

# Untersuchungen zur Aktivierung von PARP-1 und Wechselwirkung mit toxischen Metallverbindungen

Zur Erlangung des akademischen Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

**Nadin Wedler**

aus

Nordhausen

KIT-Dekan: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Referent: Prof. Dr. Andrea Hartwig

Korreferent: Prof. Dr. Mirko Bunzel

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2017



*Wohin du auch gehst, gehe mit ganzem Herzen.*

- Konfuzius



*Für*

*Nils*



## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Darüber hinaus erkläre ich, dass die Arbeit nicht anderweitig als Prüfungsarbeit oder als Dissertation bei einer anderen Fakultät verwendet wird oder wurde.

Karlsruhe, den 30.10.2017

Nadin Wedler





# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
2.1 Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1	7
2.1.1. Struktur von PARP-1	7
2.1.2. Poly(ADP-Ribosyl)ierung	8
2.1.3. Biochemische Funktionen von PARP-1	11
2.1.4. PARP-Inhibitor PJ-34	13
2.3 Zink	14
2.3.1. Vorkommen, Verwendung, Bedarf und Exposition	14
2.3.2. Biochemische Funktionen	14
2.3.3. Zelluläre Homöostase und Signalwirkung von Zink	15
2.3.4. Zinkmangel und –überversorgung	17
2.5 Cobalt	19
2.5.1. Vorkommen, Verwendung, Bedarf und Exposition	19
2.5.2. Toxizität	20
2.5.3. Kanzerogenität, Genotoxizität und Mutagenität	20
2.6 Arsen	22
2.6.1. Vorkommen, Verwendung und Exposition	22
2.6.2. Toxizität	23
2.6.3. Kanzerogenität, Mutagenität und Genotoxizität	23
2.7 DNA-Einzelstrangbruchreparatur	25
<b>3. FRAGESTELLUNG</b>	<b>28</b>
<b>4. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>30</b>
4.1 Zellkultur	30
4.1.1. Allgemeines	30
4.1.2. Zelllinien und Kultivierung	30
4.1.3. Kryokonservierung und Inkulturnahme	30
4.1.4. Inkubationen	31
4.2 Zytotoxizitätsuntersuchungen	31
4.2.1. Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit in HeLa S3-Zellen	31
4.2.2. RICC-Test in TK6-Zellen	32

4.3	Bestimmung der zellulären freien Zinkkonzentration mittels FluoZin-3	32
4.4	Bestimmung der zellulären Zinkkonzentration mittels Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie	33
4.5	Bestimmung des Zinkgehaltes der PARP-1	34
4.5.1.	Isolierung von PARP-1 mittels Dynabeads™	34
4.5.2.	Bestimmung der PARP- 1-Ausbeute mittels Western Blot	36
4.5.3.	Bestimmung des PARP-1-Gehaltes mittels Bradford	37
4.5.4.	Messung des Zinkgehaltes mittels ICP-OES	37
4.6	Quantifizierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung	38
4.6.1.	Bestimmung der intrazellulären Poly(ADP-Ribosyl)ierung mittels Immunfluoreszenz	38
4.6.2.	Bestimmung der intrazellulären Poly(ADP-Ribosyl)ierung mittels LC-MS/MS	40
4.6.3.	Bestimmung der subzellulären Poly(ADP-Ribosyl)ierung isolierter PARP-1	41
4.7	Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen mittels Alkalischer Entwindung	42
4.8	Quantifizierung von Mikrokernen mittels FACS	44
4.9	Bestimmung der Mutagenität mittels PIG-A Assay	48
4.10	Genexpressionsanalysen mittels <i>High-Throughput RT-qPCR</i>	51
4.11	Statistik	56
<b>5.</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>57</b>
5.1	Untersuchungen zum zellulären Zinkstatus	57
5.1.1.	Zytotoxizitätsuntersuchungen	57
5.1.2.	Ermittlung der zellulären Gesamtkonzentration an Zink	61
5.1.3.	Ermittlung der intrazellulären freien Zinkkonzentration	63
5.1.4.	Ermittlung des Zinkgehaltes von PARP-1	69
5.1.5.	Einfluss der zellulären Zinkkonzentration auf die Aktivität von PARP-1	72
5.1.6.	Einfluss der zellulären Zinkkonzentration auf die Anzahl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierter DNA-Strangbrüche	76
5.1.7.	Einfluss der zellulären Zinkkonzentration auf die Genexpression	78
5.2	Vergleichende Untersuchungen zum PARP-Inhibitor PJ-34, CoCl <sub>2</sub> und NaAsO <sub>2</sub>	84
5.2.1.	Zytotoxizitätsuntersuchungen	84
5.2.2.	Einfluss von PJ-34, CoCl <sub>2</sub> und NaAsO <sub>2</sub> auf die Aktivität der PARP-1	88
5.2.3.	Einfluss von PJ-34, CoCl <sub>2</sub> und NaAsO <sub>2</sub> auf die Anzahl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierter DNA-Strangbrüche	95
5.2.4.	Einfluss von PJ-34, CoCl <sub>2</sub> und NaAsO <sub>2</sub> auf die Reparatur H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierter DNA-Strangbrüche	98
5.2.5.	Einfluss von PJ-34, CoCl <sub>2</sub> und NaAsO <sub>2</sub> auf die genomische Stabilität	101
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION</b>	<b>115</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>131</b>

<b>8. ANHANG</b>	<b>144</b>
8.1 Abkürzungsverzeichnis	144
8.2 Verwendete Chemikalien	148
8.3 Lösungen und Puffer	151
8.4 Verwendete Kits	155
8.5 Verbrauchsmaterialien	156
8.6 Verwendete Geräte und Software	157
8.7 Ergänzende Daten	159
8.7.1. Untersuchungen zum zellulären Zink- und Kupferstatus	159
8.7.2. Untersuchungen zu PJ-34	161
8.7.3. Untersuchungen zu $\text{CoCl}_2$	163
8.7.4. Untersuchungen zu $\text{NaAsO}_2$	165
8.7.5. LC-MS/MS	166
8.7.6. Genexpression	167
<b>9. PUBLIKATIONSLISTE</b>	<b>177</b>
<b>10. DANKSAGUNG</b>	<b>178</b>



## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Dem Enzym Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) werden im Rahmen der DNA-Einzelstrangbruchreparatur essentielle Eigenschaften zugesprochen, welche in erster Linie aus der Funktion der DNA-Schadensdetektion abgeleitet werden. Jedoch ist hinsichtlich der Aktivierung der PARP-1 noch großer Forschungsbedarf vorhanden. Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war eine in der Literatur beschriebene geringere Affinität des Zinkfinger I der PARP-1, welcher durch Besetzung mit Zn(II) im Fall von oxidativem Stress zur Aktivierung der PARP-1 führen könnte (Bossak et al., 2015). Deshalb stellte sich zunächst die Frage, inwieweit der zelluläre Zinkstatus die PARP-1-Aktivität beeinflusst. Die Erniedrigung der Gesamtkonzentration und der „freien“ Zinkkonzentration durch TPEN, was mit einer reprimierten Expression des *MT1X*-Gens korrelierte, führte zur Inhibierung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung bei gleichzeitiger Erhöhung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüche in HeLa S3-Zellen. Subzellulär konnte, in Abwesenheit von Zn(II), keine Beeinflussung der PARP-1 beobachtet werden. Dahingegen bewirkte die Überladung der Zelle mit Zn(II), welche sich in einer erhöhten Gesamtkonzentration, „freien“ Zinkkonzentration und der vermehrten Expression der *MT*-Gene und des Zinkexportergens *SLC30A1* manifestierte, eine Zunahme der Poly(ADP-Ribosyl)ierung, während die Anzahl der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüche nicht beeinflusst wurde. Subzellulär konnte hingegen eine Inhibierung durch Zn(II) beobachtet werden, wobei die Relevanz dieser Ergebnisse gering ist, da Zn(II) in den untersuchten Konzentrationen nicht „frei“ in der Zelle vorliegt. Insgesamt deuten die Ergebnisse der Inhibierung der PARP-1 durch die Komplexbildung der zellulären Zinkionen nach oxidativem Stress und die Aktivierung der PARP-1 durch Erhöhung der „freien“ Zinkkonzentration auf die Wichtigkeit von Zn(II) für die Aktivierung der PARP-1 hin. Die Erhöhung der „freien“ Zinkkonzentration allein jedoch führte zu keiner Aktivierung der PARP-1, woraus abgeleitet werden kann, dass DNA-Schäden eine Voraussetzung der PARP-1-Aktivierung sind. Aufgrund der geringen Ausbeute der PARP-1 mittels Antikörper-gekoppelter magnetischer Dynabeads™ konnte jedoch keine Aussage über den Zinkgehalt der PARP-1 getroffen werden. Genexpressionsanalysen lieferten zudem Hinweise auf eine konzentrationsabhängige Induktion von oxidativem und genotoxischem Stress und die Einleitung der DNA-Reparatur durch eine Zinkdepletion, während die Genexpressionsanalyse

nach Zinkübersorgung lediglich eine konzentrationsabhängige Induktion von oxidativem und genotoxischem Stress anzeigte.

Die Relevanz der PARP-1 für die Zelle wurde durch Einsatz des PARP-Inhibitors PJ-34 untersucht. PJ-34 inhibierte die PARP-1 sowohl subzellulär als auch zellulär vollständig, einhergehend mit einer reduzierten Anzahl an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen. Dabei wurde die Reparatur von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen verlangsamt, jedoch nicht komplett inhibiert, was vermuten lässt, dass PARP-1 nicht zwangsläufig für die DNA-Einzelstrangbruchreparatur benötigt wird, sondern lediglich für eine Beschleunigung derselben verantwortlich ist. Nach Inhibierung der PARP-1 wurde weder mit noch ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ein mutagener, komutagener oder ein klastogener Effekt beobachtet, was auf eine funktionierende DNA-Einzelstrangbruchreparatur hindeutet. Allerdings wurde eine aneugene Wirkung unabhängig von der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Inkubation detektiert. Da PJ-34 nicht nur PARP-1, sondern alle PARPs mit dem hochkonservierten katalytischen Zentrum inhibiert, ist es fraglich, ob die Inhibierung der PARP-1 oder anderer PARPs für den aneugenen Effekt verantwortlich ist.

Thiophile Metallionen wie Cu(II) und As(III) hemmen bekanntermaßen die PARP-1, was vermutlich auf eine Interaktion mit den Zinkfingern zurückzuführen ist (Hartwig et al., 2003b; Hartwig und Schwerdtle, 2002; Schwerdtle et al., 2007; Walter et al., 2007; Yager und Wiencke, 1997). Ein Fokus dieser Arbeit lag daher auf der Untersuchung des Einflusses von Co(II), welches ebenfalls eine hohe Affinität zu Thiolgruppen aufweist, und As(III), welches PARP-1 bereits in nanomolaren Konzentrationen hemmt (Hartwig et al., 2003b), auf die Aktivität der PARP-1, auf die Kettenlänge der Poly(ADP-Ribose), auf die DNA-Einzelstrangbruchreparatur sowie allgemein auf die genomische Stabilität. Co(II) inhibierte sowohl die Aktivität isolierter PARP-1 als auch die zelluläre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung und führte zur Bildung von verkürzten Poly(ADP-Ribose)-Polymeren. Die Anzahl an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen wurde lediglich bei der höchsten eingesetzten Konzentration an Co(II) reduziert und kommt damit nicht als Ursache für die Reduktion der Poly(ADP-Ribosyl)ierung in Frage. Für den zugrundeliegenden Mechanismus wird eine Bindung von Co(II) an die Zinkfinger der PARP-1 vermutet, die dafür sorgt, dass PARP-1 nicht mehr an die DNA-Schadensstelle binden kann, was einen zentralen Punkt bei der Aktivierung der PARP-1 darstellt. Die DNA-Einzelstrangbruchreparatur wurde jedoch nicht durch die Cobalt-vermittelte Inhibierung der PARP-1 beeinflusst. Unsere Hypothese ist es, dass PARP-1 durch die Bindung von Co(II) an die

Zinkfinger nicht mehr in der Lage ist, an die DNA zu binden, und ein alternativer DNA-Reparaturweg eingeleitet wird. Beispielsweise könnte die PARP-1-unabhängige *long-patch repair* die PARP-1-abhängige *short-patch repair* ersetzen und so die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüche reparieren (Dantzer et al., 2000; Vodenicharov et al., 2000). As(III) hingegen führte nicht zu einer Abnahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung, sondern zur konzentrationsabhängigen Zunahme des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Poly(ADP-Ribose)-Gehaltes mit verkürzten Kettenlängen. Untersuchungen an isolierter PARP-1 zeigten dagegen keine veränderte Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch As(III). Mit der gesteigerten zellulären H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung korrelierte die konzentrationsabhängige, synergistische Zunahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüche, welche vermutlich die Aktivitätssteigerung der PARP-1 bewirkte. Zudem wurde keine Inhibierung oder Verlangsamung, sondern sogar eine leichte Beschleunigung der DNA-Einzelstrangbruchreparatur beobachtet. Ob dies an der vermehrten Bildung verkürzter Poly(ADP-Ribose)-Ketten liegt, kann nur spekuliert werden.

Dabei stellte sich die Frage, ob die Wechselwirkung mit PARP-1 und die damit verbundene inhibierte bzw. modulierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung zu veränderten Wechselwirkungen mit zellulären Proteinen führt und dadurch die genomische Integrität beeinflusst wird. Erst ab zytotoxischen Konzentrationen von Co(II) konnten ein Zellzyklusstopp sowie eine klastogene und aneugene Wirkung festgestellt werden, welche jedoch nach Koininkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nicht intensiviert wurde. Eine mutagene oder komutagene Wirkung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde nicht festgestellt. Die niedrigeren Konzentrationen, welche eine deutliche inhibierende Wirkung auf die PARP-1 aufwiesen, zeigten keine Auswirkung auf die ausgewählten Parameter der genomischen Stabilität. Ob sich die Inhibierung der PARP-1 auf andere Parameter der genomischen Stabilität auswirkt, sollte durch weitere Versuche abgeklärt werden. Zellzyklusuntersuchungen mit As(III) zeigten erst ab hohen zytotoxischen Konzentrationen von As(III) einen G<sub>2</sub>-Phasenarrest, während weder eine klastogene, aneugene noch mutagene oder komutagene Wirkung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beobachtet wurde. Fraglich ist jedoch, ob die Arsen-vermittelte Modifizierung der Poly(ADP-Ribose)-Kettenlänge zu einer veränderten Signalweiterleitung in der Zelle führt und damit die genomische Stabilität, gemessen an anderen Parametern, beeinflusst. Dies sollte durch weiterführende Versuche abgeklärt werden.

## Abstract

PARP-1 is believed to fulfil an essential role in the process of DNA single-strand break repair based on its function in the detection of DNA lesions. However, the process of PARP-1's activation is not yet fully understood. The basis of the current thesis is the reported low affinity of zincfinger I of PARP-1, which could lead to the activation of PARP-1 via binding of Zn(II) ions in case of oxidative stress (Bossak et al., 2015). As a consequence, the question rises, whether the cellular zinc status influences the activity of PARP-1. The decrease of the overall concentration of free Zn(II) ions with TPEN, which correlated with the repressed expression of the *MT1X* gene, lead to the inhibition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced poly(ADP-ribosyl)ation and an increase of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced strand breaks in HeLa S3 cells. On subcellular level no interference with PARP-1 could be detected in the absence of Zn(II) ions. On the other hand the overload of the cells with Zn(II) resulting in an increased total concentration of free Zn(II)-ions, the increased expression of *MT*-genes and of the zinc exporter gene *SLC30A1*, lead to an increase of the poly(ADP-ribosyl)ation while the number of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA-strand breaks was not affected. In contrast, on a subcellular level the inhibition by Zn(II) ions was observed, however, this observation has only limited relevance since free Zn(II) is not available in these concentrations in cells. In combination, these results indicate the inhibition of PARP-1 due to trapping Zn(II) as a signal after oxidative stress, which was detected by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as well as by Menadion. The activation of PARP-1 via an increase of the concentration of free Zn(II) ions indicates the importance of Zn(II) ions in the activation mechanism. However, since the increase of Zn(II) alone does not result in an activation of PARP-1, it is hypothesized that DNA lesions are required for the activation as well. Due to the low yield with antibody-coupled magnetic Dynabeads™ the level of Zn(II) in PARP-1 could not be determined. The analysis of the gene expression profile implied a concentration-dependent induction of oxidative and genotoxic stress and induction of DNA repair via zinc depletion. In contrast, the excess of Zn(II) shows exclusively a concentration-dependent induction of oxidative and genotoxic stress associated genes.

The relevance of PARP-1 was investigated via the PARP-inhibitor PJ-34, which showed complete inhibition on a cellular and subcellular level accompanied by a reduced number of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA-strand breaks. Inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation decelerated the repair of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA-strand breaks, which implies that PARP-1 is not necessarily required for DNA single-strand



break repair but solely accelerates the process. After inhibition of PARP-1 neither a mutagenic, a comutagenic, nor a clastogenic effect was observed, which indicates an intact DNA single-strand break repair. However, an aneugenic effect was observed. Since PJ-34 does not exclusively inhibit PARP-1 but all PARPs with a highly conserved catalytic center, it is questionable, whether the inhibition of PARP-1 or other PARPs is responsible for the aneugenic effect.

Thiophilic metal ions like Cu(II) and As(III) are known to inhibit PARP-1, which is very likely based on an interaction with the zincfinger (Hartwig und Schwerdtle, 2002; Schwerdtle et al., 2007; Walter et al., 2007; Yager und Wiencke, 1997). Therefore, a second focus of the current thesis was the investigation of the influence of thiophilic Co(II) ions and As(III) ions, that is known to inhibit PARP-1 in the range of nanomolar concentrations (Hartwig et al., 2003b), on the activity of PARP-1, on the poly(ADP-ribose) chain length, on the DNA single-strand break repair and, in addition, on the genomic stability in general. Co(II) inhibited the activity of isolated PARP-1, as well as the cellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced poly(ADP-ribosyl)ation and lead to the formation of shortened poly(ADP-ribose)-polymers, while the number of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA-strand breaks was only reduced at the highest applied concentration of Co(II). As a consequence, the observed reduction of the number of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA strand breaks cannot be considered as a source of the reduction of the poly(ADP-ribosyl)ation. The underlying mechanism is speculated to be based on the interaction of Co(II) with the zincfingers of PARP-1 and a consequent prevention of PARP-1's binding to the DNA lesion site, which is a central step of PARP-1's activation. However, the DNA single-strand break repair was not affected by the inhibition of PARP-1 by Co(II). Our hypothesis is that the binding of Co(II) to the zincfingers prevents PARP-1 to bind to the DNA and an alternative DNA repair pathway is triggered. As an example for such a process the PARP-1-independent long-patch repair could substitute the PARP-1-dependent short-patch repair and thus repair the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA strand breaks (Dantzer et al., 2000; Vodenicharov et al., 2000). On the contrary, As(III) did not lead to a decrease of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced poly(ADP-ribosyl)ation but to a concentration-dependent increase in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced poly(ADP-ribose) content with shortened chain lengths. However, the investigation of isolated PARP-1 showed no changes in the poly(ADP-ribosyl)ation by As(III). The increased cellular, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced poly(ADP-ribosyl)ation correlated with the concentration-dependent, synergistic increase of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA-strand breaks, which very likely increased the activity of PARP-1.

Moreover, neither an inhibition, nor a deceleration but instead a modest acceleration of the DNA single-strand break repair was observed. Whether these findings are due to the formation of shortened poly(ADP-ribose) chains can only be speculated.

The question rises whether the interaction with PARP-1 and as a consequence the reduced or modulated poly(ADP-ribosyl)ation leads to a change in the interactions with cellular proteins and thereby affects genomic stability. Only at cytotoxic concentrations of Co(II) a cell cycle arrest, as well as clastogenic and aneugenic effects could be detected. These effects, however, were not intensified by a coincubation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Lower concentrations exhibiting significant inhibition of PARP-1 showed no impact on the observed parameters of genomic stability. Whether the inhibition of PARP-1 affects other parameters of the genomic stability should be controlled in further experiments. Cell cycle investigations with As(III) exclusively showed a G<sub>2</sub> phase arrest at high cytotoxic concentrations, while neither clastogenic, aneugenic, mutagenic, nor comutagenic effects with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were observed. It remains unclear whether an arsenic-mediated modification of the poly(ADP-ribose) chain length induces a change in the signaling pathways in cells and thereby influences the genomic stability, measured by other parameters. For clarification further experiments should be conducted.

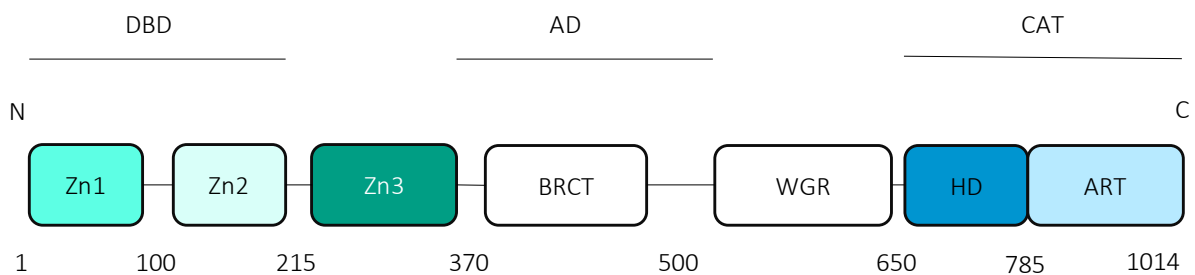
## 2. EINLEITUNG

### 2.1 Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1

Die Poly-ADP-Ribose-Polymerasen (PARPs) sind eine Familie aus Enzymen mit unterschiedlichen Struktureinheiten und zellulären Funktionen. Eine Gemeinsamkeit ist die Poly(ADP-Ribosyl)ierungs-Aktivität, für die zu 80 % PARP-1 verantwortlich ist.

#### 2.1.1. STRUKTUR VON PARP-1

PARP-1 ist ein aus 1014 Aminosäuren bestehendes, 113 kDa schweres Enzym und wird in sechs Domänen unterteilt (Abbildung 1): drei Zink-bindende Domänen (Zn1, Zn2 und Zn3), eine Automodifikationsdomäne (AD), die sogenannte WGR-Domäne sowie die katalytische Domäne (CAT) (Langelier und Pascal, 2013).



**Abbildung 1: Struktur von PARP-1.** Die DNA-Bindungsdomäne (DBD) besteht aus zwei Zinkfingermotiven Zn1 und Zn2. Daneben befindet sich Zinkfinger 3 (Zn3), gefolgt von der Automodifikationsdomäne (AD) mit dem BRCT-Element. Der WGR-Abschnitt, dessen Funktion bisher unbekannt ist, ist reich an Tryptophan, Glycin und Arginin. Die katalytische Domäne (CAT) setzt sich aus der helikalen und der ADP-Ribosyl-Transferasen (ART)-Domäne zusammen, welche für die Poly(ADP-Ribosyl)ierung wichtig sind (Langelier et al., 2012).

Die ersten zwei Zink-bindenden Domänen (Zn1, Zn2) bestehen aus je einem Zinkfinger-Motiv, bei dem Zn(II) von drei Cysteinen und einem Histidin ( $C_3H_1$ ) komplexiert wird. Diese zwei Zinkfinger-Motive ermöglichen PARP-1 die Erkennung von DNA-Schäden und die Bindung an solche, weshalb diese oft zur DNA-Bindungsdomäne zusammengefasst werden (DBD). Zusammen sind sie essentiell für die PARP-1-Aktivität. In dieser DBD ist ebenfalls ein *nuclear localization signal* (NLS) enthalten, sodass PARP-1 kerngängig ist (Schreiber et al., 1992). Die dritte Zinkfinger-Domäne Zn3 besteht, anders als Zn1 und Zn2, aus einem Zn(II), welches von

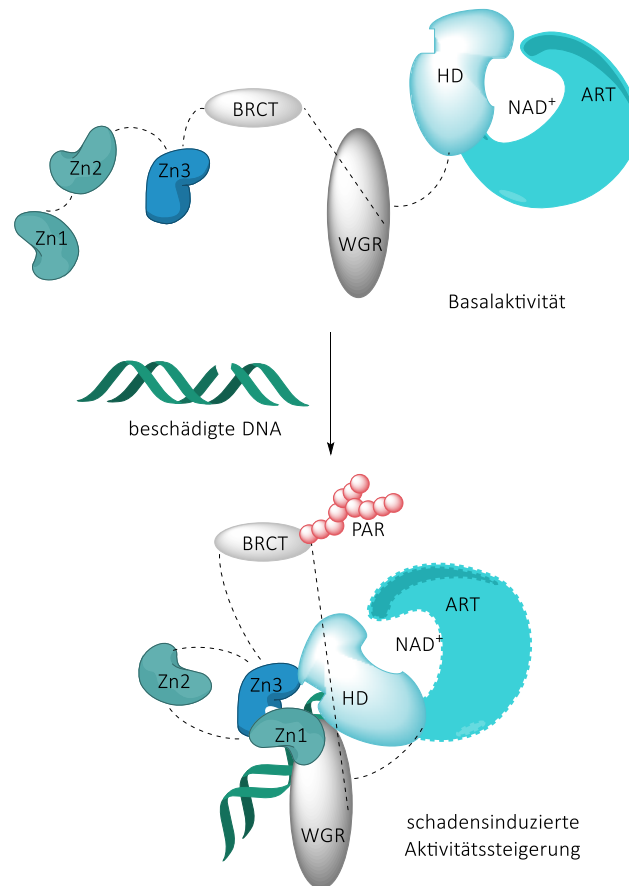
vier Cysteinen komplexiert wird (C<sub>4</sub>). Verschiedene Studien deuteten darauf hin, dass die Funktion von Zn<sub>3</sub> wichtig für die Kommunikation der verschiedenen PARP-1-Domänen untereinander ist (Langelier und Pascal, 2013).

Die Automodifikationsdomäne enthält Aminosäuren, an die PARP-1 im Fall von DNA-Schädigung Poly(ADP-Ribose) (PAR)-Ketten anheftet. Ebenso ist ein *breast cancer susceptibility protein C terminus*-Element (BRCT-Element) enthalten, welches für Protein-Protein-Wechselwirkungen zuständig ist. Die Funktion der WGR-Domäne ist bisher nicht bekannt. Diese Domäne ist reich an Tryptophan, Glycin und Arginin (Langelier und Pascal, 2013).

Die katalytische Domäne besteht aus zwei Subdomänen – die helikale Domäne mit insgesamt sechs  $\alpha$ -Helices und die ADP-Ribosyl-Transferasen (ART)-Domäne. Hier erfolgt die Bindung des Nikotinamidadenindinukleotids (NAD<sup>+</sup>) und die Katalyse der Poly(ADP-Ribosyl)ierung (PARylierung) (Langelier und Pascal, 2013).

### 2.1.2. POLY(ADP-RIBOSYL)IERUNG

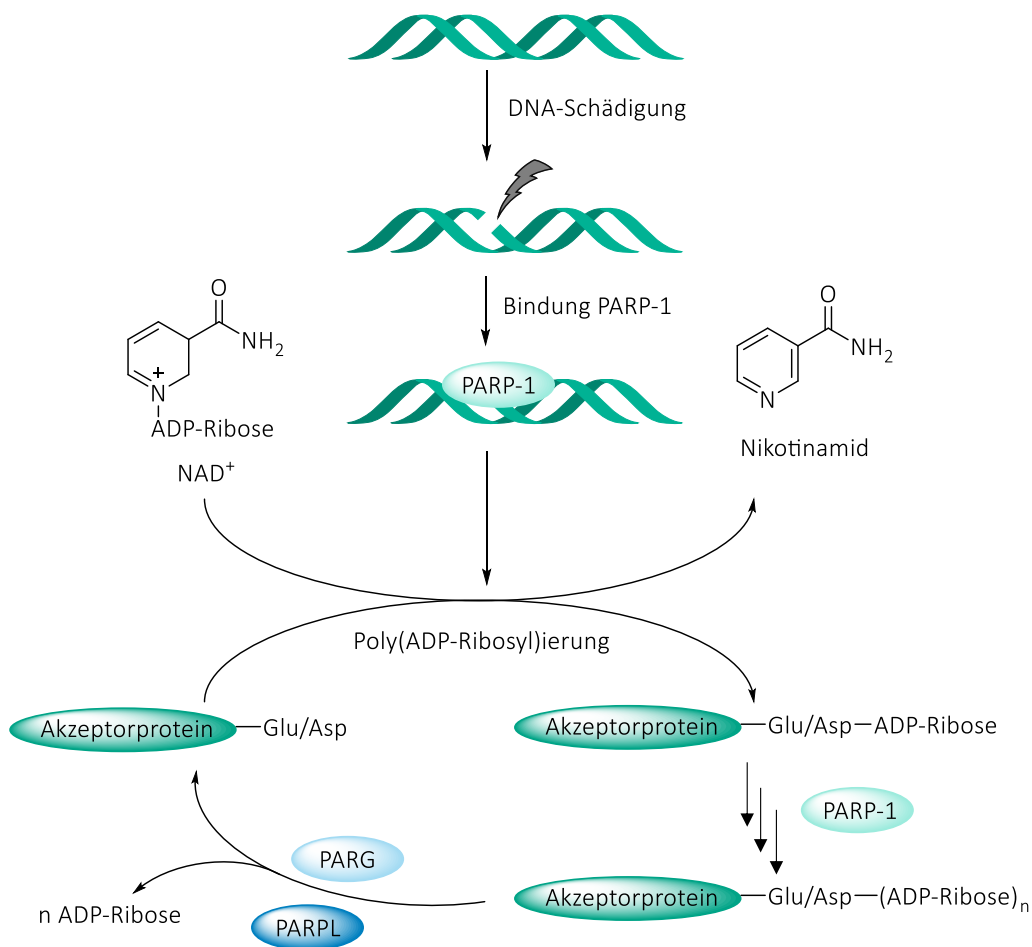
Kommt es zu DNA-Strangbrüchen, beispielsweise durch oxidativen Stress, die Replikation oder die DNA-Reparatur, bindet PARP-1 mit den Zinkfingern Zn<sub>1</sub> und Zn<sub>2</sub> an die Stelle des DNA-Schadens. Direkt nach Bindung der Zinkfinger an die DNA kommt es zu einer Konformationsänderung. Die Domänen Zn<sub>1</sub>, Zn<sub>3</sub> und WGR der PARP-1 rücken dadurch räumlich näher zusammen, wodurch der hydrophobe Kern der helikalen Domäne destabilisiert und verzerrt wird (Abbildung 2). Langelier und Kollegen postulieren, dass damit die Stabilität der CAT-Domäne herabgesetzt wird und die Aktivität der PARP-1 bis um das 500-fache über die Basalaktivität hinaus gesteigert wird (Langelier und Pascal, 2013; Langelier et al., 2012).



**Abbildung 2: Modell der schadensinduzierten Aktivierung von PARP-1.** Ist kein DNA-Schaden vorhanden, liegt PARP-1 ausgestreckt vor. Sobald ein DNA-Schaden entsteht, bindet PARP-1 mit den Zinkfingern Zn1 und Zn2 an den DNA-Schaden, woraufhin eine Konformationsänderung ausgelöst wird. Die Zn1-, Zn3- und WGR-Domänen rücken räumlich näher zusammen, wodurch die helikale Domäne verzerrt wird. Die dadurch hervorgerufene Destabilisierung der CAT-Domäne bewirkt eine Aktivitätssteigerung der PARP-1 und es kommt zur Poly(ADP-Ribosyl)ierung (modifiziert nach Langelier und Pascal, 2013).

Nach Bindung an den DNA-Schaden erfolgt eine durch die CAT-Domäne katalysierte Polymerisation von ADP-Ribose-Einheiten aus NAD<sup>+</sup> in drei Schritten (Abbildung 3). Zuerst wird die ADP-Riboseeinheit an Glutamat- oder Aspartatreste des Akzeptorproteins, wie zum Beispiel an Ligasen, Histone, Topoisomerasen und p53 (Heteromodifikation) oder an PARP-1 selbst (Automodifikation), durch Veresterung kovalent gebunden. In einem zweiten Schritt, der Elongationsphase, werden bis zu 200 ADP-Riboseeinheiten zu einer langen Kette über eine 1,2-glykosidische Bindung verknüpft. Weiterhin kann es zu einer Verzweigungsreaktion kommen. Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung dient hierbei als Signal für weitere Enzyme der DNA-Reparatur, sodass diese zur DNA-Schadensstelle rekrutiert werden (Nguewa et al., 2005). Dabei erfolgt die Interaktion der Poly(ADP-Ribose) mit den Proteinen vermutlich höchst selektiv (Fahrer et al., 2007). Die Automodifikation bewirkt zudem eine starke negative Ladung der PARP-1, wodurch

diese ab einer bestimmten Kettenlänge der PAR von der DNA abdiffundiert und diese frei für DNA-Reparaturenzyme macht. PAR selbst verfügt durch den katalytischen Abbau über die Poly(ADP-Ribose)-Glykosylase (PARG) über eine Halbwertszeit von unter einer Minute. Bei diesem katabolischen Prozess wird PAR exoglykosidisch und endoglykosidisch in ADP-Ribose gespalten und weiterhin die proximale ADP-Ribose durch die ADP-Ribosylproteinlyase (PARPL) entfernt, sodass die DNA-Reparaturproteine wieder in ihren Ausgangsformen vorliegen (Davidovic et al., 2001; Drenichev und Mikhailov, 2015; Nguewa et al., 2005).

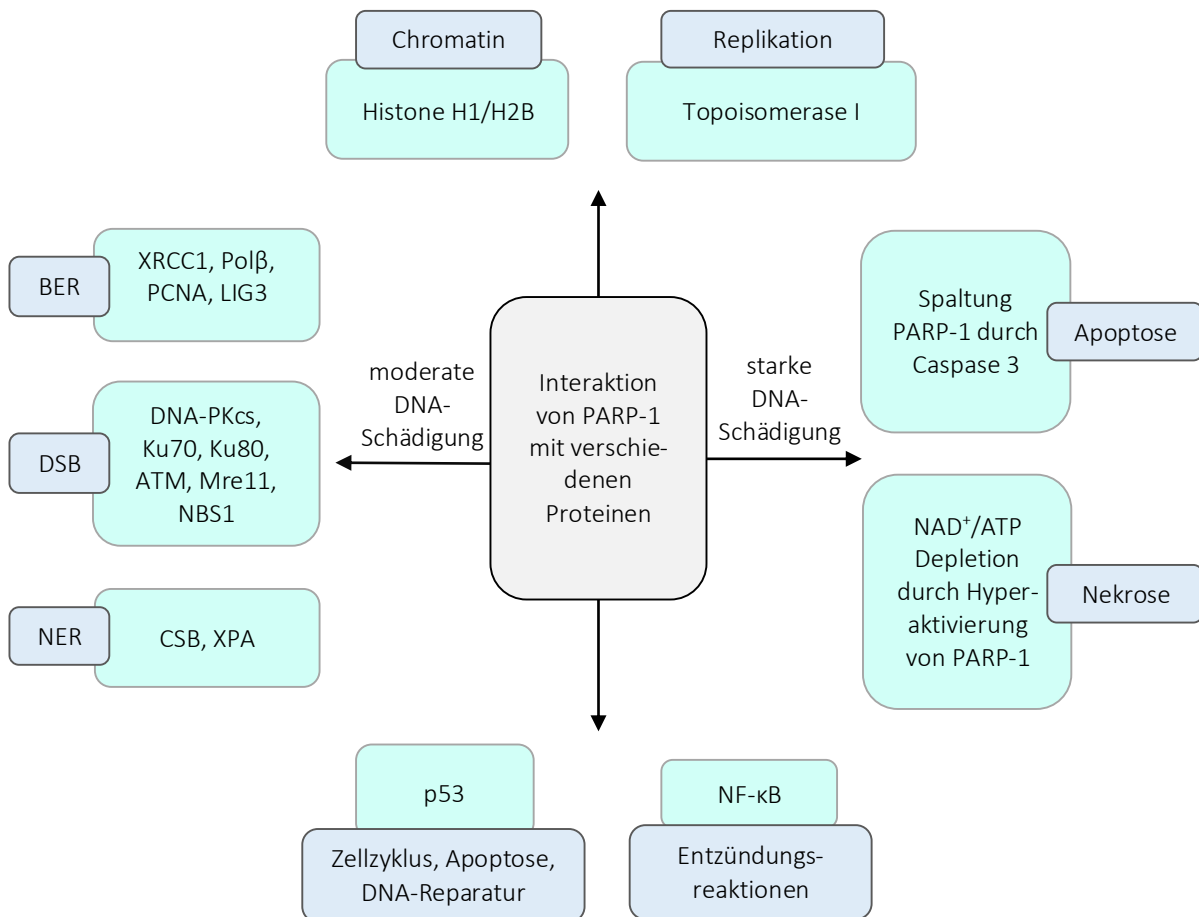


**Abbildung 3: Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1)-katalysierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung.** Nach DNA-Strangbruchinduktion lagert sich PARP-1 an die Schadensstelle an und wird aktiviert. Es erfolgt die Verknüpfung eines ADP-Monomers aus NAD<sup>+</sup> an ein Glutamat (Glu)- oder Aspartat (Asp)-Rest eines Akzeptorproteins durch PARP-1. Nach der Elongation und teilweise Verzweigung der Poly-(ADP-Ribose)-Ketten wird das Polymer durch die Poly(ADP-Ribose)-Glykosylase (PARG) in seine Monomere gespalten und die proximale ADP-Ribose durch die ADP-Ribosylproteinlyase (PARPL) entfernt.

### 2.1.3. BIOCHEMISCHE FUNKTIONEN VON PARP-1

Die zellulären Funktionen von PARP-1 sind sehr vielfältig und komplex. In Abbildung 4 ist eine Übersicht dargestellt. Im Fall einer moderaten Induktion von DNA-Strangbrüchen wird PARP-1 aktiviert und katalysiert die Polymerisation von ADP-Ribose-Einheiten. Durch Verknüpfung dieser Poly(ADP-Ribose)-Ketten an PARP-1 sowie an weitere Proteine erfolgt eine Interaktion von PARP-1 mit Proteinen vieler DNA-Reparaturprozesse und die Stimulierung der DNA-Reparatur. Das Enzym wechselwirkt hierbei mit *X-ray cross-complementing protein 1* (XRCC1), Polymerase  $\beta$  (Pol $\beta$ ) und dem *proliferation cell nuclear antigen* (PCNA) der Basenexzisionsreparatur (BER); der *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit* (PKCs), Ku70, Ku80, *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) und Mre11 der DNA-Doppelstrangbruchreparatur (DNA-DBS) sowie mit *cockayne syndrome group B* (CSB) und *xeroderma pigmentosum A* (XPA) der Nukleotidexzisionsreparatur (NER). Wurde die DNA massiv beschädigt, wird der Zelltod eingeleitet – hierbei wird entweder die Apoptose durch Aktivierung der Caspase 3 und PARP-1-Spaltung oder die Nekrose durch Depletion von NAD<sup>+</sup> und ATP im Fall einer exzessiven Poly(ADP-Ribosyl)ierung eingeleitet. Des Weiteren beeinflusst PARP-1 die Chromatinstruktur durch schadensinduzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung der Histone H1 und H2B. Durch die negative Ladung der Riboseeinheiten wird die PAR, zusammen mit den Histonen, von der ebenfalls negativ geladenen DNA elektrostatisch abgestoßen. Die damit verbundene Entwindung der DNA macht DNA-Strangbrüche zugänglich für DNA-Reparaturenzyme (Rouleau et al., 2010; Swindall et al., 2013).

Neben dem Einfluss von PARP-1 auf DNA-Reparaturprozesse spielt auch die Interaktion von PARP-1 mit der Topoisomerase I und somit der Einfluss auf die Replikation und die Transkription eine Rolle. Topoisomerase I induziert im Rahmen der Replikation und Transkription einen DNA-Einzelstrangbruch, sodass die Torsionskraft der DNA-Doppelstränge reduziert wird. Im Anschluss wird der DNA-Strangbruch wieder durch die Topoisomerase I geschlossen. Außerdem interagiert PARP-1 mit zahlreichen Transkriptionsfaktoren. PARyliert werden hier beispielsweise das Tumorsuppressorprotein p53, ein wichtiges Protein für die Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und der DNA-Reparatur, und NF- $\kappa$ B, welches unter anderem Entzündungsreaktionen hervorruft (Rouleau et al., 2010; Swindall et al., 2013).

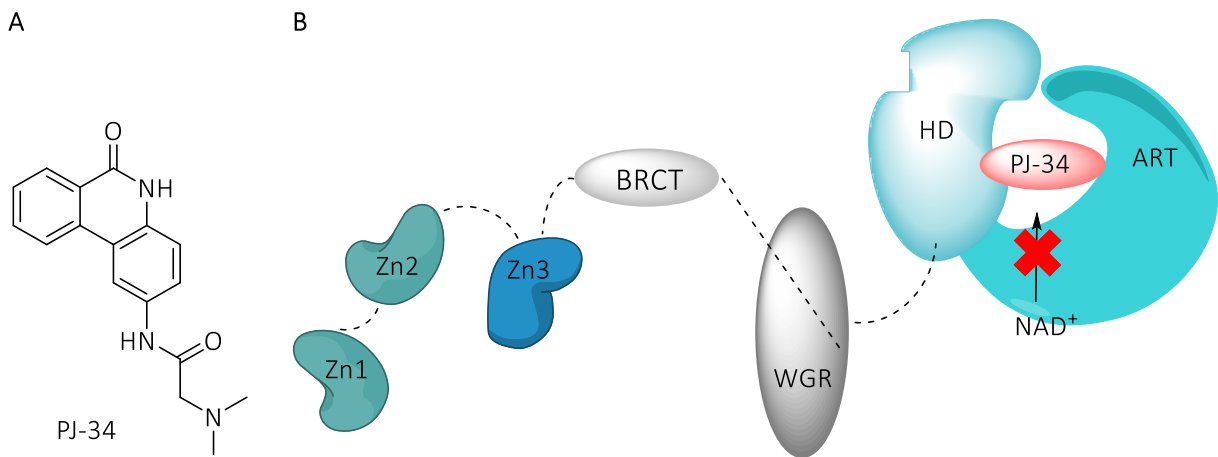


**Abbildung 4: Interaktion von PARP-1 mit verschiedenen Proteinen und deren biochemische Funktionen bzw. die Auswirkung auf zellulärer Ebene.** Bei morderater DNA-Schädigung stimuliert PARP-1 Proteine der DNA-Reparaturprozesse. PARP-1 wechselwirkt hierbei mit *X-ray cross-complementing protein 1* (XRCC1), Polymerase  $\beta$  (Pol $\beta$ ) und dem *proliferation cell nuclear antigen* (PCNA) der Basenexzisionsreparatur (BER); der *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit* (PKcs), Ku70, Ku80, *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) und Mre11 der DNA-Doppelstrangbruchreparatur (DNA-DBS) sowie mit *cockayne syndrome group B* (CSB) und *xeroderma pigmentosum A* (XPA) der Nukleotidexzisionsreparatur (NER). Der Zelltod wird erst bei starker Schädigung der DNA eingeleitet – hierbei wird entweder die Apoptose durch Aktivierung der Caspase 3 oder die Nekrose durch Depletion von NAD<sup>+</sup> und ATP im Fall einer exzessiven Poly(ADP-Ribosyl)ierung eingeleitet. Weiterhin beeinflusst PARP-1 die Chromatinstruktur durch Interaktion mit den Histonen H1 und H2B und die genomische Stabilität durch Beeinflussung der Topoisomerase I. Die Regulation zahlreicher Transkriptionsfaktoren wird ebenso durch PARP-1 reguliert. Hierbei spielen beispielsweise die Transkriptionsfaktoren p53, welches ein wichtiges Protein für die Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und der DNA-Reparatur ist, und NF- $\kappa$ B, welches unter anderem Entzündungsreaktionen hervorruft, eine Rolle (Rouleau et al., 2010; Swindall et al., 2013).



2.1.4. PARP-INHIBITOR PJ-34

Seit vielen Jahren wird an der Anwendbarkeit von PARP-Inhibitoren in der Tumorbehandlung geforscht. Diese Inhibitoren beeinträchtigen die katalytische Aktivität von Enzymen der PARP-Familie und können so die Zytotoxizität von Zytostatika, beispielsweise in BRCA1- und BRCA2-defizienten Tumorarten, erhöhen. Ein wichtiger Inhibitor ist N-(6-oxo-5, 6-dihydrophenanthridin-2-yl)-(N, N-dimethylamino)acetamid (PJ-34) (Abbildung 5), welcher mit  $\text{NAD}^+$  um die katalytische Domäne der PARPs konkurriert (Sethi und Jain, 2014), und damit die Poly(ADP-Ribosyl)ierung effektiv herunterreguliert (Jouan-Lanhouet et al., 2012). PJ-34 befindet sich derzeit in der präklinischen Testphase (Magan et al., 2012; Olaussen et al., 2013).



**Abbildung 5: (A) Struktur des PARP-Inhibitors PJ-34 und (B) Mechanismus der PARP-1-Inhibierung durch PJ-34.** Der PARP-Inhibitor PJ-34 wechselwirkt mit der katalytischen Domäne der PARP-1. Dies führt dazu, dass PARP-1 kein weiteres  $\text{NAD}^+$  binden kann, sodass die Poly(ADP-Ribosyl)ierungs-Aktivität gestoppt wird.

## 2.3 Zink

### 2.3.1. VORKOMMEN, VERWENDUNG, BEDARF UND EXPOSITION

Zink (Zn) ist ein bläulich-weißes Metall der 2. Nebengruppe des Periodensystems. In der Natur kommt es in der Oxidationsstufe +2 in vielen Erzen, wie Zinksulfid (ZnS) und Zinkspat ( $\text{ZnCO}_3$ ) vor. Verwendet wird Zink heutzutage in Batterien, als Zinkblech in Dächern und Dachrinnen und als Korrosionsschutz für Eisen. Weiterhin wird es für Legierungen eingesetzt. In der pharmazeutischen Industrie wird es zudem als Zinkoxid in Salben verarbeitet (Hartwig et al., 2012; Riedel und Janiak, 2015).

Der Hauptexpositionsweg für die Allgemeinbevölkerung stellt fast ausschließlich die Nahrung dar. Im Durchschnitt werden 8 -14 mg Zink pro Tag durch Lebensmittel aufgenommen. Dabei gelten Fleisch, Fleischprodukte, Getreideprodukte sowie Milch und Milchprodukte als Hauptaufnahmequellen (EFSA, 2014b). Die Zufuhrempfehlung der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) beträgt 10 mg/Tag für Männer und 7 mg/Tag für Frauen (DGE, 2015). Nach der *European Food Safety Authority* (EFSA) sollte der Grenzwert von 25 mg Zink/Tag nicht überschritten werden. Inhalativ wird Zink in Form von Stäuben meist am Arbeitsplatz aufgenommen. Die Maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK-Wert) wurde hierbei auf 0,1 mg Zink/m<sup>3</sup> für die alveolengängige Fraktion und auf 2 mg Zink/m<sup>3</sup> für die einatembare Fraktion gelegt (Hartwig, 2010; Hartwig et al., 2012).

### 2.3.2. BIOCHEMISCHE FUNKTIONEN

Biochemisch betrachtet handelt es sich bei Zink um ein essentielles Spurenelement, welches an zahlreichen zellulären Prozessen, wie der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung, der DNA-Reparatur, der antioxidativen Abwehr, der Genexpression, dem Immunsystem, neuronalen Funktionen oder der Wundheilung, beteiligt ist (Ho, 2004). Es ist Bestandteil von über 3000 Proteinen, von denen etwa 1000 Enzymfunktionen aufweisen (Andreini et al., 2006; SCF, 2003). Dabei hat Zink eine katalytische Funktion oder gewährleistet die korrekte Faltung von Proteinen (Honzatko et al., 1982; Keilin und Mann, 1940). Katalytische Funktionen nimmt Zink beispielsweise bei Hydrolasen, Kinasen, Peptidasen oder Phosphatasen ein. Hier werden die Enzyme durch Bindung des Zinkions aktiviert. Als Beispiel für strukturelle Funktionen von Zink sind insbesondere die sogenannten Zinkfinger zu nennen, bei denen ein Zinkion über

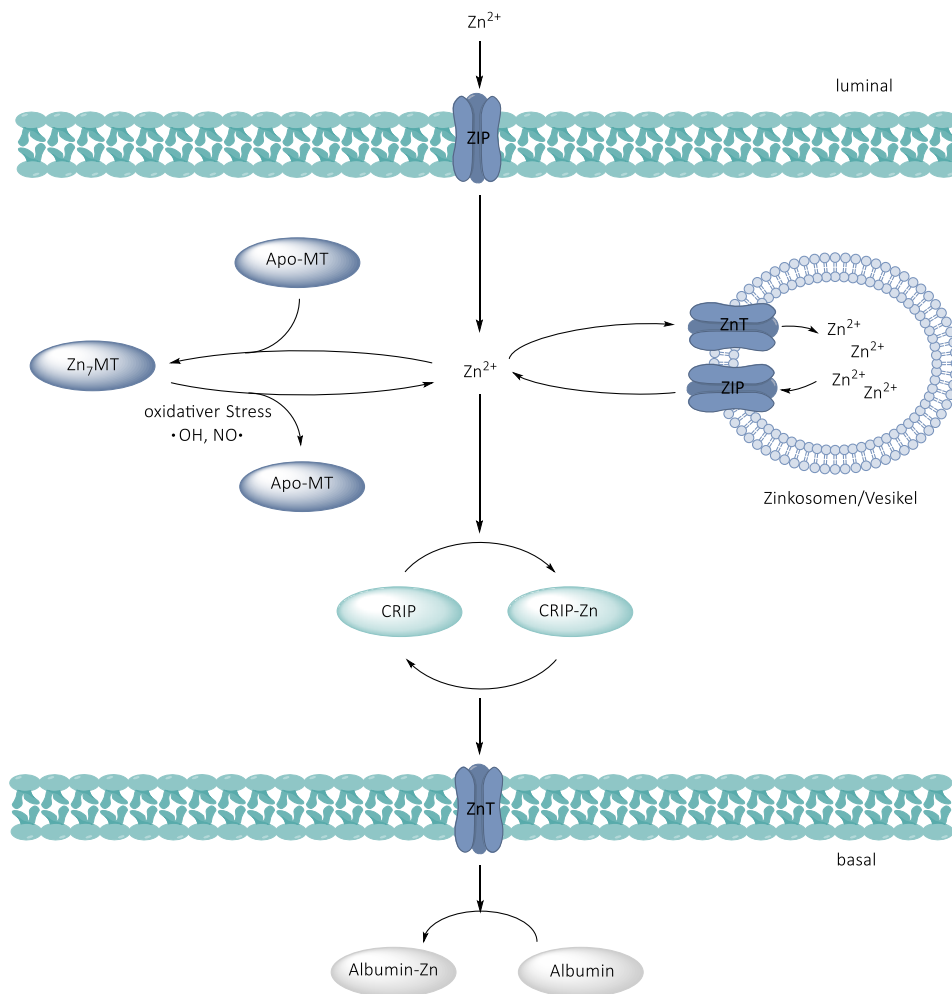
Cystein (Cys) und/oder Histidin (His) komplexiert wird. Durch diese schleifenförmige Struktur sind diese Proteine in der Lage, mit der DNA oder anderen Proteinen zu interagieren (Hartwig, 2001; Witkiewicz-Kucharczyk und Bal, 2006). Neben Transkriptionsfaktoren weisen vor allem DNA-Reparaturproteine eine solche Struktur auf. Als Beispiel hierfür ist PARP-1 zu nennen, welche insgesamt drei solcher Zinkfinger besitzt und eine wichtige Rolle in der DNA-Einzelstrangbruchreparatur und somit in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität einnimmt (Beyersmann und Haase, 2001; Hartwig, 2001).

### 2.3.3. ZELLULÄRE HOMÖOSTASE UND SIGNALWIRKUNG VON ZINK

Zink kommt in mikromolarer Konzentration als Zn(II) in der Zelle vor, während die „freie“ Zinkkonzentration im Zytoplasma im pikomolaren Bereich liegt und streng reguliert wird (Abbildung 6) (Krężel und Maret, 2006; Maret und Li, 2009). Die Zinkhomöostase wird zellulär über den Import durch die *zinc-regulated transporter-like proteins* (ZIP), den Export durch die *zinc-transporter* (ZnT) sowie über Zink-bindende Proteine reguliert (Hartwig et al., 2012; Kordas und Stoltzfus, 2004). Von den ZIP sind bislang 14 Proteine bekannt. Ihre Aufgabe besteht darin, den intrazellulären Gehalt an „freiem“ Zink, also ungebundenem bzw. schwach gebundenem Zn(II), zu erhöhen. Sie nehmen extrazelluläres Zn(II) auf oder sorgen für die Freisetzung von Zn(II) aus intrazellulären Vesikeln, den Zinkosomen. Die Antagonisten, die ZnT, von denen bisher zehn identifiziert wurden, vermindern bei erhöhter Zink-Konzentration im Zytoplasma den intrazellulären Zink-Gehalt, indem sie Zn(II) aus der Zelle heraus oder in die Zinkosomen transportieren (Eide, 2006; Kambe et al., 2014; Liuzzi und Cousins, 2004).

Die „freie“ Zinkkonzentration wird zudem von Metallothioneinen reguliert (Smulson et al., 1998). Metallothioneine sind Proteine, bei denen circa ein Drittel der Aminosäuren Cysteine darstellen, wodurch bis zu sieben Zn(II) von jeweils vier Cysteinen komplexiert werden können (Coyle et al., 2002; Kaegi und Schaeffer, 1988). Dabei weisen vier Bindungsstellen eine hohe, zwei eine mittlere und eine Bindungsstelle eine niedrige Affinität zu Zink auf (Krężel und Maret, 2007). Metallothionein ist insgesamt thermodynamisch stabil bei gleichzeitiger kinetischer Labilität, was für seine Funktion als reversibler Zinkspeicher wichtig ist. Erfährt die Zelle oxidativen Stress, so erfolgt die Freisetzung von Zn(II) aus Metallothionein. Dabei wird das Redoxsignal in ein Zinksignal konvertiert, indem die Thiolgruppen der Metallotheine oxidiert werden, damit das Zn(II) in das Zytoplasma freigesetzt wird (Maret, 2000; Maret, 2001). Die

Expression von Metallothionein wird über den *metal-responsive transcription factor* (MTF-1) reguliert. Ist in der Zelle viel „freies“ Zink vorhanden, wird MTF-1 aktiviert und bindet mit vier der sechs Zinkfinger an das *metal responsive element* (MRE), welches sich in der Promotorregion der Metallothionein-Gene befindet (Brugnera et al., 1994; Maret, 2001; Wang et al., 2004b).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Zinkhomöostase, beispielhaft in einem Enterozyten.** Die Regulation erfolgt einerseits über *zinc-regulated transporter-like proteins* (ZIP), die die intrazelluläre Zinkkonzentration durch Aufnahme von extrazellulärem Zink oder durch Freisetzung von Zink aus den Zinkosomen erhöhen. Der Gegenspieler stellen die *zinc-transporter* (ZnT) dar, welche den intrazellulären Spiegel an Zink durch die Abgabe von Zink aus der Zelle heraus oder die Aufnahme in Zinkosomen erniedrigen. Metallothioneine sorgen im Zytoplasma dafür, dass die „freie“ Zinkkonzentration erniedrigt und Zink gespeichert wird. Weiterhin sorgt das *cysteine-rich intestinal protein* (CRIP) für den Transport von Zink zur basolateralen Seite der Enterozyten, wo es durch ZnT exportiert und im Blut, beispielsweise an Albumin gebunden, transportiert wird (Hartwig et al., 2013; Plum et al., 2010).

Neben Metallothionein wirkt das *cysteine-rich intestinal protein* (CRIP) auf die Resorption von Zink. Es wird in den Enterozyten exprimiert und spielt beim Transfer von Zn(II) von der apikalen zur basolateralen Seite eine Rolle. Dabei werden pro Molekül CRIP vermutlich zwei bis drei Zinkionen gebunden (Hempe und Cousins, 1991). An der basolateralen Seite wird es letztendlich über ZnT aus der Zelle heraustransportiert und im Blut, an Albumin,  $\alpha$ -Makroglobulin oder Transferrin gebunden, transportiert (Kruse-Jarres, 1999).

### 2.3.4. ZINKMANGEL UND –ÜBERVERSORGUNG

Ein Mangel an Zink tritt beim Menschen nur selten auf. Jedoch gibt es verschiedene Faktoren die diesen begünstigen. Dazu zählen eine armutsbedingte Unterernährung, vor allem in Schwellen- und Entwicklungsländern, eine langfristig parenterale Ernährung sowie eine Behandlung mit Chelatbildnern wie Penicillinamin. Eine weitere Ursache für einen Zinkmangel sind genetische Defekte wie die Acrodermatitis enteropathica, bei der es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Mutation im Gen eines ZIP-Transporters handelt, woraus eine Malabsorption von Zink aus dem Gastrointestinaltrakt resultiert. Zinkmangel äußert sich vor allem in neuronalen Störungen wie Tremor, verminderter Leistungsfähigkeit und Gewichtsverlust, Störungen der neuromotorischen und kognitiven Fähigkeiten, Störungen des Immunsystems, Atrophien, Potenzstörungen, Durchfall, Skelettdeformationen sowie Dermatitis (Hartwig et al., 2012; Maret und Sandstead, 2006).

Neben Zinkmangel kann ebenfalls eine Zinkübersorgung auftreten, was jedoch durch eine ausgewogene Ernährung nicht zu erreichen ist. Allerdings sind Nahrungsergänzungsmittel eine potentielle Quelle, um den Grenzwert von 25 mg Zink/Tag zu überschreiten. Akut toxische Vergiftungen durch Zink sind dabei relativ selten. Es wurden jedoch bereits Vergiftungen durch Lebensmittel und Getränke beschrieben, die in zinkhaltigen Gefäßen aufbewahrt wurden. Die Symptome einer akuten Zinkvergiftung reichen dabei von Kopfschmerzen, Erbrechen bis hin zu blutigen Durchfällen (EFSA, 2014b; Hartwig et al., 2012). Chronische Effekte durch Zink sind wesentlich häufiger in der Literatur beschrieben. Symptome der chronischen Toxizität sind vor allem eine Störung der Kupferhomöostase, des Immunsystems und des Lipoprotein-Stoffwechsels. Kritisch ist hierbei vor allem die gestörte Kupferhomöostase durch die erhöhte Zinkaufnahme. Zink aktiviert in den Enterozyten MTF-1, welches wiederum die Synthese von Metallothioneinen fördert. Da Kupfer gegenüber Metallothionein eine höhere

Bindungsaffinität als Zink aufweist, wird dieses bevorzugt an Metallothionein gebunden, sodass nur wenig Kupfer ins Blut abgegeben wird. Im Darm werden zudem regelmäßig die Enterozyten abgeschilfert, sodass das darin gespeicherte Kupfer im Metallothionein über die Fäzes ausgeschieden wird. Dieser ausgelöste Kupfermangel hat zur Folge, dass Enzyme wie Ceruloplasmin, die Cytochrom-c-Oxidase und die Superoxiddismutase, in denen Kupfer ein wichtiger Kofaktor ist, nicht weiter gebildet werden (Hartwig et al., 2012; Maret und Sandstead, 2006; SCF, 2003). Beruflich bedingt kann die inhalative Aufnahme von Zink zum sogenannten Metaldampffieber führen. Dies äußert sich in Fieber, Hustenreiz, Muskelschmerzen, Schüttelfrost und Schwächegefühl (EFSA, 2014b; Hartwig et al., 2012).

## 2.5 Cobalt

### 2.5.1. VORKOMMEN, VERWENDUNG, BEDARF UND EXPOSITION

Cobalt ist ein ferromagnetisches, stahlgraues und zähes Schwermetall der 8. Nebengruppe (9. Gruppe) des Periodensystems. In der Natur kommt es in vielen Mineralien, vergesellschaftet mit Nickel, Kupfer, Silber, Eisen und Uran vor. Die wichtigsten Erze sind Cobaltit ( $\text{CoAsS}$ ), Kobaltnickelkies ( $(\text{Co,Ni})_3\text{S}_4$ ) und Skutterudit ( $\text{CoAs}_3$ ). Dabei liegt es meist in den Oxidationsstufen +2 und +3 vor (Holleman und Wiberg, 2008).

Aufgrund der blauen Farbe von Cobaltaluminat ( $\text{CoAl}_2\text{O}_4$ ) wird es häufig zur Herstellung von blauem Glas sowie als Oxid, Sulfat oder Hydroxid für hitzefeste Farben und Pigmente zur Färbung von Porzellan angewendet. Des Weiteren wird es als Legierungsbestandteil von Stählen zur Erhöhung der Festigkeit bei hohen Temperaturen, als Katalysator, in Batterien und in einigen Geschirrspülmitteln eingesetzt. In den 1960er Jahren wurde Cobalt zudem als Schaumstabilisator in Bier eingesetzt. Medizinisch wurde  $\text{CoCl}_2$  in den 1970er Jahren zur Erhöhung der Erythrozytenanzahl bei anemischen Patienten und in den letzten Jahren, begleitend zur Hormonersatztherapie bei Frauen, gegen eine exzessive Östrogenproduktion verwendet (ATSDR, 2004; Holleman und Wiberg, 2008; NTP, 2016).

Biochemisch betrachtet handelt es sich bei Cobalt um ein Spurenelement, welches als Zentralatom im Corrin-Ringsystem von Vitamin  $\text{B}_{12}$  an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt ist. Cobalt wird hauptsächlich als Vitamin  $\text{B}_{12}$  alimentär zugeführt. Neben der Aufnahme über Trinkwasser spielt die Zufuhr über Fisch, grünes Blattgemüse, Getreide und Nüsse eine wichtige Rolle, wobei Cobalt hier größtenteils anorganisch vorliegt (FSA, 2003). Die empfohlene Tagesdosis für Erwachsene beträgt  $2,4 \mu\text{g}$  Vitamin  $\text{B}_{12}$  pro Tag, welches  $0,1 \mu\text{g}$  Cobalt entspricht. Insgesamt liegt die tägliche Gesamtaufnahme im Durchschnitt bei  $11 \mu\text{g}$  Cobalt, wobei sie zwischen  $5\text{-}40 \mu\text{g}$  Cobalt schwanken kann. Neben der oralen Exposition spielt die inhalative Aufnahme von Cobalt vor allem bei Arbeitern der Cobalt-verarbeitenden Industrie eine wichtige Rolle. Hier können Belastungen von bis zu  $30.000 \mu\text{g}$  Cobalt/ $\text{m}^3$  auftreten, was circa das  $100.000\text{-}$  bis  $3.0000.000\text{-}$ fache der üblichen Belastung entspricht (ATSDR, 2004; NTP, 2016).

### 2.5.2. TOXIZITÄT

Neben seinen physiologischen Aufgaben als Vitamin B<sub>12</sub> weist Cobalt jedoch auch toxische Eigenschaften auf. Zur akuten Toxizität liegen kaum Daten vor; in einem Tierversuch mit Ratten konnte ein LD<sub>50</sub> von 89 mg Cobalt/kg ermittelt werden. Dahingegen wurden nach chronischer Exposition bei Personen, die über mehrere Jahre große Mengen an Bier konsumierten, in dem Cobalt als Schaumstabilisator eingesetzt wurde, systemische Effekte beobachtet. Die Patienten zeigten eine Akkumulation von Cobalt im Herz und wiesen mitunter kardiovaskuläre, hepatische, respiratorische, gastrointestinale sowie hematologische Schäden auf, wobei die Wirkung durch den Alkohol des Biers nicht auszuschließen ist (ATSDR, 2004). Weiterhin wurden endokrine Effekte in Patienten beobachtet, deren Sichelzellenanämie mit Cobalt therapiert wurde (Kriss et al., 1955). Daneben wurden reprotoxische Effekte in Ratten festgestellt (Corrier et al., 1985).

### 2.5.3. KANZEROGENITÄT, GENOTOXIZITÄT UND MUTAGENITÄT

Die derzeitige Datenlage hinsichtlich epidemiologischer Studien zu Cobalt wurde vom *National Toxicology Program* (NTP) als inadequat bezeichnet, sodass keine endgültige Aussage zur kanzerogenen Wirkung von Cobalt und seinen Verbindungen in Menschen getroffen werden kann. Die erhöhte Inzidenz von Lungentumoren bei Arbeitern, die in erhöhtem Maße Cobalt-exponiert sind, wird derzeit als nicht eindeutig angesehen, da diese neben Cobalt weiteren karzinogenen Substanzen ausgesetzt sind (Greim, 2007; NTP, 2016). Hinsichtlich epidemiologischer Daten von Arbeitern in der Hartmetallindustrie wurden jedoch Wolframcarbidgehaltiges und Cobalt-haltiges Hartmetall von der Senatskommission zur Überprüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe (MAK-Kommission) in die MAK Kategorie 1, also als humankanzerogen, eingestuft (DFG, 2016). Mehrere Tierstudien an Mäusen, Ratten und Hamstern zeigen jedoch auch ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Lungentumoren nach inhalativer Exposition sowie von Tumoren an der Injektionsstelle nach subkutaner, intramuskulärer oder intraperitonealer Exposition gegenüber Cobalt allein (NTP, 2016). Deshalb wurde Cobalt und seine Verbindungen von der MAK-Kommission in die MAK Kategorie 2, also als krebserzeugend für den Menschen beruhend auf diesen Tierstudien, eingeordnet (Greim, 2007; DFG, 2016). Auch von der *International Agency for Research on*



*Cancer* (IARC) sind Cobalt und seine Verbindungen als potentiell humankarzinogen eingestuft worden (IARC, 2006).

*In vitro* konnte die Induktion von DNA-Strangbrüchen und damit ein genotoxisches Potential für Co(II) in HepG2-Zellen, HeLa-Zellen, Balb/3T3 Mausfibroblasten, humanen diploiden Fibroblasten (HSBP) sowie in CHO-Zellen festgestellt werden (Alarifi et al., 2013; Hamilton-Koch et al., 1986; Hartwig et al., 1990; Ponti et al., 2009). Während in bakteriellen Testsystemen keine oder nur eine schwache mutagene Wirkung durch Cobalt festgestellt werden konnte, zeigten *in vivo*-Untersuchungen an Mäusen eine Induktion von Chromosomenbrüchen und Chromosomenaberrationen in Knochenmarkszellen durch CoCl<sub>2</sub> (Palit et al., 1991a; Palit et al., 1991b, c). Weiterhin wurden in *in vitro*-Versuchen Schwesterchromatidaustausche in P388D<sub>1</sub>-Zellen sowie in humanen Lymphozyten und, *in vivo*, die Bildung von mikrokernhaltigen Erythrozyten nach intraperitonealer Exposition von Mäusen gegenüber Co(II) beobachtet (Andersen, 1983; Suzuki et al., 1993b). Zudem wurde die Induktion von Chromosomenbrüchen in Lungenfibroblastenzellen (Smith et al., 2014) und Mutationen mittels HPRT-Test in V79-Zellen durch Cobalt festgestellt (Hartwig et al., 1990).

Ein möglicher Mechanismus der genotoxischen Wirkung von Co(II) ist die Induktion von oxidativem Stress. Cobalt ist in der Lage, den zellulären Glutathion (GSH)-Gehalt zu reduzieren, während der oxidierte GSH-Gehalt ansteigt, und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie beispielsweise das Superoxidanion, zu bilden (Alarifi et al., 2013; Lewis et al., 1991; Moorhouse et al., 1985). Die Bildung der ROS läuft eventuell in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) über eine Fenton-ähnliche Reaktion ab (Ivancsits et al., 2002; Lloyd et al., 1997). Als Folge werden oxidative DNA-Basenschäden induziert, wie bereits durch Studien belegt werden konnte (Kasprzak et al., 1994; Kawanishi et al., 1994). Ein weiterer Mechanismus der genotoxischen bzw. mutagenen Wirkung von Co(II) könnte durch die Interaktion von Cobalt mit Proteinen von DNA-Reparatursystemen erklärt werden. Aufgrund der Thiolaaffinität von Co(II) wären Zinkfinger von DNA-Reparaturenzymen ein denkbarer Angriffspunkt (Sarkar, 1995). So konnte bereits gezeigt werden, dass Co(II) subzellulär das Zn(II)-Zentralatom im Zinkfinger des Proteins *Xeroderma Pigmentosum A* (XPA), welches an der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) beteiligt ist, substituiert (Asmuss et al., 2000a; Asmuss et al., 2000b; Kopera et al., 2004). Mit diesen Daten übereinstimmend *in vitro* konnte gezeigt werden, dass Co(II) die Reparatur von UV-induzierten DNA-Schäden inhibiert (Hartwig et al., 1991; Kasten et al., 1997).

## 2.6 Arsen

### 2.6.1. VORKOMMEN, VERWENDUNG UND EXPOSITION

Arsen ist ein Halbmetall der 5. Gruppe des Periodensystems. Gediegenes Arsen kommt in der Natur selten vor; häufiger ist es in sulfidischen oder oxidischen Mineralien, wie beispielsweise in Arsenkies ( $\text{FeAsS}$ ), Löllingit ( $\text{FeAs}_2$ ) und Cobaltit ( $\text{CoAsS}$ ). Die bedeutendsten Oxidationsstufen sind dabei -3, +3 und +5 (Holleman und Wiberg, 2008).

Aufgrund der Toxizität von Arsen wurde dieses früher als Pestizid sowie zur Imprägnierung von Bauholz eingesetzt. Heutzutage wird Arsen überwiegend als Läuterungsmittel in Glas, als Legierungsbestandteil in Halbleitern und medizinisch zur Behandlung von Leukämie eingesetzt (Selene et al., 2003; Tallman, 2004).

Das im Boden vorkommende anorganische Arsen kann durch Erosion in das Grundwasser, und damit in Nutzpflanzen, und durch Vulkanismus, durch Verbrennung von Kohle und durch Verhüttung von Erzen in die Luft gelangen. Neben der Aufnahme von Arsen über Reis und Reisprodukten spielt die Belastung von Trinkwasser weltweit eine große Rolle. Vor allem in belasteten Gebieten wie Bangladesch, Mexiko, Indien oder den USA stellt die Trinkwasserbelastung mit Arsen ein Problem dar. Hier wird der von der *World Health Organization* (WHO) festgelegte Grenzwert von  $10 \mu\text{g As/L}$  um ein Vielfaches überschritten. Weiterhin wird anorganisches Arsen im Meerwasser durch Algen oder Fische zu organischen Arsenverbindungen wie Arsenobetain oder Arsenozucker metabolisiert, gespeichert und somit angereichert (NRC, 1999, 2001). Die *European Safety Authority* (EFSA) kommt dabei auf eine tägliche Aufnahme von  $0,14 - 1,04 \mu\text{g anorganisches Arsen/kg Körpergewicht}$ . Somit liegt die Exposition im Bereich des *Benchmark Dose Lower Confidence Limits* ( $\text{BMDL}_{01}$ ), welches  $0,3 - 8 \mu\text{g Arsen/kg Körpergewicht und Tag}$  beträgt, und mit einem erhöhten Risiko an Lungen-, Hautkrebs, Leukämie sowie an Hautläsionen zu erkranken, einhergeht (EFSA, 2014a). Weiterhin spielt die inhalative Aufnahme eine bedeutende Rolle. Neben Zigarettenrauch ist dabei vor allem die berufliche Exposition in Kohlekraftwerken und Kupferhütten zu nennen. Hier kann es zu einer Belastung von über  $1000 \text{ ng Arsen/m}^3$  kommen, was die Belastung in ländlichen Gebieten circa um das 50.000-fache überschreitet (WHO, 2001).

### 2.6.2. TOXIZITÄT

Aufgrund von Tierversuchen in Ziegen und Meerschweinchen wird für Arsen essentielle Rolle für den Menschen vermutet, was jedoch umstritten ist (Mayer et al., 1993). In höheren Dosen wirkt Arsen, je nach Exposition und Oxidationsstufe, toxisch. Hierbei ist vor allem das anorganische As(III) zu nennen.

Die akute Toxizität nach oraler Exposition von anorganischem Arsen geht häufig mit gastrointestinalen, kardiovaskulären, hämatologischen und neurologischen Schäden, Erbrechen sowie mit Schleimhautläsionen einher. Bei chronischer Arsenexposition von mindestens 2 - 20 µg/kg/KG/Tag werden vor allem Hautläsionen (*blackfoot disease* in Taiwan) beobachtet. Dabei sind Hyperkeratosen der Extremitäten und eine Pigmentstörung charakteristisch. Des Weiteren werden periphere Blutgefäße beschädigt und damit Gewebe zerstört (BfR, 2015; Marquardt, 2004).

### 2.6.3. KANZEROGENITÄT, MUTAGENITÄT UND GENOTOXIZITÄT

In epidemiologischen Studien konnte ein erhöhtes Risiko für Nieren-, Leber-, Prostata-, Haut-, Blasen- und Lungenkrebs nach Exposition von anorganischem Arsen festgestellt werden. Dabei stellt Lungenkrebs den empfindlichsten Parameter mit dem niedrigsten BMDL-Wert von 0,34 – 0,69 µg anorganisches Arsen/kg Körpergewicht und Tag dar (EFSA, 2009). Laut IARC und der MAK-Kommission sind Arsen und anorganische Arsenverbindungen als “kanzerogen für den Menschen”, also Gruppe 1, anzusehen (DFG, 2016; IARC, 2012; NRC, 1999, 2001).

As(III) allein zeigt kein oder nur schwaches mutagenes Potential in Bakterien oder Säugerzellen, jedoch komutagene Effekte, beispielsweise nach Behandlung mit UVC-Strahlung (Li und Rossman, 1991; Yang et al., 1992) . Des Weiteren konnte in mehreren Studien die Induktion von Chromosomenaberrationen, Mikrokernen und Schwester-Chromatid-Austauschen nachgewiesen werden (Gebel, 2001; Kligerman et al., 2003).

Eine der Ursachen für die genotoxische Wirkung könnten indirekt induzierte DNA-Schäden durch die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie reaktiven Stickstoffspezies (RNS) sein. In mehreren Studien konnte bereits die Bildung von ROS und RNS durch Arsen gezeigt werden (Huang et al., 2004; Shi et al., 2004). Die durch Arsen induzierten

DNA-Schäden, welche nicht subzellulär, sondern lediglich zellulär auftreten, könnten daher durch die ROS und RNS induziert worden sein (Schwerdtle et al., 2003b). Weiterhin ist ein potentieller genotoxischer Mechanismus von Arsen die Wechselwirkung mit DNA-Reparaturwegen. So wurde bisher eine Störung der DNA-Schadenserkennung und der Ligation nach Induktion von DNA-Schäden gezeigt werden. Zudem inhibierte Arsen die Reparatur von N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff-induzierten DNA-Schäden, welche durch die Basenexzisionsreparatur (BER) repariert werden, sowie die Reparatur von UVC-Schäden, welche durch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) behoben werden (Bau et al., 2001; Hartwig et al., 1997; Li und Rossman, 1989). Dabei ist aufgrund der hohen Thiolaffinität eine Interaktion mit den Thiolgruppen von Proteinen der DNA-Reparaturprozesse als Mechanismus denkbar. Eine wichtige Struktureinheit mit Thiolgruppen stellen die sogenannten Zinkfinger dar, bei denen Zn(II) über Histidin und/oder Cysteine komplexiert wird. Ein wichtiges Zinkfinger-Protein der DNA-Reparatur ist beispielsweise die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1, welches eine wichtige Funktion in der DNA-Schadenserkennung der DNA-Einzelstrangbruchreparatur einnimmt. Für dieses Enzym konnte bereits eine Inhibierung durch nanomolare Konzentrationen an Arsen gezeigt werden (Ding et al., 2009; Hartwig et al., 2003a; Sun et al., 2014; Yager und Wiencke, 1997).

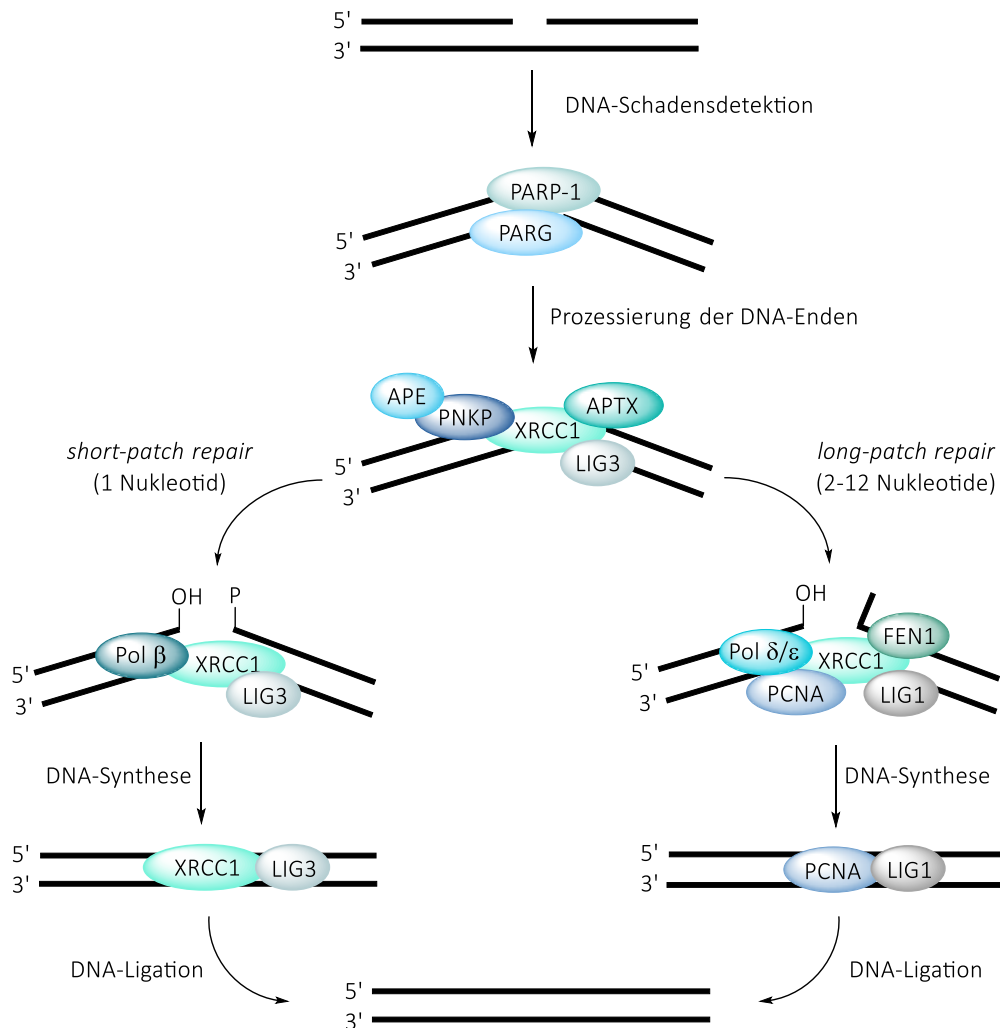
## 2.7 DNA-Einzelstrangbruchreparatur

DNA-Einzelstrangbrüche sind Lücken im Zuckerphosphat-Rückgrat eines DNA-Stranges. Durch die Replikation, während der Basenexzisionsreparatur, durch endogene ROS oder exogen durch beispielsweise  $\text{H}_2\text{O}_2$  werden täglich über Tausend DNA-Einzelstrangbrüche pro Zelle induziert. Nicht reparierte DNA-Einzelstrangbrüche werden replikativ zu DNA-Doppelstrangbrüchen überführt, welche wiederum zu genetischen Deletionen oder Chromosomenaberrationen führen können. Deshalb ist es für die Zelle überlebenswichtig, DNA-Einzelstrangbrüche zu reparieren. Ein wichtiger Reparaturweg stellt dabei die DNA-Einzelstrangbruchreparatur (*single-strand break repair*, SSBR) dar, welche in Abbildung 7 schematisch dargestellt ist (Caldecott, 2001). Im Folgenden wird die Reparatur direkt induzierter DNA-Einzelstrangbrüche, die durch Schäden im Zucker des Zuckerphosphat-Gerüsts entstehen, beschrieben.

Die Reparatur direkt induzierter DNA-Einzelstrangbrüche gliedert sich in vier Schritte: die DNA-Schadenserkennung, die Prozessierung der DNA-Einzelstrangbrüche, die DNA-Synthese und die DNA-Ligation. Die Erkennung von DNA-Einzelstrangbrüchen erfolgt durch das Enzym PARP-1, welches an die DNA-Schadensstelle bindet und aktiviert wird (Kapitel 2.1). PARP-1 katalysiert die Bildung von Poly(ADP-Ribose) aus  $\text{NAD}^+$ , welche an PARP-1 selbst sowie an Histone und DNA-Reparaturproteine kovalent gebunden werden. Die poly(ADP-ribosyl)ierte PARP-1 dient dabei als Signal für DNA-Reparaturenzyme und rekrutiert diese an die DNA-Schadensstelle, wobei die poly(ADP-ribosyl)ierten Histone durch die negative Ladung die Entwindung der DNA zur Folge hat. Nach kurzer Zeit dissoziiert PARP-1, ebenfalls durch elektrostatische Abstoßung der PAR mit der DNA, von der DNA ab, und PAR wird durch die PARG abgebaut, sodass die Proteine wieder in ihrem Ausgangszustand vorliegen, bereit für die Erkennung und Prozessierung weiterer DNA-Einzelstrangbrüche (Caldecott, 2008).

Die Prozessierung der beschädigten 3'- und/oder 5'-Enden erfolgt anschließend, je nach DNA-Schaden, durch *aprataxin 1* (APTX), die *apuricin-apyrimidinic endonuclease 1* (APE1) oder die *polynucleotide kinase 3'-phosphatase* (PNKP). Es werden an den DNA-Enden entweder 5'-Phosphat- oder 3'-Hydroxy-Reste eingeführt, welche für die nachfolgende DNA-Synthese benötigt werden. Während dieser Prozesse spielt das *X-ray repair complementing*

*protein 1* (XRCC1) eine wichtige Rolle, indem es beispielsweise APTX und PNKP stabilisiert und stimuliert (Caldecott, 2008).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des Mechanismus der DNA-Einzelstrangbruchreparatur.** Die DNA-Schadensdetektion erfolgt durch die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1). Es findet eine Katalyse der Poly(ADP-Ribosyl)ierung statt, welche DNA-Reparaturproteine zur Schadensstelle rekrutiert. Die Poly(ADP-Ribose) wird durch die Poly(ADP-Ribose)-Glykosylase (PARG) wieder abgebaut. Im zweiten Schritt erfolgt die Anlagerung von *X-ray repair complementing protein 1* (XRCC1) und die Prozessierung der DNA-Enden je nach Art des Schadens mittels der *short-patch repair* oder der *long-patch repair*. Dabei wird an den DNA-Enden durch *aprataxin 1* (APTX), der *apuricin-apyrimidinic endonuclease 1* (APE1) oder der *polynucleotide kinase 3'-phosphatase* (PNKP) entweder 5'-Phosphat- oder 3'-Hydroxy-Reste eingeführt, welche für die nachfolgende DNA-Synthese benötigt werden. Die DNA-Synthese erfolgt bei der *short-patch repair* durch die DNA-Polymerase  $\beta$  (Pol $\beta$ ) und die bei der *long-patch repair* durch die DNA-Polymerase  $\delta$  (Pol $\delta$ ) und/oder DNA-Polymerase  $\epsilon$  (Pol $\epsilon$ ). Anschließend wird die *flap endonuclease 1* (FEN1) und das *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) stimuliert, mindestens zwei Nucleotide zu entfernen. Letztendlich erfolgt die DNA-Ligation durch die DNA-Ligase 3 (LIG3) bei der *short-patch repair* und durch die DNA-Ligase 1 (LIG1) bei der *long-patch repair* (modifiziert nach Caldecott, 2008).

Die DNA-Synthese wird, analog zur Basensequenz des komplementären DNA-Stranges, von DNA-Polymerasen durchgeführt. Hierbei unterscheidet man zwischen zwei Wegen. Zum einen handelt es sich um die häufig vorkommende *short-patch repair*, bei der die DNA-Polymerase  $\beta$  (Pol $\beta$ ) unter Wechselwirkung mit XRCC1 die fehlenden Nukleotide synthetisiert. Ist das 5'-Ende weiterhin beschädigt, kommt die *long-patch repair* zum Einsatz. Dabei synthetisieren DNA-Polymerase  $\delta$  (Pol $\delta$ ) und/oder DNA-Polymerase  $\epsilon$  (Pol $\epsilon$ ) die fehlenden Nukleotide. Im Anschluss wird die *flap endonuclease 1* (FEN1) durch PARP-1 und das *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) stimuliert, mindestens zwei Nukleotide zu entfernen (Caldecott, 2008).

Die DNA-Ligation schließt dann die DNA-Reparatur ab. Bei der *short-patch repair* erfolgt die Ligation überwiegend durch die DNA-Ligase 3 (LIG3), und bei der *long-patch repair* hauptsächlich durch die DNA-Ligase 1 (LIG1), die ebenfalls mit XRCC1 interagiert (Caldecott, 2008).

### 3. FRAGESTELLUNG

Die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) ist ein Enzym, welches zahlreiche zelluläre Funktionen in der Zelle aufweist. Dazu zählt unter anderem die Detektion von DNA-Einzelstrangbrüchen, weshalb PARP-1 eine essentielle Rolle in der DNA-Einzelstrangbruchreparatur zugeschrieben wird. PARP-1 ist ein sogenanntes Zinkfinger-Protein, dessen Zink-bindende-Strukturen wichtig für dessen Bindung an die geschädigte DNA sind. Dabei ist die Affinität von Zink gegenüber dem ersten Zinkfinger im Gegensatz zum zweiten und dritten Zinkfinger so gering, sodass dieser unter normalen zellulären Bedingungen vermutlich unbesetzt vorliegt (Bossak et al., 2015). Im Fall von oxidativem Stress, welcher eine Erhöhung der „freien“ zellulären Zinkkonzentration zur Folge hat, könnte so der erste Zinkfinger mit Zn(II) besetzt und damit PARP-1 aktiviert werden. Ein Ziel dieser Arbeit ist es daher, PARP-1 aus HeLa S3-Zellen nach oxidativem Stress sowie unter normalen zellulären Bedingungen zu isolieren, und den Zinkgehalt zu bestimmen. Subzelluläre und zelluläre Betrachtung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung in Abhängigkeit des Zinkstatus, welcher sowohl die Gesamtkonzentration als auch die Konzentration an „freien“ Zinkionen umfasst, sollen den Mechanismus der PARP-1-Aktivierung weiter aufklären. Damit die Effekte des Zinkstatus auf die Schädigung der DNA von der direkten Wirkung auf PARP-1 abgegrenzt werden können, sollen ebenfalls die zelluläre Beeinflussung der Induktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generierten DNA-Strangbrüchen durch Zn(II) betrachtet und mit dem Ausmaß der Poly(ADP-Ribosyl)ierung verglichen werden. Genexpressionsuntersuchungen in Abhängigkeit des Zinkstatus sollen zudem einen Einblick in die Auswirkungen von Zn(II) auf die genomische Stabilität geben.

Die Zinkfinger der PARP-1 stellen potentielle Angriffspunkte für thiolaffine Metallionen, eventuell durch die niedrige Affinität von Zink gegenüber dem ersten Zinkfinger, dar. So konnte bereits eine Inhibierung der PARP-1 durch Cu(II) und As(III) festgestellt werden, was auf die Wechselwirkung der Metallionen mit den Zinkfingern zurückzuführen sein könnte (Schwerdtle et al., 2007; Walter et al., 2007; Yager und Wiencke, 1997). Deshalb soll sowohl subzellulär als auch zellulär der Einfluss von Co(II), welches ebenfalls thiolaffin ist, sowie von As(III) auf die PARP-1 untersucht werden und mit dem Effekt des PARP-Inhibitors PJ-34 verglichen werden. Dabei wurden zwei unterschiedliche Systeme der zellulären Poly(ADP-Ribose)-Quantifizierung angewandt, welche in Kombination einen Rückschluss auf die Kettenlänge dieser Polymere



ermöglichen. In Abhängigkeit der Kettenlänge der Poly(ADP-Ribose) werden unterschiedliche Proteine rekrutiert und aktiviert, sodass verschiedene zelluläre Signale weitergeleitet und damit reguliert werden könnten (Fahrer et al., 2007). Um die Auswirkungen von Co(II), As(III) und PJ-34 auf die PARP-1 und die Kettenlänge der Poly(ADP-Ribose) von der Schädigung der DNA abzugrenzen, soll zusätzlich die Beeinflussung der Induktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generierten DNA-Strangbrüchen untersucht werden. Da PARP-1 eine Rolle in der Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen spielt, soll außerdem der Einfluss von Co(II) und As(III) auf die DNA-Einzelstrangbruchreparatur untersucht und mit der Wirkung von PJ-34 verglichen werden. Als Endpunkte der genomischen Stabilität sollen weiterhin der Einfluss von Co(II), As(III) und PJ-34 auf den Zellzyklus, auf die Mutagenität, die Komutagenität mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und zuletzt auf die Mikrokerninduktion erfasst werden.

Als Zellmodell dient hierbei die Zervix-Adenomakarzinomzelllinie HeLa S3 für die Untersuchung der Gesamtkonzentration und „freien“ Konzentration an Zn(II), der Poly(ADP-Ribosyl)ierung, der PARP-1-Isolierung und der Messung des PARP-1-Zinkgehaltes, der DNA-Strangbruchanzahl, der DNA-Einzelstrangbruchreparatur, den Genexpressionsanalysen sowie der Mikrokerninduktion. Die humane B-lymphoblastoide Zelllinie TK6 dient weiterhin zur Untersuchung der Mutagenität.

## 4. MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Zellkultur

#### 4.1.1. ALLGEMEINES

Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Lösungen sowie Geräte sind im Anhang aufgeführt. Vor Verwendung in der Zellkultur wurden sowohl die Lösungen und Puffer als auch die Verbrauchsmaterialien sterilfiltriert, hitzeautoklaviert oder mit Heißluft sterilisiert und anschließend unter einer Sicherheitswerkbank der Stufe 2 gearbeitet.

#### 4.1.2. ZELLINIEN UND KULTIVIERUNG

Die adhärente humane Zervix-Adenokarzinomazelllinie HeLa S3 wurde in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) in Zellkulturschalen und die humane B-lymphoblastoide Suspensionszelllinie TK6 in RPMI-1649-Medium in Zellkulturflaschen mit jeweils 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin kultiviert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die TK6-Zellsuspension Zelldichten zwischen  $0,8 - 1,0 \times 10^5$  Zellen/mL aufwies. Die Kultivierungsbedingungen im Brutschrank waren 37°C mit 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchtigkeit.

Beide Zelllinien wurden alle 2-3 Tage passagiert. Hierfür wurden die Lösungen auf 37°C temperiert. HeLa S3-Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit 0,25 %iger Trypsinlösung für 30 sek behandelt und für 3 min im Brutschrank belassen. Die Zellen wurden in frischem DMEM aufgenommen und durch Resuspendieren vereinzelt. Nach Ermittlung der Zellzahl mittels des Zellzählgerätes Casy® wurde eine bestimmte Anzahl an Zellen in eine neue Zellkulturschale überführt. Für die Subkultivierung der Suspensionszelllinie TK6 wurde lediglich resuspendiert und nach Zellzahlbestimmung mittels CASY® eine definierte Anzahl an Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit frischem RPMI 1640 überführt.

#### 4.1.3. KRYOKONSERVIERUNG UND INKULTURNAHME

Für HeLa S3- und TK6-Zellen wurden Aliquots mit je  $5 \times 10^6$  Zellen in 1 mL FKS/ 10 % DMSO (v/v) mittels eines Cryo 1°C Coolers (VWR) eingefroren und danach in Flüssigstickstoff gelagert. Für die Inkulturnahme von HeLa S3-Zellen wurde das 2 mL-Kryoröhrchen bei 37°C im Wasserbad

aufgetaut und sofort in eine Zellkulturschale in 10 mL frisches DMEM gegeben. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel und nach 48 h die erste Subkultivierung. Die Zellen wurden nach dreimaligem Passagieren für Experimente verwendet. Für TK6-Zellen wurde das 2 mL-Kryoröhrchen ebenfalls im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und sofort in 10 mL RPMI-1640 in ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 22 °C und 250 g wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 20 mL RPMI-1640-Medium aufgenommen und in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Nach zweitägiger Wachstumsphase wurden die Zellen für Versuche verwendet.

#### 4.1.4. INKUBATIONEN

Für die Inkubationen mit CoCl<sub>2</sub>, NaAsO<sub>2</sub> und ZnCl<sub>2</sub> wurden zunächst Stammlösungen mit bidestilliertem Wasser angesetzt. Nach Sterilfiltration wurden die Stammlösungen bis auf die gewünschte Konzentration verdünnt und entsprechende Volumina für die Inkubationskonzentrationen direkt in das Medium pipettiert. Für N,N,N',N'-Tetrakis(2-Pyridylmethyl)-ethylendiamin (TPEN) und den PARP-Inhibitor PJ-34 wurden die jeweiligen Stammlösungen in DMSO hergestellt und entsprechend verdünnt. Die Inkubationslösungen wurden stets mit einem Verdünnungsfaktor von 100 in das Kulturmedium gegeben.

Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Inkubationslösung wurde vor jedem Versuch frisch aus einer 9,788 M Stammlösung in bidestilliertem Wasser hergestellt.

## 4.2 Zytotoxizitätsuntersuchungen

#### 4.2.1. ZELLZAHL UND KOLONIEBILDUNGSFÄHIGKEIT IN HELA S3-ZELLEN

Zur Bestimmung der akuten Zytotoxizität wurde nach Inkubation die Zellzahl bestimmt. Langerfristige zytotoxische Wirkungen wurden mit dem Koloniebildungsassay erfasst.

Hierfür wurden zunächst 5 x 10<sup>5</sup> Zellen in eine 60 mm Zellkulturschale in Doppelbestimmung ausgestreut, 24 h anwachsen gelassen und mit 5 ml der Testsubstanzlösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, trypsinisiert, in frischem DMEM aufgenommen und mittels Casy® gezählt.

Zur Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit wurden im Anschluss pro Zellkulturschale 300 Zellen in Dreifachbestimmung weitergesetzt und für 8 Tage im Brutschank belassen. Die

Kolonien wurden mit PBS gewaschen und mit eiskaltem 96 %igem Ethanol fixiert. Nach 30-minütiger Färbung der Kolonien mit Giemsa-Lösung und Waschen der Zellkulturschalen mit destilliertem Wasser wurden diese über Nacht getrocknet und die Kolonien mit Hilfe des Koloniezählgerätes (*Colony Counter BZG-30*) ausgezählt. Die Analysen von  $\text{CoCl}_2$  und  $\text{NaAsO}_2$  wurden teilweise in Zusammenarbeit mit Herrn Lukas Stark im Rahmen seiner wissenschaftlichen Abschlussarbeit und die Untersuchungen von  $\text{ZnCl}_2$  und TPEN teilweise mit Frau Tizia Matthäus im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

### 4.2.2. RICC-TEST IN TK6-ZELLEN

Für die Suspensionszelllinie TK6 wurde die Teilungsfähigkeit anhand der relativen Zellzahlzunahme bestimmt um eine ausreichende Teilungsfähigkeit im Rahmen des PIG-A Assays zu gewährleisten. Dazu wurden pro Probe  $5 \times 10^6$  Zellen in 10 ml RPMI-1640 in Doppelbestimmung angesetzt und mit der Testsubstanz inkubiert. Nach Inkubationsabbruch wurden die TK6-Zellen mit einer Dichte von  $0,1 \times 10^6$  Zellen/mL in RPMI-1640 in Dreifachbestimmung in eine 24-Well-Platte ausgestreut und nach weiteren 48 h mittels des Zellzählgerätes Casy® ausgezählt.

RICC wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{RICC (\% der Kontrolle)} = \frac{\text{Zellzahl-}0,1 \times 10^6}{\text{Zellzahl (Kontrolle)-}0,1 \times 10^6} \times 100 \quad (1)$$

Diese Untersuchungen wurden zum Teil in Zusammenarbeit mit Frau Mareike Kunzmann im Zuge ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt.

### 4.3 Bestimmung der zellulären freien Zinkkonzentration mittels FluoZin-3

Zur Ermittlung der intrazellulären freien Zinkkonzentration wurde die spezifische Zinksonde FluoZin-3 in Acetomethylester-Form eingesetzt. Diese Sonde ist membranpermeabel und wird intrazellulär durch Esterasen gespalten, sodass eine Rückdiffusion aus der Zelle verhindert wird. Die gespaltene Form ist nun in der Lage, freies oder schwach gebundenes  $\text{Zn}^{2+}$  zu binden, was eine messbare proportionale Erhöhung des Fluoreszenzsignals zur Folge hat (Dean et al., 2012).

Pro Probe wurden je  $0,5 \times 10^5$  Zellen in Doppelbestimmung in eine 96-Well-Platte ausgestreut und für 24 h anwachsen gelassen. Nach darauffolgender 24-stündiger Inkubation mit der

Testsubstanzlösung wurde das Medium abgesaugt und mit 100 µL PBS gewaschen. Die Sonde wurde für jeden Versuch frisch angesetzt. Dazu wurde die FluoZin-3-Lösung (100 µM in 20 % Pluronic F-127) 1:40 in PBS verdünnt und davon je 100 µL in ein Well pipettiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37°C im Dunkeln wurde mit 100 µL PBS gewaschen und für 1 h mit den verschiedenen Zinkkonzentrationen sowie mit verschiedenen TPEN-Konzentrationen in DMEM ohne FKS bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und die Konzentration von freiem Zn<sup>2+</sup> nach Zugabe von frischem PBS gemessen. Für die absolute Quantifizierung wurde die Minimalfluoreszenz ( $F_{\min}$ ) mit 100 µM TPEN und die Maximalfluoreszenz ( $F_{\max}$ ) mit 500 µM ZnCl<sub>2</sub> und 100 µM Pyridithion ermittelt und die Werte nach 90-minütiger Messung herangezogen. Die Exzitationswellenlänge betrug 485 nm und die Emissionswellenlänge 535 nm. Der absolute Gehalt an freiem Zink wurde nach folgender Gleichung berechnet (Krężel und Maret, 2006):

$$c_{\text{freies Zn}^{2+}} [\text{nM}] = 15 \times \frac{(F - F_{\min})}{(F_{\max} - F)} \quad (2)$$

Die Untersuchungen von ZnCl<sub>2</sub> und TPEN wurden zum Teil in Zusammenarbeit mit Frau Tizia Matthäus durchgeführt.

#### 4.4 Bestimmung der zellulären Zinkkonzentration mittels Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie

##### Versuchsansatz

Für die Aufnahmeuntersuchungen von ZnCl<sub>2</sub> wurden 2,5 x 10<sup>6</sup> HeLa S3-Zellen in eine 150 mm Zellkulturschale ausgestreut und nach 24 h für weitere 24 h mit der Testsubstanzlösung inkubiert. Für den Inkubationsabbruch wurde das Medium abgesaugt, die Zellen trypsiniert, in 10 mL PBS/10 % FKS resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1250 rpm und 4°C wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 10 mL PBS resuspendiert. Hiervon wurden 9,5 mL Zellsuspension in ein weiteres Zentrifugenröhrchen pipettiert und nochmals für 5 min bei 1250 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und zweimal mit 500 µL PBS gewaschen. Nach Überführen der Zellsuspension in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde ein letztes Mal für 5 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet bis zur Aufarbeitung bei Raumtemperatur gelagert.

Mit den restlichen 0,5 mL wurden die Zellzahl und das mittlere Zellvolumen mittels des Casy® ermittelt.

### Zellaufschluss

Für den sauren Aufschluss wurde jedes Zellpellet sowie ein leeres Eppendorf-Reaktionsgefäß als Blindprobe mit 500 µL salpetersaurer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (31 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 69 % HNO<sub>3</sub> im Verhältnis 1:1) versetzt, eine Stunde stehen gelassen und anschließend im Thermoschüttler stufenweise von 60°C auf 95°C hochgeheizt. Nach ca. 10-stündiger Eindampfung der Proben bis zur Trockne wurden die Rückstände in 1 mL bidestilliertem H<sub>2</sub>O aufgenommen und gevortext.

### Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie-Analyse

Für die Quantifizierung von Zink mittels Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie (F-AAS) wurden eine Luft-Acetylen-Flamme und eine Zink-Hohlkathodenlampe verwendet. Zunächst wurde eine externe Kalibrierung im Bereich von 0,25 – 1,00 mg/L Zink gemessen. Zur Quantifizierung wurde die Absorption der Blindwerte von der Absorption der Proben stets abgezogen. Die Zinkkonzentration wurde wie folgt berechnet:

$$c_{\text{Zn}} [\mu\text{M}] = \frac{c_{\text{Messung}} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right]}{M_{\text{Zn}} \left[ \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right] \times \text{ZZ} [\text{mL}^{-1}] \times \text{ZV} [\mu\text{L}]} \times 10^6 \quad (3)$$

ZZ Zellzahl

MV mittleres Zellvolumen

M<sub>Zn</sub> molare Masse von Zink

Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Tizia Matthäus durchgeführt.

## 4.5 Bestimmung des Zinkgehaltes der PARP-1

### 4.5.1. ISOLIERUNG VON PARP-1 MITTELS DYNABEADS™

#### Versuchsansatz

Der Bestimmung des Zn-Gehaltes von PARP-1 wurde eine Isolierung mittels Dynabeads™ vorgeschaltet. Pro Probe wurden zweimal 4 x 10<sup>6</sup> HeLa S3-Zellen in je eine 150 mm

Zellkulturschale ausgestreut und 24 h anwachsen gelassen. Die weiteren 24 h wurde mit einer Testsubstanz inkubiert und mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  5 min koinkubiert. Die Inkubation wurde durch Absaugen des Mediums abgebrochen, mit 10 mL PBS gewaschen, die Zellen abtrypsiniert und pro Zellkulturschale in 10 mL kaltem PBS/10 % FKS aufgenommen. Die Zellsuspensionen von zwei Zellkulturschalen einer Probe wurden in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen vereinigt und für 3 min bei 1300 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 mL kaltem PBS aufgenommen. Nach Überführen in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde ein weiteres Mal 3 min bei 1300 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

### Zellaufschluss

Das Zellpellet wurde in Protease-Inhibitor-Lösung (Tablette cOmplete Mini, Roche, in 10 mL bidestilliertem Wasser aufgelöst) aufgenommen und mittels Scherkräfte durch fünfmaliges Einfrieren und Auftauen aufgeschlossen. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C wurde der Überstand, in dem die Zellproteine enthalten waren, für die weitere Aufarbeitung verwendet.

### Vorbehandlung der Dynabeads™

Die Protein A gekoppelten Dynabeads™ (Thermo Fisher Scientific) wurden für 5 min vorsichtig gevortext. Pro Probe wurden 100  $\mu\text{L}$  Dynabeads™-Lösung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, in den Magneten DynaMag™-2 gestellt und der Überstand entfernt. Das Reaktionsgefäß wurde vom Magneten entfernt und die Dynabeads™ mit 400  $\mu\text{L}$  Antikörper in einem Binde- und Waschpuffer (PARP-1 Antikörper H250 in Binde- und Waschpuffer 1/20) suspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation unter vorsichtigem Schwenken bei Raumtemperatur wurde das Eppendorf-Reaktionsgefäß auf den DynaMag™-2 gestellt und der Überstand entfernt. Anschließend wurden die mit dem PARP-1-Antikörper gekoppelten Dynabeads™ mit 400  $\mu\text{L}$  Binde- und Waschpuffer und zwei weitere Male mit 400  $\mu\text{L}$  frisch hergestelltem Konjugationspuffer gewaschen.

### Crosslinking des Protein A mit dem PARP-1-Antikörper

Die Dynabeads™ wurden mit 500 µL frisch hergestelltem 5 mM Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS<sup>3</sup>) für 30 min unter vorsichtigem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert und somit das Protein A mit dem PARP-1-Antikörper irreversibel vernetzt. Die Vernetzungsreaktion wurde durch Zugabe von 25 µL Quenching Buffer und 15 min Inkubation unter Schwenken gestoppt. Die Dynabeads™ wurden dreimal mit je 400 µL PBST gewaschen und der Überstand entfernt.

### Immunopräzipitation von PARP-1

Der wässrige Überstand des Zellpellets wurde auf die Dynabeads™ pipettiert und vorsichtig resuspendiert. Im Anschluss wurde für 20 min unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert und nach Stellen des Eppendorf-Reaktionsgefäßes in den DynaMag™-2 der Überstand entfernt. Der Dynabeads™-Antikörper-PARP-1-Komplex wurde dreimal mit je 400 µL Waschpuffer gewaschen und in 200 µL Waschpuffer aufgenommen. Die Suspension wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und der Überstand mit Hilfe des Magneten entfernt.

### Elution von PARP-1

PARP-1 wurde von den Dynabeads™-Antikörper-Komplexen durch Zugabe von 50 µL 100 mM TEA (pH 11,5) und 2-minütiger Inkubation eluiert. Der Überstand, der die PARP-1 enthielt, wurde mit Hilfe des DynaMag™-2 in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und direkt im Anschluss der Proteingehalt mittels Bradford ermittelt.

#### 4.5.2. BESTIMMUNG DER PARP- 1-AUSBEUTE MITTELS WESTERN BLOT

Zur Bestimmung der PARP-1-Ausbeute nach Isolierung wurde die Elutionslösung der Beads zunächst denaturiert, über ein 10%-iges Polyacrylamidgel laufen gelassen und auf eine Nitrocellulose-Membran (Western Blot) transferiert. PARP-1 wurde anschließend durch Inkubation mit dem primären Antikörper H250 und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper mittels Chemilumineszenz detektiert.



### Versuchsdurchführung

Die PARP-1-Elutionslösung nach Isolierung mittels Dynabeads™ sowie gekaufte PARP-1 (50 ng) wurden mit dem Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Lösungen wurden neben einem Größenmarker PageRuler auf ein SDS-Polyacrylamidgel (10%-iges Trenngel und 4%-iges Sammelgel) aufgetragen und die Elektrophorese bei 80 V im Sammelgel und bei 180 V im Trenngel laufen gelassen. Das Gel und die Nitrocellulose-Membran wurden anschließend in kaltem Transferpuffer äquilibriert. Der Proteintransfer erfolgte mittels Tank Blot über Nacht im Kühlschrank. Die Membran wurde zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei Raumtemperatur in Magermilchpulver (5 % in PBST) geschwenkt und danach mit dem 5 mL des Primärantikörpers H250 (1:2000 in Blockierlösung) 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in PBST wurde die Membran für eine weitere Stunde mit 5 mL des Sekundärantikörpers *donkey-anti-rabbit* (1:2000 in Blockierlösung) inkubiert. Nach weiteren drei Waschschrritten wurde die Membran für 5 min in PBS gelassen und mit 700 µL LumiGlo-Lösung für 1 min versetzt. Das Chemilumineszenz-Signal wurde am LAS 3000 aufgenommen und über die Auswertesoftware AIDA ausgewertet.

#### 4.5.3. BESTIMMUNG DES PARP-1-GEHALTES MITTELS BRADFORD

Für die Kalibriergerade der Proteinbestimmung mittels Bradford wurde zunächst eine Stammlösung von 5 mg Rinderserumalbumin (BSA)/mL bidest. H<sub>2</sub>O hergestellt und diese 1/10 verdünnt. Aus dieser BSA-Lösung wurden die Kalibrierpunkte von 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 und 0,2 mg BSA/mL erstellt. Pro Probe und pro Kalibrierpunkt wurden 2 µL in eine Kavität einer 384-Well-Platte in Doppelbestimmung pipettiert. Als Blindprobe wurde bidest. H<sub>2</sub>O verwendet. Direkt im Anschluss wurden pro Well 18 µL Reagenzmix (22 % Bradford-Reagenz in bidest. H<sub>2</sub>O(v/v)) mit einer Mutlipette hinzupipettiert und nach exakt 5 min Ruhezeit im Dunkeln die Absorption bei 595 nm am Photometer gemessen.

#### 4.5.4. MESSUNG DES ZINKGEHALTES MITTELS ICP-OES

Nach Isolierung und Bestimmung des Gehaltes von PARP-1 wurden Untersuchungen zum Zinkgehalt der PARP-1 in Kooperation mit Frau Marita Heinle (Institut für Funktionelle Grenzflächen, KIT) durchgeführt. Dazu wurde die isolierte PARP-1 zunächst eingedampft, mit HNO<sub>3</sub> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:1) aufgeschlossen und der Zinkgehalt mittels ICP-OES gemessen.

## 4.6 Quantifizierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung

### 4.6.1. BESTIMMUNG DER INTRAZELLULÄREN POLY(ADP-RIBOSYL)IERUNG MITTELS IMMUNFLUORESCENZ

Die Messung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung wurde in HeLas S3-Zellen durchgeführt wie zuvor beschrieben (Bürkle et al., 1993; Hartwig et al., 2003a; Kupper et al., 1990). Das Prinzip der Methode basiert auf der immunfluorimetrischen Detektion der Poly(ADP-Ribose). Hierfür wurde der spezifische monoklonale Primärantikörper (10H) aus Maushybridomazellen, welche von Prof. Bürkle (Universität Konstanz) zur Verfügung gestellt wurden, isoliert und gegen die PAR verwendet, an der wiederum der Fluorescein-Isothiocyant-konjugierte Sekundärantikörper konjugiert wurde. Diese Untersuchungen wurden zum Teil in Zusammenarbeit mit Herrn Lukas Stark im Rahmen seiner wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt.

#### Gewinnung des Antikörpers 10H

Für die immunfluorimetrische Detektion der Poly(ADP-Ribose) wurde zunächst der monoklonale Primärantikörper 10H aus der Maushybridomazelllinie 10H isoliert. Hierfür wurden die Maushybridomazellen aufgetaut, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 3 min bei 250 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 2 mL Auftaumedium (50 % DMEM mit 10 % FKS, 48 % RPMI-1640, 2 % NCTC, einfach essentielle Aminosäuren und 50 µM s-Mercaptoethanol) resuspendiert und in eine Zellkulturflasche mit 10 mL Auftaumedium überführt. Nach zweimaligem Subkultivieren im Auftaumedium wurden die Zellen acht weitere Male in DMEM subkultiviert und zuletzt das Hybridoma-SMF-Medium (Gibco) auf die Zellen für zwei Passagen gegeben, um die Antikörpersynthese anzuregen. Die Antikörper im Medium wurden durch Zentrifugation von den Zellen abgetrennt und bis zur Aufreinigung bei -20°C gelagert.

Die Aufreinigung erfolgte mit dem *Protein A Antibody Purification Kit* (Sigma Aldrich) nach Herstellerangaben. Zur Vorbereitung wurde die *Desalting Cartridge*, eine Entsalzungssäule, mit 10 mL HEPES-Puffer und die *Protein A Cartridge*, eine Säule an der Protein A angehängt ist, mit einer Flussrate von 1 mL/min konditioniert. Im Anschluss wurde die *Protein A Cartridge* mit 4 mL Bindepuffer äquilibriert, die Probe aufgetragen und mit 0,5 mL/min durch die Säule laufen gelassen. Es wurde mit bidestilliertem Wasser gespült und mit 6 mL Bindepuffer mit 1 mL/min

gewaschen. Für die Elution wurde die *Protein A Cartridge* vor die *Desalting Cartridge* geschaltet und der Antikörper 10H mit 5 mL Elutionspuffer bei einer Flussrate von 0,5 mL/min eluiert. Für die Regeneration der Säulen wurde die *Protein A Cartridge* mit 5 mL Regenerationspuffer und die *Desalting Cartridge* mit 10 mL HEPES-Puffer behandelt.

Die Bestimmung der idealen Antikörperkonzentration für die Immunfluoreszenzversuche erfolgte anhand Positivkontrollen von 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  bei einer Antikörperverdünnung zwischen 1/10 bis 1/500.

### Versuchsansatz, Induktion der PARylierung und Fixierung

In 40 mm-Zellkulturschalen wurde direkt vor dem Ausstreuen von 150.000 HeLa S3-Zellen je ein Deckglas hineingegeben. Nach einer Wachstumszeit von 24 h wurden die Zellen für weitere 24 h mit  $\text{CoCl}_2$ , bzw. 18 h mit  $\text{NaAsO}_2$ , inkubiert und weitere 5 min mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  zur Induktion der PARylierung behandelt. Zu jedem Versuchsansatz wurde eine Negativkontrolle mit reinem DMEM und eine Positivkontrolle mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  mitgeführt. Daraufhin wurden die Deckgläser aus den Zellkulturschalen entfernt und mit kaltem PBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte durch 10-minütiges Eintauchen der Deckgläser in eiskalte 10 %ige Trichloressigsäure (w:v). Die Fixierung erfolgte mit eiskaltem 70 %, 90 % und 96 % Ethanol für jeweils 5 min. Anschließend wurden die Deckgläser bei Raumtemperatur getrocknet.

### Immunolabelling

Nach Benetzung der Deckgläser mit PBS erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit 50  $\mu\text{l}$  des Anti-Poly(ADP-Ribose) Antikörpers 10H (Verdünnung 1:20 in PBS/5 % Milchpulver (w/v)) in einer feuchten Kammer bei 37°C. Die Antikörper-Lösung wurde abgetupft und die Deckgläser dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Es erfolgte eine weitere 30-minütige Inkubation mit 70  $\mu\text{l}$  des FITC-markierten Sekundärantikörpers (Verdünnung 1:50 in PBS/5 % Milchpulver (w/v)) bei 37°C in einer feuchten Kammer, wobei ab diesem Schritt aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Sekundärantikörpers bei gedämpftem Licht gearbeitet wurde. Nach einer abermaligen Waschprozedur wurden die Deckgläser mit Vectashield und DAPI (1 $\mu\text{g/ml}$ ) auf Objektträger aufgebracht und mit Lack versiegelt.

### Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung

Die Quantifizierung der Poly(ADP-Ribose) erfolgte im Zellkern anhand der Auswahl kolokalisierter Fluoreszenz von DAPI und FITC mittels AxioVision Software Rel. 4.8 von Zeiss. Die Fluoreszenzen wurden relativ zur Fluoreszenzintensität der Positivkontrolle dargestellt.

### 4.6.2. BESTIMMUNG DER INTRAZELLULÄREN POLY(ADP-RIBOSYL)IERUNG MITTELS LC-MS/MS

#### Versuchsansatz

Ribosyladenosin, ein Baustein der Poly(ADP-Ribose), wurde zur Quantifizierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung herangezogen. Hierfür wurde pro Probe dreimal  $1 \times 10^6$  HeLa S3-Zellen in 60 mm-Zellkulturschalen ausgestreut und für mindestens 24 h anwachsen gelassen. Dabei dienten die Zellen einer Zellkulturschale der Zellzahlbestimmung. Nach Inkubation mit den Testsubstanzlösungen wurde für 5 min mit  $100 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  koinkubiert, mit PBS gewaschen und die Zellen mit 20 %iger TCA (w/v) fixiert.

#### Verdau von DNA, RNA und Proteinen

Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von den Schalen abgekratzt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem 70 %igem Ethanol wurden die Zellpellets in  $225 \mu\text{L}$   $0,5 \text{ M}$  KOH resuspendiert und für 45 min bei Raumtemperatur unter mehrmaligem Vortexen inkubiert. Zur Neutralisation wurden  $50 \mu\text{L}$   $4,8 \text{ M}$  MOPS-Puffer (pH 5,9) hinzupipettiert und DNA sowie RNA durch Zugabe von  $44 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $0,5 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0,1 \text{ mg/mL}$  DNase I (Roche) und  $55 \mu\text{g/mL}$  RNase (Sigma Aldrich) und Inkubation für 3 h bei  $37^\circ\text{C}$  verdaut. Proteine wurden mit  $0,2 \text{ mg/mL}$  Proteinase K (Roche) bei  $37^\circ$  über Nacht zersetzt.

#### Extraktion und Fragmentierung der Poly(ADP-Ribose)

Die Extraktion von Poly(ADP-Ribose) wurde mittels des *High pure* miRNA Isolierungskits (Roche) durchgeführt. Zunächst wurden die Proben mit  $1 \text{ mM}$  MgAc,  $30 \text{ mM}$   $\text{NH}_4\text{Ac}$ ,  $10 \text{ Units}$  Alkalischer Phosphatase (Sigma Aldrich) und  $0,5 \text{ U}$  Phosphodiesterase (Affymetric) für 3 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Mittels eines  $10 \text{ kDa}$ -Filters (Nanosep,  $10 \text{ K}$ , Pall) wurden die Enzyme durch Zentrifugation bei  $14.000 \text{ g}$  für 20 min entfernt und die Zellextrakte vakuumgetrocknet.

Nach Resuspension der Extrakte in 100 µL bidestilliertem H<sub>2</sub>O wurden die Proben in die LC-MS/MS injiziert.

### Chromatographische Trennung und Detektion

Die chromatographische Trennung erfolgte an einem Waters 2695 Trennungsmodul an einer Hypersil Gold aQ-Säule (150 mm x 2,1 mm, Partikelgröße 3 µm, Thermo Scientific) bei 30°C. Die Auftrennung erfolgte isokratisch mit wässriger 8 mM NH<sub>4</sub>Ac-Lösung und 1,5 % Acetonitril mit einer Flussrate von 0,4 mL/min. Die Säule wurde mit einem Quattro Micro Massenspektrometer (Waters) gekoppelt, der mit einem positivem ESI-Modus lief (Parameter des Massenspektrometers siehe Anhang). Die Analysen mit ZnCl<sub>2</sub> und TPEN wurden in Zusammenarbeit mit Frau Tizia Matthäus im Zuge ihrer Masterarbeit durchgeführt.

### 4.6.3. BESTIMMUNG DER SUBZELLULÄREN POLY(ADP-RIBOSYL)IERUNG ISOLIERTER PARP-1

Zur Untersuchung der direkten Inhibierung von PARP-1 durch verschiedene Testsubstanzen, wurde das „HT Universal Colorimetric PARP Assay Kit with Histone-Coated Strip Wells“ verwendet (Trevigen).

### Versuchsansatz und Poly(ADP-Ribosyl)ierung

Pro Probe wurden zwei Wells mit 50 µL PARP-Puffer versetzt und 30 min einwirken gelassen. Nach Entfernen des Puffers wurden die Testsubstanzlösungen mit je 10 µL hineinpipettiert und mit 15 µL frisch verdünntem PARP-Enzym (0,5 Units/Well) versetzt. Als Negativkontrolle wurde statt Enzymlösung 15 µL PARP-Puffer, sowie für die Positivkontrolle statt Inhibitorlösung 10 µL PARP-Puffer hinzupipettiert. Nach 10-minütiger Inkubation wurden 25 µL PARP-Cocktail hinzugegeben (enthielt 1x PARP Cocktail, 1x aktivierte DNA in 1x PARP-Puffer) und für 60 min inkubiert.

### Detektion

Pro Well wurde zweimal mit je 200 µL PBS/0,1 % Triton X-100 (v/v) und anschließend zweimal mit je 200 µL PBS gewaschen. Es wurden 50 µL frisch verdünnte Strep-HRP-Lösung (Strep-HRP mit Strep-Diluent im Verhältnis 1:500) in je ein Well pipettiert und für 60 min reagieren gelassen. Weitere vier Waschschriffe erfolgten mit zweimal 200 µL PBS/0,1 % Triton X-100 (v/v)

und zweimal mit 200  $\mu\text{L}$  PBS. Zuletzt wurden 50  $\mu\text{l}$  der auf Raumtemperatur vorgewärmten TACS-Sapphire™-Lösung hinzugegeben, 30 min im Dunkeln reagieren gelassen, 50  $\mu\text{L}$  0,2 M HCl hinzupipettiert und die Absorption bei 450 nm gemessen.

### 4.7 Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen mittels Alkalischer Entwindung

#### Versuchsansatz

Mittels der Methode der Alkalischen Entwindung wurde die Anzahl an DNA-Strangbrüchen detektiert (Hartwig et al., 1993). Hierfür wurden pro Probe  $0,8 \times 10^5$  HeLa S3-Zellen in eine 40 mm-Zellkulturschale in Dreifachbestimmung ausgestreut und diese mindestens 24 h anwachsen gelassen. Nach Inkubation mit der Testsubstanzlösung wurde 5 min mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  koinkubiert sowie für die Untersuchung der DNA-Reparatur mit den entsprechenden Reparaturzeiten mit DMEM nachinkubiert. Die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen und bis zur weiteren Aufarbeitung auf Eis gelagert.

#### Alkalische Entwindung

Nach Absaugen des PBS wurden die Zellen zur Entwindung der DNA 30 min im Dunkeln mit 1,5 mL alkalischer Lösung (pH 12,3) behandelt. Nach Neutralisation mit 0,1 N HCl auf pH 6,8 wurden die lysierten Zellen resuspendiert, in ein Glasröhrchen überführt und für 15 sek auf Eis sonifiziert. Zur Stabilisierung der einzelsträngigen DNA wurde diese mit 0,05 % SDS versetzt und die Proben bis zur säulenchromatographischen Trennung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

#### Säulenchromatographische Trennung und photometrische Detektion

Für die Trennung der einzel- und doppelsträngigen DNA wurde auf einer Hydroxylapatit-Säule gearbeitet, wobei alle verwendeten Puffer auf  $60^\circ\text{C}$  vorgewärmt wurden. Zur Vorbereitung der Säulen wurde Hydroxylapatit 30 min mit NaP-Puffer (0,1 g/mL) bei  $60^\circ\text{C}$  quellen gelassen, der flüssige Überstand gegen frischen NaP-Puffer ausgetauscht und in eine mit einem Glasfaserfilter ausgelegte 3 mL-Einwegspritze pipettiert. Das obere Ende wurde mit einem weiteren Glasfaserfilter bedeckt und die Säule mit 0,5 M KP-Puffer gewaschen. Nach Säulenconditionierung mit 0,01 M NaP-Puffer wurden die Proben auf die Säulen pipettiert und anschließend mit 0,01 M NaP-Puffer gewaschen. Die Elution der einzelsträngigen DNA erfolgte mit 0,15 M KP-Puffer, gefolgt von der Elution der doppelsträngigen DNA mit 0,35 M KP-Puffer,

jeweils in 24-Well-Platten. Nach 30-minütiger Inkubation der DNA-Fragmente mit Hoechst 33258 (0,75  $\mu\text{M}$ ) im Dunkeln wurde die Fluoreszenz photometrisch erfasst. Die Exzitationswellenlänge betrug 360 nm und die Emissionswellenlänge 455 nm.

#### Berechnung der DNA-Strangbruchanzahl

Die Anzahl an DNA-Strangbrüchen wurde nach Hartwig und Kollegen berechnet (Hartwig et al., 1996; Hartwig et al., 1993). Die Fluoreszenzintensität des Blindwertes wurde von den Fluoreszenzintensitäten der Proben abgezogen. Zunächst wurde die Anzahl an doppelsträngiger DNA nach Gleichung 5 berechnet, gefolgt von der Anzahl an DNA-Strangbrüchen pro  $10^6$  Basenpaare nach Gleichung 6.

$$\text{Anteil doppelsträngige DNA} = \frac{rF_{\text{dsDNA}}}{rF_{\text{dsDNA}} + 2,1 \times rF_{\text{dsDNA}}} \quad (5)$$

rF relative Fluoreszenz (Fluoreszenz der Probe – Fluoreszenz des Blindwertes)

dsDNA doppelsträngige DNA

2,1 Faktor, der berücksichtigt, dass Hoechst 33258 stärker an doppelsträngige DNA als an einzelsträngige DNA bindet

$$\text{DNA-SB pro Zelle} = -\ln \frac{\text{dsDNA}_{\text{Probe}}}{\text{dsDNA}_{\text{Kontrolle}}} \times 16.666 \quad (6)$$

16.666 Korrekturfaktor (bestimmt durch Kalibrierung mittels Röntgenstrahlung)

$$\text{DNA-SB pro } 10^6 \text{ BP} = \frac{\text{DNA-SB pro Zelle}}{6000} \quad (7)$$

6000 Faktor zur Normierung auf  $1 \times 10^6$  Basenpaare

Die Analysen zu den DNA-Reparaturkinetiken wurden zum Teil in Zusammenarbeit mit Herrn Lukas Stark im Rahmen seiner wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt.

## 4.8 Quantifizierung von Mikrokernen mittels FACS

Die Induktion von Mikrokernen wurde am *Fluorescence Accelerated Cell Sorter* (FACS) bestimmt. Diese Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Mareike Kunzmann im Zuge ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt.

### Versuchsansatz

Es wurden pro Probe  $5 \times 10^4$  HeLa S3-Zellen in 1 mL DMEM in Doppelbestimmung in 24-Well-Platten ausgestreut und für 24 h anwachsen gelassen. Nach Inkubation mit der Testsubstanzlösung wurde 24 h mit frischem DMEM nachinkubiert. Die Platten wurden 20 min auf Eis gekühlt und nach Absaugen des Mediums mit 300  $\mu$ L kalter Färbelösung (8  $\mu$ g/mL Ethidiummonoazidbromid in Puffer) unter einer 1000 Watt-Kaltlichthalogenlampe 15 min behandelt. Dadurch wurde die DNA apoptotischer und nekrotischer Zellen rot gefärbt.

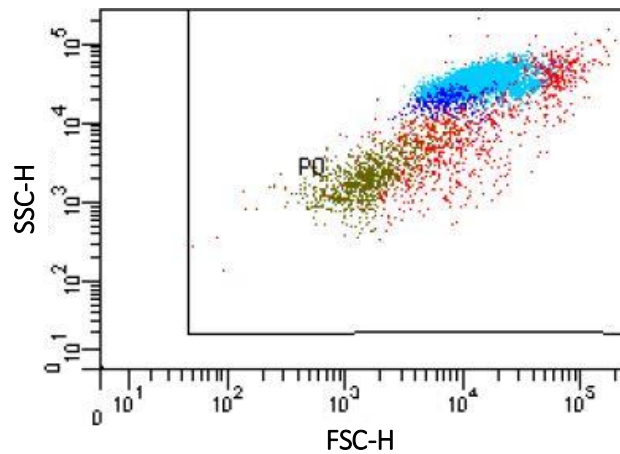
### Zelllyse und Färbung intakter Zellen

Nach Waschen der Zellen mit Puffer wurden pro Well 500  $\mu$ L Lyselösung A hinzupipettiert und für 1 h bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Das darin enthaltene SYTOX Green färbte die DNA intakter sowie nekrotischer und apoptotischer Zellen, einschließlich der Mikrokerne, grün. Es wurden 500  $\mu$ L der Lyselösung B hinzugefügt und weitere 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach Überführen der Zellsuspension in ein FACS-Tube wurden die Proben am Durchflusszytometer LSR Fortessa analysiert.

### Auswertung

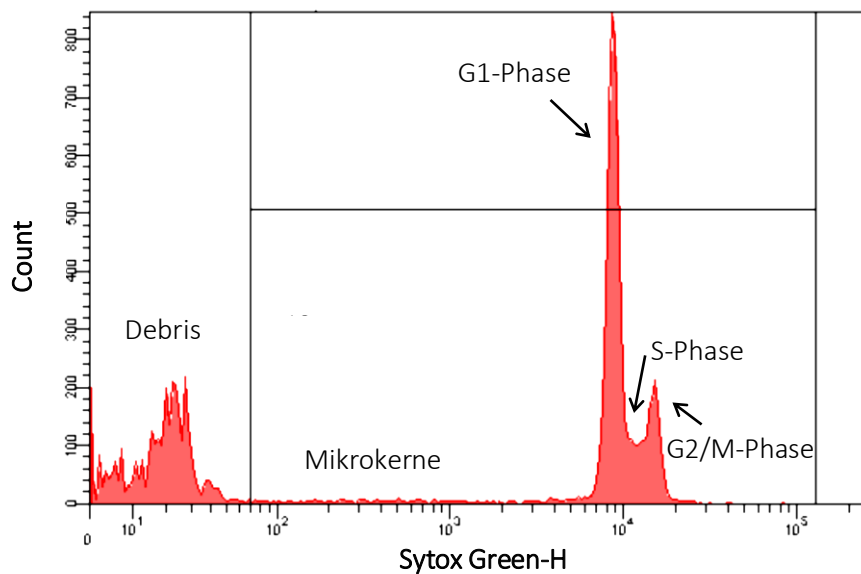
Durch das Setzen verschiedener Gates nach diversen Parametern wurden lediglich die Mikrokerne einzelner und intakter HeLa S3-Zellen ausgewertet. Im ersten Graphen (Abbildung 8) wurde das Seitwärtsstreulicht (SSC) gegen das Vorwärtsstreulicht (FSC) aufgetragen. Durch das Setzen eines Gates wurden lediglich die Zellkerne berücksichtigt, die ein bestimmtes Verhältnis von Größe zu Granularität aufwiesen, um nichtzelluläre Bestandteile aus der Analyse zu entfernen.





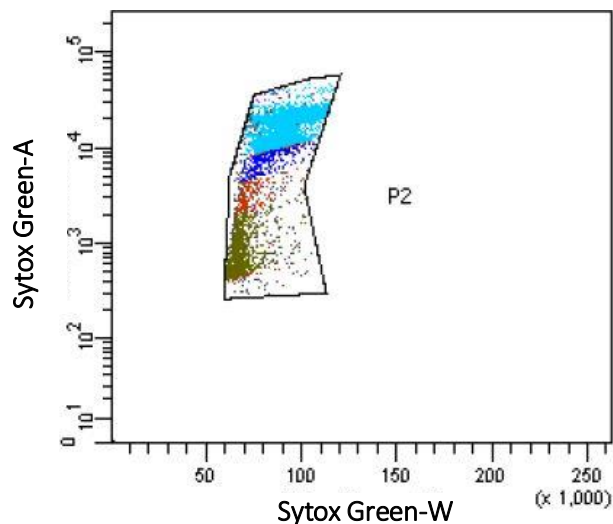
**Abbildung 8: Durchflusszytometrische Gating-Prozedur zum Ausschluss nichtzellulärer Bestandteile aus der weiteren Analyse.** Aufgetragen sind das Vorwärtsstreuung (FSC) gegen das Seitwärtsstreuung (SSC).

Des Weiteren wurde die Anzahl der Events gegen die Fluoreszenzintensität von SYTOX Green aufgetragen (Abbildung 9). Es wurde ein Gate gesetzt, um den Zelldebris von der Analyse auszuschließen. In diesem Graphen sind die Mikrokerne bereits sichtbar; sie weisen im Vergleich zu den intakten Zellkernen aufgrund ihrer geringen Größe ein Hundertstel des Fluoreszenzsignals auf. Weiterhin wurden Daten über die Zellzyklusverteilung erhalten.



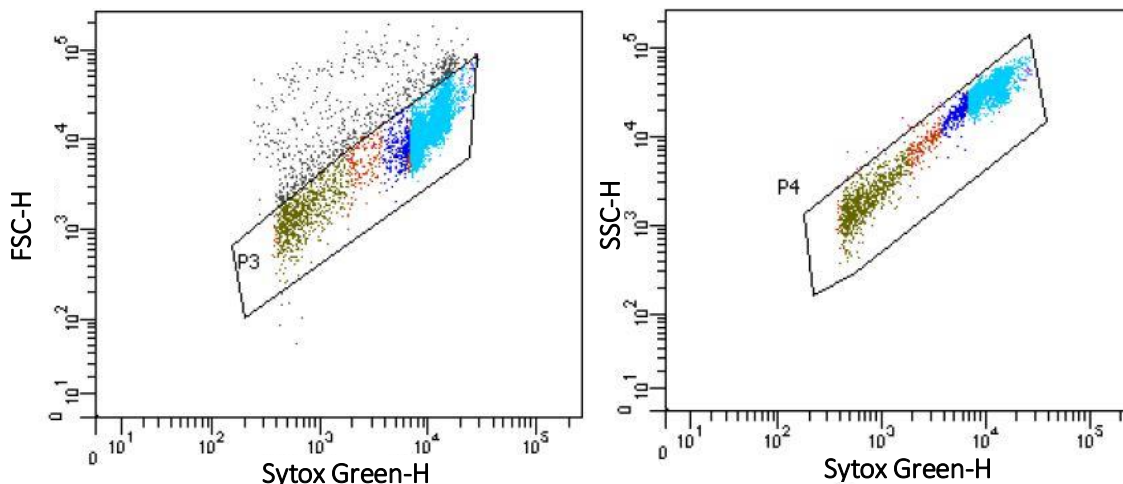
**Abbildung 9: Durchflusszytometrische Gating-Prozedur zum Ausschluss von Zelldebris aus der weiteren Analyse.** Aufgetragen ist die Anzahl der Events gegen die Fluoreszenzintensität von SYTOX Green.

Damit die Zelldupletten von der Analyse ausgeschlossen werden, wurde nachfolgend die SYTOX Green Weite (W) gegen die SYTOX Green Fläche (A) aufgetragen und ein entsprechendes Gate gesetzt (Abbildung 10). Zellagglomerate weisen eine höhere Fluoreszenzintensität auf, sodass sie von einzelnen Zellen unterschieden werden können.



**Abbildung 10:** Durchflusszytometrische Gating-Prozedur zur Auswahl vereinzelter Zellen für die weitere Analyse. Aufgetragen sind die Fluoreszenzintensität von SYTOX Green der Fläche (A) gegen die Weite (W).

Weiterhin wurde der FSC sowie der SSC gegen die SYTOX Green-Fluoreszenzintensität aufgetragen (Abbildung 11). Es wurde darauf geachtet, dass nur Zellen mit einheitlichem Verhältnis von Größe sowie Granularität zu Fluoreszenzintensität weiter analysiert wurden.



**Abbildung 11:** Durchflusszytometrische Gating-Prozedur zur Auswahl intakter Zellen für die weitere Analyse. Aufgetragen sind FSC sowie SSC gegen die SYTOX-Green-Fluoreszenzintensität. Es wurden lediglich Zellen mit einem ähnlichen Verhältnis von Größe bzw. Granularität zu Fluoreszenzintensität weiter analysiert.

Um nekrotische und apoptotische Zellen auszuschließen, wurde die Fluoreszenzintensität des SYTOX Green gegen die Ethidiummonoazidbromid (EMA)-Fluoreszenzintensität aufgetragen (Abbildung 12). Da EMA lediglich die DNA absterbender Zellen mit einer beschädigten Membran anfärbt, wurden die Events mit einer erhöhten EMA-Fluoreszenzintensität aus der weiteren Analyse ausgeschlossen.

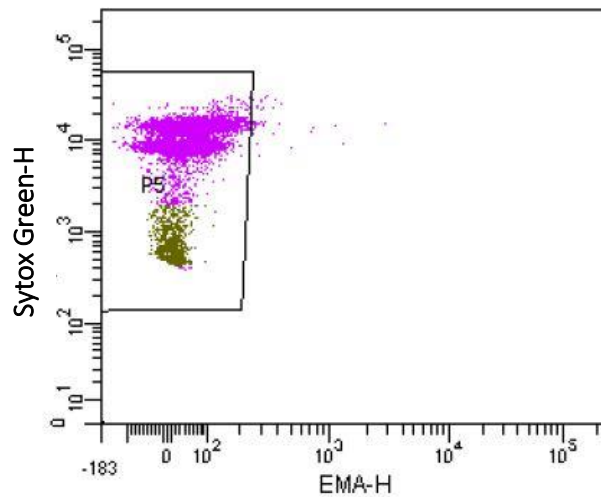


Abbildung 12: Durchflusszytometrische Gating-Prozedur zum Ausschluss von nekrotischen und apoptotischen Zellen aus der weiteren Analyse. Aufgetragen sind die Fluoreszenzintensität von SYTOX Green gegen die von EMA.

Zuletzt wurde das FSC gegen die Fluoreszenzintensität des SYTOX Greens aufgetragen (Abbildung 13). Anhand der Größe wurden die Gates für die Mikrokerne, die hypodiploiden Zellkerne sowie die intakten Zellkernen gesetzt.

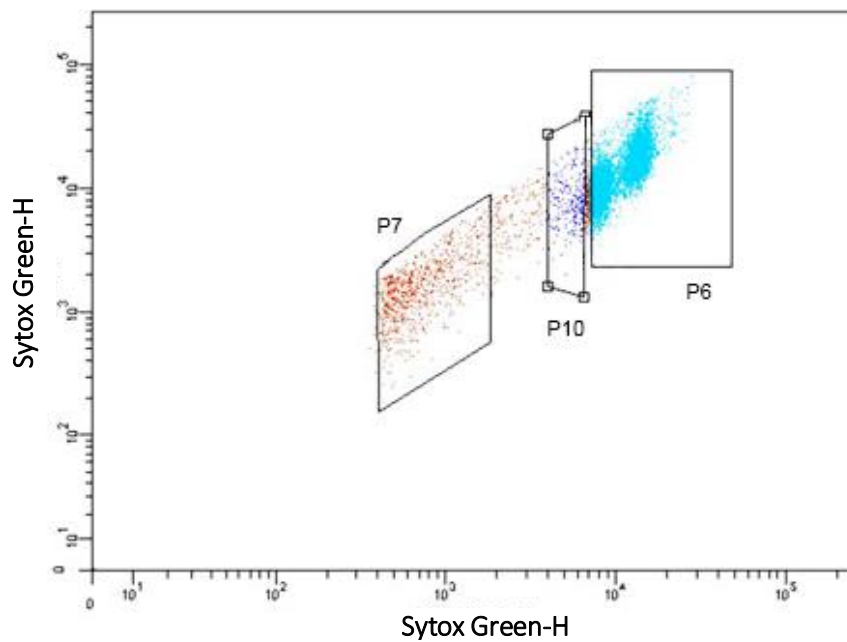


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Ermittlung der Mikrokerne und hypodiploiden Zellkerne. Aufgetragen sind das FSC gegen die Fluoreszenzintensität des SYTOX Greens. Die Anzahl der Mikrokerne (P7), hypodiploiden Zellkerne (P10) und der intakten Zellkerne (P6) wurden quantitativ durch Setzen der Gates ermittelt.

## 4.9 Bestimmung der Mutagenität mittels PIG-A Assay

Mittels des PIG-A Assays können mutierte Zellen anhand ihrer veränderten Zelloberfläche detektiert werden. Dies lässt sich am Status des Glykosylphosphatidyl-Ankers (GPI-Ankers) erkennen, welcher durch eine Mutation im PIG-A Gen verloren geht. Ist der GPI-Anker in einer Zelle vorhanden, so werden diverse Proteine daran gebunden. Im Fall einer Mutation im PIG-A Gen entfällt die Biosynthese des GPI-Ankers und dementsprechend können keine Proteine an den Anker binden. Durch immunfluorimetrische Anfärbung der Proteine CD55 und CD59 kann so auf das Vorhandensein des GPI-Ankers und damit auf ein mutagenes Potential von Testsubstanzen geschlossen werden (Krüger et al., 2015). Diese Analysen wurden zum Teil in Zusammenarbeit mit Frau Mareike Kunzmann im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt.

### Abreicherung von GPI(-) Zellen

Um im PIG-A Assay in der Negativkontrolle eine möglichst geringe Anzahl an GPI-defizienten (GPI(-)) TK6-Zellen zu haben, wurde eine Abreicherung von TK6-Zellen durchgeführt. Hierfür erfolgte eine Inkubation des Sekundärantikörpers *Goat-anti-mouse* IgG (5 µg in 1 mL PBS) jeweils in zwei 40 mm *Cellstar*-Zellkulturschalen über Nacht, um die Bindung des Antikörpers an die Zellkulturschale zu gewährleisten. Das PBS wurde abgesaugt und die Zellkulturschale zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit je 1 mL Rinderserumalbumin-Lösung (BSA) bei Raumtemperatur 1 h geschwenkt. Nach Absaugen wurde eine Zellkulturschale mit 1 mL *Mouse-anti-human* CD59-Antikörper-Lösung (5 µg in 1 mL PBS) und die andere mit 1 mL *Mouse-anti-human* CD55-Antikörper-Lösung für 1 h inkubiert. Es wurde mit 1 mL PBS durch vorsichtiges Schwenken gewaschen und  $1 \times 10^6$  TK6-Zellen in 1 mL RPMI-1640 in die Zellkulturschale gegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde der Überstand abgesaugt und viermal mit je 1 mL RPMI-1640 vorsichtig gewaschen. Die an der Zellkulturschale haftenden Zellen wurden in 1 mL RPMI-1640 resuspendiert und in die zweite Zellkulturschale nach Waschen mit 1 mL PBS überführt. Im Anschluss erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37° und erneutes viermaliges Waschen mit je 1 mL RPMI-1640. Nach Resuspension der abgereicherten TK6-Zellen wurden diese in eine 50 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit 10 mL RPMI-1640 überführt. Das Ablösen der Zellen von der Zellkulturschale erfolgte zwei weitere Male mit je 1 mL RPMI-1640. Anschließend wurden die Zellen bis zu einer Zelldichte

von  $0,5 - 1,0 \times 10^6$  Zellen/mL kultiviert und für die weiteren Versuche kryokonserviert (Kapitel 4.1.3).

### Versuchsansatz

Für jeden PIG-A Versuchsansatz wurden GPI(-) abgereicherte TK6-Zellen verwendet. Für die Durchführung der Abreicherung siehe Kapitel 4.9. Es wurden pro Probe zwei Zellsuspensionen von  $5 \times 10^6$  TK6-Zellen in 10 mL RPMI-1640 in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche hergestellt und mit 100 µL der Testsubstanzlösungen inkubiert. Die Zellsuspension wurde in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 250 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen mit 4 mL gewaschen und die Zellzahl in 3 mL RPMI-1640 ermittelt. Im Anschluss wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 25 mL RPMI-1640 bzw.  $1 \times 10^6$  Zellen in 35 mL RPMI-1640 je nach Rhythmus der Subkultivierung überführt.

### Subkultivierung

Am Tag 1 wurde die Inkubation durchgeführt und anschließend wurden die TK6-Zellen für einen Zeitraum von 10 Tagen in einem Abstand von jeweils 2 – 3 Tagen subkultiviert, wobei  $2 \times 10^6$  Zellen in 25 mL RPMI-1640 bzw.  $1 \times 10^6$  Zellen in 35 mL RPMI-1640 weitergesetzt wurden.

### Probenaufarbeitung

Nach 10-tägiger Subkultivierung wurden die Zellen resuspendiert und die Zellzahl mittels Casy® bestimmt. Es wurden  $8 \times 10^6$  Zellen in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt, 5 min bei 250 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 3 mL kaltem Färbepuffer aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und  $2 \times 10^6$  Zellen in ein 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Nach weiterer Zentrifugation für 5 min bei 250 g und 4°C wurde der Überstand vorsichtig abgekippt und das Zellpellet in 150 µL Färbepuffer aufgenommen.

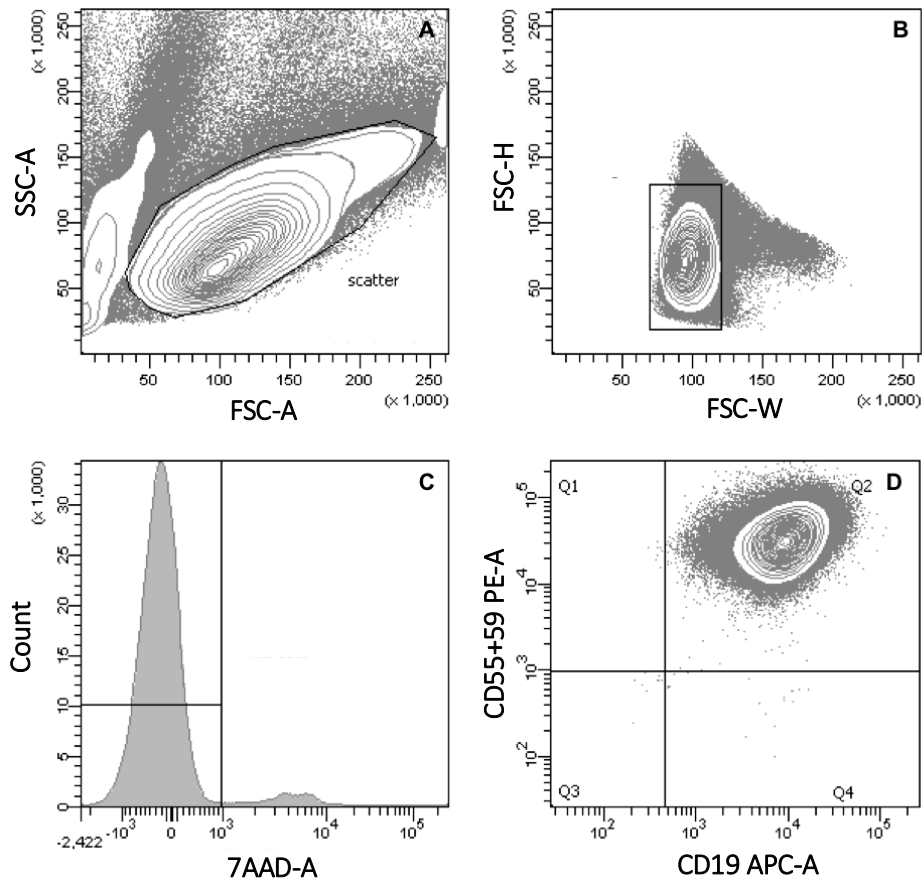
### Antikörperfärbung und Färbung toter Zellen

Es wurden je Probe 15 µL Antikörperlösung (Anti CD55-PE, Anti CD59-PE und Anti CD19-APC) hinzupipettiert, für 20 sek gevortext und 15 min auf Eis im Dunkeln unter Schwenken inkubiert. Die Proben wurden für 20 sek bei 250 g und 4°C zentrifugiert und weitere 15 min auf Eis im Dunkeln geschwenkt. Die Proben wurden mit 1 mL Färbepuffer gewaschen, 40 sek gevortext,

5 min bei 250 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dies wurde ein zweites Mal wiederholt. Die Proben wurden in 500 µL 7-Aminoactinomycin D (7-AAD)-Puffer aufgenommen und 20 sek gevortext. Nach 8 min Inkubation im Dunkeln wurde 5 min bei 250 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen.

### Fixierung und Analyse

Die Zellpellets wurden mit 200 µL Fixierungspuffer versetzt und sofort 3 sek gevortext um die Verklumpung der Zellen zu vermeiden. Anschließend wurden die Proben resuspendiert, in ein FACS-Tube überführt und am Durchflusszytometer analysiert. Die Flussrate lag dabei bei circa  $1 \times 10^4$  Events/s. Insgesamt wurde die Messung solange durchgeführt, bis  $1 \times 10^6$  nicht mutierte Zellen ausgezählt waren. In Abbildung 14 ist das Vorgehen der Auswertung abgebildet. Zunächst wurde der SSC gegen den FSC aufgetragen (Abbildung 14A) und Zellen mit geeigneter Größe und Granularität ausgewählt. In Abbildung 14B wurden die Weite und die Höhe der Zellwolke bestimmt um Zellagglomerate von der weiteren Analyse auszuschließen. Weiterhin wurden nekrotische und apoptotische Zellen, welche ein hohes 7-AAD-Fluoreszenzsignal aufweisen, aus der Analyse raugenommen (Abbildung 14C). Im letzten Schritt (Abbildung 14D) wurde das Fluoreszenzsignal des PE der CD55- und CD59-Antikörper gegen das Fluoreszenzsignal des APC des CD19-Antikörpers aufgetragen. Da das Protein CD19 unabhängig des GPI-Ankers an die Zelloberfläche bindet, wurde gewährleistet, dass Zellschrott, der kein PE-Signal aufweist, nicht als falsch positiv gewertet wird. Events, die in Quadrant 1 und 3 lagen, wurden als Zelldebris betrachtet. In Quadrant 2 wurden die nicht mutierten, also GPI(+) Zellen, und in Quadrant 4 die mutierten, also GPI(-) Zellen, ausgezählt.



**Abbildung 14: Auswertung der GPI(-)-Zellen durch das geeignete Setzen von Gates.** A: Aufgetragen ist der SSC gegen den FSC. Es wurde ein Gate gesetzt, sodass Zellen mit einer gewissen Größe und Granularität ausgewählt wurden. B: Aufgetragen ist hier der FSC der Höhe gegen den FSC der Weite. Durch das Setzen eines geeigneten Gates wurden Zelldupletten ausgeschlossen. C: Auftragung von den gezählten Events gegen die Fluoreszenzintensität des 7-AAD. Da 7-AAD nur an apoptotische und nekrotische Zellen bindet, wurden Events mit einem zu hohen 7-AAD-Signal für die weitere Analyse ausgeschlossen. D: Aufgetragen ist die PE-Fluoreszenzintensität der CD55- und CD59-Antikörper gegen die Fluoreszenzintensität des APC des CD19-Antikörpers. Während sich in Quadrant 1 und 3 Zelldebris befindet, sieht man in Quadrant 2 nicht mutierte (GPI(+)) und in Quadrant 4 mutierte Zellen (GPI(-)).

#### 4.10 Genexpressionsanalysen mittels *High-Throughput RT-qPCR*

Die Genexpressionsanalysen wurden nach der Methode von Fischer und Kollegen durchgeführt (Fischer et al., 2016).

##### Versuchsansatz

Pro Probe wurden  $5 \times 10^5$  HeLa S3-Zellen in ein 60 mm Zellkulturschale ausgestreut und für 24 h anwachsen gelassen. Nach Inkubation mit den Testsubstanzen wurden die Zellen trypsinisiert, in 3 mL PBS/10 % FKS aufgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Im

Anschluss wurde 3 min bei 1300 rpm bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 mL PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, abermals 3 min bei 1300 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

### Isolierung und Quantifizierung von RNA

Alle Arbeitsflächen und verwendete Lösungen wurden mit 80 %igem Ethanol desinfiziert und Kunststoffpipettenspitzen autoklaviert. Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem NucleoSpin® Plus Kit nach Herstellerangaben.

Zunächst wurde das Zellpellet in 350 µL Lysepuffer resuspendiert, gevortext und auf eine gDNA *Removal* Säule überführt. Nach 30 s Zentrifugation bei 11.000 g befand sich die RNA im Eluat. Die gDNA, die auf der Säule verblieb, wurde verworfen. Der RNA wurden 100 µL *Binding Solution* zugegeben und anschließend resuspendiert. Das Zelllysate wurde auf eine zweite Säule gegeben, auf der die RNA gebunden wurde. Durch Zentrifugation für 20 s bei 11.000 g wurden störende Substanzen abgetrennt. Es wurden 200 µL Waschpuffer 1 hinzupipettiert, 20 s bei 11.000 g zentrifugiert und das Ganze mit 600 µL Waschpuffer 2 sowie ein drittes Mal mit 250 µL Waschpuffer 2 unter denselben Zentrifugationsbedingungen wiederholt. Die Säule wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben und die gebundene RNA mit 30 µL RNase-freiem Wasser mittels Zentrifugation (1 min, 11.000 g) eluiert. Zur Steigerung der Ausbeute wurde das Eluat ein weiteres Mal auf die Säule gegeben und zentrifugiert (1 min, 11.000 g). Die Eluate wurden bei -80°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

Der Gehalt an RNA in der Probe wurde mittels NanoDrop Photometer bestimmt. Hierfür wurden 2 µL Probe auf eine NanoQuant-Platte pipettiert, die Absorption bei 269 nm und 280 nm gemessen und der Absorptionsquotient von 260/280 nm ermittelt. Um eine optimale Reinheit zu gewährleisten, musste jede Probe einen Absorptionsquotienten von über 2,0 aufweisen.



Umschreibung in cDNA

Die Reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte mittels *qScript cDNA Synthesis* Kit. Pro Probe wurden 1 µg RNA mit 5 µL des Mastermixes (1 µL *iScript Reverse Transcriptase* + 4 µL *Reaction Mix* (5x)) versetzt, mit nukleasefreiem Wasser auf 20 µL aufgefüllt, gevortext und zentrifugiert. Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte im *Thermocycler* mit einem entsprechenden Temperaturprogramm (Tabelle 1).

Tabelle 1: Temperaturprogramm der cDNA-Synthese.

Zeitspanne (min)	Temperatur (°C)
5	25
30	42
5	85
Endtemperatur	4

Die erhaltene cDNA wurde bis zur Präamplifikation bei -20°C gelagert.

Präamplifikation (*Specific Target Amplification*)

Um eine ausreichende *template*-Menge zu gewährleisten, wurden die Zielgene durch eine Präamplifikation (STA) gemäß Herstellerangaben vervielfältigt. Als erstes wurden die Primer in einem PCR-Cap gepoolt, mit einem DNA-Suspensionspuffer auf 500 nM (*Pooled Primer Mix*) verdünnt und bei -20°C gelagert. Dabei setzte sich ein Reaktionsansatz wie in Tabelle 2 beschrieben zusammen. Als Kontrolle wurden eine Wasser-Kontrolle ohne *template* (NTC-STA) sowie eine nicht umgeschriebene RNA-Kontrolle mitgeführt.

Tabelle 2: Ansatz der Präamplifikation.

	Volumen (µL)
2 x TaqMan PreAmp Master Mix	2,50
Pooled Primer Mix	0,50
PCR-zertifiziertes H <sub>2</sub> O	0,75
cDNA-Probe	1,25

Die Proben wurden resuspendiert, zentrifugiert, in den *Thermocycler* gestellt und mit dem in Tabelle 3 aufgeführten Temperaturprogramm präamplifiziert.

Tabelle 3: Temperaturprogramm der Präamplifikation.

	Zeit	Temperatur (°C)
initiale Denaturierung	10 min	95
Denaturierung	15 s (12x)	95
Annealing und Elongation	4 min (12x)	60
Endtemperatur		4

Zur Entfernung der ungebundenen Primer erfolgte ein Exonuklease I Verdau. Hierfür wurden 0,4 µL Exonuklease I (Exo I, 20 *units*/µL) mit 0,2 µL Exonuklease I Reaktionspuffer und 1,4 µL PCR-zertifiziertem Wasser zusammen pipettiert, die Probe mit 2 µL der verdünnten Exonuklease I Lösung versetzt (Endkonzentration 4 *units*/µL) und durchmischt. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation und der Verdau im *Thermocycler* nach dem Temperaturprogramm in Tabelle 4.

Tabelle 4: Temperaturprogramm des Exonuklease I-Verdau.

	Zeit (min)	Temperatur (°C)
Verdau	40 min	37
Inaktivierung	15 min	80
Endtemperatur		4

Zuletzt wurden die Proben mit TE-Puffer 5-fach verdünnt, gevortext und zentrifugiert. Die Proben wurden bis zu zwei Tage bei -20°C gelagert.

#### Primer- und Probenvorbereitung

Die *forward* und *reverse* Primer-Paare wurden auf 5 µM verdünnt. Hierfür wurden je 2,5 µL Primer-Paar mit 25 µL 2x *Assay Loading Reagent* und 22,5 µL DNA Suspensionspuffer versetzt und durchgemischt. Weiterhin wurde eine Kontrolle (*no reaction control*, NRC) mitgeführt, bei der statt Primer-Paar PCR-zertifiziertes Wasser verwendet wurde. Die Primer-Paar-Lösungen wurden bei -20°C gelagert.

Je 2,25 µL der STA und Exonuklease I behandelten Proben wurden mit 2,5 µL 2x *SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low ROX* und 0,25 µL 20x *DNA Sample Loading Reagent* versetzt und durchmischt und zentrifugiert. Als Kontrolle wurde eine nicht präamplifizierte Wasser-Kontrolle ohne template (*no template control*, NTC) mitgeführt.

96 x 96 Dynamic Array IFC qPCR Analyse

Die Vorbereitung und Beladung des *dynamic array IFC (integrated fluidic circuit)* wurde nach Herstellervorgaben durchgeführt. Die Akkumulatoren des *dynamic array* wurden mit 150 µL Kontrollfluid befüllt und die Schutzfolie am Chipboden entfernt. Der Chip wurde in den *IFC Controller HX* gestellt, das *Prime (136x)*-Programm gestartet und somit das Fluid in die Chip-Mikrokanäle geleitet. Innerhalb von 2 h wurden je 5 µL Proben- und Primer-Reaktionsgemische luftblasenfrei in den Chip pipettiert. Mittels *Load Mix (136x)*-Programm wurden die Proben und Primer in den Reaktionskammern gemischt. Eventuell anhaftende Staubpartikel wurden mittels Tesafilm vom Chip entfernt und dieser im Anschluss in das BioMark™-System überführt. Die qPCR wurde mit dem Temperaturprogramm in Tabelle 5 durchgeführt.

Tabelle 5: Temperaturprogramm der qPCR.

	Zeit (s)	Temperatur (°C)
Thermale Durchmischung	2400	70
Thermale Durchmischung	30	60
Hot Start	60	95
Denaturierung	5 (30x)	96
Annealing und Elongation	20 (30x)	60

Die Schmelzkurvenanalyse startete bei 60°C für 3 s, wobei sich die Temperatur alle 3 s um 1°C bis auf 95°C erhöhte.

Datenanalyse

Die Auswertung wurde mittels der Software *Fluidigm Real-Time PCR Analysis* durchgeführt. Zunächst wurde anhand des passiven Referenzfarbstoffes ROX auf gleichmäßige Beladung der Beladungskammern geprüft. Die *Cycle of Quantification*-Werte ( $C_q$ -Werte) der Zielamplifikate wurden mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen® bestimmt, wobei für die Präzisierung der  $C_q$ -Werte die Schwellenwert-Methode zur Basislinienkorrektur angewandt wurde.

Zur Übersicht wurden die Daten in Form einer *Heat Map* dargestellt. Dabei wurden die Gene als Spalten, die Proben als Reihen und die  $C_q$ -Werte anhand einer Farbskalierung

veranschaulicht. Gelbe und rote Farbtöne stellten kleine  $C_q$ -Werte dar, wohingegen hohe  $C_q$ -Werte violett und blau abgebildet wurden.

Nach Darstellung der Schmelzkurven wurde die Spezifität der PCR-Reaktionen geprüft. Durch Betrachtung der Negativkontrollen, NoRT, NTC, NTC-STA und NRC, wurde die Bildung von Nebenprodukten, Primer-Dimeren und ein zu hoher gDNA-Hintergrund ausgeschlossen. Die Daten der *Heat Map* wurden exportiert und weiter mit Hilfe der *GenEx*-Software verarbeitet. Hierfür wurden mit den Programm-Tools *geNorm* und *NormFinder* geeignete Referenzgene selektiert. Zur Verfügung standen hierbei *ACTB*, *BSM*, *GAPDH*, *GUSB* und *HPRT1*. Im Anschluss wurden die relativen Transkriptmengen nach Anwendung der  $\Delta\Delta C_q$ -Methode (siehe Gleichungen 8-10) relativ zur Kontrolle dargestellt. Dabei wurde die Expression der Kontrolle auf 1 gesetzt (Livak und Schmittgen 2001; Pfaff 2001). Diese Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Bettina Strauch und Frau Tizia Matthäus durchgeführt.

$$\Delta C_q = C_q \text{ Zielgen} - C_q \text{ Referenzgen} \quad (8)$$

$$\Delta\Delta C_q = \Delta C_q \text{ Behandlung} - \Delta C_q \text{ Kontrolle} \quad (9)$$

$$\text{Verhältnis} = 2^{-\Delta\Delta C_q} \quad (10)$$

### 4.11 Statistik

Neben der deskriptiven Statistik wurde ab drei unabhängigen Stichproben nach Levene-Statistik auf Varianzenhomogenität getestet. Mittels einfaktorieller Varianzanalyse (Ivanova et al.) wurden die Unterschiede zwischen den Mittelwerten ermittelt. Dabei wurde bei Varianzenhomogenität der Post-Host-Test Dunnett's T und bei Varianzeninhomogenität Dunnett's T3 verwendet. Wurden Unterschiede zwischen nur zwei Stichproben analysiert, wurde im Rahmen der induktiven Statistik die Unterschiede mittels T-Test untersucht.

## 5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

PARP-1 ist ein wichtiges Protein der DNA-Einzelstrangbruchreparatur, welches insgesamt drei Zinkfinger-Strukturen aufweist. Die Affinität des ersten Zinkfingers ist im Gegensatz zu denen des zweiten und dritten Zinkfingers so gering, dass dieser unter normalen zellulären Bedingungen vermutlich unbesetzt vorliegt (Bossak et al., 2015). Im Fall von oxidativem Stress, welcher eine Erhöhung der zellulären „freien“ Zinkkonzentration zur Folge hat, wäre es denkbar, dass der erste Zinkfinger mit Zn(II) besetzt und PARP-1 aktiviert wird. Deshalb wurden im folgenden die Auswirkungen des Zinkstatus auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung und weiterführend auf die Reparaturkinetik von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Einzelstrangbrüchen sowie die genomische Stabilität genauer betrachtet. Neben einer Vielfalt von oxidativen DNA-Basenschäden induziert H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms am Zuckerphosphat-Rückgrats vor allem DNA-Einzelstrangbrüche, weshalb es in dieser Arbeit als Modelllesion verwendet wurde.

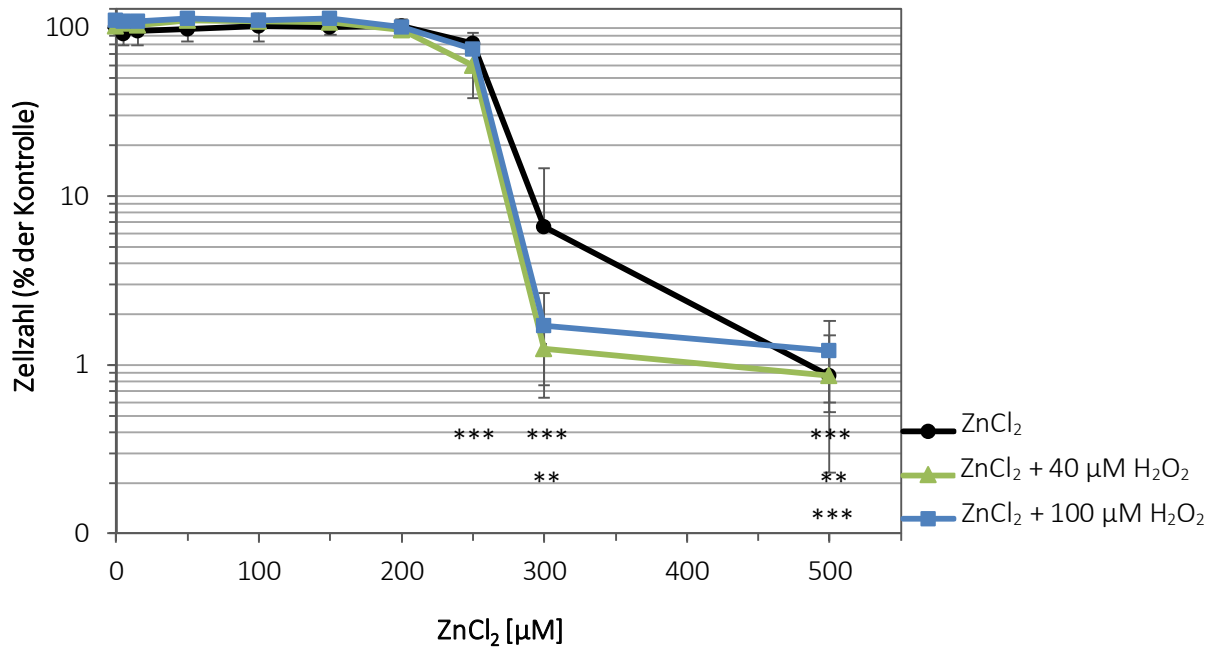
### 5.1 Untersuchungen zum zellulären Zinkstatus

#### 5.1.1. ZYTOTOXIZITÄTSUNTERSUCHUNGEN

Zunächst wurde anhand der Zytotoxizität ein geeigneter Konzentrationsbereich für die optimale Inkubationskonzentration von Zink in HeLa S3-Zellen ermittelt. Als Maß der akuten Zytotoxizität wurde die Zellzahl und für längerfristig zytotoxische, proliferationshemmende Effekte die Koloniebildungsfähigkeit untersucht.

#### Untersuchung der Zellzahl von HeLa S3-Zellen

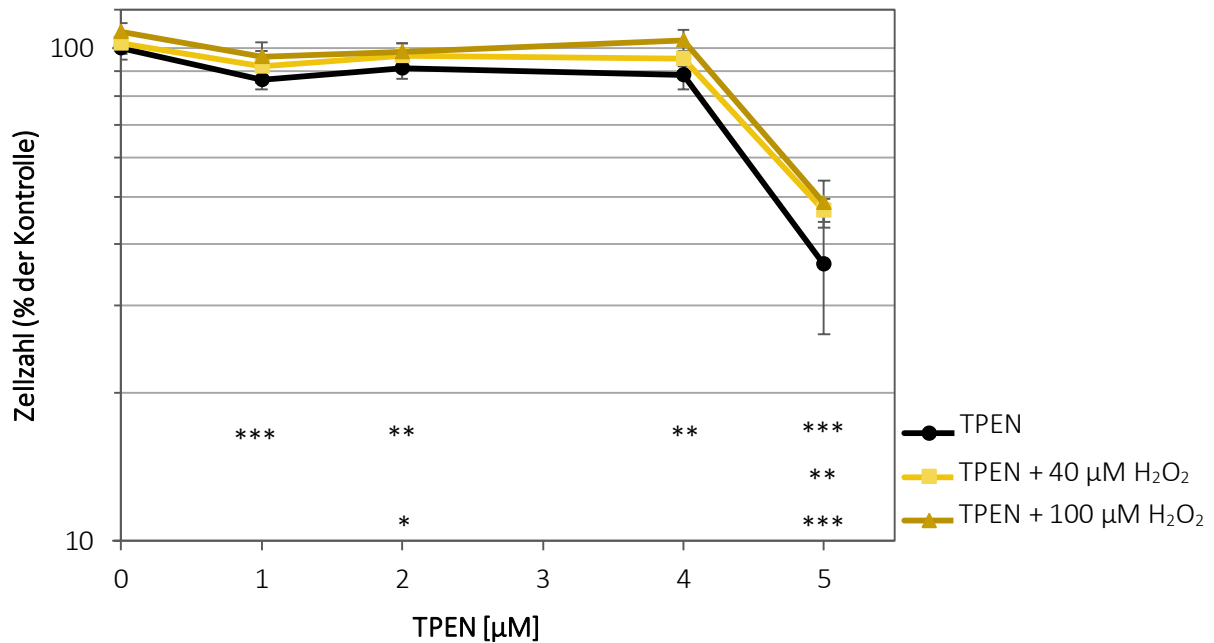
Die Zellen wurden für jeweils 24 h mit 5 – 500 µM ZnCl<sub>2</sub> für die Generierung einer normalen bis überhöhten Zinkversorgung behandelt (Abbildung 15). Die basale Versorgung mit Zink in der Kontrolle betrug 1,3 µM durch die Inkubation von DMEM mit FKS. Es zeigte sich ein leicht zytotoxischer Effekt nach Behandlung mit 250 µM ZnCl<sub>2</sub>, wobei die Zellzahl circa 80 % der Kontrolle betrug. Ab 300 µM war dagegen ein deutlicher Abfall der Zellzahl auf circa 7 % der Kontrolle zu verzeichnen.



**Abbildung 15: Einfluss von ZnCl<sub>2</sub> bzw. ZnCl<sub>2</sub> mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Zellzahl von HeLa S3-Zellen.** Die Zellen wurden 24 h mit ZnCl<sub>2</sub> vorinkubiert und 5 min mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 koinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von mindestens sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test (\*\*p ≤ 0,01; \*\*\*p ≤ 0,001).

Der abrupte Abfall der Zellviabilität nach Behandlung von HeLa-Zellen mit 300 µM ZnCl<sub>2</sub> wurde bereits in der Literatur beschrieben (Bozym et al., 2010). Weiterhin wurde in Jurkat-Zellen eine deutliche und abrupte Abnahme der Zellviabilität nach 24 h Inkubation mit 200 µM ZnSO<sub>4</sub> beobachtet (Haase et al., 2015). Für weiterführende Versuche wurden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte DNA-Einzelstrangbrüche als Modellläsionen verwendet, sodass die zytotoxische Wirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ebenfalls abgeklärt wurde. Die Zugabe von 40 µM bzw. 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 5 min reduzierte die Zellzahl der Kontrolle nicht. Auch die Koinkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wirkte sich nicht auf die akute zytotoxische Wirkung von ZnCl<sub>2</sub> aus.

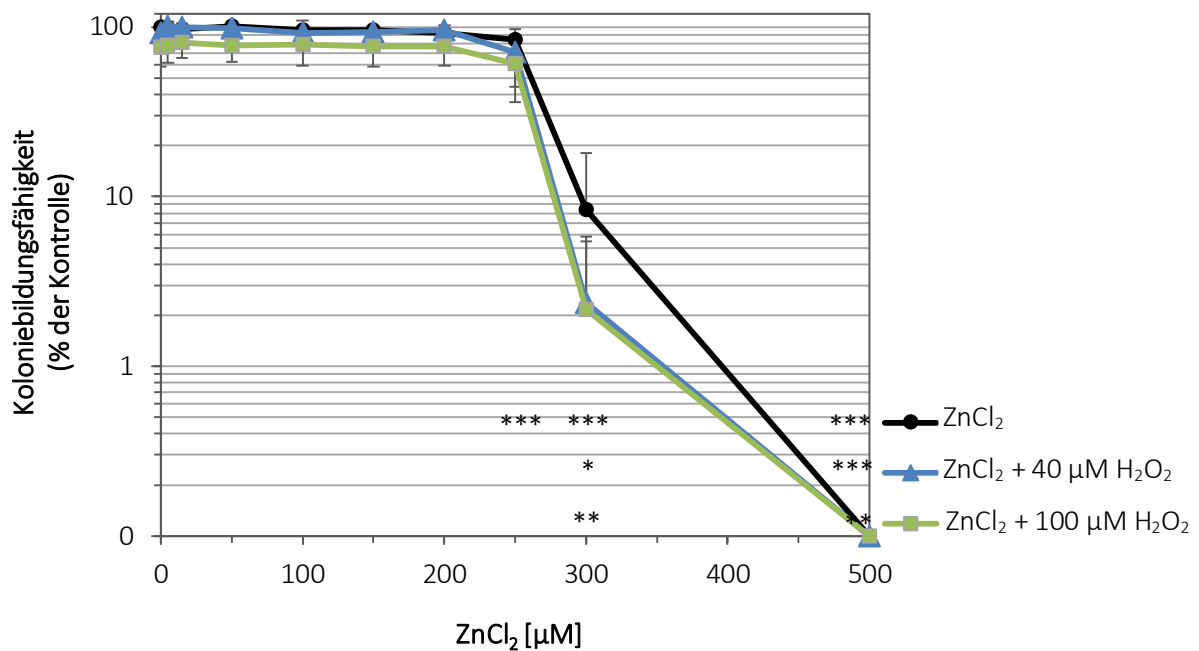
Zur Generation eines Zinkmangels wurden die HeLa S3 Zellen 24 h mit 4 – 6 µM TPEN, einem membranpermeablen Zinkchelator, behandelt (Abbildung 16). Dabei reduzierten 1 µM bis 4 µM TPEN die Zellzahl auf durchschnittlich 90 % der Kontrolle, während ab 5 µM TPEN die Zellviabilität auf circa 40 % der Kontrolle gesenkt wurde. Eine Koinkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wirkte sich nicht auf die TPEN-induzierte Zellzahlabnahme aus.



**Abbildung 16: Einfluss von TPEN bzw. TPEN mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Zellzahl von HeLa S3-Zellen.** Die Zellen wurden 24 h mit TPEN vorinkubiert und 5 min mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kokubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von mindestens sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T3 Post-Hoc-Test (\*p ≤ 0,05; \*\*p ≤ 0,01; \*\*\*p ≤ 0,001).

#### Untersuchung der Koloniebildungsfähigkeit von HeLa S3-Zellen

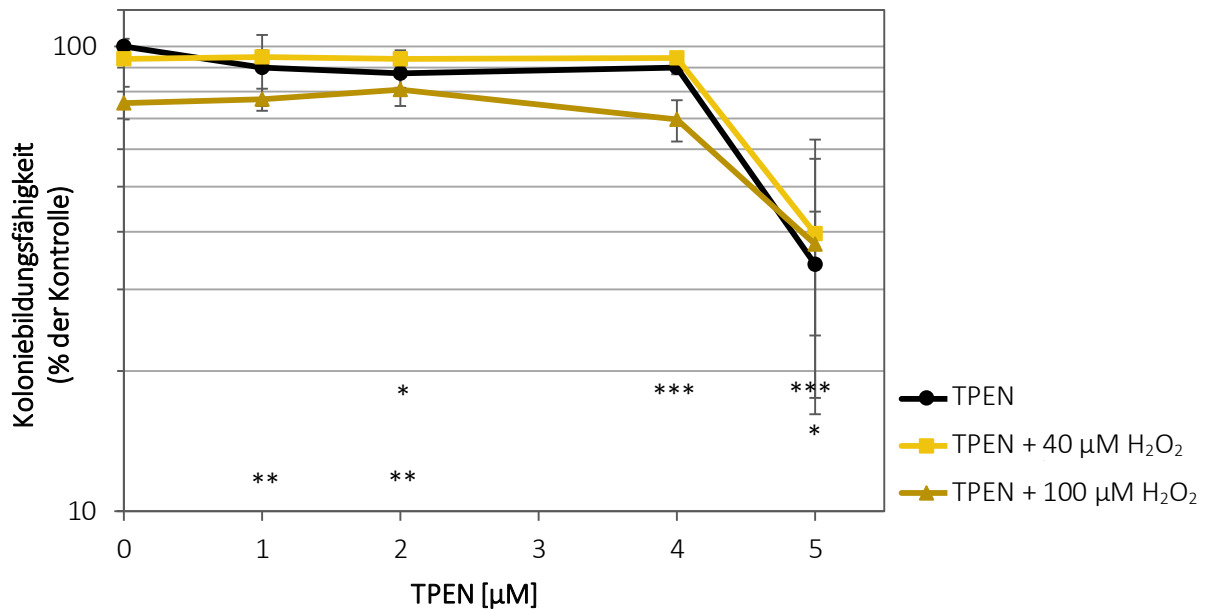
Als Maß für die chronische Toxizität von ZnCl<sub>2</sub> wurde die Koloniebildungsfähigkeit herangezogen (Abbildung 17). ZnCl<sub>2</sub> zeigte bis zu einer Konzentration von 200 µM keine Auswirkung auf die Koloniebildungsfähigkeit, während 250 µM ZnCl<sub>2</sub> die Koloniezahl auf etwa 85 % im Vergleich zur Kontrolle reduzierte. Eine starke Zytotoxizität wurde erst nach Inkubation mit 300 µM bzw. 500 µM ZnCl<sub>2</sub> erreicht. Eine Inkubation mit 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wirkte nicht zytotoxisch und beeinflusste auch nicht die ZnCl<sub>2</sub>-induzierte Abnahme der Koloniebildungsfähigkeit. Eine Erhöhung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration auf 100 µM führte zu einer Reduktion der Kolonienanzahl auf etwa 75 % der Kontrolle, wobei nach Kokubation mit ZnCl<sub>2</sub> weder eine additive noch eine synergistische Wirkung auf die Zytotoxizität beobachtet wurde.



**Abbildung 17: Einfluss von ZnCl<sub>2</sub> bzw. ZnCl<sub>2</sub> mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Koloniebildungsfähigkeit von HeLa S3-Zellen.** Die Zellen wurden 24 h mit ZnCl<sub>2</sub> vorinkubiert und 5 min mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 koinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von mindestens sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T3 Post-Hoc-Test (\*p ≤ 0,05; \*\*p ≤ 0,01; \*\*\*p ≤ 0,001).

Die Auswirkung einer Zinkdepletion auf die Koloniebildungsfähigkeit wurde in HeLa S3-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 4 – 6 µM TPEN untersucht (Abbildung 18). Die Behandlung mit 1 µM TPEN reduzierte die Koloniebildungshähigkeit um etwa 10 %, während ab 5 µM TPEN die Kolonienzahl auf circa 35 % der Kontrolle gesenkt wurde. Übereinstimmend mit diesen Daten konnte in der Literatur für 1 µM TPEN kein zytotoxischer Effekt, jedoch nach 24-stündiger Inkubation mit 5 µM TPEN eine signifikante Akkumulation der Lactatdehydrogenase (LDH), welche im Fall von Zellschäden freigesetzt wird, in Gill-Zellen ermittelt werden (Chung et al., 2005). Die Inkubation bzw. Koinkubation mit 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wirkte sich nicht auf die Koloniezahl bzw. die TPEN-induzierte Abnahme der Koloniebildungsfähigkeit aus. Erst ab 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde die Zellzahl der Kontrolle auf etwa 75 % gesenkt, wobei sich die Koinkubation mit 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> additiv auf die Zytotoxizität von TPEN auswirkte.





**Abbildung 18: Einfluss von TPEN bzw. TPEN mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Koloniebildungsfähigkeit von HeLa S3-Zellen.** Die Zellen wurden 24 h mit TPEN vorinkubiert und 5 min mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von mindestens sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T3 Post-Hoc-Test (\*p ≤ 0,05; \*\*p ≤ 0,01; \*\*\*p ≤ 0,001).

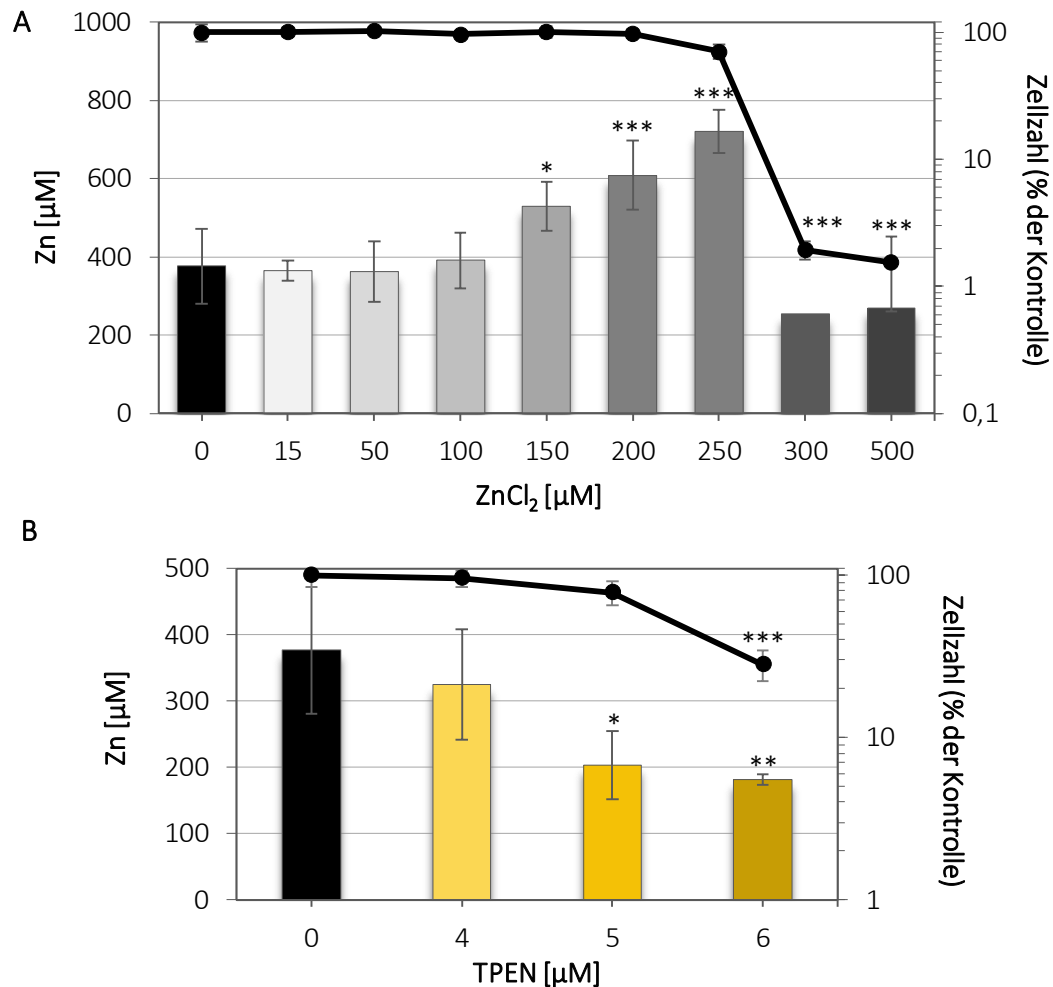
Auf Grundlage dieser Daten wurden für die weiteren Versuche eine Normalversorgung von Zink durch Inkubation mit 5 – 200 µM ZnCl<sub>2</sub>, eine Überversorgung ab 250 µM ZnCl<sub>2</sub> und eine Unterversorgung mit 5 µM TPEN angenommen.

### 5.1.2. ERMITTLUNG DER ZELLULÄREN GESAMTKONZENTRATION AN ZINK

Um die Bioverfügbarkeit von Zink und die Auswirkung des zellulären Zinkgehaltes auf die Zellviabilität zu untersuchen, wurde die Zellzahl und die Gesamtkonzentration nach Inkubation mit ZnCl<sub>2</sub> und TPEN in HeLa S3-Zellen mittels Flammen-AAS bestimmt (Abbildung 19).

Die Behandlung mit 15 µM bis 100 µM ZnCl<sub>2</sub> zeigte keinen Anstieg der zellulären Zinkkonzentration im Vergleich zur Kontrolle mit etwa 380 µM Zn(II) (Abbildung 19 A). Auch die Zellzahl veränderte sich in diesem Konzentrationsbereich im Vergleich zur Kontrolle nicht. Ab einer Inkubation mit 150 µM Zn(II) stieg die Konzentration von Zink linear an, bis auf circa das Doppelte der Kontrolle bei einer Behandlung mit 250 µM, wobei die Zellzahl auf etwa 65 % absank. Stark zytotoxische Konzentrationen ab 300 µM ZnCl<sub>2</sub> führten hingegen zu einer deutlich verminderten zellulären Konzentration an Zink.

Desweiteren erfolgte zur Zinkdepletion eine Behandlung der HeLa S3-Zellen mit dem Zinkchelator TPEN (Abbildung 19 B). Ab einer Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  TPEN wurde die zelluläre Zinkkonzentration um circa 170  $\mu\text{M}$  erniedrigt, während eine leichte Abnahme der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen war. Die höchste Konzentration an TPEN (6  $\mu\text{M}$ ) reduzierte die zelluläre Zinkkonzentration auf circa die Hälfte der Konzentration in der Kontrolle, während die Zellzahl auf 30 % gesenkt wurde.



**Abbildung 19: Einfluss von ZnCl<sub>2</sub> und TPEN auf die zelluläre Gesamtkonzentration an Zink.** HeLa S3- Zellen wurden jeweils 24 h mit (A) ZnCl<sub>2</sub> und (B) TPEN behandelt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von mindestens drei Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Bei den Werten von 300  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  ZnCl<sub>2</sub> sind keine Standardabweichungen dargestellt, da zwei Versuche eine Zinkkonzentration unterhalb der Bestimmungsgrenze lieferten. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T3 Post-Hoc-Test (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Der konstante Gehalt an Zink im Inkubationsbereich von 15  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  deutet auf eine funktionierende Zinkhomöostase hin. Ab Behandlung mit 150  $\mu\text{M}$  Zn(II) stieg der Zinkgehalt linear mit der Inkubationskonzentration wiederum an, was eine Überladung der Zelle und damit eine Störung der Zinkhomöostase vermuten lässt. Dahingegen könnte der drastische Abfall der

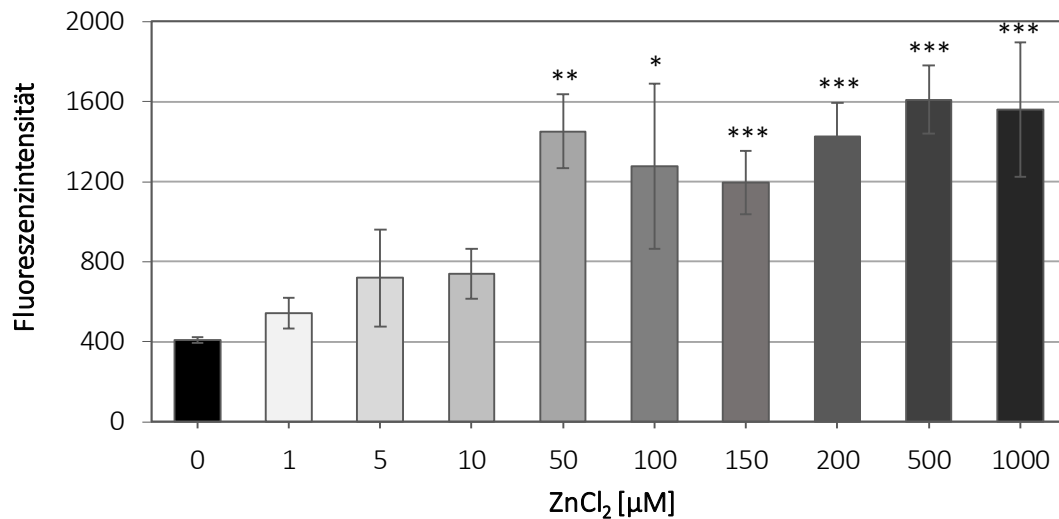
zellulären Zinkkonzentration bei Inkubationskonzentrationen von 300  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  durch die stark zytotoxische Wirkung erklärt werden. Übereinstimmend mit diesen Daten konnten Haase und Kollegen in C6 Glioma-Zellen von Ratten bei Inkubationen bis zu 100  $\mu\text{M}$  ebenfalls keine erhöhte zelluläre Zinkkonzentration feststellen. Bei einer höheren Inkubationskonzentration von 250  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  wurde eine Verdreifachung des zellulären Zinkgehaltes ermittelt (Haase und Beyersmann, 1999). Ähnliche Ergebnisse wurden in HTC Hepatomzellen und Hepatozyten der Ratte sowie in Caco-2-Zellen beobachtet (Steinebach und Wolterbeek, 1993; Zodl et al., 2003).

Eine Depletion an Zink konnte durch den Zinkchelator TPEN erreicht werden. In der Literatur wurde, ähnlich zu unseren Daten, ein verminderter Zinkgehalt nach Inkubation mit TPEN in HaCaT Keratinozyten, humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVEC) sowie in menschlichen primären Lungenfibroblasten beobachtet (Ho et al., 2003; Mertens et al., 2015; Parat et al., 1997). Vermutlich ist dabei die reduzierte Aufnahme an Zink mit der extrazellulären Komplexierung von Zink durch TPEN zu erklären. Möglich wäre es weiterhin, dass der intrazelluläre TPEN-Zink-Komplex wieder aus der Zelle herausdiffundieren kann, was Parat und Kollegen ebenfalls vermuten (Parat et al., 1997). Zu beachten ist weiterhin, dass der Metallchelator TPEN ebenfalls in der Lage ist,  $\text{Cu(II)}$  zu komplexieren. So wurde mittels Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie eine deutliche Abnahme der zellulären Kupferkonzentration durch TPEN gemessen (Anhang 8.7.1.1).

### 5.1.3. ERMITTLUNG DER INTRAZELLULÄREN FREIEN ZINKKONZENTRATION

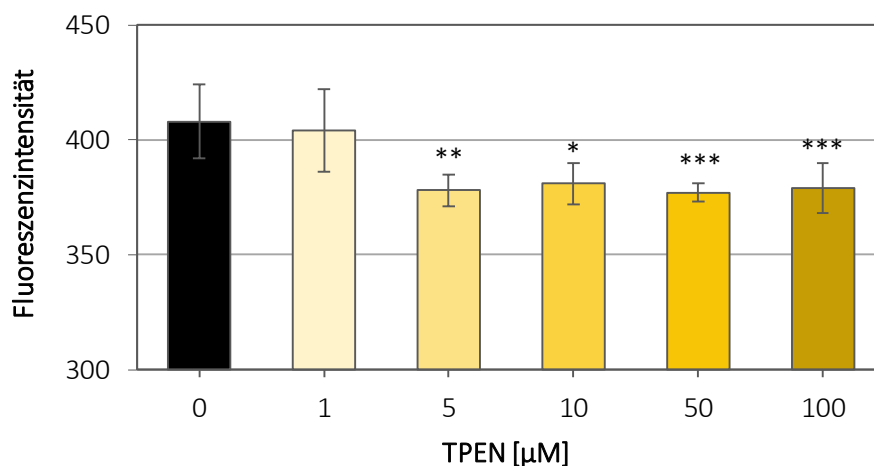
#### 5.1.3.1. OPTIMIERUNG DER MESSMETHODE MITTELS FLUOZIN-3

Zur Ermittlung der absoluten intrazellulären Konzentration an „freiem“ Zink mittels der Zinksonde FluoZin-3 wurde zunächst die optimale Konzentration an  $\text{ZnCl}_2$  für das Erreichen der Sättigung der Sonde in HeLa S3-Zellen untersucht (Abbildung 20). Zur Verbesserung der Aufnahme wurde zusätzlich zu  $\text{Zn(II)}$  mit jeweils 100  $\mu\text{M}$  Pyrithion für 1 h inkubiert. Pyrithion stellt dabei einen spezifischen Ionophor für Zink dar, welcher Zink komplexiert, durch die Zellmembran diffundiert und Zink intrazellulär wieder freisetzt (Zalewski et al., 1993). Die Fluoreszenzintensität näherte sich ab 500  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  einem Plateau an, weshalb diese Konzentration für die weiteren Versuche als maximale Fluoreszenzintensität mitgeführt wurde.



**Abbildung 20: Fluoreszenzintensität nach einstündiger Inkubation mit ZnCl<sub>2</sub> und 100 µM Pyrithion in HeLa S3-Zellen.** Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von mindestens vier Bestimmungen aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T3 Post-Hoc-Test (\* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01, \*\*\* p ≤ 0,001).

Die minimale Fluoreszenzintensität wurde durch Behandlung der HeLa S3-Zellen mit dem Zinkchelator TPEN erreicht (Abbildung 21). Es wurden insgesamt Konzentrationen von 1 – 100 µM TPEN eingesetzt, wobei bereits ab 5 µM TPEN eine Erniedrigung der Fluoreszenzintensität des FluoZin-3-Zink-Komplexes erreicht wurde. Für weitere Versuche wurde für die minimale Fluoreszenz 100 µM TPEN eingesetzt.

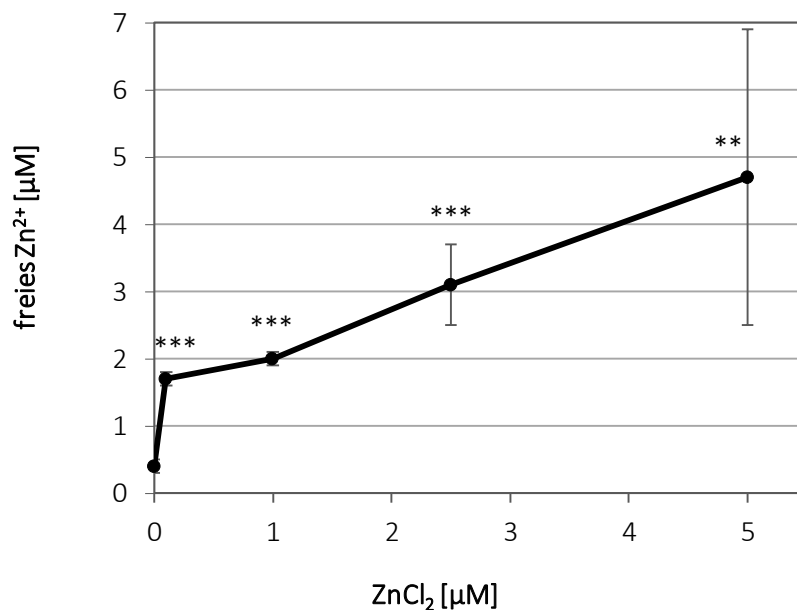


**Abbildung 21: Fluoreszenzintensität nach 1-stündiger Inkubation mit TPEN in HeLa S3-Zellen.** Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von mindestens vier Bestimmungen aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T3 Post-Hoc-Test (\* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01, \*\*\* p ≤ 0,001).

Nach einstündiger Inkubation mit ZnCl<sub>2</sub> bzw. TPEN wurde die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zeit gemessen. Die Fluoreszenzintensität stieg dabei zunächst an, erreichte

jedoch bei 90 min Messzeit ein Plateau (Anhang 8.7.1.2). Für die weiteren Versuche wurden daher die Fluoreszenzwerte nach 90 min für die Auswertung der „freien“ Zinkkonzentration herangezogen.

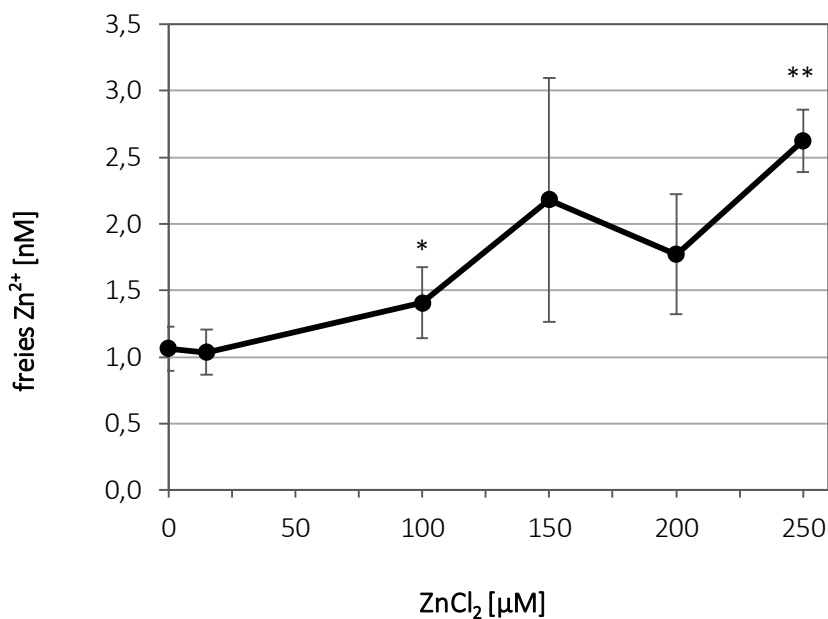
Zuletzt wurde die etablierte Methode anhand der Behandlung von HeLa S3-Zellen mit niedrigen Konzentrationen von  $\text{ZnCl}_2$  mit  $100 \mu\text{M}$  Pyrithion getestet. Die Ermittlung der „freien“ Zinkkonzentration erfolgte anhand der Gleichung nach Krezel und Maret (Kapitel 4.3). Nach einstündiger Inkubation von  $\text{ZnCl}_2$  zeigte sich ein deutlicher Anstieg der intrazellulären „freien“ Zinkkonzentration (Abbildung 22). Bereits durch  $0,1 \mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  stieg die „freie“ Konzentration an  $\text{Zn(II)}$  auf etwa  $1,8 \text{ nM}$  an, während durch  $5 \mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  bereits eine intrazelluläre „freie“ Zinkkonzentration von circa  $4,7 \text{ nM}$  zu verzeichnen war. Die Messung der intrazellulären „freien“ Zinkkonzentration erfolgte somit konzentrationsabhängig, sodass die Methode für weiterführende Untersuchungen verwendet wurde.



**Abbildung 22: Konzentration an „freiem“ Zn(II) nach einstündiger Inkubation mit  $\text{ZnCl}_2$  und  $100 \mu\text{M}$  Pyrithion in HeLa S3-Zellen.** Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test (\*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

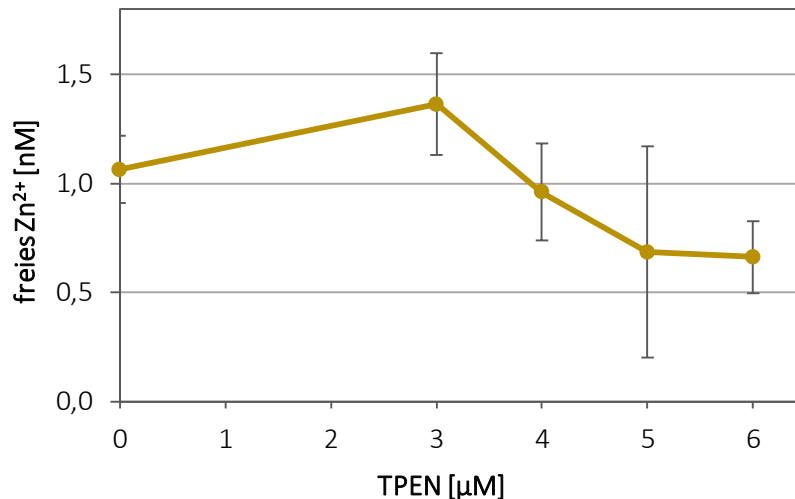
### 5.1.3.2. ERMITTLUNG DER INTRAZELLULÄREN FREIEN ZINKKONZENTRATION IN ABHÄNGIGKEIT VON DER EXTRAZELLULÄREN ZINKKONZENTRATION

Nach 24-stündiger Inkubation mit Konzentrationen von 15  $\mu\text{M}$  bis 250  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  zeigte sich ein Anstieg der intrazellulären „freien“ Zinkkonzentration (Abbildung 23). Erst ab 100  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  stieg die „freie“ Zinkkonzentration auf etwa 1,4 nM an, während durch Behandlung mit 250  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  der Gehalt an „freiem“  $\text{Zn(II)}$  etwa 2,6 nM betrug.



**Abbildung 23: Konzentration an „freiem“  $\text{Zn(II)}$  24-stündiger Inkubation mit  $\text{ZnCl}_2$  in HeLa S3-Zellen.** Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ).

Zur Erzeugung eines Zinkmangels wurde mit dem Zinkchelator TPEN gearbeitet, welcher ungebundenes und schwach gebundenes  $\text{Zn(II)}$  komplexiert (Abbildung 24). Der „freie“ Zinkgehalt nach TPEN-Behandlung sank ab 5  $\mu\text{M}$  ab, wobei die Abnahme der „freien“ Zinkkonzentration aufgrund der hohen Standardabweichung keine Signifikanz aufwies. Ab 6  $\mu\text{M}$  konnte eine Reduktion des intrazellulären „freien“ Zinkgehaltes ermittelt werden, die jedoch aufgrund der relativ hohen Standardabweichungen nicht signifikant war.



**Abbildung 24:** Konzentration an „freiem“ Zn(II) nach 24-stündiger Inkubation mit TPEN in HeLa S3-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen.

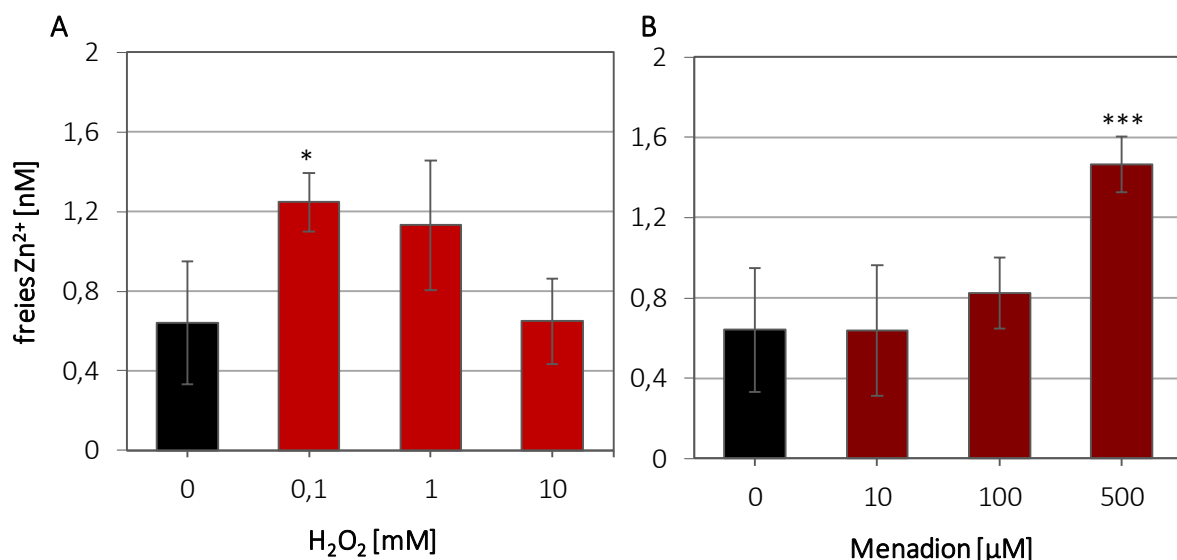
Der absolute Gehalt an „freien“ Zinkionen der Kontrolle lag in allen Versuchen zwischen 0,4 – 1,0 nM. Verglichen mit der Literatur ist dieser Gehalt an labilem Zn(II) geringfügig höher. Beispielsweise weisen *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) sowie Jurkat- und Raji-Zellen eine Konzentration an „freiem“ Zink von etwa 0,1 – 0,2 nM auf (Haase et al., 2006; Haase et al., 2007). Haase und Kollegen untersuchten ebenfalls den Zusammenhang einer extrazellulären Konzentration an Zn(II) mit der intrazellulären Konzentration an „freiem“ Zn(II) in Jurkat-Zellen (Haase et al., 2015). Beispielsweise wurde nach 2-stündiger Inkubation mit 100 µM ZnSO<sub>4</sub> eine Konzentration an „freiem“ Zn(II) von etwa 1,7 nM analysiert, während in unserer Studie nach Behandlung mit 100 µM ZnCl<sub>2</sub> eine intrazelluläre Konzentration an „freiem“ Zn(II) von 1,4 nM detektiert wurde.

#### 5.1.3.3. ERMITTLUNG DER INTRAZELLULÄREN FREIEN ZINKKONZENTRATION NACH OXIDATIVEM STRESS

Um die Auswirkung von oxidativem Stress auf die intrazelluläre „freie“ Zinkkonzentration zu untersuchen, wurden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Menadion in HeLa S3-Zellen eingesetzt. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann intrazellulär in Gegenwart von Übergangsmetallionen wie Kupfer und Eisen zu einem hoch reaktiven Hydroxylradikal umgesetzt werden. Dieses Radikal kann wiederum mit der DNA reagieren und zu oxidativen Basenschäden oder DNA-Einzelstrangbrüchen führen (Dizdaroglu et al., 1991; Imlay und Linn, 1988). Im Gegensatz zu dazu reagiert Menadion intrazellulär reversibel mit Nikotinamidadenindinukleotid (NADH) oder Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH), wobei in Gegenwart von Sauerstoff hoch reaktive Superoxidanionen freigesetzt werden. Diese

können an die DNA binden und ebenfalls zu oxidativen Basenschäden führen (Criddle et al., 2006). Sowohl  $\text{H}_2\text{O}_2$  als auch Menadion sind folglich in der Lage, oxidativen Stress zu induzieren. In mehreren Studien wurde bereits gezeigt, dass durch oxidativen Stress der Gehalt an intrazellulärem „freien“ Zink erhöht wird. In dieser Arbeit wurde für die Zelllinie HeLa S3 die Zinkfreisetzung durch oxidativen Stress durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  analysiert. Zusätzlich wurde Menadion eingesetzt, um einen molekülspezifischen Effekt durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  auszuschließen.

Nach 5-minütiger Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  konnte eine Erhöhung der Konzentration an intrazellulären „freien“ Zinkionen beobachtet werden (Abbildung 25 A). Bei höheren Konzentrationen an  $\text{H}_2\text{O}_2$  lag die „freie“ Zinkkonzentration im Bereich der Kontrolle, vermutlich aufgrund der hohen Zytotoxizität. Menadion induzierte ab  $500 \mu\text{M}$  eine Zunahme der „freien“ Zinkkonzentration auf etwa das Doppelte im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 25 B).



**Abbildung 25: Einfluss von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Menadion auf die intrazelluläre „freie“ Zinkkonzentration.** HeLa S3-Zellen wurden (A) 5 min mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  bzw. (B) 1h mit Menadion behandelt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Übereinstimmend mit diesen Ergebnisse wurde die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -vermittelte Erhöhung der „freien“ Zinkkonzentration durch Matsui und Kollegen in Thymozyten von Ratten gezeigt (Matsui et al., 2010). Weiterhin konnte eine Freisetzung von „freiem“  $\text{Zn(II)}$  nach Induktion von oxidativem Stress durch Hypochlorsäure, Selenit, 2,2'-Dithiodipyridin und Monochloramin beobachtet werden (Aizenman et al., 2000; Cima et al., 2006; Turan et al., 1997). Dieser Sachverhalt stützt die These, dass „freies“  $\text{Zn(II)}$  nach oxidativem Stress als intrazelluläres Signal fungiert.



Inwieweit dies Proteine der DNA-Reparatur beeinflusst, wie beispielsweise PARP-1, ist bisher nicht bekannt.

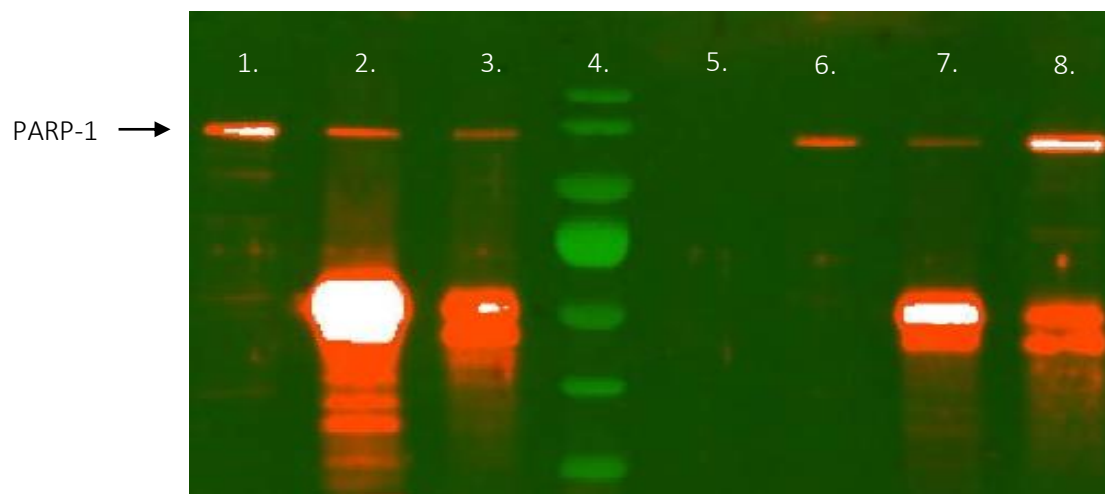
### 5.1.4. ERMITTLUNG DES ZINKGEHALTES VON PARP-1

#### 5.1.4.1. ISOLIERUNG VON PARP-1 MITTELS MAGNETIC BEADS

Zur Ermittlung des Zinkgehaltes der PARP-1 wurde diese zunächst mittels magnetischer Protein A-gekoppelter Dynabeads™ aus HeLa S3-Zellen isoliert. Diese Isoliermethode wurde zuerst anhand kommerzieller, isolierter PARP-1 optimiert, um eine höchstmögliche Ausbeute an PARP-1 aus HeLa-S3-Zellen zu erzielen. Die Protein A-gekoppelten magnetischen Dynabeads™ wurden für jede Isolierung mit dem PARP-1-Antikörper H250 gekoppelt, gegebenenfalls mit einem Crosslinker verknüpft, mit PARP-1 inkubiert und anschließend mit verschiedenen Lösungen eluiert. Dabei wurde insbesondere die Elution mittels verschiedener Reagentien getestet und optimiert. Je nach Art der nicht-kovalenten Bindung zwischen dem Ziel-Antigen und dem Antikörper sind hier unterschiedliche Elutionsarten optimal. Die Interaktion zwischen dem Antigen und Antikörper können dabei in unterschiedlicher Ausprägung elektrostatisch sein oder aus Wasserstoffbrückenbindungen bestehen, die durch Veränderung des pH oder durch Ionen aufgebrochen werden können (Horton et al., 2008). In Abbildung 26 ist eine repräsentative Chemilumineszenzaufnahme dargestellt. In der 2. Spalte ist die Ausbeute von PARP-1 nach der konventionellen Elution mittels 50 mM Glycin (Gly) bei pH 2,8 zu sehen. Bei dieser Elution erfolgte die Auflösung der nicht-kovalenten Bindung von PARP-1 und dem PARP-1-Antikörper durch Protonierung geladener Carboxylgruppen sowie von Aminogruppen und der damit einhergehenden Aufhebung elektrostatischer Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen. PARP-1 wurde durch saures Glycin zwar eluiert, allerdings ebenso der Antikörper H250 und Protein A. Nach dieser Elution wurde dieselbe Probe mit 100 mM Triethylamin (TEA) eluiert, um zu eruieren, ob PARP-1-Reste auf den Bead-gebundenen Antikörpern verbleiben. TEA ist eine Base, die aus protonierten, geladenen Aminogruppen ein Wasserstoffatom abstrahiert und somit in die ionischen Wechselwirkungen zwischen Antigen und Antikörper eingreift. Durch TEA konnte weiterhin PARP-1 eluiert werden, was zeigt, dass eine Elution mit Glycin unvollständig verläuft. Allerdings wurden auch hier Antikörper und Protein A miteluiert.

Um die Elution des H250-Antikörpers bzw. von Protein A zu vermeiden, wurde der Primärantikörper mit Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS<sup>3</sup>) bzw. Dimethylpimelimidat (DMP) an

die Protein-A gekoppelten Dynabeads™ vor Inkubation mit PARP-1 verknüpft. Ein Crosslinking mit DMP und Elution mit Glycin führte lediglich zu einer Verringerung an eluierten Antikörpern sowie von Protein A bei geringer Ausbeute an PARP-1, wobei die Elution mit TEA zwar die Ausbeute an PARP-1 deutlich verbesserte, jedoch weiterhin Antikörper bzw. Protein A miteluiert wurden. Eine Behandlung der Beads mit dem Crosslinker BS<sup>3</sup> und einer Elution mit Glycin blockierte sowohl die Elution der Antikörper und des Protein A als auch die der PARP-1. Als optimal stellte sich ein Crosslinking mit BS<sup>3</sup> und einer Elution mit TEA heraus, bei der ausreichend PARP-1 eluiert wurde bei gleichzeitiger Retention der H250-Antikörper und des Protein A (6. Spalte).



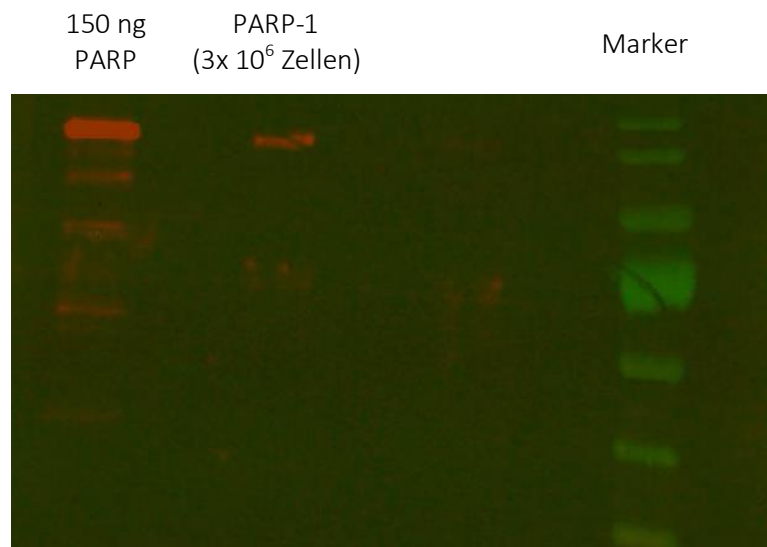
PARP-1 (ng)	150	500	500	Marker	500	500	500	500
Beads	-	+	+	-	+	+	+	+
Elution	-	Gly	Gly + TEA	-	Gly	TEA	Gly	TEA
Crosslink	-	-	-	-	BS <sup>3</sup>	BS <sup>3</sup>	DMP	DMP

**Abbildung 26: Behandlung von isolierter PARP-1 mit magnetischen Protein A Dynabeads™.** Der Antikörper H250 wurde mit den Beads inkubiert und entweder direkt mit PARP-1 oder davor mit Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS<sup>3</sup>) oder Dimethylpimelimidat (DMP) irreversibel verknüpft. Nach mehreren Waschschrten wurde die gebundene PARP-1 mittels 50 mM Glycin (Gly) oder 100 mM Triethylamin (TEA) eluiert. Nach anschließender Denaturierung der PARP-1 in SDS-PAGE Loading Buffer, elektrophoretischer Auftrennung sowie einem Blotting auf eine Nitrocellulosemembran wurde PARP-1 mit Primäntikörper H250 und einem HRP-konjugiertem Sekundäntikörper inkubiert sowie die Chemilumineszenz am LAS 3000 detektiert. Dargestellt ist eine repräsentative Chemilumineszenzaufnahme.

In der Literatur wurde analog unserer Daten durch einen Glycin-Puffer eine unvollständige Elution der Proteine UNG1 und UNG2 bei gleichzeitiger Elution des entsprechenden Primäntikörpers und des Protein A berichtet. Ein Crosslinking mit DMP führte wie in unseren Versuchen lediglich zur Verringerung der Elution an Antikörpern und Protein A. Als optimal

stellte sich hier ebenso ein Crosslinking mit BS<sup>3</sup> heraus. Weiterhin untersuchten Sousa und Kollegen die Auswirkung von unterschiedlichen Elutionspuffern auf die Elutionsausbeute verschiedener Proteine. Je nach Protein waren unterschiedliche Elutionspuffer geeignet, sodass für jedes Protein ein optimaler Elutionspuffer ermittelt werden sollte (Sousa et al., 2011).

Im Anschluss wurde die Ausbeute der PARP-1-Isolierung aus HeLa S3-Zellen untersucht. Hierfür wurden unterschiedliche Mengen an HeLa S3-Zellen eingesetzt. In Abbildung 27 ist eine repräsentative Chemilumineszenzaufnahme nach Isolierung von PARP-1 aus  $3 \times 10^6$  HeLa S3-Zellen dargestellt. Anhand der Bandenbreite ist erkennbar, dass die Ausbeute an PARP-1 relativ gering ausfiel. Deshalb wurde für anschließende Bestimmung des Zinkgehaltes isolierter PARP-1 die eingesetzte Zellzahl der HeLa S3-Zellen auf  $20 \times 10^6$  erhöht sowie die eingesetzte Menge an Beads hochskaliert. Die optimierte Vorgehensweise wurde in Kapitel 4.5.1 beschrieben.



**Abbildung 27: Isolierung zellulärer PARP-1 mittels magnetischer Protein A Dynabeads™.** Der Antikörper H250 wurde mit den Beads inkubiert, mit BS<sup>3</sup> irreversibel verknüpft und mit HeLa S3-Zellextrakt versetzt. Nach diversen Waschschritten wurde die gebundene PARP-1 mittels 100 mM TEA eluiert. Nach anschließender Denaturierung der PARP-1 in SDS-PAGE Loading Buffer, elektrophoretischer Auftrennung sowie einem Blotting wurde PARP-1 mit Primärantikörper H250 und einem HRP-konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert sowie die Chemilumineszenz am LAS 3000 detektiert. Dargestellt ist eine repräsentative Chemilumineszenzaufnahme.

### 5.1.4.2. BESTIMMUNG DES ZINKGEHALTES DER PARP-1

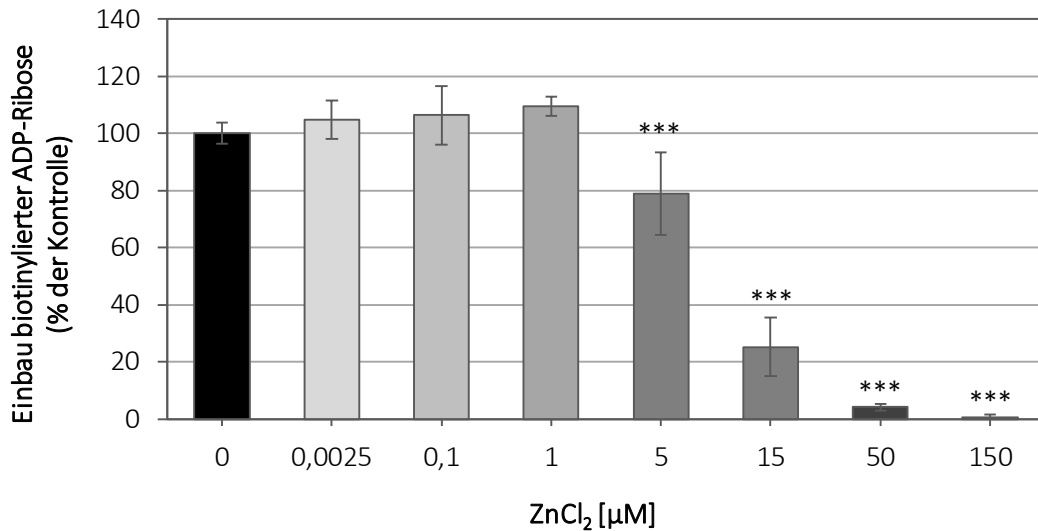
Nach Isolierung der PARP-1 mittels magnetischen Protein-A-gekoppelten Dynabeads™ aus HeLa S3-Zellen wurde der Proteingehalt der PARP-1 in dem Eluat mittels der Bradford-Methode ermittelt, die Lösung eingedampft und mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:HNO<sub>3</sub> (1:1) aufgeschlossen. Die Messung des Zinks erfolgte mittels *inductively coupled plasma optical emission spectroscopy* (ICP-OES) in Kooperation mit Martia Heinle. Aufgrund der geringen Ausbeute an PARP-1 aus HeLa S3-Zellen lagen die entsprechenden Zinkgehalte der PARP-1 jedoch knapp unter oder im Bereich der Bestimmungsgrenze, sodass keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielt werden konnten.

### 5.1.5. EINFLUSS DER ZELLULÄREN ZINKKONZENTRATION AUF DIE AKTIVITÄT VON PARP-1

Die von PARP-1 katalysierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung ist einer der ersten Schritte der DNA-Einzelstrangbruchreparatur. Dabei spielen vor allem die Zinkfinger der PARP-1 durch die Bindung an die DNA eine entscheidende Rolle in der Aktivierung der PARP-1. Im Folgenden wurde daher untersucht, inwieweit sich die Konzentration an Zink auf die Poly(ADP-Ribosyl)ierung sowohl von zellulärer als auch von isolierter PARP-1 auswirkt.

#### 5.1.5.1. UNTERSUCHUNGEN AN ISOLIRTER PARP-1

Der Einfluss von ZnCl<sub>2</sub> auf die Aktivität von PARP-1 wurde mittels eines Kits bestimmt, bei dem der Einbau biotinylierter ADP-Ribose durch isolierte PARP-1 kolorimetrisch quantifiziert wird (Abbildung 28). Die Aktivität der PARP-1 wurde bei Konzentrationen von 2,5 nM bis 1 µM Zn(II) nicht beeinflusst. Bei 5 µM und 15 µM ZnCl<sub>2</sub> wurde der Einbau von biotinylierter ADP-Ribose bis auf 80 % bzw. 30 % der Kontrolle gehemmt, während bei 50 µM und 150 µM eine komplette Inhibierung der PARP-1 verzeichnet wurde. Die Inhibierung der PARP-1 durch höhere Zinkkonzentrationen ab 5 µM Zn(II) könnten durch Wechselwirkungen von Zn(II) mit den Carboxylgruppen von Glutamatresten der PARP-1 erklärt werden. In der Literatur wurde bereits gezeigt, dass Glu988 und Glu923 essentiell für die katalytische Domäne der PARP-1 sind (Ruf et al., 1998). Somit wäre eine Zink-vermittelte Bindung und ein damit einhergehender Funktionalitätsverlust der katalytischen Domäne sowie die Inhibierung der PARP-1 denkbar. Weiterhin könnte Zink an Thiolgruppen von Cysteinresten außerhalb der Zinkfinger der PARP-1 binden. So konnte gezeigt werden, dass Cys908 in der katalytischen Domäne eine wichtige Rolle in der PARP-1-vermittelten Poly(ADP-Ribosyl)ierung spielt (Rolli et al., 1997).



**Abbildung 28:** Einfluss einer einstündigen Inkubation von ZnCl<sub>2</sub> auf den PARP-1-katalysierten Einbau von biotinierter ADP-Ribose. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test (\*\*\*) p ≤ 0,001).

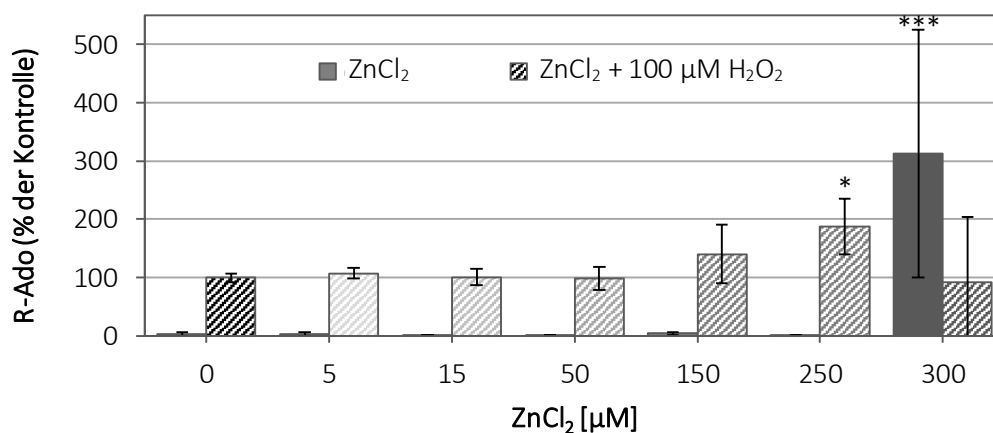
Eine Zinkdepletion beeinflusste die Aktivität isolierter PARP-1 nicht (Anhang 8.7.1.3). So konnte bei Konzentrationen von 4 µM bis 6 µM TPEN keine Auswirkung auf den Einbau biotinierter ADP-Ribose festgestellt werden. Die Dissoziationskonstante von TPEN gegenüber Zn(II) (0,26 fM) ist im Vergleich zu Zinkfinger I und II der PARP-1 zu Zn(II) (26 nM bzw. 4 pM) niedriger, sodass die Bindung von TPEN zu Zn(II) stärker ist (Bossak et al., 2015; Haase und Rink, 2006). Fraglich ist jedoch, ob sich die Affinitäten von Zn(II) zu den Zinkfingerpeptiden verglichen mit den Zinkfingern von intakter PARP-1 unterscheiden bzw. ob TPEN in der Lage ist, Zn(II) aus PARP-1 herazulösen. Im zellulären System spielen jedoch auch freie Zinkionen, vor allem nach Induktion von oxidativem Stress, eine wichtige Rolle (Maret, 2000; Maret, 2001). Ob hierdurch PARP-1 aktiviert werden könnte und TPEN in diese Signalwirkung eingreifen kann, ist bislang nicht geklärt.

Es muss jedoch beachtet werden, dass im zellulären System die freien Zinkionen gepuffert und niedrig gehalten werden, während in diesem Testsystem Zn(II) direkt mit PARP-1 inkubiert wurde. Weiterhin führt TPEN in der Zelle zu einer Komplexierung der niedrigen freien sowie schwach gebundenen Zinkionen, während in diesem Testsystem lediglich die Wechselwirkung von TPEN mit PARP-1 direkt untersucht wurde. Welchen Einfluss Zn(II) bzw. seine Depletion im zellulären System hat, wurde im nächsten Kapitel analysiert.

## 5.1.5.2. UNTERSUCHUNGEN IN HELA S3-ZELLEN

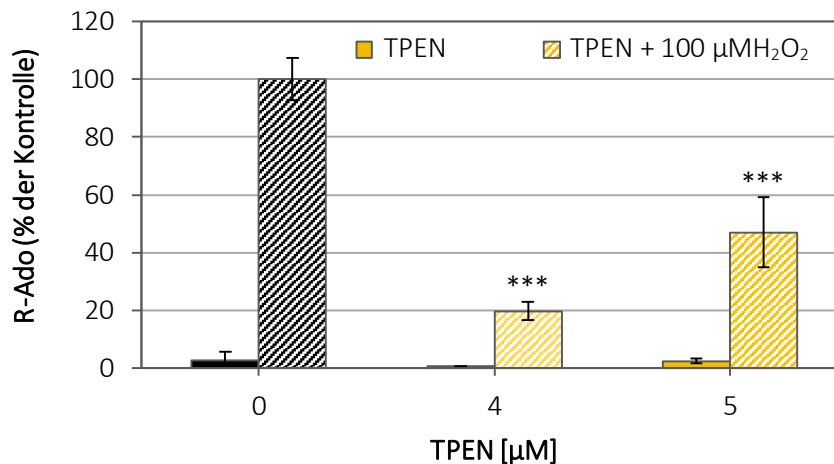
PARP-1 ist an der DNA-Strangbruchdetektion beteiligt und wird in der Literatur als ein wichtiges Protein der DNA-Einzelstrangbruchreparatur beschrieben. Dabei bindet PARP-1 mit der DNA-bindenden-Domäne mit den Zinkfingerstrukturen an die DNA-Schadensstelle. Inwieweit der zelluläre Zinkstatus bei der Aktivität von PARP-1 eine Rolle spielt, ist bisher nicht geklärt. Daher wurde die Rolle von Zink bei der Aktivität der PARP-1 durch Analyse des Einflusses von Zink auf den Gehalt der Poly(ADP-Ribose) in HeLa S3-Zellen bestimmt. Dafür wurde zur Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen für 5 min mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  inkubiert und somit PARP-1 aktiviert. Nach Isolierung und Spaltung der Poly(ADP)-Ribose wurde dann der Gehalt an Ribosyladenosin massenspektrometrisch bestimmt.

In Abbildung 29 ist der Einfluss von Zn(II) auf die PARP-1-Aktivität dargestellt.  $\text{ZnCl}_2$  allein induzierte erst bei einer stark zytotoxischen Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  eine Poly(ADP-Ribosyl)ierung. Hinsichtlich des Einflusses der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung konnte in einem Konzentrationsbereich von 5  $\mu\text{M}$  bis 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  keine Veränderung des Ribosyladenosin-Gehaltes im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Ab 150  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  stieg der Gehalt an Ribosyladenosin auf 140 % der Kontrolle an, was jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung im Schwankungsbereich der Kontrolle lag. Nach Inkubation mit 250  $\mu\text{M}$  Zn(II) wurde eine Verdopplung des Gehaltes an Ribosyladenosins und somit eine Aktivitätssteigerung der PARP-1 identifiziert. Die stark zytotoxische Konzentration von 300  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  führte wiederum zu keiner Beeinflussung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung.



**Abbildung 29: Massenspektrometrische Bestimmung des Einflusses einer 24-stündigen Inkubation mit  $\text{ZnCl}_2$  auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung in HeLa S3-Zellen.** Die Schadensinduktion erfolgte mittels 5-minütiger Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Dargestellt sind Mittelwerte + SD von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T3 Post-Hoc-Test (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Weiterhin wurde der Einfluss einer Zinkdepletion, hervorgerufen durch eine Inkubation mit dem Zinkchelator TPEN, untersucht (Abbildung 30). TPEN allein führte zu keiner Poly(ADP-Ribosyl)ierung. Bei der Inkubation mit der nicht-zytotoxischen Konzentration von 4  $\mu\text{M}$  TPEN sowie mit der stark zytotoxischen Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  TPEN konnte eine deutlich verminderte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung von 20 % bzw. 47 % der Kontrolle detektiert werden.



**Abbildung 30: Massenspektrometrische Bestimmung des Einflusses einer 24-stündigen Inkubation mit TPEN auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung in HeLa S3-Zellen.** Die Schadensinduktion erfolgte mittels 5-minütiger Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Dargestellt sind Mittelwerte + SD von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ ).

Der erhöhte Gehalt an  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induziertem Ribosyladenosin durch 150  $\mu\text{M}$  bzw. 250  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}(\text{II})$  könnte zum einen damit erklärt werden, dass die dadurch bedingte Erhöhung der „freien“ Zinkkonzentration, wie in Kapitel 5.1.3 gezeigt werden konnte, zu einer vollständigen Besetzung der Zinkfinger der PARP-1 und somit zu deren Aktivierung führen könnte. Bossak und Kollegen analysierten die Affinitäten von  $\text{Zn}(\text{II})$  zu Zinkfinger I und II der PARP-1 und fanden eine deutlich verminderte Affinitätskonstante für  $\text{Zn}(\text{II})$  zum Zinkfinger I im Vergleich zum Zinkfinger II (Bossak et al., 2015). Eventuell liegt der Zinkfinger I unter „normalen“ zellulären Bedingungen ungebunden vor und wird erst durch eine erhöhte „freie“ Zinkkonzentration, bedingt durch die Freisetzung von Zinkionen aus Zinkosomen oder Metallothionen in Folge von oxidativem Stress, aktiviert. Die daraus resultierende verstärkte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung könnte folglich den hier gemessenen erhöhten Gehalt an Ribosyladenosin erklären. Weiterhin wäre eine vermehrte Anzahl an  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbrüchen möglich. Dahingegen wurde die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch 300  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$

reduziert. Dies könnte an der stark zytotoxischen Wirkung der Koinkubation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $300 \mu\text{M ZnCl}_2$ , was in Kapitel 5.1.1 gezeigt wurde, liegen. PARP-1 wird bekanntlich unter stark zytotoxischen, apoptotischen oder nekrotischen Bedingungen gespalten, sodass die Poly(ADP-Ribosyl)ierung zum Erliegen kommt (Gobeil et al., 2001). Die Inkubation mit  $300 \mu\text{M ZnCl}_2$  allein führte wiederum zu einer deutlichen Poly(ADP-Ribosyl)ierung. Eventuell wird dadurch die intrazelluläre „freie“ Zinkkonzentration so stark erhöht, dass auch hier eine Besetzung des Zinkfinger I möglich wäre und so die PARP-1 sogar ohne Vorliegen eines DNA-Schadens aktiviert. Ein weiterer Grund für die gesteigerte Poly(ADP-Ribosyl)ierung könnte eine vermehrte Induktion von DNA-Strangbrüchen sein. Dies wurde im nächsten Kapitel untersucht.

Eine Zinkdepletion durch den Zinkchelator TPEN hingegen reduzierte den Gehalt an Ribosyladenosin drastisch. Denkbar wäre hier ein Abfangen des Zinksignals, welches durch den oxidativen Stress der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Inkubation ausgelöst wird. Somit würde der Zinkfinger I der PARP-1 nicht mit  $\text{Zn(II)}$  besetzt, die PARP-1 nicht in dem Ausmaß wie in der Kontrolle aktiviert und die Poly(ADP-Ribosyl)ierung gehemmt werden. Weiterhin wäre es möglich, dass TPEN zu einer reduzierten Anzahl an  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbrüchen führt. Ob dies der Fall ist, wurde im nächsten Kapitel untersucht.

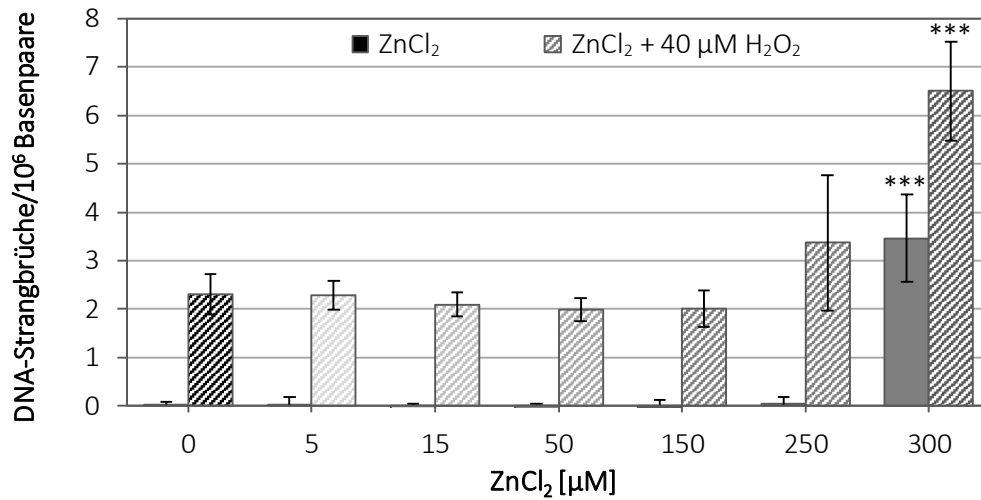
### 5.1.6. EINFLUSS DER ZELLULÄREN ZINKKONZENTRATION AUF DIE ANZAHL $\text{H}_2\text{O}_2$ -INDUZIERTER DNA-STRANGBRÜCHE

Zur Analyse eines Einflusses des zellulären Zinkstatus auf die Induktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbrüchen wurden HeLa S3-Zellen für 24 h mit  $\text{ZnCl}_2$  vorinkubiert und die Strangbrüche durch eine 5-minütige Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  induziert. Anschließend wurde die DNA-Strangbruchanzahl mittels Alkalischer Entwindung quantifiziert.

In Abbildung 31 ist der Einfluss von Zink auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte DNA-Strangbruchanzahl dargestellt. Zink allein induzierte im Konzentrationsbereich von  $5 - 150 \mu\text{M}$  keine DNA-Strangbrüche; erst ab einer zytotoxischen Konzentration von  $300 \mu\text{M}$  konnten circa 3,4 DNA-Strangbrüche pro  $10^6$  Basenpaaren detektiert werden. Weiterhin konnte keine Beeinflussung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbruchanzahl durch  $\text{ZnCl}_2$  bei Konzentrationen bis zu  $150 \mu\text{M}$  beobachtet werden. Bei einer Konzentration von  $250 \mu\text{M ZnCl}_2$  stieg die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte Anzahl an DNA-Strangbrüchen tendenziell leicht an, während durch die stark zytotoxische, DNA-strangbrechende Konzentration von  $300 \mu\text{M ZnCl}_2$  die Anzahl der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-

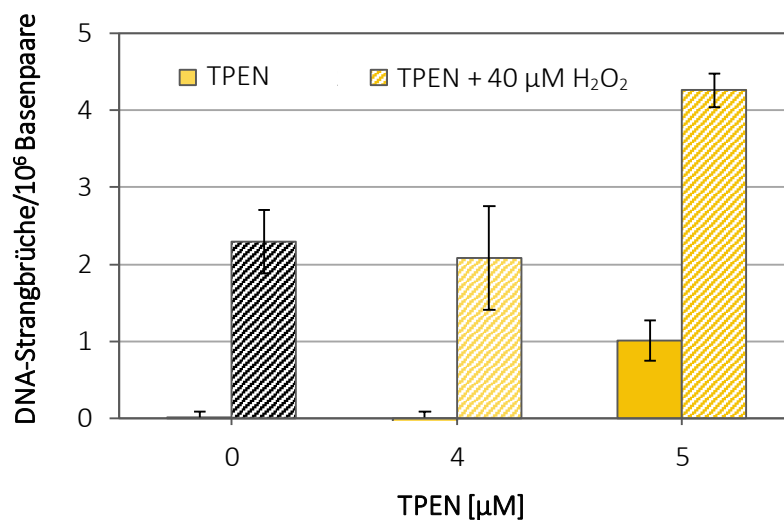


Strangbrüche additiv auf etwa 6,5 DNA-Strangbrüche pro  $10^6$  Basenpaare anstieg. Demnach wirkt Zink vermutlich erst ab einem deutlichen zellulären und zytotoxischen Überschuss genotoxisch.



**Abbildung 31:** Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit ZnCl<sub>2</sub> auf die Anzahl von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen in HeLa S3-Zellen. Die Schadensinduktion erfolgte mit 40 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 5 min. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von neun Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T3 Post-Hoc-Test (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

Eine 24-stündige Inkubation mit dem Zinkchelator TPEN führte ab einer zytotoxischen Konzentration von 5 μM zu einer Induktion von DNA-Strangbrüchen sowie zu einer synergistischen Zunahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbruchanzahl (Abbildung 32).



**Abbildung 32:** Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit TPEN auf die Anzahl von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen in HeLa S3-Zellen. Die Schadensinduktion erfolgte mit 40 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 5 min. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von neun Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

In vorangehenden Untersuchungen unseres Arbeitskreises wurde ebenfalls der Einfluss von Zink auf die Anzahl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierter DNA-Strangbrüche in nicht-transformierten Epithelzellen aus dem Schweinedünndarm (IPEC-J2-Zellen) analysiert. Nach 24 h Inkubation konnte erst ab einer zytotoxischen Konzentration von 125 µM eine Erhöhung der Anzahl an DNA-Strangbrüchen, welche durch 5-minütige Behandlung mit 10 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziert wurden, beobachtet werden. Zink allein wirkte nicht genotoxisch (Schulze, 2014). Ebenso konnten Elgohary und Kollegen in der humanen Blutzelllinie HL-60 nach 24-stündiger Inkubation mit 100 µM ZnCl<sub>2</sub> keine Erhöhung der Anzahl an DNA-Strangbrüchen, welche durch 30-minütige Inkubation mit 25 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generiert wurden, detektieren (Elgohary et al., 1998).

Eine Depletion an Zink induzierte in unseren Studien DNA-Strangbrüche und erhöhte die Anzahl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierter DNA-Strangbrüche synergistisch im zytotoxischen Konzentrationsbereich von TPEN. In der Literatur wurde ebenfalls eine DNA-strangbrechende Wirkung sowie weiterhin eine Induktion von Mikrokernen nach Depletion von Zn(II) in menschlichen primären Keratinozyten berichtet. Dabei reduzierte die Depletion an Zink die Anzahl der lebenden Zellen (Sharif et al., 2012). Auch in Ratten konnte nach Zinkdepletion eine Induktion von DNA-Strangbrüchen detektiert werden (Song et al., 2009).

### 5.1.7. EINFLUSS DER ZELLULÄREN ZINKKONZENTRATION AUF DIE GENEXPRESSION

Um den Einfluss des zellulären Zinkstatus auf die genomische Stabilität zu analysieren, wurde die Auswirkung von ZnCl<sub>2</sub> und TPEN auf Gene untersucht, die mit der genomischen Integrität assoziiert sind. Dabei wurden Gene der (oxidativen) Stressantwort, Transkriptionsfaktoren, der Zellzyklusregulation und Proliferation, der DNA-Schadensantwort und –Reparatur sowie der Apoptose herangezogen. In Abbildung 33 ist ein Überblick in Form einer Heatmap dargestellt; die genauen Werte sind in Form von Balkendiagrammen mit statistischer Auswertung im Anhang zu finden (Anhang 8.7.6.2). Im Folgenden werden nur die Gene betrachtet, die sich durch Behandlung mit ZnCl<sub>2</sub> bzw. TPEN signifikant um den Faktor 0,5 und niedriger bzw. um den Faktor 2 und höher von der Genexpression der Kontrolle unterschieden.

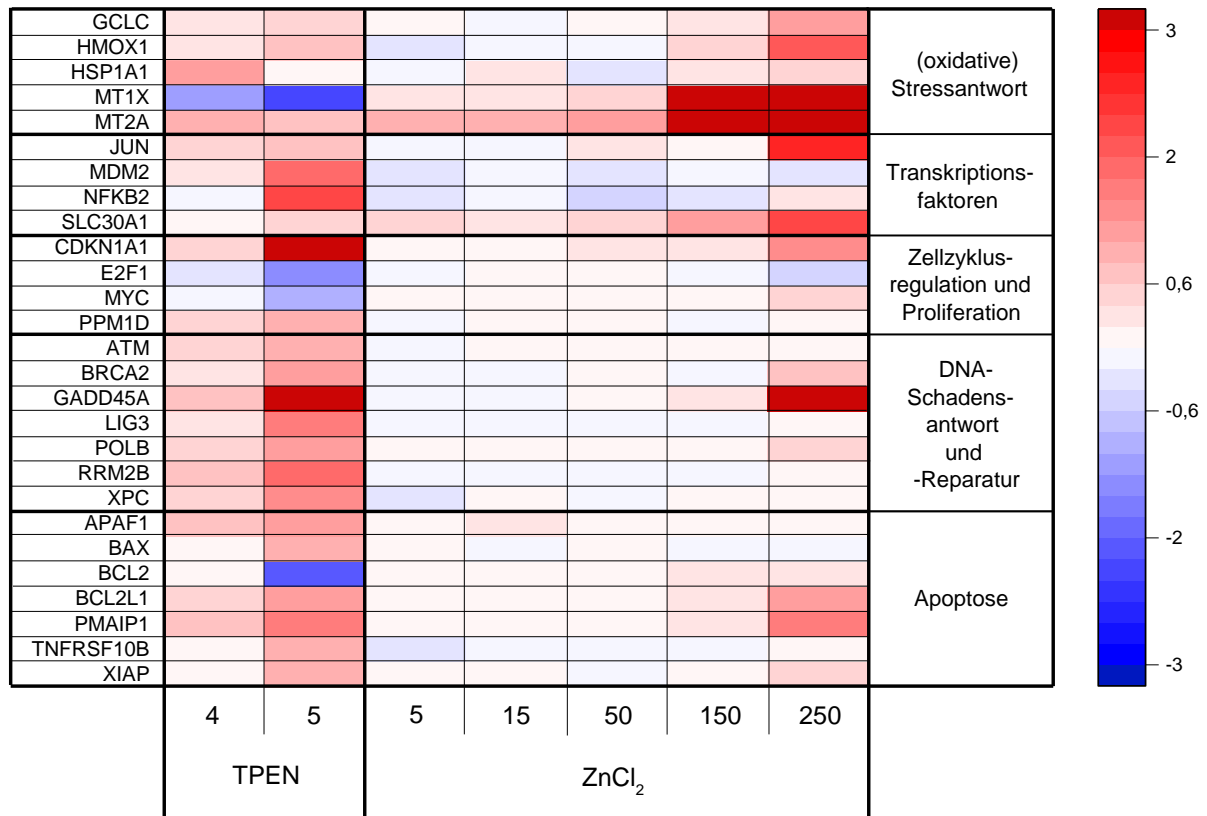


Abbildung 33: Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit ZnCl<sub>2</sub> und TPEN in HeLa S3-Zellen auf die relative Expression von Genen der (oxidativen) Stressantwort, Transkriptionsfaktoren, der Zellzyklusregulation und Proliferation, der DNA-Schadensantwort und -Reparatur sowie der Apoptose. Abgebildet sind Mittelwerte von sechs Bestimmungen aus drei unabhängigen Versuchen in Form einer Heatmap. Dabei steht Rot für eine Hochregulierung und Blau für eine Herunterregulierung der Gene.

Es ist deutlich zu sehen, dass ein Zinkmangel durch TPEN die Expression aller Gengruppen konzentrationsabhängig beeinflusst. Das „Stresssensor“-Gen *HSPA1A* wurde beispielsweise um das Doppelte der Kontrolle hochreguliert. Zudem wurde die Expression von *MT1X* konzentrationsabhängig bis auf ein Fünftel der Kontrolle herunterreguliert. Dies deutet auf eine deutlich verminderte intrazelluläre Konzentration an Zink nach TPEN-Behandlung hin. Diese Daten stehen im Einklang mit den von Parat und Kollegen publizierten Ergebnissen. Sie zeigten ebenfalls eine Reprimierung der *MT*-Gene durch Behandlung von HaCaT-Zellen mit 50 µM TPEN (Parat et al., 1999). In einer weiteren Studie wurde eine Erniedrigung des Proteingehaltes an MT nach Zinkdepletion in HOK-Zellen nachgewiesen (Sharif et al., 2012). Hinsichtlich der Transkriptionsfaktoren führte die Behandlung mit TPEN zu einer gesteigerten Transkription der proliferationsassoziierten Gene *JUN* und *NFKB2*. Zusätzlich wurde eine gesteigerte Genexpression des Protoonkogens *MDM2* beobachtet, welches durch aktives p53 induziert wird. Dies weist auf eine Aktivierung von p53 hin. Die Gene des Zellzyklus und der Proliferation deuteten durch Hochregulierung der *CDKN1A*- und *PPM1D*-Gene sowie Herunterregulierung

der *E2F1*- und *MYC*-Gene auf einen Zellzyklusarrest durch eine Zinkdefizienz hin. Betrachtet man die Expression der Gene der DNA-Schadensantwort und -Reparatur, wurden *ATM*, *BRCA2*, *GADD45A*, *LIG3*, *POLB*, *RRM2B* sowie *XPC* durch 5  $\mu$ M TPEN signifikant hochreguliert. Dies deutet auf eine vermehrte DNA-Schadensinduktion und das Stattfinden mehrerer DNA-Reparaturwege hin. So werden *ATM* und *BRCA2* vor allem mit der DNA-Doppelstrangbruchreparatur, *LIG3* mit der Reparatur von oxidativen DNA-Basenschäden sowie von DNA-Strangbrüchen, *POLB* mit der Basenexzisionsreparatur und *XPC* mit der Nukleotidexzisionsreparatur assoziiert. *GADD45A*, welches für das gleichnamige Protein GADD45A codiert und einen Zellzyklusarrest induziert, wurde sogar um das 12-fache der Kontrolle durch 5  $\mu$ M TPEN hochreguliert, was als Marker für genotoxischen Stress dient. Im Einklang mit unseren Daten wurde in humanen Bronchialepithelzellen (NHBE-Zellen) eine vermehrte Expression von *GADD45A* durch eine Zinkdefizienz festgestellt (Fanzo et al., 2001). Zudem wurde eine Verdreifachung der *RRM2B*-Transkriptmenge durch 5  $\mu$ M TPEN detektiert. *RRM2B* codiert für Ribonukleotid-Reduktase M2B, welche nach DNA-Schadensinduktion in Abhängigkeit von p53 die Reduktion von Nukleotiddiphosphaten für die DNA-Synthese katalysiert (Nakano et al., 2000; Tanaka et al., 2000). Die Hochregulierung des *RRM2B*-Gens lässt somit eine erhöhte DNA-Reparaturrate sowie eine Aktivierung von p53 nach Zinkdepletierung vermuten. Des Weiteren wurden durch die Generierung einer Zinkdepletion die Gene *APAF1*, *BAX*, *BCL2* sowie *PMAIP1* im proapoptotischen Sinne verändert. Alle vier Gene codieren dabei für Proteine des intrinsischen Apoptosesignalweges (Jourdan et al., 2009). Die Transkriptmengen von *APAF1* und *BAX* wurden durch 5  $\mu$ M TPEN jeweils verdoppelt, während die Genexpression von *PMAIP1* verdreifacht wurde und die Genexpression von *BCL2* lediglich 25 % der Kontrolle betrug. Auch das Gen der extrinsischen Apoptosesignalkaskade, *TNFRSF10B*, welches für den Todesrezeptor DR5 codiert, wurde in seiner Expression im Vergleich zur Kontrolle verdoppelt. Im Gegensatz dazu wurden die antiapoptotischen Gene *BCL2L1* und *XIAP*, verglichen mit der Kontrolle, verdoppelt. Somit kann keine eindeutige Aussage über die Auswirkung einer Zinkdepletion auf die Apoptose getroffen werden. In der Literatur wurde auf Proteinebene nach Inkubation mit TPEN, im Einklang mit unseren Ergebnissen, eine Einleitung des intrinsischen Apoptoseweges durch Messung der Caspase-3-Aktivität in der humanen Neuroblastomazelllinie IMR-32 sowie in primären kortikalen Neuronenzellen und Hepatozyten der Ratte detektiert (Adamo et al., 2009; Nakatani et al., 2000). Auch Chimienti und Kollegen fanden eine Aktivierung der Caspase-3, -8 und -9 in HeLa S3-Zellen, was auf die Einleitung der

Apoptose hindeutet (Chimienti et al., 2001). Im Gegensatz hierzu wurde in einer weiteren Studie jedoch keine Auswirkung einer Zinkdefizienz auf die Genexpression von *BCL2L1*, *BAX* und *BCL2* und auch keine Beeinflussung der Caspase-3-Aktivität in der humanen Bronchialepithelzelllinie NHBE gefunden (Fanzo et al., 2001). Allerdings wurde hier die Inkubation der Zellen mit 0,4  $\mu\text{M}$  Zn(II) als Zink-defizient bezeichnet, während in unserer Studie eine Zinkdepletion durch TPEN erfolgte, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte.

Die Behandlung der HeLa S3-Zellen mit 5 – 150  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , welches eine Normalversorgung mit Zink darstellt, zeigte zum größten Teil keine Veränderung der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle. Es stieg lediglich die Transkriptmenge der *MT*-Gene sowie von *SLC30A1* an. So konnte nach Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  eine tendenziell erhöhte Expression des *MT1X*-Gens festgestellt werden, während 150  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  die *MT1X*-Expression um den Faktor 17 verglichen mit der Kontrolle drastisch erhöhten. Das Gen *MT2A* wurde ebenfalls ab Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  signifikant verdoppelt und durch 150  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  um das 23-fache im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Beide *MT*-Gene codieren für zwei verschiedene MT-Proteinisoformen. Die Expression wird dabei über den Transkriptionsfaktor MTF-1 reguliert, sodass eine vermehrte Transkriptmenge der *MT*-Gene auf eine Aktivierung von MTF-1 zurückzuführen sind. MTF-1 besitzt einen Zinkfinger, der als Sensor für die intrazelluläre Konzentration an Zn(II) fungiert und im Falle einer hohen Zinkkonzentration die Expression von *MT*-Genen bewirkt. Somit deutet die drastische Erhöhung der *MT*-Transkriptmenge durch Behandlung mit hohen Konzentrationen an  $\text{ZnCl}_2$  auf einen starken Anstieg der intrazellulären Zinkkonzentration hin. Diese These stützend konnten Martin und Kollegen eine gesteigerte Transkriptmenge von *MT* sowie einen erhöhten Proteingehalt des Genproduktes MT nach 24-stündiger Inkubation von IPEC-J2-Zellen mit  $\text{ZnSO}_4$  nachweisen (Martin et al., 2013). Auch nach Supplementierung von Zn(II) in Mäusen wurde ein erhöhter MT-Proteingehalt gefunden (Wang et al., 2006). Des Weiteren wurde die Transkriptmenge des Gens *SLC30A1* durch 150  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  im Vergleich zur Kontrolle verdoppelt. Das Gen *SLC30A1* codiert für den Zinktransporter ZnT-1, welche für eine niedrige cytoplasmatische Zinkkonzentration durch den Efflux von Zn(II) aus der Zelle oder durch den Influx in zelluläre Vesikel sorgen. Da *SLC30A1* durch MTF-1 reguliert wird, weist die erhöhte Genexpression auf eine Aktivierung von MTF-1 durch hohe intrazelluläre Konzentrationen von Zn(II) hin (Gunther et al., 2012). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde *in vivo* in Ratten eine erhöhte Transkriptmenge des ZnT-1-Gens durch Zinksupplementierung im Darm und in der Leber detektiert (McMahon und Cousins, 1998).

Dies konnte ebenfalls nach oraler Gabe von Zn(II) an Schweinen sowie *in vitro* in IPEC-J2-Zellen nachgewiesen werden (Martin et al., 2013).

Die Generierung einer Zinkübersorgung wurde durch 250  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  erreicht und zeigte im Gegensatz zur Normalversorgung mit Zink eine ausgeprägte Beeinflussung der Expression vieler Gene im Vergleich zur Kontrolle. So wurde die Expression des *MT1X*-Gens um den Faktor 133 und des *MT2A*-Gens um den Faktor 135 verglichen mit der Kontrolle hochreguliert, was auf eine drastische Überladung der Zelle mit Zink hindeutet. Das Gen *GCLC*, welches für die  $\gamma$ -Glutamat-Cystein-Ligase (GCL) codiert (Lu et al., 2008), wurde durch 250  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  verstärkt exprimiert. GCL ist ein essentielles Enzym der GSH-Synthese, sodass eine Induktion des *GCLC*-Gens durch hohe Zinkkonzentrationen auf eine Aktivierung des GSH-Abwehrsystems bzw. auf eine zelluläre GSH-Depletion hinweist. In neuronalen PC12-Zellen konnte, übereinstimmend mit dieser Theorie, eine Abnahme des zellulären GSH-Gehaltes nach einer 2-stündigen Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  und 300  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  detektiert werden (Pavlica et al., 2009). Auch in primären Astrozyten von Ratten wurde eine drastische Abnahme des zellulären GSH-Spiegels nach Inkubation mit 200  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  beobachtet (Ryu et al., 2002). Durch die Generierung einer Zinkübersorgung mit 250  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  wurde ebenso eine vierfach erhöhte Transkriptmenge des „Sensorgens“ *HMOX1* quantifiziert. Dabei codiert *HMOX1* für die Hämoxigenase, welches am Katabolismus von Häm beteiligt ist und einen Indikator für oxidativen Stress darstellt (Choi und Alam, 1996). Hinsichtlich der Genexpression der Transkriptionsfaktoren wurde eine Vervierfachung des *SLC30A1*-Gens beobachtet, was auf eine Überladung der Zelle mit Zink hindeutet. Auch die Genexpression von *JUN* wurde deutlich gesteigert. *JUN* selbst codiert für den Transkriptionsfaktor AP-1, welcher essentiell für Gene des Zellwachstums und der Proliferation ist (Angel et al., 1988; Angel und Karin, 1991). Da *JUN* durch AP-1 autoreguliert wird, weist die gesteigerte Expression von *JUN* auf eine Aktivierung von AP-1 durch eine Zinkdefizienz und einen Zinküberschuss hin. Die Zinkübersorgung bewirkte zudem eine Hochregulierung des *CDKN1A*-Gens, was jedoch widersprüchlich zu der erhöhten Transkriptmenge an *JUN* ist und somit keine Aussage über die Induktion eines Zellzyklusarrests oder der Proliferation durch hohe Zinkkonzentrationen zulässt. Die Expression von Genen der DNA-Schadensantwort und –Reparatur im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert. Hinsichtlich der Apoptose-assoziierten Gene wurde lediglich die Expression von *BCL2L1* und *PMAIP1* hochreguliert. Da *BCL2L1* antiapoptotisch und *PMAIP1* proapoptotisch wirkt, kann die apoptotischen Wirkung eines Zinküberschusses nicht abschließend beurteilt werden. Fanzo

und Kollegen stellten eine apoptotische Wirkung nach Zinksupplementierung im Rahmen einer Hochregulierung der *BAX*- und *BCL2*-Gene in der humanen Aortenendothelzelllinie HAEC fest. Weiterhin wurde eine Abnahme der Caspase-3-Aktivität ermittelt, was darauf hindeutet, dass keine Apoptose eingeleitet wurde (Fanzo et al., 2002). Folglich waren auch hier die Ergebnisse widersprüchlich und es konnte keine eindeutige Aussage über die apoptotische Wirkung einer Zinksupplementierung getroffen werden.

Insgesamt führte die Normalversorgung an Zink lediglich zur veränderten Genexpression weniger Gene, wobei die Effekte jedoch erst bei der höheren Konzentration von 150  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  auftraten. Die Zinkdefizienz führte hingegen zu einer starken Beeinflussung der Gene aller Signalwege. Im Gegensatz dazu wirkte die Zinkübersorgung sich nicht auf die Expression der Gene der DNA-Schadensantwort und –Reparatur aus und führte zu einer insgesamt weniger stark ausgeprägten Veränderung der Transkriptmenge im Vergleich zur Zinkdefizienz.

## 5.2 Vergleichende Untersuchungen zum PARP-Inhibitor PJ-34, CoCl<sub>2</sub> und NaAsO<sub>2</sub>

### 5.2.1. ZYTOTOXIZITÄTSUNTERSUCHUNGEN

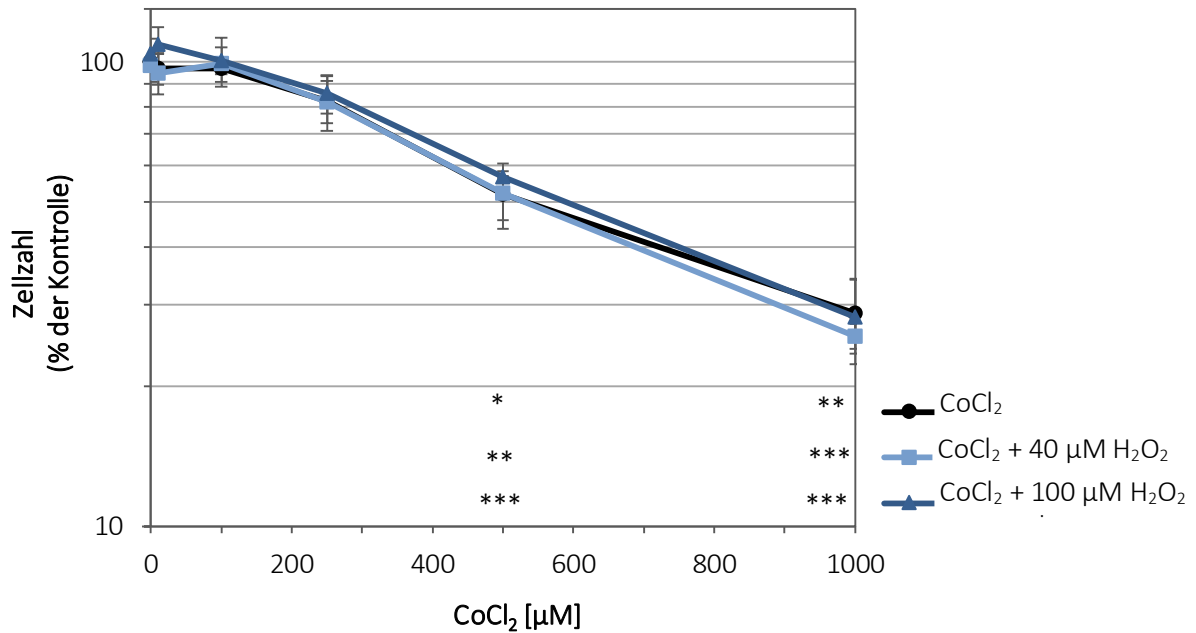
Um die optimalen Inkubationskonzentrationen für den PARP-Inhibitor PJ-34, CoCl<sub>2</sub> und NaAsO<sub>2</sub> festzulegen, wurden Zytotoxizitätsuntersuchungen in HeLa S3-Zellen und Untersuchungen zur Zellteilungsfähigkeit in TK6-Zellen vorgenommen. Die Zellen wurden zusätzlich jeweils 5 min mit 40 µM bzw. 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koinkubiert. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diente dabei in den Folgeversuchen zur Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen, die für die Aktivitätsversuche der PARP-1 relevant waren.

#### Untersuchung der Zellzahl von HeLa S3-Zellen

Der PARP-Inhibitor PJ-34 zeigte bis zu einer Konzentration von 20 µM keine akut zytotoxische Wirkung auf HeLa S3-Zellen (Anhang 8.7.2.1). Auch die Koinkubation mit 40 µM und 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduzierte die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle nicht.

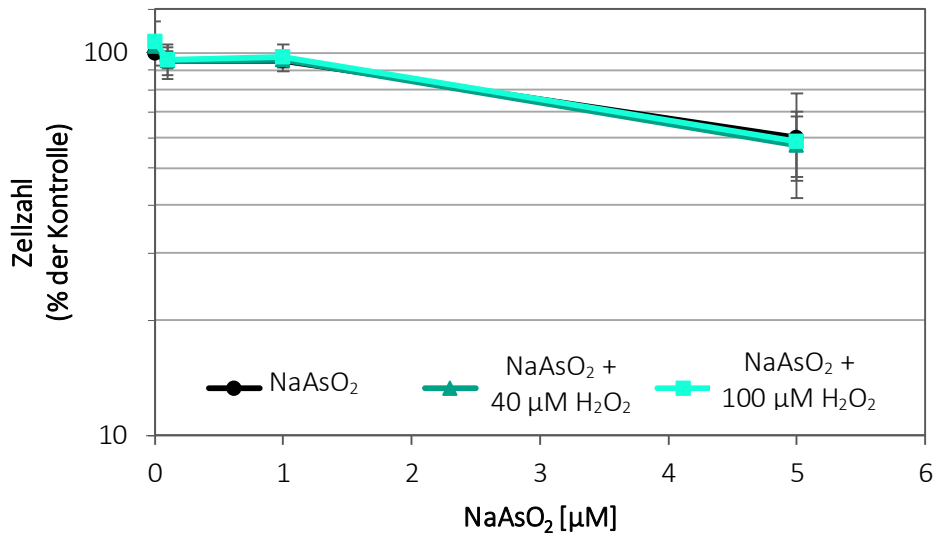
Die Zellzahlen nach Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> sind in Abbildung 34 dargestellt. Bis 100 µM CoCl<sub>2</sub> konnte keine verminderte Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Bei 250 µM CoCl<sub>2</sub> wurde die Zellzahl bis auf 80 % der Kontrolle reduziert, während 500 µM und 1 mM CoCl<sub>2</sub> stark zytotoxisch wirkten und die Zellzahl bis auf etwa 50 % bzw. 25 % der Kontrolle reduzierten. Die Inkubation sowie Koinkubation mit 40 µM bzw. 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte zu keiner Zellzahlabnahme im Vergleich zur Kontrolle. In einer Studie der Literatur wurde ein ähnliches Ausmaß der akuten Zytotoxizität in HeLa-Zellen mittels einer Trypanblaufärbung nachgewiesen (Hartwig et al., 1990). Während 200 µM CoCl<sub>2</sub> die Membranintegrität mäßig störte, konnte mit 500 µM CoCl<sub>2</sub> eine massive Schädigung der Membran detektiert werden.





**Abbildung 34: Einfluss von CoCl<sub>2</sub> bzw. CoCl<sub>2</sub> mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Zellzahl von HeLa S3-Zellen.** Die Zellen wurden 24 h mit CoCl<sub>2</sub> vorinkubiert und 5 min mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von mindestens sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T3 Post-Hoc-Test (\* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01; \*\*\* p ≤ 0,001).

In Abbildung 35 sind die relativen Zellzahlen nach Behandlung mit NaAsO<sub>2</sub> dargestellt. Bis zu einer Konzentration von 1 µM NaAsO<sub>2</sub> wurde keine Abnahme der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle detektiert, während 5 µM NaAsO<sub>2</sub> die Zellzahl auf 60 % der Kontrolle senkte. Die Koinkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte zu keiner zusätzlichen Reduktion der relativen Zellzahl. In früheren Studien unseres Arbeitskreises wurde ebenfalls die Zellzahl nach 18-stündiger Inkubation von HeLa S3-Zellen mit NaAsO<sub>2</sub> bestimmt, deren Ergebnisse sich mit dieser Studie decken. Lediglich die Konzentration von 5 µM NaAsO<sub>2</sub> wirkte hier leicht zytotoxischer (Hartwig et al., 2003b).



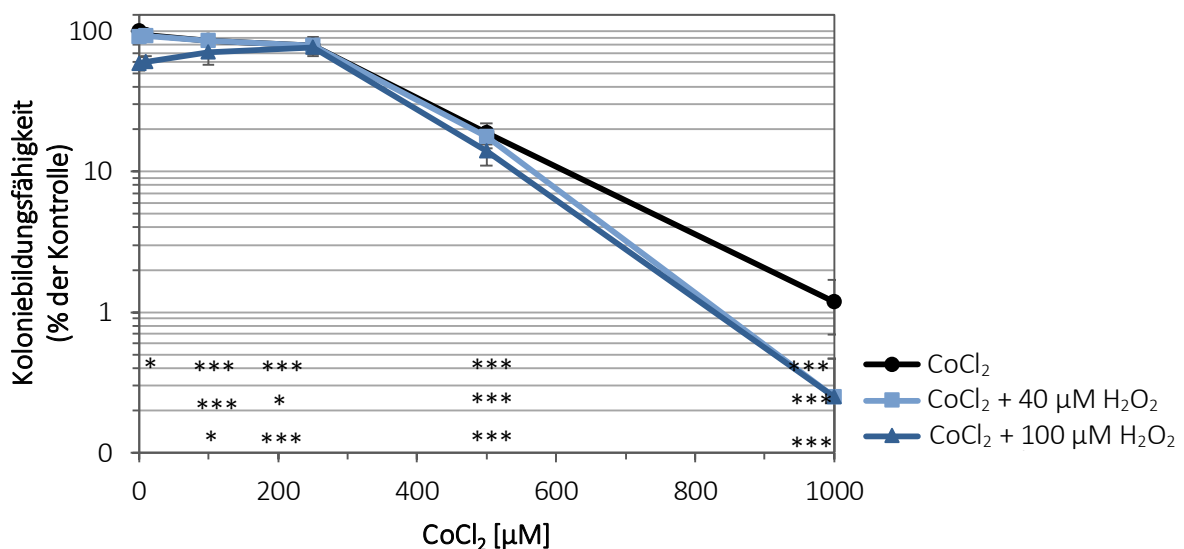
**Abbildung 35: Einfluss von NaAsO<sub>2</sub> bzw. NaAsO<sub>2</sub> mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Zellzahl von HeLa S3-Zellen.** Die Zellen wurden 18 h mit NaAsO<sub>2</sub> vorinkubiert und 5 min mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von mindestens sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen.

#### Untersuchung der Koloniebildungsfähigkeit von HeLa S3-Zellen

Hinsichtlich der Koloniebildungsfähigkeit reduzierte PJ-34 bei einer Konzentration von 10 µM die Koloniezahl der Kontrolle um etwa 10 %, während durch 20 µM PJ-34 die Koloniebildungsfähigkeit um circa 20 % gesenkt wurde (Anhang 8.7.2.1). Die Inkubation mit 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wirkte sich nicht auf die Koloniebildungsfähigkeit der Kontrolle aus und verstärkte auch nicht die PJ-34-vermittelte Zytotoxizität. Dahingegen reduzierten 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Koloniebildungsfähigkeit auf circa 75 %. Die zytotoxische Wirkung der Koinkubation von PJ-34 mit 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> setzte sich additiv aus der Zytotoxizität von PJ-34 und 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zusammen. In der Literatur wurde ähnlich zu unseren Ergebnissen eine Koloniebildungsfähigkeit von 80 % im Vergleich zur Kontrolle durch 10 µM PJ-34 festgestellt (Chevanne et al., 2010). Die leicht stärkere zytotoxische Wirkung könnte entweder durch die verlängerte Inkubationszeit von 24 h oder durch die unterschiedliche Empfindlichkeit der hier verwendeten Melanomzelllinie M14 erklärt werden.

CoCl<sub>2</sub> zeigte bis zu einer Konzentration von 100 µM keine Auswirkung auf die Koloniebildungsfähigkeit, während 250 µM CoCl<sub>2</sub> die Kolonienzahl auf etwa 75 % im Vergleich zur Kontrolle reduzierte (Abbildung 36). Eine starke Zytotoxizität wurde erst nach Inkubation mit 500 µM CoCl<sub>2</sub> erreicht. Eine Inkubation mit 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wirkte nicht zytotoxisch und beeinflusste auch nicht die CoCl<sub>2</sub>-induzierte Abnahme der Koloniebildungsfähigkeit. Eine

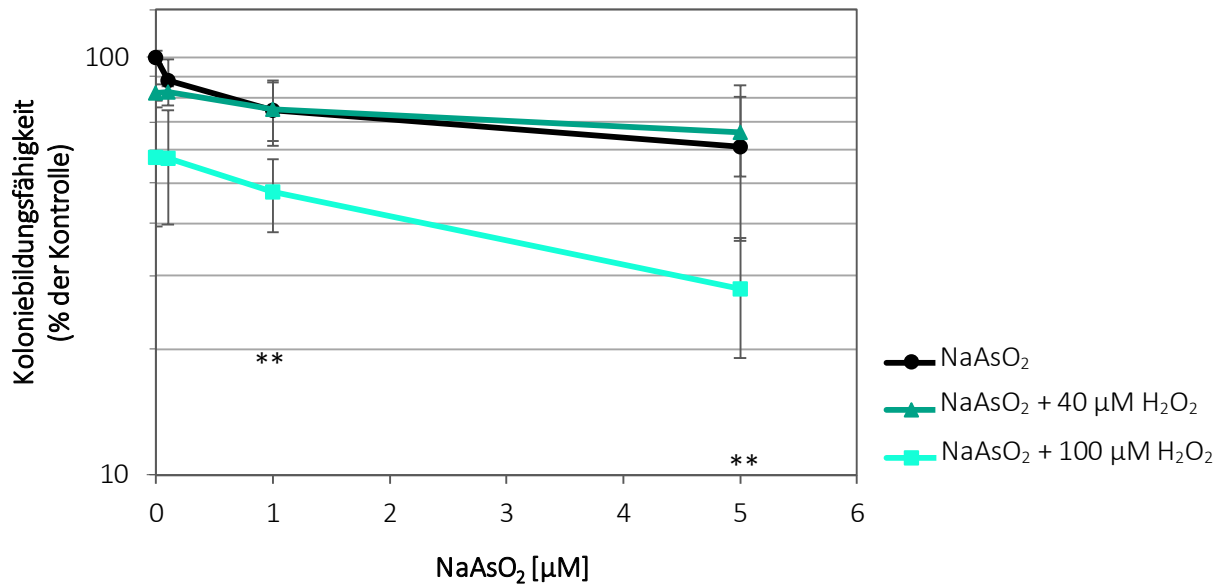
Erhöhung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration auf 100 µM führte zu einer Reduktion der Kolonienanzahl auf etwa 60 % der Kontrolle, wobei nach Koinkubation mit CoCl<sub>2</sub> weder eine additive noch eine synergistische Wirkung auf die Zytotoxizität beobachtet wurde. In der Literatur wurde bereits bei einer Konzentration von 100 µM CoCl<sub>2</sub> eine Abnahme der Koloniebildungsfähigkeit von 50 % im Vergleich zur Kontrolle in HeLa-Zellen detektiert, die linear bis hin zu 2 % bei 500 µM CoCl<sub>2</sub> abnahm (Hartwig et al., 1990). Ob der Subklon HeLa S3 prinzipiell empfindlicher gegenüber toxischen Substanzen reagiert, wurde bisher nicht gezeigt. Die stärkere zytotoxische Wirkung könnte erklärt werden durch das Verwenden eines anderen Mediums (hier DMEM im Vergleich zu MEM in der Literatur). Tendenziell empfindlicher zeigten sich U266-Zellen gegenüber einer 24-stündigen Behandlung mit CoCl<sub>2</sub>. So wurde bereits nach Inkubation mit 10 µM CoCl<sub>2</sub> eine um etwa 20 % geringere Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle gemessen, wobei mit 100 µM CoCl<sub>2</sub> die Zellviabilität in der Kontrolle um circa 35 % reduziert wurde (Bae et al., 2012).



**Abbildung 36:** Einfluss von CoCl<sub>2</sub> bzw. CoCl<sub>2</sub> mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Koloniebildungsfähigkeit von HeLa S3-Zellen. Die Zellen wurden 24 h mit CoCl<sub>2</sub> vorinkubiert und 5 min mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von mindestens sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T3 Post-Hoc-Test (\* p ≤ 0,05; \*\*\* p ≤ 0,001).

NaAsO<sub>2</sub> wirkte bis zu einer Konzentration von 1 µM leicht sowie bei 5 µM moderat zytotoxisch (Abbildung 37). Eine Inkubation bzw. Koinkubation mit 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wirkte sich nicht auf die Koloniebildungsfähigkeit der HeLa S3-Zellen aus. Dahingegen reduzierte eine Behandlung mit 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Koloniebildungsfähigkeit um etwa 40 % der Kontrolle. Eine Koinkubation von 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und NaAsO<sub>2</sub> führte jeweils zu einer additiven Abnahme der

Koloniezahl. Die Koloniebildungsfähigkeit nach Inkubation mit  $\text{NaAsO}_2$  wurde bereits in früheren Studien unseres Arbeitskreises untersucht, wobei ähnliche Ergebnisse erhalten wurden (Hartwig et al., 2003a; Schwerdtle et al., 2003b).



**Abbildung 37:** Einfluss von  $\text{NaAsO}_2$  bzw.  $\text{NaAsO}_2$  mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf die Koloniebildungsfähigkeit von HeLa S3-Zellen. Die Zellen wurden 18 h mit  $\text{NaAsO}_2$  vorinkubiert und 5 min mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  koinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von mindestens sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T3 Post-Hoc-Test (\*\*  $p \leq 0,01$ ).

### 5.2.2. EINFLUSS VON PJ-34, $\text{COCl}_2$ UND $\text{NaAsO}_2$ AUF DIE AKTIVITÄT DER PARP-1

Der PARP-Inhibitor PJ-34 ist in der Lage die Aktivität von PARP-1 vollständig zu inhibieren. Derzeit befindet er sich in einer präklinischen Entwicklung als Einsatz in der Tumorthherapie (Magan et al., 2012; Olausson et al., 2013). Thiolaffine Metallionen sind ebenfalls bekannt dafür, PARP-1 in ihrer Enzymaktivität zu hemmen. Als Mechanismus hierfür wird eine Wechselwirkung mit den Zinkfingerstrukturen der PARP-1 diskutiert. Inwiefern thiolaffine Metallionen die Kettenlänge und damit die Signalweiterleitung beeinflussen, ist bisher nicht bekannt. Im Folgenden wurde die Auswirkung von As(III) und Co(II) auf die subzelluläre und zelluläre Poly(ADP-Ribosyl)ierung untersucht, anhand der massenspektrometrischen und immunfluorimetrischen Quantifizierung der zellulären Poly(ADP-Ribose) deren Kettenlänge analysiert und mit dem Einfluss von PJ-34 verglichen.

### 5.2.2.1.        UNTERSUCHUNGEN AN ISOLIRTER PARP-1

Zunächst wurde der Einfluss von PJ-34,  $\text{CoCl}_2$  und  $\text{NaAsO}_2$  auf die Aktivität isolierter PARP-1 anhand des Einbaus biotinylierter ADP-Ribose kolorimetrisch ermittelt (Abbildung 38). Der Inhibitor PJ-34 führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der PARP-1-Aktivität. Durch  $0,1 \mu\text{M}$  PJ-34 wurde die PARP-1-Aktivität um etwa 60 % verringert, während bei  $10 \mu\text{M}$  PJ-34 eine komplette Inhibierung der PARP-1 verzeichnet wurde.

$\text{Co(II)}$  ist bekannt für seine hohe Affinität zu Zinkfinger-Strukturen (Asmuss et al., 2000a; Kopera et al., 2004; Palecek et al., 1999; Predki und Sarkar, 1992). PARP-1 enthält insgesamt drei solcher Zinkfinger, welche einen potentiellen Angriffspunkt für  $\text{Co(II)}$  darstellen könnten.  $\text{Co(II)}$  zeigte in einem Konzentrationsbereich von  $1 \mu\text{M}$  bis  $9 \mu\text{M}$  keine Beeinflussung der PARP-1-Aktivität (Abbildung 38 B). Durch die nächsthöhere eingesetzte Konzentration von  $10 \mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  wurde die PARP-1-Aktivität hingegen komplett inhibiert.  $\text{Co(II)}$  ist folglich in der Lage, die Aktivität der PARP-1 direkt zu hemmen. In dieser Studie wurde  $\text{CoCl}_2$  direkt mit PARP-1 inkubiert, während in Zellen  $\text{Co(II)}$  zunächst aufgenommen und zur PARP-1 gelangen müsste. Inwieweit eine Cobalt-vermittelte Inhibierung der PARP-1 auch im zellulären System gegeben ist, wurde im nächsten Kapitel analysiert.

$\text{As(III)}$  ist ebenfalls bekannt für seine hohe Affinität zu Zinkfinger-Strukturen. So wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben, dass die Zinkfinger der PARP-1 einen potentiellen Angriffspunkt für  $\text{As(III)}$  darstellen (Ding et al., 2009; Hartwig et al., 2003b). Eine Inkubation von PARP-1 mit  $\text{NaAsO}_2$  führte in einem Konzentrationsbereich von  $1 \text{ nM}$  bis  $1 \mu\text{M}$  zu keiner veränderten Menge an eingebauter biotinylierter ADP-Ribose und somit zu keiner beeinflussten Poly(ADP-Ribosyl)ierung (Abbildung 38 C).  $\text{As(III)}$  beeinflusst folglich nicht die Menge an eingebauter ADP-Ribose, jedoch kann keine Aussage über die Länge der einzelnen Poly(ADP-Ribose)-Ketten getroffen werden. Eventuell führt eine Behandlung mit  $\text{NaAsO}_2$  zur Bildung von vielen kleinen ADP-Ribose-Polymeren, worüber mittels photometrischer Auswertung keine Aussage getroffen werden kann. Ob dies tatsächlich der Fall ist, wurde in den nächsten Kapiteln durch Kombination der Ergebnisse der immunfluorimetrischen und massenspektrometrischen Quantifizierung der Poly(ADP-Ribose) untersucht. In der Literatur wurde eine subzelluläre Hemmung der PARP-1-Aktivität durch  $\text{NaAsO}_2$  beobachtet (Walter et al., 2007). Allerdings wurden hier hohe Konzentrationen von  $10 \mu\text{M}$  bis  $500 \mu\text{M}$  eingesetzt,

während As(III) in der Zelle die Poly(ADP-Ribosyl)ierung bereits ab 0,1  $\mu\text{M}$  verändert. Dabei ist höchst fraglich, ob solch hohe Konzentrationen PARP-1 lokal in der Zelle erreichen.

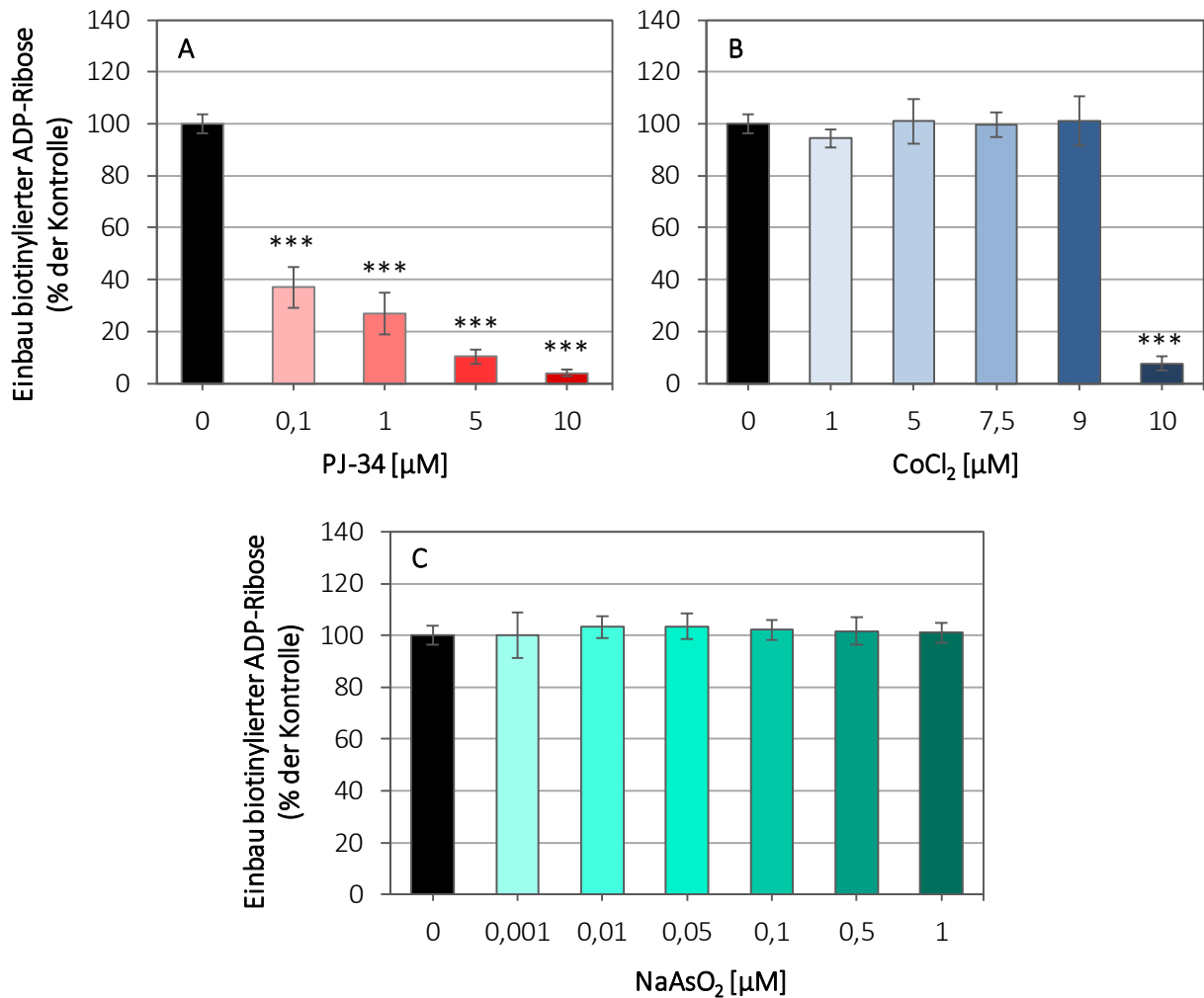


Abbildung 38: Einfluss einer einstündigen Inkubation von (A) PJ-34, (B) CoCl<sub>2</sub> und (C) NaAsO<sub>2</sub> auf den PARP-1-katalysierten Einbau von biotinylierter ADP-Ribose. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T3 Post-Hoc-Test (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass PJ-34 und Co(II) PARP-1 direkt hemmen, während As(III) keinen direkten Einfluss auf PARP-1 zu haben scheint.

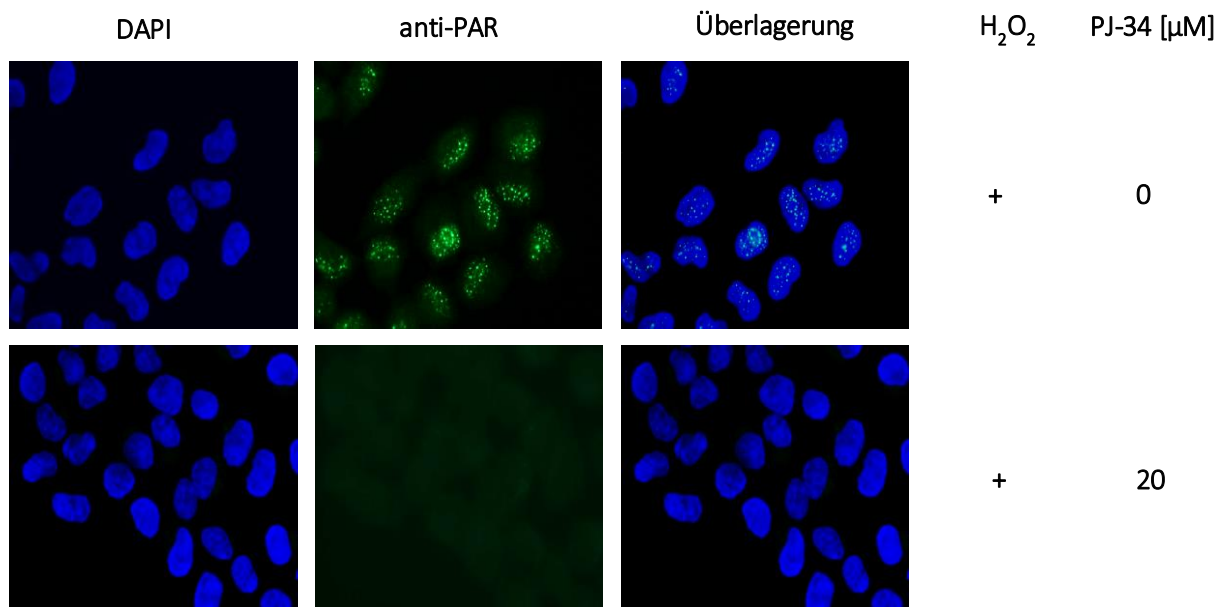
#### 5.2.2.2. UNTERSUCHUNGEN IN HELA S3-ZELLEN

##### Bestimmung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung mittels Immunfluoreszenz

Der Einfluss von PJ-34, CoCl<sub>2</sub> und NaAsO<sub>2</sub> auf die zelluläre Poly(ADP-Ribosyl)ierung wurde in HeLa S3-Zellen bestimmt. Dafür wurde zur Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen für 5 min

mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert und somit PARP-1 aktiviert. Die Poly(ADP-Ribose) wurde nach Fixierung der Zellen immunfluorimetrisch nachgewiesen.

In Abbildung 39 sind exemplarische Aufnahmen eines Versuchs mit PJ-34 dargestellt. Bei der eingesetzten Konzentration von 20 µM PJ-34 wurde keine Poly(ADP-Ribose) mehr nachgewiesen, was auf eine vollständige Inhibierung der PARP-1 hindeutet. PJ-34 ist nach unseren Daten ein potenter PARP-Inhibitor. In der Literatur wurde analog unserer Ergebnisse eine Inhibierung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten PARP-Aktivität in HeLa S3-Zellen berichtet (Feng und Koh, 2013). In früheren Untersuchungen unseres Arbeitskreises inhibierte PJ-34 bei einer Konzentration von 20 µM die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung in gleichem Maße (Piberger et al., 2015).

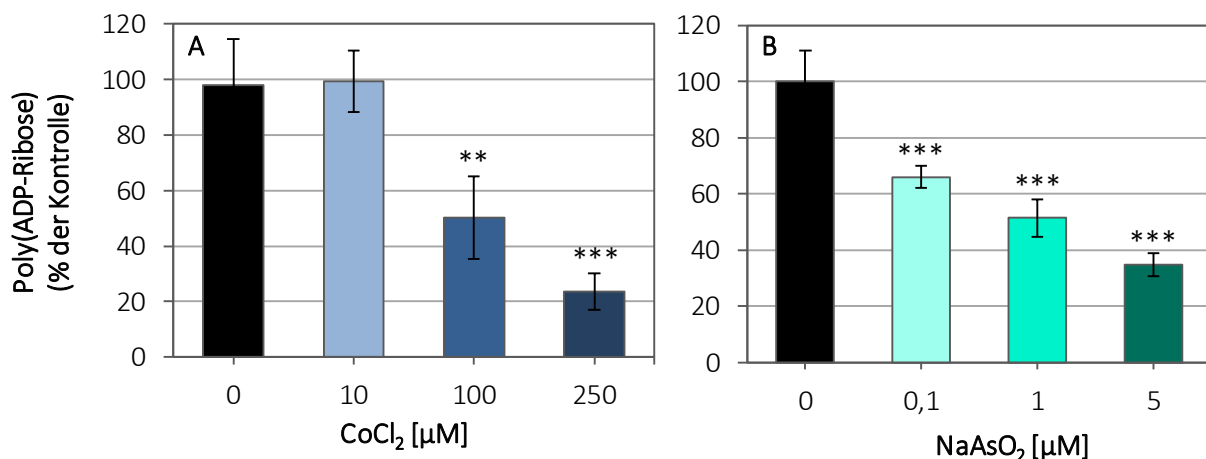


**Abbildung 39:** Immunfluorimetrische Analyse des Einflusses einer 2-stündigen Inkubation von PJ-34 auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung in HeLa S3-Zellen. Die DNA-Schadensinduktion erfolgte mit 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 5 min. Dargestellt sind exemplarische Aufnahmen eines Versuchs.

Der Einfluss von Co(II) auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung ist in Abbildung 40 A dargestellt. Die Behandlung mit 10 µM CoCl<sub>2</sub> wirkte sich nicht auf den Gehalt der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Poly(ADP-Ribose) aus. Ab 100 µM CoCl<sub>2</sub> wurde die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung auf die Hälfte und ab 250 µM CoCl<sub>2</sub> fast vollständig reduziert. Die Inkubation von CoCl<sub>2</sub> allein induzierte keine Poly(ADP-Ribosyl)ierung (Daten nicht dargestellt). Demnach ist CoCl<sub>2</sub> in der Lage, nicht nur isolierte PARP-1 zu hemmen, sondern auch zellulär den Gehalt an Poly(ADP-Ribose) zu reduzieren. Mit der immunfluorimetrischen Detektion der Poly(ADP-

Ribose) lassen sich jedoch keine kurzkettigen Poly(ADP-Ribose)-Polymere bestimmen, da der Primärantikörper lediglich an längere Poly(ADP-Ribose)-Ketten bindet. Eventuell könnte  $\text{CoCl}_2$  dazu führen, dass diese Ketten verkürzt werden, sodass mittels Immunfluoreszenz eine Abnahme des Poly(ADP-Ribose)-Gehaltes gemessen werden würde. Ob dies tatsächlich der Fall ist, wurde im nächsten Kapitel untersucht.

In der Literatur wurde bereits eine Reduktion der schadensinduzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch As(III), gemessen mittels Immunfluoreszenz, berichtet (Ding et al., 2009; Hartwig et al., 2003b). Inwiefern dies tatsächlich durch eine Inhibierung der PARP-1 oder eventuell durch die Bildung von verkürzten ADP-Riboseketten hervorgerufen wird, wurde bisher nicht geklärt. Deshalb wurden zunächst die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmessung der Poly(ADP-Ribose) reproduziert und anschließend mittels LC-MS näher untersucht. In Abbildung 40 B ist der Einfluss einer  $\text{NaAsO}_2$ -Inkubation auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung in HeLa S3-Zellen dargestellt. As(III) allein induzierte keine Poly(ADP-Ribosyl)ierung (Daten nicht dargestellt). Der Gehalt an  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierter Poly(ADP-Ribose) wurde konzentrationsabhängig reduziert. So konnte nach Behandlung mit  $0,1 \mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  eine Abnahme des Poly(ADP-Ribose)-Gehaltes um etwa 34 % verzeichnet werden, welcher nach Inkubation mit der höchsten Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  auf circa ein Drittel der Kontrolle abgesenkt wurde.



**Abbildung 40: Immunfluorimetrische Bestimmung des Einflusses von  $\text{CoCl}_2$  und  $\text{NaAsO}_2$  auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung in HeLa S3-Zellen.** Die Zellen wurde (A) 24h mit  $\text{CoCl}_2$  und (B) 18 h mit  $\text{NaAsO}_2$  inkubiert. Die DNA-Schadensinduktion erfolgte mit  $100 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  für 5 min. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T3 Post-Hoc-Test (\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).



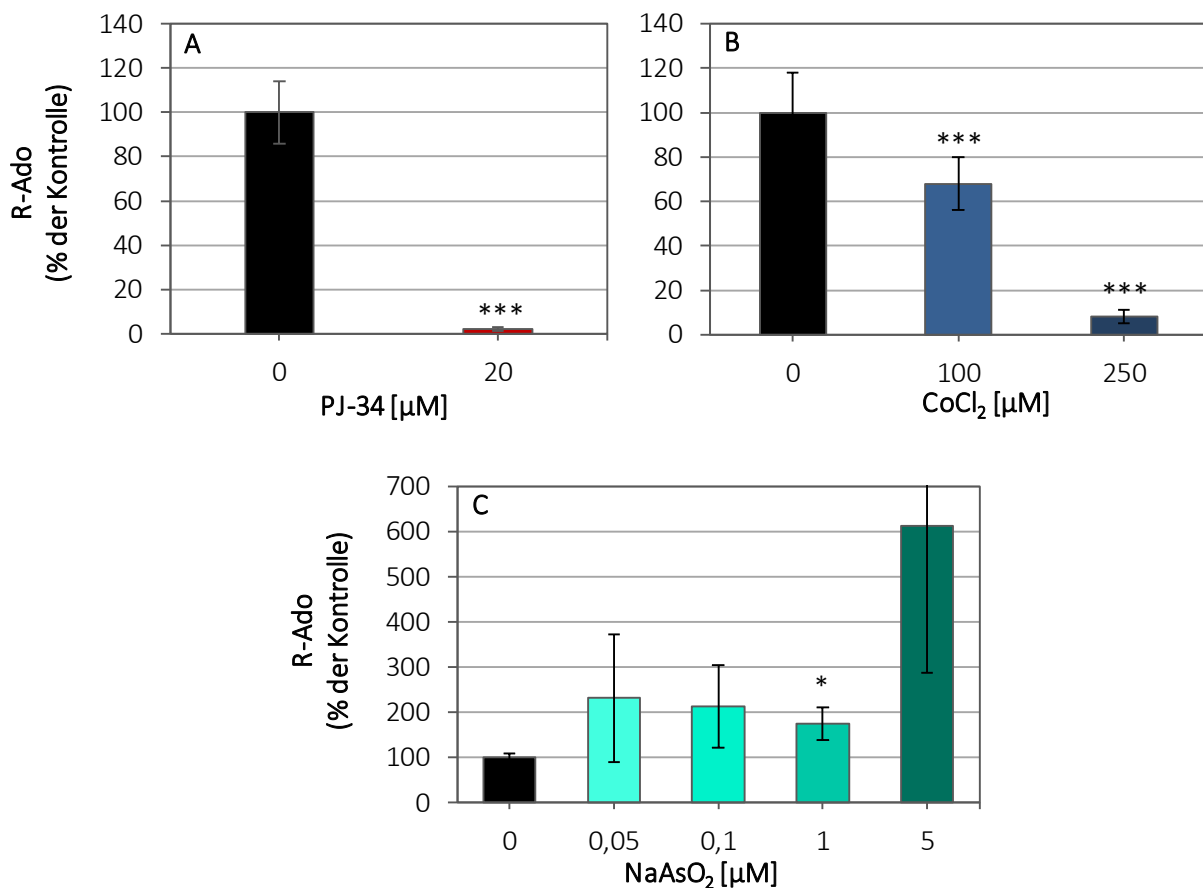
Sowohl der PARP-Inhibitor PJ-34 als auch die thiolaffinen Metallionen Co(II) und As(III) hemmten die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung, gemessen mittels Immunfluoreszenz, nahezu vollständig. Inwiefern die Abnahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung tatsächlich auf eine verminderte Anzahl an Poly(ADP-Ribose)-Polymeren zurückzuführen ist, oder ob lediglich die Kettenlänge der Polymere verkürzt wird, wurde näher mittels LC-MS untersucht.

### Bestimmung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung mittels LC-MS/MS

Zusätzlich zur Quantifizierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung mittels Immunfluoreszenz wurde eine Messung mittels LC-MS/MS nach Martello und Kollegen vorgenommen (Martello et al., 2013). Während immunfluorimetrisch lediglich lange Poly(ADP-Ribose)-Ketten bestimmt werden können, werden massenspektrometrisch alle Poly(ADP-Ribose)-Ketten, unabhängig von ihrer Länge, quantifiziert. In Abbildung 41 A ist der Einfluss von PJ-34 auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung dargestellt. Dabei wurde das Ribosyladenosin, der Baustein der Poly(ADP-Ribose), massenspektrometrisch gemessen. Wie bei der immunfluorimetrischen Analyse inhibierte auch hier PJ-34 die PARP-1 vollständig.

In Abbildung 41 B ist die Auswirkung von CoCl<sub>2</sub> auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung dargestellt. Bei einer Konzentration von 100 µM CoCl<sub>2</sub> wurde der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Gehalt an Ribosyladenosin um etwa 30 % im Vergleich zur Positivkontrolle reduziert. Eine nahezu kompletter Rückgang der Poly(ADP-Ribosyl)ierung auf etwa 10 % der Positivkontrolle konnte ab 250 µM CoCl<sub>2</sub> beobachtet werden. CoCl<sub>2</sub> allein induzierte keine Poly(ADP-Ribosyl)ierung (Daten nicht dargestellt). Während mittels Immunfluoreszenz eine Abnahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung um 50 % durch 100 µM CoCl<sub>2</sub> ermittelt wurde, konnte massenspektrometrisch lediglich eine Reduktion von 30 % festgestellt werden. Da der Primärantikörper 10H, welcher für die immunfluorimetrische Detektion der Poly(ADP-Ribose) eingesetzt wird, eine gewisse Kettenlänge der Poly(ADP-Ribose)-Polymere für die Bindung benötigt, wäre es denkbar, dass CoCl<sub>2</sub> durch direkte Wechselwirkung mit PARP-1 zur Bildung verkürzter Poly(ADP-Ribose)-Ketten führt. Da die Kettenlänge eine wichtige Rolle bei der Protein-Protein-Interaktion innerhalb der Zelle spielt, könnte dies ein zentraler Schadensmechanismus für Co(II) darstellen. So konnte gezeigt werden, dass die Kettenlänge die Bindungsaffinität verschiedener Proteine verändert und so eventuell unterschiedliche

Signalkaskaden auslöst. Beispielsweise führen lange Poly(ADP-Ribose)-Ketten zur Bindung von drei p53-Komplexen und einer Interaktion mit dem DNA-Reparaturprotein XPA, während kurze Poly(ADP-Ribose)-Ketten lediglich einen p53-Komplex binden und nicht mit XPA wechselwirken (Fahrer et al., 2007). Ein Mechanismus der Cobalt-vermittelten Reduktion der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung könnte die Bindung an die Zinkfinger der PARP-1 sein. Es wurde bereits gezeigt, dass Co(II) eine hohe Affinität gegenüber Zinkfinger anderer Proteine wie XPA, p53 und den Estrogenrezeptor aufweist (Asmuss et al., 2000a; Kopera et al., 2004; Palecek et al., 1999; Predki und Sarkar, 1992). Ein weiterer Grund für die reduzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch Co(II) könnte eine Abnahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüche sein. Dies wurde im nächsten Kapitel untersucht.



**Abbildung 41: Massenspektrometrische Bestimmung des Einflusses von PJ-34, CoCl<sub>2</sub> und NaAsO<sub>2</sub> auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung in HeLa S3-Zellen.** Die Zellen wurde (A) 2 h mit PJ-34, (B) 24h mit CoCl<sub>2</sub> und (C) 18 h mit NaAsO<sub>2</sub> inkubiert Die DNA-Schadensinduktion erfolgte mit 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 5 min. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle mit T-Test (\* p ≤ 0,05; \*\*\* p ≤ 0,001).

As(III) allein induzierte keine Poly(ADP-Ribosyl)ierung (Daten nicht dargestellt). Dahingegen konnte eine deutliche Zunahme des Gehaltes an Ribosyladenosin und somit eine verstärkte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung festgestellt werden (Abbildung 41 C). Bereits ab einer

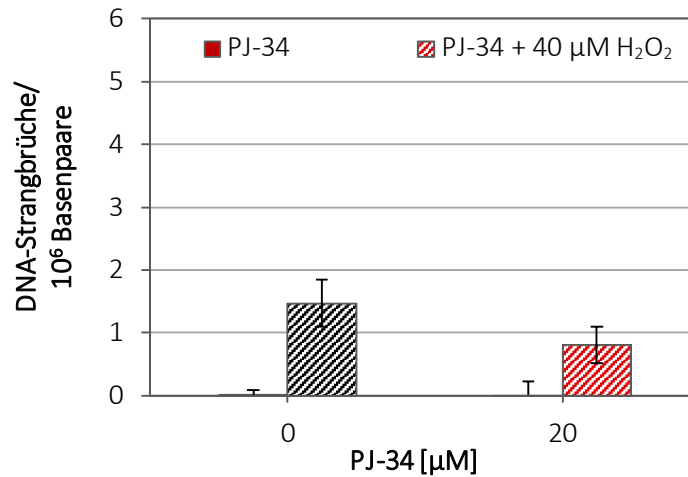
Inkubation von 0,1  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  wurde eine verstärkte Poly(ADP-Ribosyl)ierung von 182 % der Kontrolle beobachtet, die bei der höchsten Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  sogar auf bis zu 600 % der Kontrolle anstieg. Vergleicht man nun die Ergebnisse der immunfluorimetrischen Methode mit der massenspektrometrischen Methode, so kann auf die Kettenlänge der Poly(ADP-Ribose) rückgeschlossen werden. Mit der Immunfluoreszenz konnte nach Behandlung mit 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  eine konzentrationsabhängige Reduktion des  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten Poly(ADP-Ribose)-Gehaltes detektiert werden, während massenspektrometrisch eine konzentrationsabhängige Zunahme der Poly(ADP-Ribose)-Konzentration ermittelt wurde. Dies deutet darauf hin, dass As(III) zu einer vermehrten Bildung von Poly(ADP-Ribose) führt, welche jedoch kurzketzig sind. Die Kettenlänge der Poly(ADP-Ribose) scheint ein wichtiges Signal innerhalb der Zelle darzustellen. Dies könnte ein wichtiger Mechanismus sein, wie As(III) die PARP-1 bzw. deren Signal in Form der Poly(ADP-Ribose) beeinflusst.

Die Ergebnisse der subzellulären und zellulären Poly(ADP-Ribosyl)ierung deuten somit für PJ-34,  $\text{CoCl}_2$  und  $\text{NaAsO}_2$  auf deutlich unterschiedliche Wirkmechanismen hinsichtlich der Wechselwirkung mit PARP-1 hin.

### 5.2.3. EINFLUSS VON PJ-34, $\text{CoCl}_2$ UND $\text{NaAsO}_2$ AUF DIE ANZAHL $\text{H}_2\text{O}_2$ -INDUZIERTER DNA-STRANGBRÜCHE

Zur Analyse eines Einflusses des PARP-1-Inhibitors PJ-34,  $\text{CoCl}_2$  und  $\text{NaAsO}_2$  auf die Induktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbrüchen wurden HeLa S3-Zellen mit den entsprechenden Testsubstanzen vorinkubiert, die DNA-Strangbrüche durch eine 5-minütige Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  induziert und die DNA-Strangbruchanzahl mittels Alkalischer Entwindung quantifiziert.

In Abbildung 42 ist der Einfluss von PJ-34 auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte DNA-Strangbruchanzahl dargestellt. PJ-34 allein induzierte bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  keine DNA-Strangbrüche. Eine Koinkubation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und PJ-34 führte zu einer tendenziell geringeren DNA-Strangbruchanzahl verglichen mit der Inkubation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  allein.

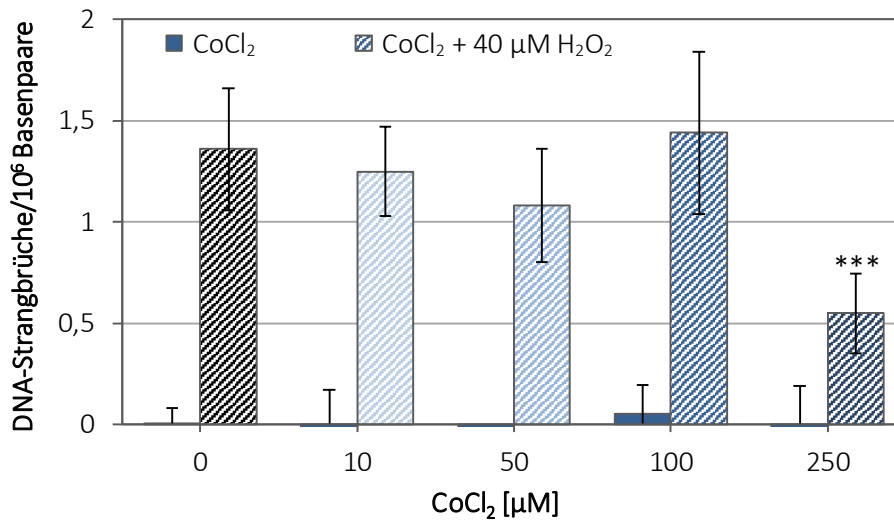


**Abbildung 42** Einfluss einer 2-stündigen Inkubation mit PJ-34 auf die Anzahl von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen in HeLa S3-Zellen. Die Schadensinduktion erfolgte mit 40  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 5 min. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von neun Werten aus drei unabhängigen Versuchen.

In Abbildung 43 ist der Einfluss von CoCl<sub>2</sub> auf die Häufigkeit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generierten DNA-Strangbrüchen dargestellt. Nach alleiniger Inkubation mit CoCl<sub>2</sub> waren keine DNA-Strangbrüche im Vergleich zur Negativkontrolle detektierbar. In Kombination mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konnte bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  CoCl<sub>2</sub> kein Einfluss auf die DNA-Strangbruchrate festgestellt werden. Bei der höchsten Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  CoCl<sub>2</sub> wurde eine Erniedrigung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbruchanzahl um etwa 60 % gemessen. Eine Inkubation mit Co(II) allein führte in unserer Studie zu keiner DNA-Strangbruchinduktion. In der Literatur sind hierzu widersprüchliche Studien zu finden. So wurde beispielsweise in Lymphozyten, gemessen mittels Alkalischer Elution, keine DNA-strangbrechende Wirkung durch CoCl<sub>2</sub> beobachtet (Anard et al., 1997). Dahingegen wurden nach 24-stündiger Behandlung von HeLa-Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  CoCl<sub>2</sub> DNA-Strangbrüche mittels Nukleoid-Sedimentation nachgewiesen (Hartwig et al., 1990).

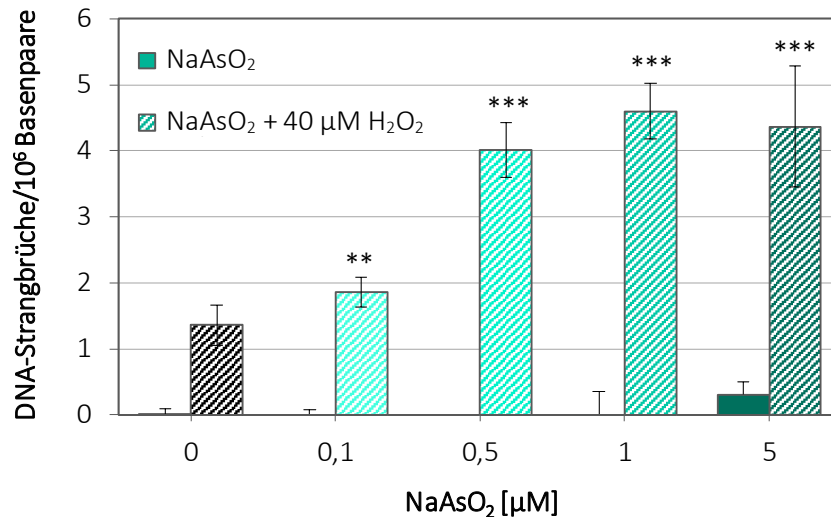
In unseren Experimenten beeinflusste eine Behandlung mit Co(II) die Anzahl an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  CoCl<sub>2</sub> nicht. Dies deutet darauf hin, dass die Cobalt-vermittelte Abnahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch die direkte Inhibierung der PARP-1 zustande kommt. Lediglich 250  $\mu\text{M}$  CoCl<sub>2</sub> führte zu einer Reduktion der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbruchrate. Ein möglicher Grund dafür könnte die vermehrte Expression von antioxidativen Proteinen darstellen, welche H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder die reaktiveren Sauerstoffspezies wie das Superoxidanion oder Hydroxylradikale detoxifizieren

könnten. Passend zu dieser Theorie konnte eine erhöhte Aktivität der Glutathionperoxidase durch Co(II) in HepG2-Zellen festgestellt werden (Ehleben et al., 1997).



**Abbildung 43: Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit CoCl<sub>2</sub> auf die Anzahl von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen in HeLa S3-Zellen.** Die Schadensinduktion erfolgte mit 40 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 5 min. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von neun Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test (\*\*\*) p ≤ 0,001).

Abbildung 44 zeigt den Einfluss von As(III) auf die Häufigkeit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierter DNA-Strangbrüche. Eine Inkubation mit NaAsO<sub>2</sub> allein führte zu keiner Induktion an DNA-Strangbrüchen. Eine Koinkubation von NaAsO<sub>2</sub> mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hingegen führte zu einer synergistischen Zunahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüche. Dabei wurde ab einer Konzentration von 0,5 μM NaAsO<sub>2</sub> die Anzahl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierter DNA-Strangbrüche etwa verdreifacht. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen fanden Schwerdtle und Kollegen kein DNA-strangbrechendes Potential für As(III) allein (Schwerdtle et al., 2003b). Auch in HaCaT-Zellen induzierte As(III) keine DNA-Strangbrüche (Qin et al., 2008). Übereinstimmend mit unseren Daten wurde eine synergistische Induktion von DNA-Strangbrüchen für die Koinkubation von 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit 0,5 μM NaAsO<sub>2</sub> beobachtet (Hartwig et al., 2003b). Dies könnte durch die hohe Affinität von As(III) gegenüber Thiolgruppen erklärt werden. Beispielsweise ist As(III) in der Lage, einen Komplex mit drei Glutathion (GSH) zu bilden und so das Substrat abzufangen, welches der Detoxifizierung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dient (Scott et al., 1993).



**Abbildung 44:** Einfluss einer 18-stündigen Inkubation mit NaAsO<sub>2</sub> auf die Anzahl von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen in HeLa S3-Zellen. Die Schadensinduktion erfolgte mit 40 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 5 min. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von neun Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T3 Post-Hoc-Test (\*\* p ≤ 0,01; \*\*\* p ≤ 0,001).

Insgesamt konnte also gezeigt werden, dass PJ-34 sowie lediglich die höchste Konzentration an CoCl<sub>2</sub> die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte DNA-Strangbruchanzahl tendenziell erniedrigten, während NaAsO<sub>2</sub> zu einem synergistischen Anstieg führte.

#### 5.2.4. EINFLUSS VON PJ-34, COCL<sub>2</sub> UND NAASO<sub>2</sub> AUF DIE REPARATUR H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-INDUZIERTER DNA-STRANGBRÜCHE

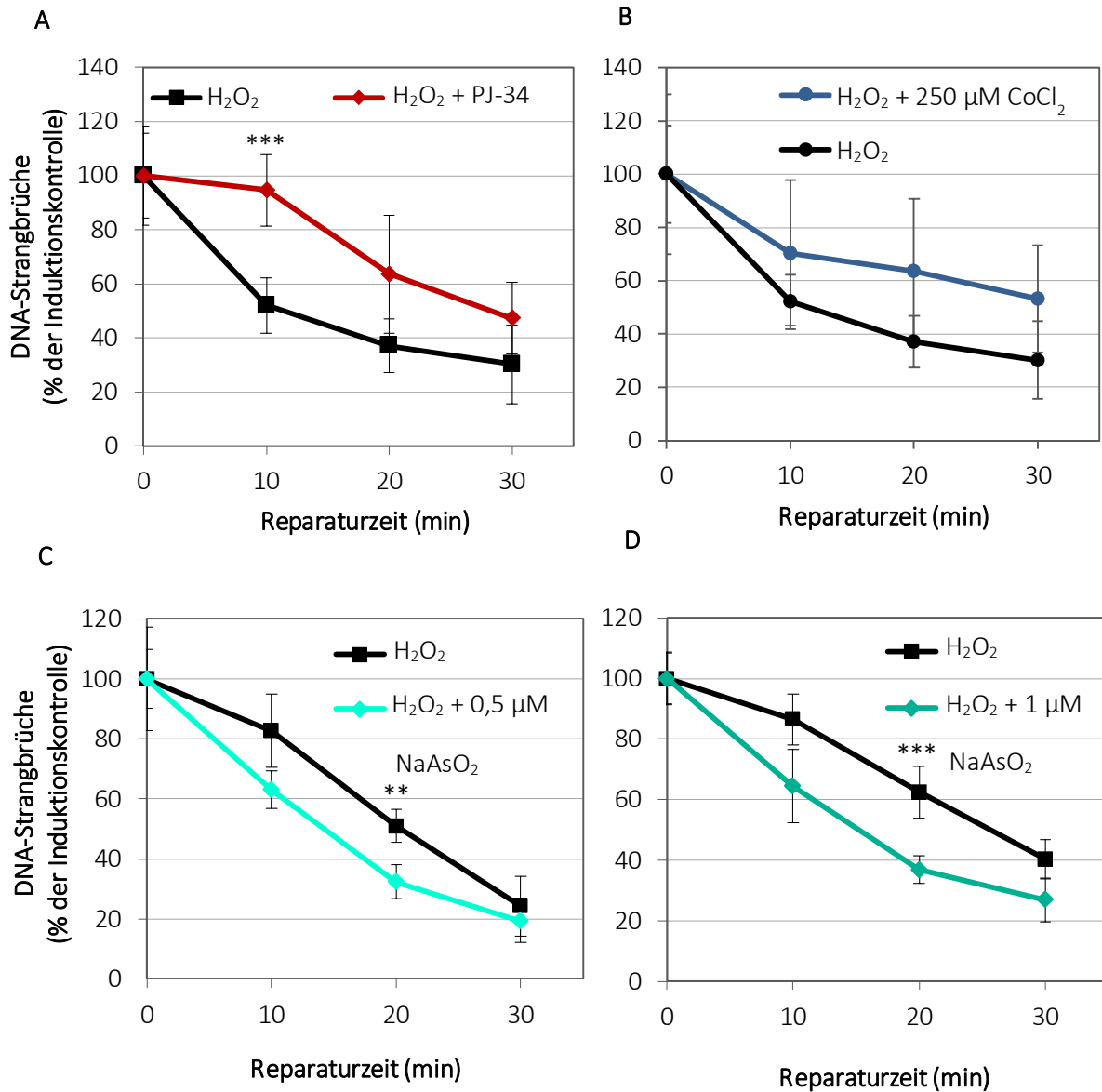
PARP-1 ist für die DNA-Schadensdetektion bei der DNA-Einzelstrangbruchreparatur verantwortlich. Inwieweit eine Inhibierung von PARP-1 die Reparaturkinetik von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen beeinflusst, wurde nach Behandlung von HeLa S3-Zellen mit dem PARP-Inhibitor PJ-34, CoCl<sub>2</sub> und NaAsO<sub>2</sub> mittels Alkalischer Entwindung untersucht. Hierfür wurden HeLa S3-Zellen mit den Testsubstanzen inkubiert, DNA-Strangbrüche durch 5-minütige Inkubation mit 40 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziert und deren Reparatur über 30 min mittels Alkalischer Entwindung bestimmt.

In Abbildung 45 A ist die Reparaturkinetik von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen in normalen bzw. durch PJ-34 PARP-inhibierten HeLa S3-Zellen dargestellt. Die Reparatur von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen erfolgte fast vollständig innerhalb von 30 min nach Schadensinduktion im Rahmen einer einfach exponentiell abnehmenden Funktion. PJ-34 verlangsamte hingegen die Reparatur nach 10 min Reparaturzeit, während nach 30 min lediglich eine geringfügige, nicht signifikante vermehrte Anzahl an DNA-Strangbrüchen zu

erkennen war. Cantoni und Kollegen untersuchten ebenfalls die Reparaturkinetik von  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbrüchen in CHO-Zellen und erhielten vergleichbare Werte (Cantoni et al., 1986). Weiterhin wurde für HeLa S3-Zellen eine vollständige Reparatur von  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Schäden nach einer Stunde beschrieben (Collins et al., 1995). In früheren Untersuchungen unseres Arbeitskreises wurden ähnliche Reparaturkinetiken erhalten; lediglich nach 10 min Reparaturzeit wurde eine höhere Anzahl an DNA-Strangbrüchen verglichen mit den Daten dieser Arbeit verzeichnet (Piberger et al., 2015).

Die Inhibierung von PARP-1 führte in unserer Studie lediglich zu einer verlangsamen und nicht zu einer kompletten Inhibierung der DNA-Strangbruchreparatur. Dies deckt sich mit den Daten der Literatur. In einer Studie von Cantoni und Kollegen wurde der Einfluss des PARP-Inhibitors 3-Aminobenzamid (3-AB) auf die Reparaturkinetik  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierter DNA-Strangbrüche beschrieben. Die Inhibierung der PARP-1 durch 3-AB führte zu einer verlangsamen Reparaturkinetik mit Halbwertszeiten für die Reparatur von DNA-Strangbrüchen, die sich mit unseren Daten decken. Weiterhin wurde eine verlangsamte Reparaturkinetik durch drei weitere PARP-Inhibitoren, INH2BP, 1,5-IQD und NU1025, beobachtet (Ryabokon et al., 2009). In früheren Untersuchungen unseres Arbeitskreises konnte ebenfalls eine ähnlich ausgeprägte Verlangsamung der Reparaturkinetik der DNA-Strangbruchreparatur durch PJ-34 festgestellt werden (Piberger et al., 2015).

Die Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  beeinflusste die DNA-Einzelstrangbruchreparatur nicht (Anhang 8.7.3.1). Bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 250  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  wurden die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbrüche tendenziell langsamer repariert, jedoch lagen die DNA-Strangbruchwerte aufgrund der relativ großen Standardabweichung im Schwankungsbereich der Kontrolle (Abbildung 45 B). Die tendenziell verlangsamte DNA-Reparatur nach Behandlung mit 250  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  könnte auf die Inhibierung von PARP-1 durch  $\text{Co(II)}$  zurückzuführen sein. Die DNA-Schadensdetektion der PARP-1 stellt einen wichtigen Faktor für eine schnelle DNA-Einzelstrangbruchreparatur dar. So konnte bereits gezeigt werden, dass ein Knock-out von PARP-1 zu einer signifikant verlangsamen DNA-Einzelstrangbruchreparatur führt (Fisher et al., 2007). Allerdings sollten aufgrund der hohen Standardabweichung weitere Experimente durchgeführt werden, um die Cobalt-vermittelte Verlangsamung der DNA-Einzelstrangbruchreparatur zu verifizieren.



**Abbildung 45:** Einfluss von PJ-34, CoCl<sub>2</sub> und NaAsO<sub>2</sub> auf die Reparatur von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen in HeLa S3-Zellen. Die Zellen wurden (A) 2 h mit PJ-34, (B) 24 h mit CoCl<sub>2</sub> und (C, D) 18 h mit NaAsO<sub>2</sub> inkubiert. Die Schadensinduktion erfolgte mit (A) 40 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (B) 60 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und (C) 80 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 5 min. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von neun Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle mit T-Test (\*\* p ≤ 0,01; \*\*\* p ≤ 0,001).

Wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben, ist As(III) in der Lage, die Kettenlänge der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Poly(ADP-Ribose) zu verringern. Inwiefern sich dies auf die DNA-Einzelstrangbruchreparatur auswirkt, wurde anhand der Reparaturkinetik von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen untersucht. Da eine Koinkubation von NaAsO<sub>2</sub> mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einer synergistischen Zunahme der Anzahl an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen und somit zu einer unterschiedlichen Reparaturkinetik führt, wurde die Konzentration der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Kontrolle so angepasst, dass zu Beginn der DNA-Reparatur in etwa die gleiche DNA-Strangbruchanzahl wie mit NaAsO<sub>2</sub>



vorhanden war. Eine Behandlung von HeLa S3-Zellen mit 0,1  $\mu\text{M}$  bis 5  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  verlangsamte die Reparatur der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbrüche nicht (Anhang 8.7.4.1). Bei den eingesetzten Konzentrationen von 0,5  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  kam es sogar zu einer beschleunigten DNA-Reparatur nach 10 min bzw. 20 min Reparaturzeit (Abbildung 45 C und D). Der Einfluss von As(III) auf die DNA-Einzelstrangbruchreparatur ist in der Literatur bis dato noch nicht beschreiben und wird hier erstmals gezeigt. Die in den vorigen Kapiteln beschriebene erhöhte Anzahl an  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbrüchen kann folglich nicht auf eine inhibierte oder verlangsamte DNA-Einzelstrangbruchreparatur zurückgeführt werden. As(III) ist bei einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  sogar in der Lage, die DNA-Einzelstrangbruchreparatur zu beschleunigen. Woran dies liegen könnte, kann nur spekuliert werden. Eventuell resultiert aus der vermehrten Bildung an kürzeren Poly(ADP-Ribose)-Ketten durch As(III), wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben, eine Beschleunigung der DNA-Einzelstrangbruchreparatur. Dies sollte durch weitere Versuche aufgeklärt werden.

Wie bei den Analysen des Einflusses auf die Poly(ADP-Ribosyl)ierung deuten die Ergebnisse des Einflusses von PJ-34,  $\text{CoCl}_2$  und  $\text{NaAsO}_2$  auf die Reparaturkinetik  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierter DNA-Strangbrüche auf unterschiedliche zelluläre Wirkmechanismen hin.

### 5.2.5. EINFLUSS VON PJ-34, $\text{CoCl}_2$ UND $\text{NaAsO}_2$ AUF DIE GENOMISCHE STABILITÄT

#### 5.2.5.1. UNTERSUCHUNG DES ZELLYKLUS

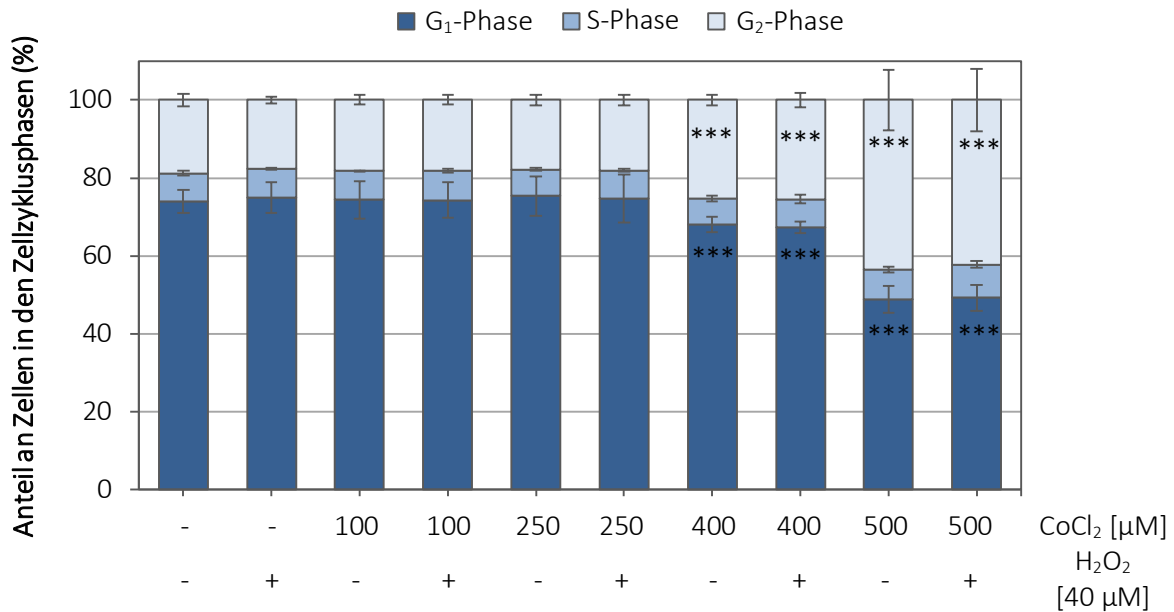
Zur Untersuchung der genomischen Stabilität von PARP-beeinflussten Zellen erfolgte eine Analyse der Zellzyklusphasenverteilung unter Verwendung des DNA-interkalierenden Farbstoffs SYTOX Green in HeLa S3-Zellen. Die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes korreliert dabei mit der Menge an DNA, sodass auf die vorliegende Zellzyklusphase rückgeschlossen werden kann. Der DNA-Gehalt der  $G_2/M$ -Phase, also nach der Replikation, ist im Vergleich zur  $G_0/G_1$ -Phase verdoppelt, während die S-Phase direkt zwischen beiden Phasen liegt.

$\text{H}_2\text{O}_2$  allein hatte keine Auswirkung auf die Zellzyklusverteilung (Anhang 8.7.2.1). Auch die Inhibierung der PARP-1 durch PJ-34 wirkte sich nicht auf die Zellzyklusverteilung aus, weder allein noch nach Koinkubation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Anhang 8.7.2.1). Jin und Kollegen untersuchten die Auswirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf die Zellzyklusphasenverteilung in menschlichen Lungenepithelzellen. Nach 9-stündiger Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  konnte ebenfalls kein Zellzyklusarrest detektiert werden (Jin et al., 2015). Auch nach einer Studie von Park und Kollegen beeinflusste  $\text{H}_2\text{O}_2$  die

Zellzyklusphasenverteilung nach 24-stündiger Inkubation in HeLa-Zellen, analog zu unseren Daten, nicht (Park, 2014). Dahingegen wurde in Hepatomazellen eine erhöhte Zellzahl in der S-Phase nach 30-minütiger Inkubation mit einer höheren Konzentration von 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  festgestellt (Yang et al., 2013).

In dieser Arbeit konnte keine Beeinflussung der Zellzyklusverteilung durch PJ-34 detektiert werden, wohingegen Yang und Kollegen durch eine 24-stündige Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  PJ-34 einen  $\text{G}_0/\text{G}_1$ -Phasenarrest in Hepatomazellen beobachteten. Da die Inkubation mit einem weiteren PARP-Inhibitor, 3-AB, sowie durch PARP-1-Depletion durch PARP-1 siRNA, ebenso zu einem  $\text{G}_0/\text{G}_1$ -Phasenarrest führte, postulierten sie für PARP-1 eine wichtige Rolle in der Zellproliferation (Yang et al., 2013). Auch Madison und Kollegen beobachteten einen Zellzyklusarrest, allerdings in der  $\text{G}_2/\text{M}$ -Phase, nach 6- bzw. 24-stündiger Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  PJ-34 in HeLa-Zellen. Die Diskrepanz zu unseren Ergebnissen könnte erklärt werden durch die geringere Inkubationszeit von 2 h im Vergleich zu den 6 h bzw. 24 h in der Literatur.

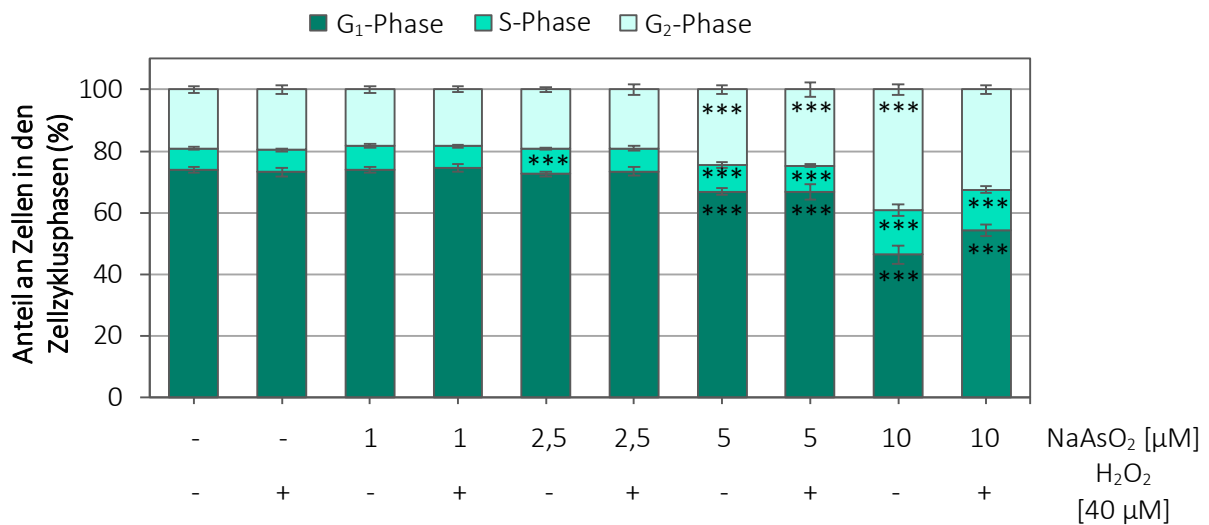
Die Auswirkung von  $\text{CoCl}_2$  auf die Zellzyklusverteilung ist in Abbildung 46 dargestellt.  $\text{CoCl}_2$  führte erst ab hohen, zytotoxischen Konzentrationen von 400  $\mu\text{M}$  bzw. 500  $\mu\text{M}$  zu einem Zellzyklusarrest in der  $\text{G}_2$ -Phase. So lag der Anteil an Zellen in der  $\text{G}_2$ -Phase nach Behandlung mit 400  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  bei 25 % bzw. mit 500  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  bei 43 % verglichen mit 19 % in der Kontrolle. Die Inkubation mit 40  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  bzw. die Koinkubation mit 40  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  führte zu keinem bzw. keinem verstärkten Cobalt-vermittelten  $\text{G}_2$ -Phasenarrest.



**Abbildung 46: Einfluss von CoCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. CoCl<sub>2</sub> mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Zellzyklusphasenverteilung in HeLa S3-Zellen.** Die Zellen wurden 24 h mit CoCl<sub>2</sub> bzw. 5 min mit 40 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert und deren Verteilung in den Zellzyklusphasen am FACS mittels SYTOX Green-Färbung bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T3 Post-Hoc-Test (\*\*\*) p ≤ 0,001).

NaAsO<sub>2</sub> führte erst ab hohen, zytotoxischen Konzentrationen von 5 μM bzw. 10 μM zu einem Zellzyklusarrest in der G<sub>2</sub>-Phase (Abbildung 47). Dabei lag der Anteil an Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase nach Behandlung mit 5 μM NaAsO<sub>2</sub> bei 24 % bzw. mit 10 μM NaAsO<sub>2</sub> bei etwa 39 % verglichen mit 19 % in der Kontrolle. Die alleinige Inkubation sowie Koinkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatte keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung. In der Literatur wurden bereits Effekte von As(III) auf die Zellzyklusverteilung berichtet. In den ovariellen Fischzellen TO-2 konnte analog unserer Daten ein Zellzyklusarrest in der G<sub>2</sub>-Phase beobachtet werden. Dahingegen rief eine Behandlung mit NaAsO<sub>2</sub> in der Fischzelllinie JF einen G<sub>1</sub>-Phasenarrest hervor (Wang et al., 2004a). Ein Arrest in der S-Phase wurde wiederum in der humanen Lymphomzellen Molt-3 nach 24-stündiger Behandlung mit 5 μM bis 20 μM NaAsO<sub>2</sub> ermittelt (Yager und Wiencke, 1997). Demnach hat

As(III) einen Einfluss auf den Zellzyklus, der sich je nach Zelltyp in einem Arrest in unterschiedlichen Phasen manifestiert.



**Abbildung 47: Einfluss von NaAsO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. NaAsO<sub>2</sub> mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Zellzyklusphasenverteilung in HeLa S3-Zellen.**

Die Zellen wurden 24 h mit NaAsO<sub>2</sub> bzw. 5 min mit 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert und deren Verteilung in den Zellzyklusphasen am FACS mittels Sytox-Green-Färbung bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test (\*\*\*) p ≤ 0,001).

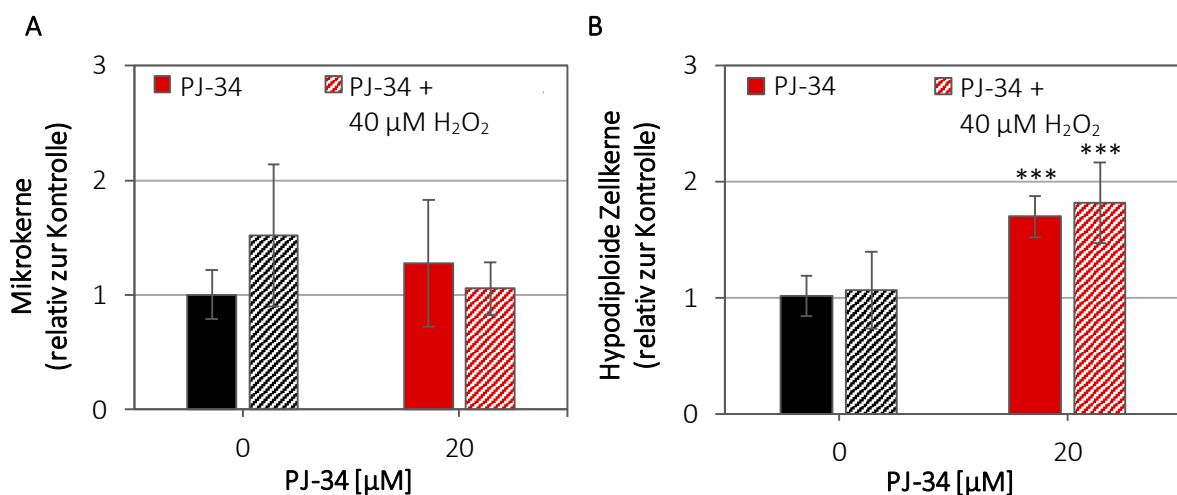
#### 5.2.5.2. UNTERSUCHUNG DER GENOTOXIZITÄT

Um den Einfluss von PARP-1 auf die genomische Stabilität zu untersuchen, wurde der Mikrokerntest mittels FACS nach Inkubation mit PJ-34, CoCl<sub>2</sub> und NaAsO<sub>2</sub>, teils gefolgt von einer 5-minütigen Inkubation mit 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, durchgeführt. Mikrokerne sind chromatinhaltige, membranumhüllte Strukturen in der Zelle, welche neben dem Zellkern vorkommen können. Dabei werden zwei Arten unterschieden: zum einen der klassische Mikrokernel, welcher durch klastogene, also chromosomenbrechende, Substanzen gebildet werden kann, sowie der hypodiploide Zellkern, welcher durch aneugene, also spindelschädigende, Effekte induziert wird (Andreassi et al., 2007).

In Abbildung 48 sind die Ergebnisse des Mikrokerntests nach PJ-34-Inkubation dargestellt. Der PARP-Inhibitor PJ-34 induzierte keine Mikrokerne, jedoch konnte eine vermehrte Anzahl an hypodiploiden Zellkernen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Eine Koinkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beeinflusste die Ergebnisse zur PJ-34-vermittelten Induktion von hypodiploiden Zellkernen nicht und wies auch keine vermehrte Anzahl an Mikrokerneln auf.

Auch in der Literatur konnte nach Inhibierung der PARP-1 keine Mikrokerninduktion festgestellt werden. Beispielsweise untersuchten Catena und Kollegen die Auswirkung von 3-Aminobenzamid (3-AB) auf die Mikrokernanzahl in Lymphozyten und fanden keine erhöhte Mikrokernrate im Vergleich zur Kontrolle (Catena et al., 1994).

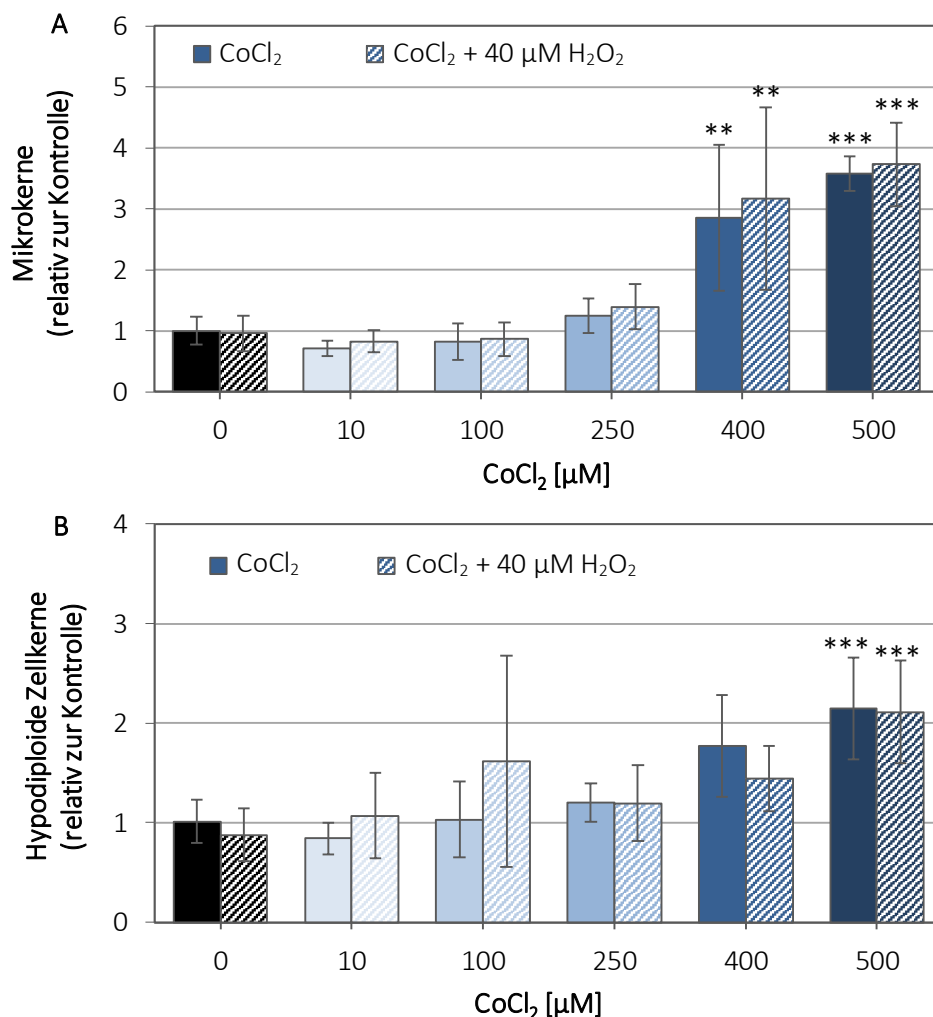
Die aneugene Wirkung des PARP-Inhibitors könnte anhand der Rolle der Poly(ADP-Ribose) in der Mitose erklärt werden. Eizellen des Krallenfrosches *Xenopus* zeigen eine Anreicherung der Poly(ADP-Ribose) in der mitotischen Spindel, welche essentiell ist für die Ausbildung der bipolaren Spindel (Chang et al., 2004). In einer weiteren Studie wurden, übereinstimmend mit unseren Daten, aneugene Effekte in PARP-1-defizienten Embryonenfibroblasten aus Mäusen beobachtet (Fagagna et al., 1999). PARP-1 könnte somit eine wichtige Rolle in der Mitose und damit in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität spielen.



**Abbildung 48: Induktion von Mikrokernen nach einer 2-stündigen Inkubation mit 20 µM PJ-34 mit oder ohne Inkubation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> HeLa S3-Zellen.** Die Zellen wurden 2 h mit 20 µM PJ-34 vorinkubiert bzw. 5 min mit 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. (A) Klastogene Effekte wurden anhand der Mikrokernbildung gemessen und (B) aneugene Effekte anhand der Bildung von hypodiploiden Zellkernen. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von neun Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach T-Test (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

In Abbildung 49 ist die Cobalt-vermittelte Induktion von Mikrokernen in HeLa S3-Zellen dargestellt. CoCl<sub>2</sub> induzierte bei zytotoxischen Konzentrationen von 400 µM bzw. 500 µM Mikrokerninduktion. Die Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte zu keiner Mikrokerninduktion und erhöhte auch nicht die Anzahl der Cobalt-induzierten Mikrokerninduktion. Weiterhin konnte eine Induktion von hypodiploiden Zellkernen, ebenfalls durch 400 µM und 500 µM CoCl<sub>2</sub>, beobachtet werden. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigte keine Induktion und führte auch nicht zu einer Erhöhung der Cobalt-induzierten hypodiploiden Zellkerne. Konsistent mit diesen Daten konnten Suzuki und Kollegen keine

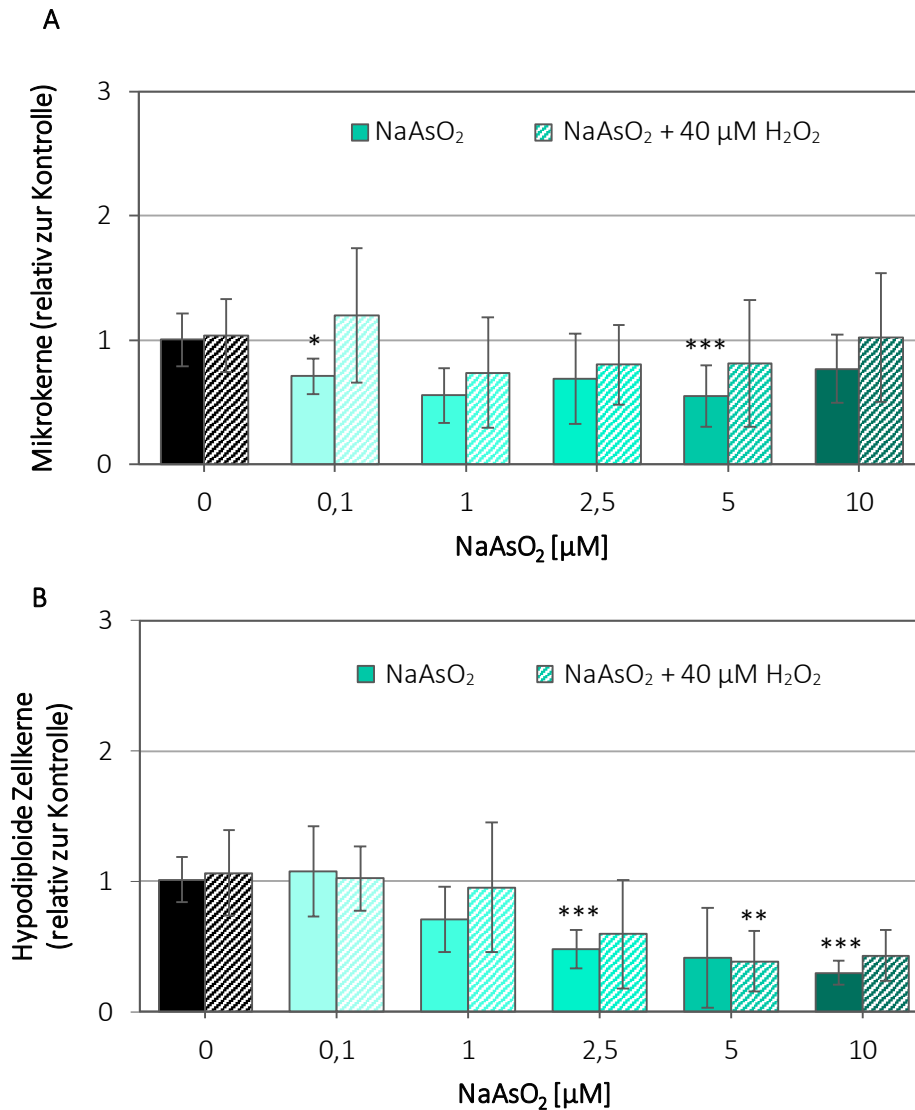
Mikrokerninduktion bis zu einer Konzentration von 210  $\mu\text{M}$  Co(II) in Maus-Knochenmarkszellen beobachten. *In vivo* induzierte  $\text{CoCl}_2$  nach intraperitonealer Verabreichung in Mäusen ab einer Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht polychromatische mikrokernhaltige Erythrozyten (Suzuki et al., 1993a). Auch nach oraler Gabe induzierte Co(II) Mikrokerne in Knochenmarkszellen von Mäusen (Palit et al., 1991b). Dies weist auf einen klastogenen Effekt hin. Zusätzlich zur Mikrokerninduktion wurde die Generation von hypodiploiden Zellkernen durch Co(II) festgestellt, was auf einen aneugenen Effekt hindeutet. Dies wird durch mehrere Studien in der Literatur bekräftigt. So wurde auch *in vivo* ein aneugenes Potential von Co(II) festgestellt (Farah, 1983; Figgitt et al., 2010).



**Abbildung 49: Induktion von Mikrokernen durch  $\text{CoCl}_2$  mit oder ohne Inkubation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in HeLa S3-Zellen.** Die Zellen wurden 24 h mit  $\text{CoCl}_2$  vorinkubiert bzw. 5 min mit 40  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kokubiert. (A) Klastogene Effekte wurden anhand der Mikrokernbildung gemessen und (B) aneugene Effekte anhand der Bildung von hypodiploiden Zellkernen. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von neun Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T3 Post-Hoc-Test (\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

NaAsO<sub>2</sub> induzierte in dem getesteten Konzentrationsbereich von 0,1 µM bis 10 µM weder Mikrokerne noch hypodiploide Zellkerne (Abbildung 50). Die Anzahl an hypodiploiden Zellkernen nahm sogar nach Behandlung ab 2,5 µM NaAsO<sub>2</sub> ab. Die Inkubation bzw. Koinkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte zu keiner erhöhten Anzahl an Mikrokernen sowie hypodiploiden Zellkernen. In der Literatur wurde bereits mehrfach eine Induktion von Mikrokernen durch As(III) berichtet. Allerdings lagen die getesteten Konzentrationen überwiegend im stark zytotoxischen Bereich. So wurden ab zytotoxischen Konzentration von 20 µM NaAsO<sub>2</sub> in XRS-5-Zellen sowie von 20 µM bzw. 40 µM NaAsO<sub>2</sub> in CHO-K1-Zellen Mikrokerne beobachtet (Liu und Huang, 1997; Wang und Huang, 1994). Auch *in vivo* wurde in Knochenmarkszellen der Maus die Induktion von Mikrokernen festgestellt. Hier wurden den Mäusen jeweils Dosen von 1 mg/kg KG bzw. 2,5 mg/kg KG oral, intraperitoneal oder mittels Gavage verabreicht (Tice et al., 1997; Tinwell et al., 1991). Insgesamt induziert As(III) folglich erst ab höheren Konzentrationen Mikrokerne.

Die Abnahme der Anzahl an hypodiploiden Zellkerne könnte erklärt werden durch einen Arsenvermittelten mitotischen Arrest. In Kapitel 5.2.5.1 wurde bereits ein Zellzyklusarrest in der G<sub>2</sub>-Phase berichtet. Da hypodiploide Zellkerne erst als Resultat einer Zellteilung entstehen, könnte so die Anzahl an hypodiploiden Zellkernen im Vergleich zur Kontrolle gesenkt werden. In der Literatur hingegen wurden aneugene Effekte durch As(III) berichtet. In HFW-Zellen induzierte As(III) ab zytotoxischen Konzentrationen Kinetochor-positive Zellen, was auf einen aneugenen Effekt hindeutet (Yih und Lee, 1999). Auch in humanen Lymphozyten konnte ab einer 24-stündigen Behandlung mit einer niedrigen Konzentration von 0,1 nM As(III) die Induktion von hypodiploiden Zellkernen detektiert werden (Vega et al., 1995). Im Vergleich dazu konnte in unseren Experimenten weder ein klastogener noch aneugener Effekt durch As (III) beobachtet werden. Dies könnte durch die unterschiedlichen Methoden erklärt werden. Während die Mikrokerne und hypodiploiden Zellkerne in den Versuchen der Literatur am Mikroskop ohne Anfärbung von apoptotischen oder nekrotischen Zellen ausgezählt wurden, wurden in unseren Versuchen eine Färbetechnik mit EMA und SYTOX Green angewandt, um mittels FACS die nekrotischen und apoptotischen Zellen von der Analyse auszuschließen. In vergleichenden Experimenten am Mikroskop und am FACS konnte ein klastogenes und aneugenes Potential für As(III) mittels Mikroskop, jedoch keine Wirkung mittels FACS festgestellt werden (Daten nicht dargestellt).



**Abbildung 50: Induktion von Mikrokernen durch NaAsO<sub>2</sub> mit oder ohne Inkubation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in HeLa S3-Zellen.** Die Zellen wurden 18 h mit NaAsO<sub>2</sub> vorinkubiert bzw. 5 min mit 40 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koinkubiert. (A) Klastogene Effekte wurden anhand der Mikrokernbildung gemessen und (B) aneugene Effekte anhand der Bildung von hypodiploiden Zellkernen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von neun Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T3 Post-Hoc-Test (\* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01; \*\*\* p ≤ 0,001).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein induzierte in unseren Studien weder Mikrokernbildung noch hypodiploide Zellkerne. Die Literaturdaten zur Mikrokerninduktion sind sehr widersprüchlich. In humanen Lymphozyten wurde bereits eine klastogene Wirkung ab einer 30-minütigen Inkubation mit 50 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beobachtet (Fenech et al., 1999). Dahingegen wurden in einer anderen Studie nach 30-minütiger Inkubation mit bis zu 250 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> keine Mikrokernbildung, ebenfalls in humanen Lymphozyten, nachgewiesen (Domínguez et al., 1993). Die Daten wurden mittels Mikroskop generiert, wodurch eventuell nekrotische und apoptotische Zellkerne, die im Vergleich zu den



lebenden Zellen vermehrt Mikrokerne aufweisen, mit ausgezählt wurden. Wie bei den Versuchen mit  $\text{NaAsO}_2$  konnten wir mikroskopisch eine Induktion von Mikrokernen, jedoch keine mittels FACS, beobachten (Daten nicht dargestellt). Dies bekräftigt die Theorie, dass anhand des Mikrokerntests am Mikroskop auch nekrotische und apoptotische Zellen mit ausgewertet werden. Aneugene Effekte durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  sind bis dato nicht bekannt. Nach unserem Kenntnisstand liegen in der Literatur keine Daten zu aneugenen Effekten durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  vor.

### 5.2.5.3.        UNTERSUCHUNG DER MUTAGENITÄT

Die mutagene Wirkung von PJ-34,  $\text{CoCl}_2$  und  $\text{NaAsO}_2$  wurde mittels des PIG-A Assays in TK6-Zellen untersucht. Anhand der relativen Zellzahlzunahme (RICC) wurde zunächst die Zellteilungsfähigkeit nach Behandlung der Suspensionszelllinie TK6 mit den Testsubstanzen eingeschätzt, um eine ausreichende Zellteilungsrate für den PIG-A Mutagenitäts-Assay sicherzustellen.

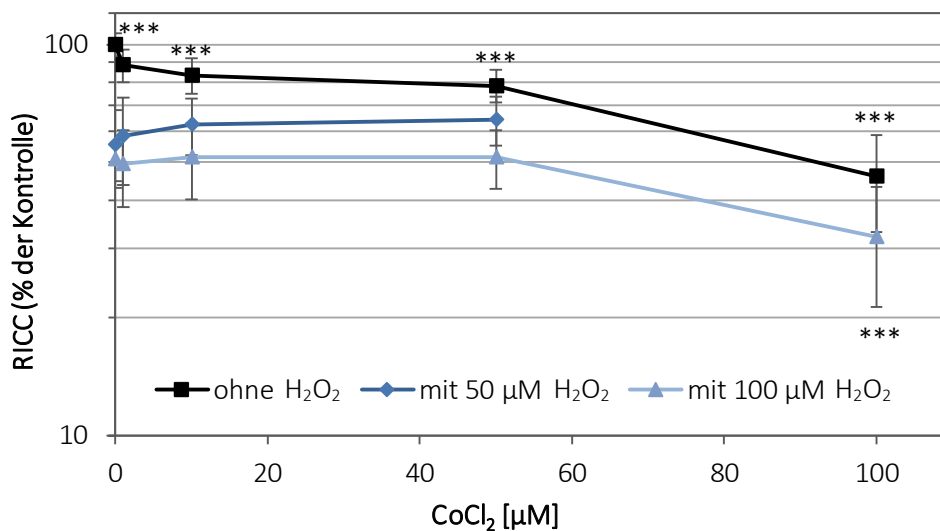
#### Untersuchung der Zellteilungsfähigkeit in TK6-Zellen

Die eingesetzte Konzentration von  $20 \mu\text{M}$  PJ-34 führte zu keiner Abnahme des RICC (Anhang 8.7.2.1).  $\text{H}_2\text{O}_2$  allein sowie in Koinkubation mit PJ-34 führte hingegen zu einer Verringerung des RICC um 60 %. Pyriochou und Kollegen untersuchten die Zellzahl nach 48-stündiger Behandlung mit PJ-34 in humanen umbilikalen venösen Endothelzellen. Bei  $10 \mu\text{M}$  PJ-34 wurde hier eine Zellzahl von etwa 80 % der Kontrolle gemessen, was auf eine mäßige Zytotoxizität hindeutet (Pyriochou et al., 2008). Eventuell ist die Diskrepanz der Ergebnisse mit der deutlich höheren Inkubationszeit von 48 h zu erklären.

Die deutlich zytotoxischere Wirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in TK6-Zellen im Vergleich zu HeLa S3-Zellen resultiert vermutlich aus den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. Während HeLa S3-Zellen adhärent wachsen, wachsen TK6-Zellen in einer Suspension, sodass der Kontakt mit den Testsubstanzen im Gegensatz zu den HeLa S3-Zellen von allen Seiten erfolgt.

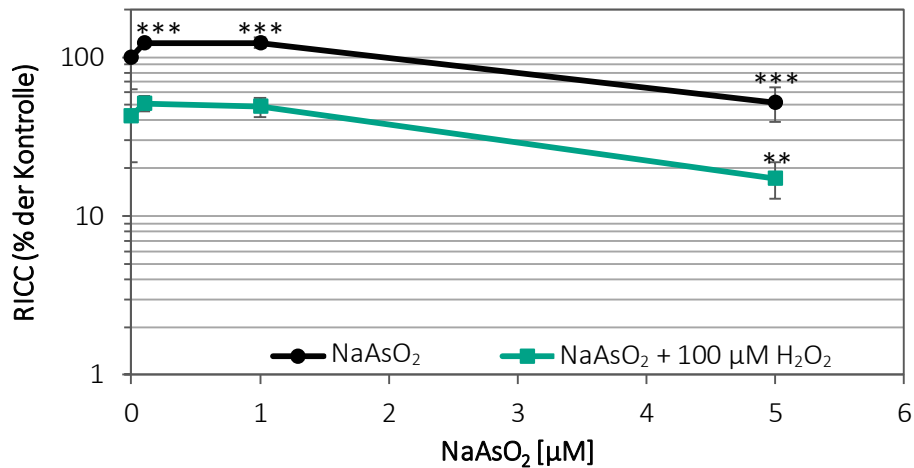
$\text{CoCl}_2$  führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Zellteilungsfähigkeit von TK6-Zellen (Abbildung 51). Mäßige Effekte auf die Zellteilungsfähigkeit wurden nach Behandlung mit  $10 \mu\text{M}$  und  $50 \mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  festgestellt. Eine starke Reduktion des RICC trat erst nach Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  auf.  $\text{H}_2\text{O}_2$  senkte den RICC bei einer Konzentration von  $50 \mu\text{M}$

bzw. 100  $\mu\text{M}$  auf etwa 50 % der Kontrolle und hemmte damit deutlich die Zellteilungsfähigkeit der TK6-Zellen. Die Koinkubation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{CoCl}_2$  führte zu einer additiven hemmenden Wirkung auf die Zellteilungsfähigkeit. Verglichen mit der Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit von  $\text{CoCl}_2$  in HeLa S3-Zellen wurden bei denselben Konzentrationen zytotoxischere Effekte in TK6-Zellen beobachtet. Dies könnte, wie im Fall von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , durch die erhöhte Exposition der Suspensionszellen TK6 im Vergleich zu den adhären wachsenden HeLa S3-Zellen erklärt werden, die aufgrund des Anwachsens an die Zellkulturschale lediglich von einer Seite inkubiert werden.



**Abbildung 51: Einfluss von  $\text{CoCl}_2$  bzw.  $\text{CoCl}_2$  mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf die Zellteilungsfähigkeit von TK6-Zellen.** Die Zellen wurden 24 h mit  $\text{CoCl}_2$  vorinkubiert und 5 min mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  koinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von sechs Werten von drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T3 Post-Hoc-Test (\*\*\*) ( $p \leq 0,001$ ).

$\text{NaAsO}_2$  führte zunächst bei Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme des RICC von TK6-Zellen (Abbildung 52). Moderate Effekte auf die Zellteilungsfähigkeit der TK6-Zellen wurden nach Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  beobachtet. Die Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  reduzierte den RICC deutlich, wobei die Koinkubation von 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  mit  $\text{NaAsO}_2$  die Zellteilungsfähigkeit der TK6-Zellen additiv hemmte. Verglichen mit den Daten zur Koloniebildungsfähigkeit wirkte  $\text{NaAsO}_2$  leicht zytotoxischer in TK6-Zellen als in HeLa S3. Dies könnte durch die unterschiedliche Inkubationsart von der adhären Zelllinie HeLa S3, die lediglich von einer Seite mit der Inkubationslösung in Kontakt kommt, im Vergleich zur Suspensionszelllinie TK6, die von allen Seiten mit der Testsubstanz inkubiert wird, erklärt werden.

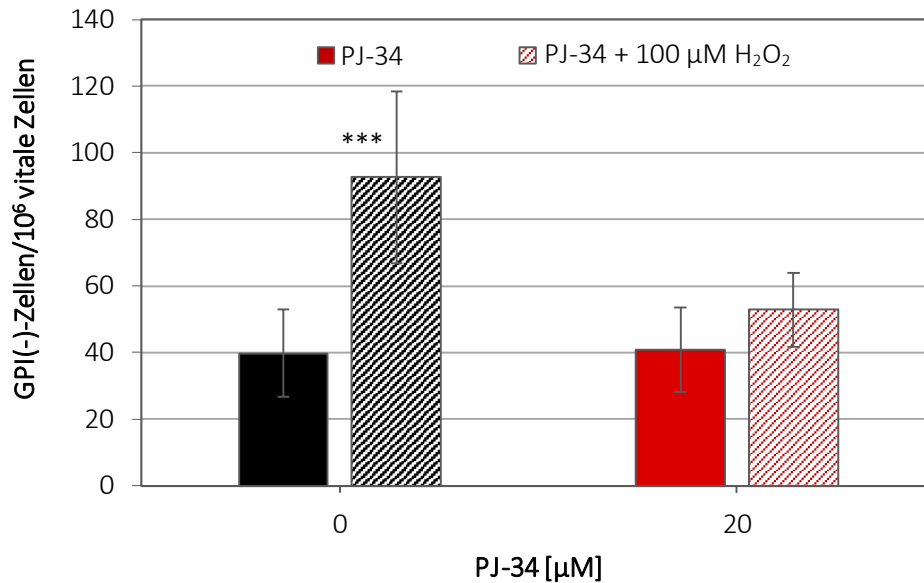


**Abbildung 52: Einfluss von NaAsO<sub>2</sub> bzw. NaAsO<sub>2</sub> mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Zellteilungsfähigkeit von TK6-Zellen.** Die Zellen wurden 24 h mit NaAsO<sub>2</sub> vorinkubiert und 5 min mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von sechs Werten von drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test (\*\* p ≤ 0,01; \*\*\* p ≤ 0,001).

#### Mutagenitätsbestimmung mittels PIG-A

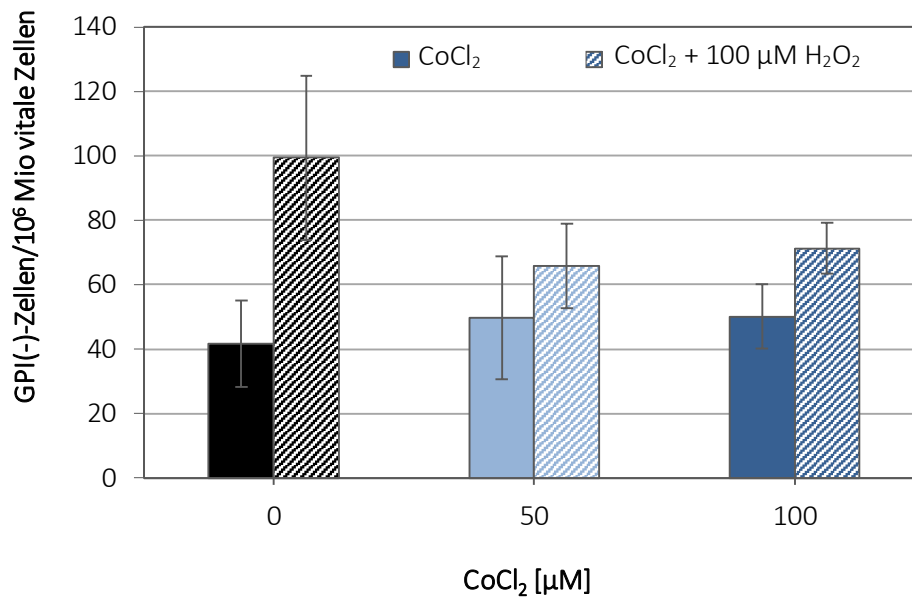
Für PARP-1 wird eine wichtige Rolle in der Genauigkeit der DNA-Reparatur postuliert. Daher wurde die Rolle von PARP-1 in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität anhand der Mutationsrate mittels des PIG-A Assays mit und ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Koinkubation analysiert. In Abbildung 53 ist die Mutationsrate der TK6-Zellen dargestellt. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein erhöhte die Frequenz an GPI(-)-Zellen um mehr als das Doppelte der Kontrolle. In der Literatur wurde ebenfalls eine mutagene Wirkung durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beschrieben. In Zellen der L5178Y Maus-Lymphomasubzelllinie LY-R konnten bereits ab 5 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mutagene Effekte beobachtet werden (Kruszewski et al., 1994). In V79-Zellen wurde bei höheren Konzentrationen, beginnend ab 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, eine mutagene Wirkung nachgewiesen (Ziegler-Skylakakis und Andrae, 1987). Beide Studien ermittelten die Mutationsrate mit dem HPRT-Test.

Eine Inhibierung der PARP-1 durch PJ-34 führte in unseren Versuchen zu keiner erhöhten Mutationsrate. Die Koinkubation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit PJ-34 führte sogar zu einer leichten Abnahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Mutationsrate. Durch eine erhöhte Zytotoxizität nach Koinkubation kann dies allerdings nicht erklärt werden, da eine Inhibierung der PARP-1 die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Zytotoxizität nicht verstärkt.



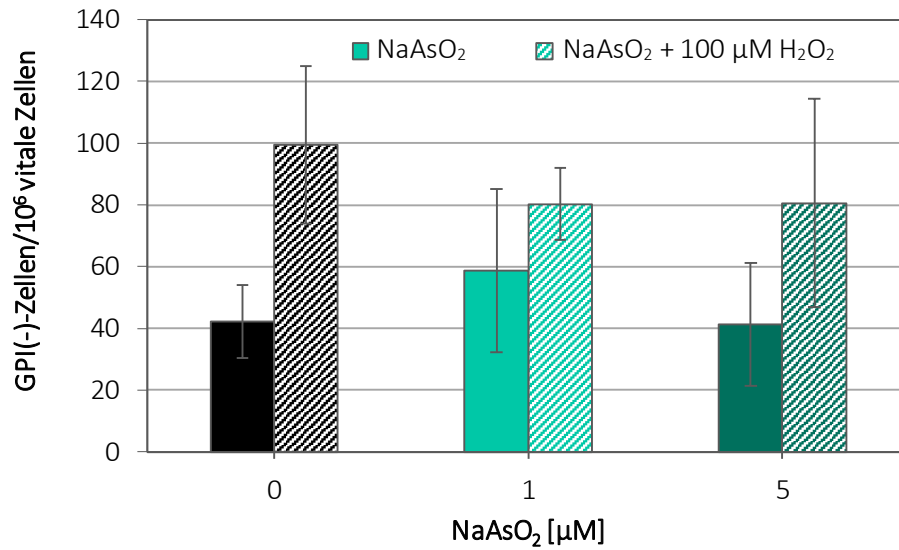
**Abbildung 53:** Anzahl an GPI(-)-Zellen/10<sup>6</sup> vitale TK6-Zellen nach Inkubation mit PJ-34 mit oder ohne 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Zellen wurden 2 h mit 20 μM PJ-34 vorinkubiert bzw. 5 min mit 40 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kokubiert. Nach Abbruch der Kokubation von PJ-34 und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde für 30 min mit 20 μM PJ-34 nachinkubiert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ± SD von 18 Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach T-Test (\*\*\*) p ≤ 0,001).

CoCl<sub>2</sub> induzierte bei den eingesetzten Konzentrationen von 50 μM und 100 μM wie PJ-34 keine Mutationen (Abbildung 54). Es wurde sogar eine geringfügige Erniedrigung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Mutationen durch beide eingesetzten Konzentrationen ermittelt, welche jedoch aufgrund der Standardabweichungen im Schwankungsbereich der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Kontrolle lagen. Übereinstimmend mit unseren Daten wurden am TK-Locus von Mauslymphoma L5178Y-Zellen nach Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> in einem Konzentrationsbereich von 24 μM bis 240 μM keine Mutationen festgestellt (Amacher und Paillet, 1980). Im Gegensatz dazu induzierte Co(II) Mutationen im hprt-Locus in V79-Zellen ab einer zytotoxischen Konzentration von 100 μM CoCl<sub>2</sub> (Hartwig et al., 1990).



**Abbildung 54:** Anzahl an GPI(-)-Zellen/10<sup>6</sup> vitale TK6-Zellen nach Inkubation mit CoCl<sub>2</sub> mit oder ohne 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Zellen wurden 24 h mit CoCl<sub>2</sub> vorinkubiert bzw. 5 min mit 40 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koinkubiert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ± SD von 18 Werten aus drei unabhängigen Versuchen.

As(III) induzierte keine GPI(-)-Zellen verglichen mit der Kontrolle, und wirkte sich auch nicht auf die Anzahl an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Mutationen aus (Abbildung 55). Arsenit scheint in Bakterien- und Säugerzellen keine Punktmutationen zu induzieren. So konnten in *Escherichia coli* keine Tryptophan<sup>+</sup>-Revertanten detektiert werden. Auch in den chinesischen Hamsterzellen V79 fanden sich nach Inkubation mit As(III) keine Ouabain-resistente Mutanten und auch keine Mutanten im HPRT-Test (Rossman et al., 1980). Im Gegensatz dazu induzierte As(III) große Deletionen in Hamster-Mensch Hybridzellen (Hei et al., 1998). Während As(III) keine direkten Mutationen induziert, wurden in mehreren Studien komutagene Effekte mit UV-Licht, Alkylanzien sowie mit Benz[a]pyren verzeichnet (Hartwig und Schwerdtle, 2009). In unserer Studie wurde jedoch kein komutagenes Potential mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nachgewiesen.



**Abbildung 55:** Anzahl an GPI(-)-Zellen/10<sup>6</sup> vitale TK6-Zellen nach Inkubation mit NaAsO<sub>2</sub> mit oder ohne 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Die Zellen wurden 24 h mit NaAsO<sub>2</sub> vorinkubiert bzw. 5 min mit 40 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koinkubiert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ± SD von 18 Werten aus drei unabhängigen Versuchen.

## 6. ZUSAMMENFASSENDER DISKUSSION

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der Aktivierung von PARP-1, der Wechselwirkung mit den toxischen Metallverbindungen Co(II) und As(III) und der Auswirkung einer Wechselwirkung mit PARP-1 auf die genomische Stabilität. PARP-1 stellt dabei ein wichtiges Enzym der DNA-Reparatur dar, welches insgesamt drei Zinkfinger aufweist. Deshalb wurde zunächst der Einfluss des zellulären Zinkstatus auf PARP-1 untersucht. Eine Zinkdepletion wurde durch 24-stündige Behandlung mit TPEN erreicht. Bereits durch 5  $\mu\text{M}$  wurde die Gesamtkonzentration an Zn(II) erniedrigt sowie die intrazelluläre Konzentration an freiem Zn(II) von etwa 1 nM auf 660 pM abgesenkt. Daneben wurde ebenfalls die zelluläre Kupfer-Konzentration abgesenkt. Dies korrelierte mit der Herunterregulierung des *MT1X*-Gens. Diese Beobachtung wurde auch von Sharif und Kollegen auf Proteinebene bestätigt (Sharif et al., 2012). Dahingegen zeigte sich nach 24-stündiger Behandlung der HeLa S3-Zellen mit  $\text{ZnCl}_2$  ab 200  $\mu\text{M}$  eine deutliche Erhöhung der Gesamtkonzentration an Zn(II), einhergehend mit einer Erhöhung der „freien“ Zinkkonzentration. Dies deutete auf eine Störung der Zinkhomöostase und eine Zinkübersorgung der Zelle hin. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung konnte eine verstärkte Expression der *MT*-Gene und des *SLC30A1*-Gens, welcher für den Zinkexporter ZnT1 codiert, detektiert werden. Im Einklang mit unseren Daten zeigten Martin und Kollegen ebenfalls eine Hochregulierung des *SLC30A1*-Gens sowie einen erhöhten zellulären MT-Gehalt (Martin et al., 2013). Die höchsten eingesetzten Konzentrationen von 300  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  senkten die Gesamtkonzentration an Zink jedoch drastisch, was mit der starken zytotoxischen Wirkung und der daraus resultierenden Schädigung der Zellmembran sowie einer Regulationsstörung der Zinkkonzentration erklärt werden kann. Nach 24-stündiger Inkubation mit  $\text{ZnCl}_2$  konnte bereits ab 250  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  eine deutliche Erhöhung der „freien“ Zinkkonzentration festgestellt werden, was auf eine Störung des homöostatischen Gleichgewichts hindeutet. Die Erhöhung der intrazellulären Konzentration an „freiem“ Zn(II) konnte ebenfalls nach oxidativem Stress beobachtet werden, was als Zinksignal gedeutet werden kann. Sowohl  $\text{H}_2\text{O}_2$  als auch Menadion führten zu einem Anstieg des „freien“ Zinkgehaltes, der vergleichbar war mit dem der Zinkübersorgung.

PARP-1 besitzt insgesamt drei Zinkfinger, von denen der Zinkfinger I eine niedrigere Affinität zu Zn(II) aufweist als Zinkfinger II und III, was eine Nichtbesetzung unter „normalen“ zellulären Bedingungen vermuten lässt (Bossak et al., 2015). Es wäre denkbar, dass Zinkfinger I lediglich

unter oxidativen Bedingungen, aus denen eine Freisetzung von Zn(II) aus den Zinkosomen oder Methallothioneinen und damit eine Erhöhung der „freien“ Zinkkonzentration resultiert, mit Zn(II) besetzt wird und daraus eine Aktivierung der PARP-1 erfolgt. Deshalb war ein Ziel die Quantifizierung des Zinkgehaltes zellulärer PARP-1 unter „normalen“ Bedingungen sowie nach oxidativem Stress. Zunächst wurde hierfür eine Methode entwickelt, um PARP-1 aus der Zelle zu isolieren. Dazu wurden PARP-1-Primärantikörper irreversibel an magnetische Protein-A gekoppelte Dynabeads™ mit dem Crosslinker BS<sup>3</sup> verknüpft und mit der PARP-1-enthaltenden Zellsuspension inkubiert. Nach Elution der PARP-1 wurde ein saurer Aufschluss vorgenommen und das Zn(II) mittels ICP-OES quantifiziert. Aufgrund der geringen Ausbeute der PARP-1 aus der Zelle lagen die gemessenen Zinkkonzentrationen jedoch unterhalb der Bestimmungsgrenze, sodass keine Aussage über den Zinkgehalt der PARP-1 getroffen werden konnte.

Eine Zinkdepletion durch TPEN beeinflusste die Aktivität isolierter PARP-1 nicht, während intrazellulär eine drastisch verminderte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung bereits bei einer leicht zytotoxischen Konzentration von 4 µM TPEN gemessen wurde. Es wäre denkbar, dass TPEN durch Komplexbildung der „freien“ Zinkionen, die nach oxidativem Stress durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> freigesetzt werden, das Zinksignal in der Zelle stört. Dies bekräftigt unsere Hypothese, dass Zn(II) als Signal für PARP-1, im Fall von oxidativem Stress, fungiert. Demgegenüber führte eine Zinkübersversorgung zu einer gesteigerten zellulären H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung. Bereits ab 150 µM ZnCl<sub>2</sub> wurde die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung tendenziell erhöht, während ab einer leicht zytotoxischen Konzentration von 250 µM ZnCl<sub>2</sub> eine drastische Zunahme zu verzeichnen war. Dies deckte sich auch mit der Erhöhung der zellulären „freien“ Zinkkonzentration; ab 150 µM ZnCl<sub>2</sub> wurde eine tendenzielle und ab 250 µM ZnCl<sub>2</sub> eine deutliche Zunahme der „freien“ Zinkkonzentration beobachtet. Eventuell führte die Erhöhung des Gehaltes an „freien“ Zinkionen zu einer Verstärkung des Zinksignals, welches nach oxidativem Stress induziert wird, und zu einer verstärkten Besetzung des Zinkfinger I der PARP-1, was eine Aktivitätssteigerung bezwecken könnte. Die Behandlung mit Zn(II) allein führte bis 250 µM ZnCl<sub>2</sub> zu keiner Poly(ADP-Ribosyl)ierung. Vermutlich werden DNA-Schäden benötigt, damit PARP-1 aktiv wird. Ab 300 µM ZnCl<sub>2</sub> wurde eine Poly(ADP-Ribosyl)ierung induziert, was auf eine DNA-Schadensinduktion hindeutet. Dahingegen führte die Koinkubation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 300 µM ZnCl<sub>2</sub> zu einer Abnahme der Poly(ADP-Ribosyl)ierung, was durch die ermittelte starke zytotoxische Wirkung und der damit einhergehenden Spaltung von PARP-1



erklärt werden kann (Soldani et al., 2001). Die direkte Behandlung von isolierter PARP-1 mit  $\text{ZnCl}_2$  resultierte jedoch in einer Abnahme der Poly(ADP-Ribosyl)ierung. Während durch  $5 \mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  die Poly(ADP-Ribosyl)ierung auf 80 % der Kontrolle reduziert wurde, konnte durch  $50 \mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  eine komplette Inhibierung der PARP-1 detektiert werden. Dies könnte erklärt werden durch die Wechselwirkung von  $\text{Zn(II)}$  mit Glutamatresten oder Cysteinresten in der katalytischen Domäne der PARP-1. So wurde in der Literatur eine essentielle Rolle von Glu923, Glu988 sowie Cys908 in der katalytischen Domäne der PARP-1 berichtet (Rolli et al., 1997). Zu beachten ist außerdem, dass solch hohe Konzentrationen an „freiem“  $\text{Zn(II)}$  in der Zelle nicht erreicht werden, sodass eine Zink-vermittelte Hemmung der PARP-1 im zellulären System höchstwahrscheinlich irrelevant ist.

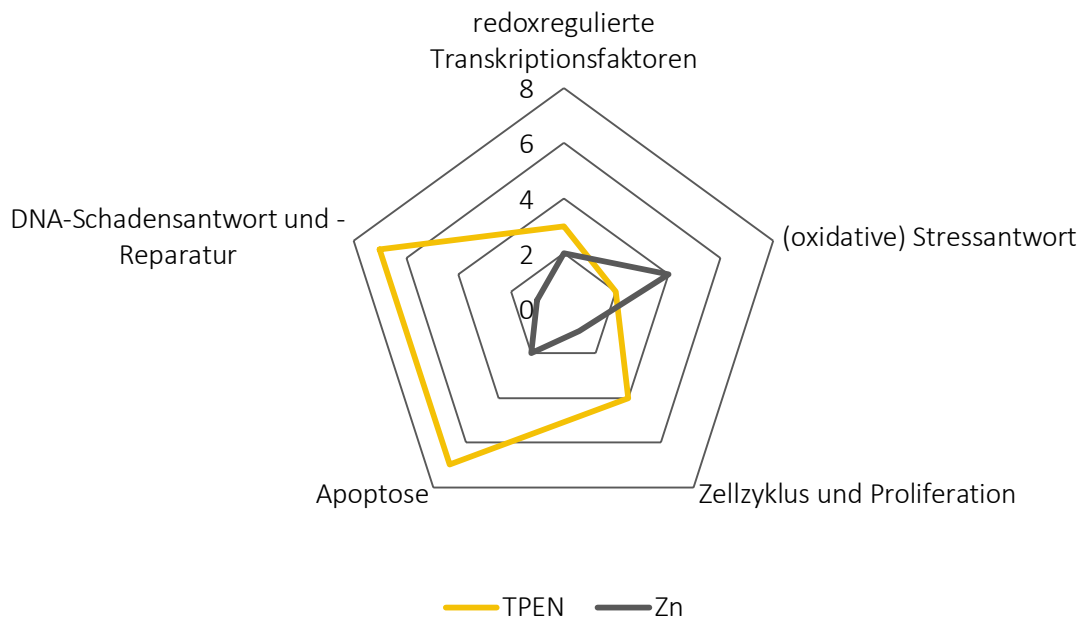
Die verminderte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch TPEN sowie die gesteigerte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch eine Zinkübersversorgung könnten auch durch eine Beeinflussung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbruchanzahl zustande kommen. Mittels Alkalischer Entwindung konnte nach Behandlung der HeLa S3-Zellen mit  $4 \mu\text{M}$  TPEN keine Beeinflussung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbruchanzahl gemessen werden. Ab  $5 \mu\text{M}$  TPEN konnte sowohl nach alleiniger Inkubation eine DNA-strangbrechende Wirkung als auch ein synergistischer Anstieg der Anzahl an  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbrüchen detektiert werden, sodass die verminderte Poly(ADP-Ribosyl)ierung nicht auf eine reduzierte DNA-Strangbruchanzahl zurückgeführt werden kann. Die genotoxische Wirkung von TPEN resultiert wahrscheinlich aus einer Wechselwirkung mit dem Zink von Zink-komplexierenden Proteinen, was mit einem Funktionalitätsverlust einhergehen könnte. Beispielsweise wurde bereits ein verminderter Zinkgehalt in MT nach Behandlung mit TPEN beobachtet (Meeusen et al., 2012). So wäre es denkbar, dass TPEN auch mit Zink-komplexierenden Enzymen der antioxidativen Abwehr, wie der SOD, interagiert und einen Aktivitätsverlust bewirkt, was wiederum die Konzentration an ROS steigen lässt und zu vermehrten DNA-Schäden führen kann. Neben der Komplexierung von  $\text{Zn(II)}$  ist TPEN ebenfalls in der Lage,  $\text{Cu(II)}$  zu komplexieren. So wäre ebenfalls eine Interaktion mit  $\text{Cu(II)}$  aus der SOD plausibel, was zusätzlich eine erhöhte Konzentration an ROS zur Folge haben könnte. Die Behandlung mit  $\text{ZnCl}_2$  führte bis zu einer Konzentration von  $150 \mu\text{M}$  zu keiner Veränderung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbruchanzahl. Erst durch eine Zinkübersversorgung durch leicht zytotoxische  $250 \mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  konnte eine tendenzielle Zunahme der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbruchmenge beobachtet werden. Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung stieg jedoch schon nach Behandlung mit  $150 \mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$

tendenziell an, wobei ab 250  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  fast eine Verdopplung der PARP-1-Aktivität zu verzeichnen war. Folglich wäre es denkbar, dass die Zink-vermittelte Verstärkung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung nicht aus einer vermehrten Anzahl an  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbrüchen, sondern aus einer Wechselwirkung mit PARP-1, insbesondere den Zinkfinger-Strukturen, resultiert, zumal durch 150  $\mu\text{M}$  bereits die Konzentration der „freien“ Zinkionen erhöht wurde. Bei der stark zytotoxischen Konzentration von 300  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  konnte nach alleiniger Inkubation eine DNA-strangbrechende Wirkung festgestellt werden, wobei nach Koinkubation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  die DNA-Strangbruchanzahl additiv anstieg. Die DNA-strangbrechende Wirkung von 300  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  ist höchstwahrscheinlich nicht auf eine direkte Interaktion von  $\text{Zn(II)}$  mit der DNA zurückzuführen, da  $\text{Zn(II)}$  nicht reaktiv ist. Wahrscheinlicher ist eine deutliche Überladung der Zelle mit  $\text{Zn(II)}$ , was in einer Erhöhung der „freien“ Zinkkonzentration resultiert und so zu einer generellen Destabilisierung der Zelle führen könnte. Da  $\text{Zn(II)}$  hohe Affinitäten gegenüber Thiolgruppen des Cysteins, Carboxylgruppen des Glutamats bzw. Aspartats sowie zum Stickstoff des Imidazolrings des Histidins aufweist (Maret und Li, 2009), wäre eine unspezifische Bindung von „freiem“  $\text{Zn(II)}$  an Proteine möglich, was zu deren Funktionalitätsverlust führen könnte. Sind dabei Proteine der antioxidativen Abwehr involviert, könnten ROS schlechter detoxifiziert werden, was zu einer vermehrten Induktion von DNA-Basenschäden und DNA-Strangbrüchen führen könnte. Beispielsweise wurde in Astrozyten eine Inaktivierung der Glutathionreduktase durch Konzentrationen über 100  $\mu\text{M}$   $\text{Zn(II)}$  festgestellt, was mit einer erhöhten Rate an intrazellulären ROS einherging (Bishop et al., 2007). Zusätzlich wurde bereits eine inhibierende Wirkung von 100  $\mu\text{M}$   $\text{Zn(II)}$  auf die Katalase in der Pflanze *Phaseolus vulgaris* beobachtet, was unsere Vermutung bekräftigt (Chaoui et al., 1997). Zudem lieferte die Hochregulierung des *GCLC*-Gens Hinweise für eine Zink-vermittelte GSH-Depletion. GSH ist ein Substrat der Glutathion-Peroxidase, welches an der Detoxifizierung von ROS beteiligt ist. Da die Glutathion-Peroxidase im Falle einer GSH-Depletion keine ROS mehr detoxifizieren kann, könnte die Bindung von  $\text{Zn(II)}$  an GSH einen weiteren indirekten Mechanismus darstellen, wie  $\text{Zn(II)}$  zur Induktion von DNA-Strangbrüchen führt. Wahrscheinlich führte die erhöhte Anzahl an DNA-Strangbrüchen durch 300  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  wiederum zur Aktivierung der PARP-1, was mittels LC-MS detektiert wurde.

Die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch hohe Konzentrationen von TPEN reflektierte sich auch in der Hochregulierung der Stresssensorgene *HSPA1A* und *GADD45A*, was auf genotoxischen Stress hindeutet. Außerdem lieferten die hochregulierten Gene *ATM*, *LIG3*, *XPC*,

*BRCA2*, *POLB* sowie *RRM2B* Hinweise auf eine Aktivierung der DNA-Reparaturwege wie der BER, NHEJ und der NER. Gleichzeitig wies die vermehrte Genexpression von *GADD45A*, *RRM2B*, *PPM1D*, *MDM2* und *BAX* auf eine Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 hin. Auf Proteinebene konnte bereits eine erhöhte p53-Menge nach Zinkdepletion nachgewiesen werden, was unsere Ergebnisse bekräftigt (Fanzo et al., 2001; Ho und Ames, 2002). Das Expressionsspektrum der Gene *CDKN1A*, *PPM1D*, *MYC* sowie *E2F1* deuteten zudem auf einen Zellzyklusarrest hin. Hinsichtlich der Apoptose-assoziierten Genregulation zeigte sich für *APAF1*, *PMAIP1*, *TNFRSF10B*, *BCL2* und *BAX* eine proapoptotische Wirkung, im Hinblick auf die Expression von *BCL2L1*, *MYC*, *E2F1* und *XIAP* jedoch ein antiapoptotisches Signal, sodass keine eindeutige Aussage über die Auswirkung einer Zinkdefizienz auf die Apoptose getroffen werden kann. Insgesamt spiegelt das Genexpressionsprofil (zusammengefasst in Abbildung 56) relativ genau die Zytotoxizität sowie die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch TPEN wieder und lässt eine Störung der genomischen Stabilität durch eine Zinkdefizienz vermuten.

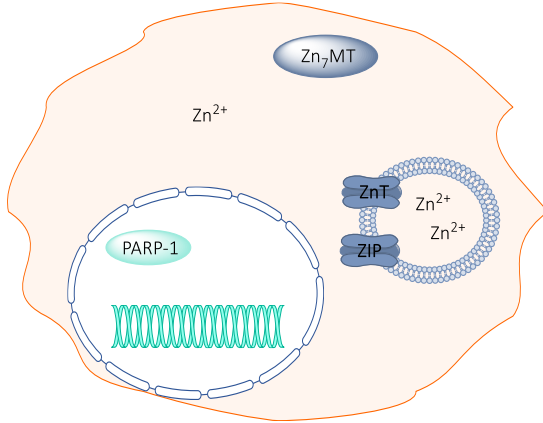
Die synergistische Induktion von DNA-Strangbrüchen nach Generierung einer Zinkübersorgung durch 250  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  wurden ergänzt durch die Hochregulierung der Stresssensorgene *HMOX1* und *GADD45A*, was auf die Induktion von oxidativem und genotoxischem Stress hindeutet. Eine Aktivierung von p53 wurde zudem durch verstärkte Expression von *MDM2* vermutet. Hinsichtlich der proliferationsassoziierten Gene wurden sowohl *CDKN1A* verstärkt exprimiert, was auf einen Zellzyklusarrest hindeutet, als auch JUN herunterreguliert, was wiederum einem Zellzyklusarrest widerspricht, sodass hier keine eindeutige Aussage über die Auswirkung einer Zinkübersorgung auf die Proliferation getroffen werden kann. Zusätzlich wurde neben *PMAIP1*, was proapoptotisch wirkt, auch *BCL2L1*, was antiapoptotisch wirkt, hochreguliert, sodass auch hier keine eindeutigen Angaben über die apoptotische Wirkung einer Zinkübersorgung gemacht werden können. Das Genexpressionsprofil der Zinkübersorgung (zusammengefasst in Abbildung 56) spiegelt, wie bei der Zinkdefizienz, relativ genau die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch  $\text{ZnCl}_2$  wieder.



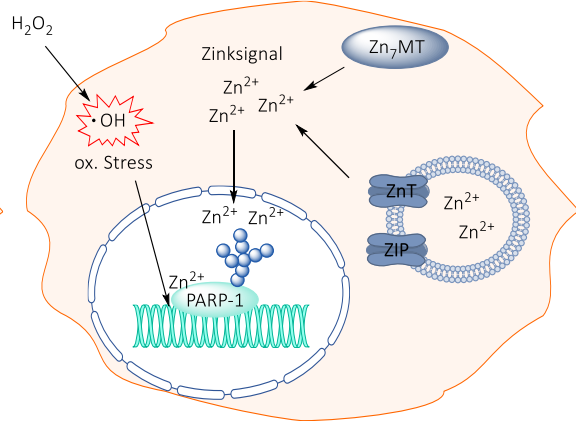
**Abbildung 56: Zusammenfassung des Einflusses einer Zinkdefizienz (5  $\mu\text{M}$  TPEN) und einer Zinkübersorgung (250  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ ) auf die Genexpression.** Dargestellt ist die Anzahl der Gene, welche um mindestens den Faktor 2 im Vergleich zur Kontrolle verändert wurden.

Der Überblick einer Normalversorgung, Unterversorgung sowie Übersorgung mit Zink ist in Abbildung 57 dargestellt. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass TPEN zu einer geringeren Gesamtkonzentration sowie zu einer geringeren „freien“ Konzentration an  $\text{Zn(II)}$  führt. Neben der Inhibierung der PARP-1 bewirkt diese Zinkdepletion ebenfalls eine erhöhte Anfälligkeit der DNA gegenüber ROS sowie vermutlich eine aktivierte DNA-Reparatur und einen Zellzyklusarrest.  $\text{ZnCl}_2$  hingegen erhöht die Gesamtkonzentration und die Konzentration an „freiem“  $\text{Zn(II)}$  ab hohen Inkubationskonzentrationen über 200  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , was eine Störung der Zinkhomöostase mit sich bringt. Die erhöhte Konzentration an „freiem“ Zinkionen führt dann vermutlich zu einer Aktivitätssteigerung von PARP-1 durch Besetzung der Zinkfinger, insbesondere des Zinkfinger I, vermutlich jedoch nur unter Vorliegen eines DNA-Schadens. Ab 250  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  könnte dann durch exzessive Überladung der Zelle mit  $\text{Zn(II)}$  eine Inhibierung von Proteinen durch unspezifische Bindung von  $\text{Zn(II)}$  erfolgen, was die Zelle anfälliger gegenüber ROS macht und so vermehrt DNA-Schäden induziert werden.

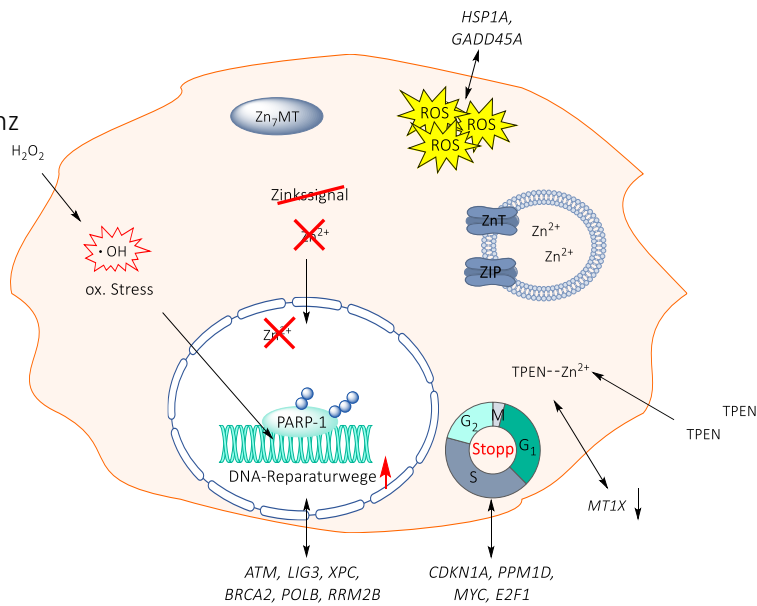
**A** Normalzustand bei Redoxgleichgewicht



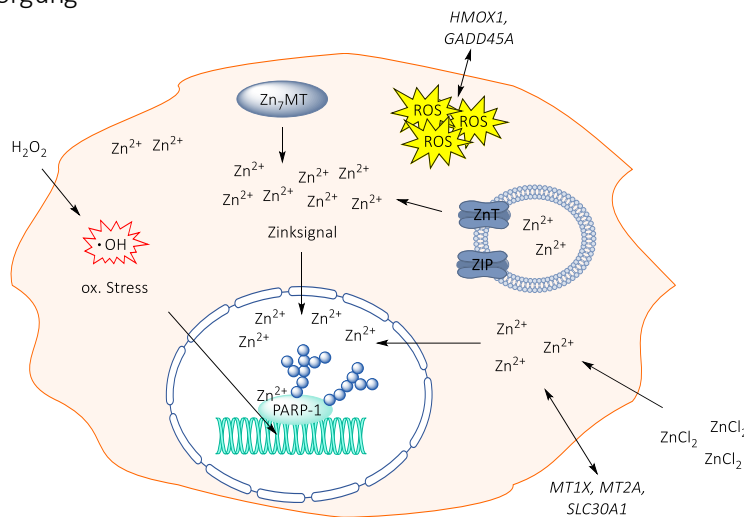
**B** Normalzustand nach oxidativem Stress



**C** Zinkdefizienz



**D** Zinkübersversorgung



● ADP-Ribose

**Abbildung 57: Einfluss einer Zinkdefizienz und einer Zinkübersversorgung auf den Normalzustand der Zelle.** Dargestellt sind (A) der Normalzustand der Zelle bei Redoxgleichgewicht, (B) der Normalzustand der Zelle nach oxidativem Stress durch  $H_2O_2$ , (C) der Einfluss einer Zinkdefizienz durch TPEN nach oxidativem Stress und (D) der Einfluss einer Zinkübersversorgung nach oxidativem Stress. Zn(II) wird dabei in Metallothionein ( $Zn_7MT$ ) und Zinkosomen mit den entsprechenden Zinktransportern (ZnT, ZIP) gespeichert und in Folge von oxidativem Stress freigesetzt.

Neben dem Einfluss des zellulären Zinkstatus auf die PARP-1 sowie allgemein auf das Genexpressionsprofil wurde die Auswirkung von PJ-34,  $\text{CoCl}_2$  und  $\text{NaAsO}_2$  auf die Poly(ADP-Ribosyl)ierung, die Kettenlänge der Poly(ADP-Ribose), die DNA-Einzelstrangbruchreparatur und die genomische Stabilität untersucht. PARP-1 spielt eine wichtige Rolle in zahlreichen zellulären Prozessen, unter anderem in der Apoptose, der Zellteilung sowie der DNA-Reparatur (Bürkle et al., 2005). Dabei wird PARP-1 eine zentrale Bedeutung in der Erkennung von DNA-Schäden bei der DNA-Einzelstrangbruchreparatur zugeschrieben (Caldecott, 2001). Eine Hemmung der PARP-1 und damit der DNA-Reparatur ist derzeit eine vielversprechende Methode, um die Therapieeffizienz von Tumoren, welche eine Defizienz in der DNA-Doppelstrangbruchreparatur aufweisen, zu steigern. PJ-34 stellt einen PARP-Inhibitor dar, welcher bekannt ist für seine effektive Hemmung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung (Feng und Koh, 2013; Piberger et al., 2015). In unseren Experimenten konnte subzellulär eine komplette Hemmung von PARP-1 durch  $10 \mu\text{M}$  PJ-34, und zellulär eine vollständige Inhibierung der PARP-1 durch  $20 \mu\text{M}$  PJ-34 beobachtet werden. Dabei reduzierte PJ-34 die Anzahl an  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbrüchen um etwa 47 %. Trotz des Vorliegens von DNA-Strangbrüchen wurde die Poly(ADP-Ribosyl)ierung komplett gehemmt, sodass die Abnahme des Poly(ADP-Ribose)-Gehaltes durch PJ-34 nicht durch eine vollständige Reduktion der Anzahl  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierter DNA-Strangbrüche erklärt werden kann. Auch eine apoptotische Spaltung der PARP-1 kann als Ursache ausgeschlossen werden, da bei der Konzentration von  $20 \mu\text{M}$  PJ-34 nur moderate zytotoxischen Effekte auftraten. Eine Ursache könnte die indirekte Inhibierung von Glykosylasen, wie der APE1 (Prasad et al., 2015), darstellen, welche durch die Poly(ADP-Ribosyl)ierung aktiviert werden. So würde nach Inhibierung der PARP-1 und somit der Glykosylasen die Exzisionsrate und damit die Anzahl der DNA-Strangbruch-Intermediate nach Inzision durch die Endonukleasen abnehmen.

In vielen Proteinen stellen die Zinkfinger einen Angriffspunkt für thiolaffine Metallionen dar (Hartwig et al., 2002). Auch PARP-1, welche insgesamt drei solcher Zink-bindenden Strukturen aufweist, ist bekannt dafür, von Metallionen wie  $\text{As(III)}$  und  $\text{Cu(II)}$  inhibiert zu werden, was vermutlich auf eine Interaktion der Metallionen mit den Thiolgruppen der Zinkfinger zurückzuführen ist (Schwerdtle et al., 2007; Walter et al., 2007; Yager und Wiencke, 1997). Ein weiterer Fokus dieser Arbeit lag daher auf der Untersuchung des Einflusses von  $\text{Co(II)}$ , welches ebenfalls eine hohe Affinität zu Thiolgruppen aufweist, auf die Aktivität der PARP-1.  $\text{Co(II)}$  allein induzierte keine DNA-Strangbrüche und damit auch keine Poly(ADP-

Ribosyl)ierung. Dahingegen reduzierte Co(II) die zelluläre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung konzentrationsabhängig. Bei einer Konzentration von 100 µM Co(II) wurde mittels Immunfluoreszenz eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung von 50 % der Kontrolle, und mittels LC-MS eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung von 68 % der Kontrolle gemessen. Da der Primärantikörper bei der immunfluorimetrischen Methode lediglich an längere Poly(ADP-Ribose)-Ketten bindet und mittels LC-MS das Ribosyladenosin, der Hauptbestandteil der Poly(ADP-Ribose), unabhängig von der Kettenlänge quantifiziert wird, deutet dies auf eine Cobalt-vermittelte Verkürzung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Poly(ADP-Ribose)-Ketten hin. Die Länge der Poly(ADP-Ribose) scheint dabei entscheidend für die Interaktion von PARP-1 mit weiteren Proteinen und damit für die Weiterleitung von Signalen innerhalb der Zelle zu sein. Beispielsweise zeigten Fahrer und Kollegen eine Kettenlängen-abhängige Bindungsaffinität von p53 und XPA zur Poly(ADP-Ribose). Lange Poly(ADP-Ribose)-Ketten führten in dieser Studie zur Bindung von drei p53-Komplexen und einer Wechselwirkung mit XPA, während kurze Poly(ADP-Ribose)-Ketten zu einer Bindung von einem p53-Komplex führten und nicht mit XPA interagierten (Fahrer et al., 2007). Ab einer Konzentration von leicht zytotoxischen 250 µM Co(II) wurde die Poly(ADP-Ribosyl)ierung komplett inhibiert. Ein Mechanismus der Cobalt-vermittelten Abnahme des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Poly(ADP-Ribose)-Gehaltes könnte die Bindung von Co(II) an die Zinkfinger der PARP-1 und damit die Verdrängung von Zn(II) sein. Co(II) zeigte schon mehrfach eine hohe Affinität gegenüber Zink-bindenden Strukturen anderer Proteine, unter anderem von XPA, p53 und dem Estrogenrezeptor (Asmuss et al., 2000a; Kopera et al., 2004; Palecek et al., 1999; Predki und Sarkar, 1992). Denkbar wäre vor allem der Zinkfinger I als Angriffspunkt, da dieser unter „normalen“ zellulären Bedingungen vermutlich nicht mit Zn(II) besetzt ist und so empfindlich gegenüber thiolaffinen Metallionen sein könnte (Bossak et al., 2015). Eine direkte Interaktion von Co(II) mit PARP-1 scheint sehr wahrscheinlich, da Co(II) auch die Aktivität isolierter PARP-1 ab 10 µM inhibierte. Eine Abnahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüche durch Co(II) kann als Grund für die reduzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung ausgeschlossen werden, da bis zu einer Konzentration von 100 µM Co(II) die Anzahl der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüche nicht beeinflusst wurde. Lediglich bei der Konzentration von 250 µM Co(II) wurde die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte DNA-Strangbruchanzahl auf etwa 35 % der Kontrolle gesenkt. Zu beachten ist, dass bei dieser Konzentration trotz Vorliegen von DNA-Strangbrüchen die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung komplett inhibiert wurde, sodass vermutlich auch hier eine Interaktion von Co(II) mit PARP-1 eine Rolle spielt. Die

Abnahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüche könnte aus einer Induktion von Proteinen des antioxidativen Abwehrsystems durch Co(II), wie der Glutathionperoxidase (Ehleben et al., 1997), resultieren.

Zusätzlich wurde die Auswirkung von As(III) auf die PARP-1-Aktivität untersucht. As(III) ist bekannt für seine Tiolaffinität und der damit verbundenen Interaktion mit Zinkfinger-Proteinen. Beispielsweise wurde eine Wechselwirkung von As(III) mit p53 (Tang et al., 2006) sowie mit dem Zinkfingerpeptid von XPA berichtet (Schwerdtle et al., 2003a). Das empfindlichste Protein stellt dabei PARP-1 dar, welches bereits in nanomolaren Konzentrationen von As(III) im zellulären System inhibiert wird (Hartwig et al., 2003b). Zhou und Kollegen isolierten PARP-1 nach Arsen-Inkubation von HaCaT-Zellen und stellten einen reduzierten Zinkgehalt, einhergehend mit einer verminderten DNA-Bindungsfähigkeit, fest (Zhou et al., 2011). Weitere Untersuchungen von Sun und Kollegen zeigten einen ähnlichen Zinkverlust der PARP-1 nach Inkubation mit TPEN und eindeutige direkte Bindung von As(III) an synthetisierte Zinkfingerpeptide der PARP-1 (Sun et al., 2014). In unserer Studie konnte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Abnahme der Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch As(III) mittels Immunfluoreszenz, ähnlich zu den Literaturdaten, beobachtet werden (Hartwig et al., 2003b; Yager und Wiencke, 1997). Im Gegensatz dazu wurde mittels LC-MS eine konzentrationsabhängige Zunahme des Poly(ADP-Ribose)-Gehaltes durch dieselben Konzentrationen an As(III) detektiert. So wurde nach Behandlung der HeLa S3-Zellen mit leicht zytotoxischen 1 µM As(III) immunfluorimetrisch eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Poly(ADP-Ribose)-Gehalt von 66 % der Kontrolle ermittelt, während massenspektrometrisch eine Poly(ADP-Ribosyl)ierung von 175 % der Kontrolle beobachtet wurde. Bei der höchsten, stark zytotoxischen Konzentration von 5 µM As(III) wurde ein weiterer Abfall des Poly(ADP-Ribose)-Gehaltes auf 35 % der Kontrolle mittels Immunfluoreszenz, und eine drastische Zunahme der Poly(ADP-Ribosyl)ierung auf 600 % der Kontrolle mittels LC-MS gemessen. Da der Primärantikörper der Immunfluoreszenz-Methode lediglich an längere Poly(ADP-Ribose)-Ketten binden kann und mittels LC-MS das komplette Ausmaß der Poly(ADP-Ribosyl)ierung unabhängig von der ADP-Ribose-Kettenlänge gemessen wird, führt As(III) vermutlich zur Bildung von kurzen Poly(ADP-Ribose)-Ketten. Dabei stellt sich die Frage, ob die erhöhte Poly(ADP-Ribosyl)ierung im Vergleich zur Kontrolle, welche massenspektrometrisch detektiert wurde, auf eine direkte Aktivierung der PARP-1 zurückzuführen ist. In unseren Untersuchungen an isolierter PARP-1 hatte As(III) keine Auswirkung auf die Aktivität der PARP-1, was darauf hindeutet, dass die erhöhte Poly(ADP-Ribosyl)ierung nicht aus einer



direkten Wechselwirkung mit PARP-1 resultiert. Die Bindung von As(III) an die Zinkfingerpeptide der PARP-1, welche Sun sowie Zhou und Kollegen detektierten, ist eventuell nur in Abwesenheit von Zn(II) möglich. Unsere Vermutung ist es, dass Zn(II) eine höhere Affinität zu den Zinkfingern der PARP-1 aufweist als As(III). Indizien hierfür liefert die Betrachtung des Zinkgehaltes der zellulären PARP-1 nach Koinkubation von As(III) und Zn(II). Im Vergleich zum Zinkgehalt nach alleiniger Behandlung der Zellen mit As(III) ist der Zinkgehalt nach Koinkubation von As(III) mit Zn(II) deutlich erhöht, was auf eine höhere Affinität von Zn(II) zu den Zinkfingern der PARP-1 hindeutet (Sun et al., 2014). Huestis und Kollegen beobachteten eine geringere thermodynamische Stabilität und eine höhere kinetische Labilität von As(III) im Vergleich zu Zn(II) gegenüber dem ersten Zinkfinger der PARP-1, was diese Interpretation unterstützt (Huestis et al., 2016). Unsere Hypothese ist es, dass der Zinkfinger I der PARP-1 unter „normalen“ zellulären Bedingungen unbesetzt vorliegt, sodass er ein empfindlicher Angriffspunkt für thiolaffine Metallionen darstellen könnte. Der erniedrigte Zinkgehalt nach Arsen-Inkubation, welcher Sun und Kollegen gemessen haben, könnte durch eine Bindung von As(III) in Abwesenheit von Zn(II) erklärt werden (Sun et al., 2014). Im Fall von oxidativem Stress, welcher dazu führt, dass Zn(II) von Metallothioneinen und Zinkosomen freigesetzt wird und als Signal fungiert, würde der Zinkfinger I mit Zn(II) besetzt werden bzw. As(III) aufgrund seiner höheren Thiolaffinität verdrängen, sodass PARP-1 aktiviert wird und viele kurze Poly(ADP-Ribose)-Ketten induziert, was aus den Ergebnissen der Immunfluoreszenz und der LC-MS geschlossen werden kann. Die erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung könnte zudem aus einer vermehrten Induktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen resultieren. Während As(III) allein keine DNA-Strangbrüche induzierte, wurde mittels Alkalischer Entwindung bereits durch 0,1 µM As(III) eine synergistische Zunahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbruchanzahl um 35 % analysiert, was beispielsweise durch die Bindung von As(III) an GSH erklärt werden kann (Scott et al., 1993). Ab dieser Konzentration wurde massenspektrometrisch ebenfalls eine Zunahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung beobachtet. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Mechanismus der Arsen-vermittelten Zunahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung eher aus einer vermehrten DNA-Schadensinduktion als aus einer direkten Aktivierung der PARP-1 resultiert.

Insgesamt wechselwirken der PARP-Inhibitor PJ-34, Co(II) und As(III) mit PARP-1 folglich auf unterschiedliche Weise. Während PJ-34 die Poly(ADP-Ribosyl)ierung komplett inhibiert, führt Co(II) zu leicht verkürzten Poly(ADP-Ribose)-Ketten bei gleichzeitiger

konzentrationsabhängiger Abnahme des Poly(ADP-Ribose)-Gehaltes und As(III) zu einer Zunahme verkürzter Poly(ADP-Ribose)-Ketten. Inwieweit sich dies auf die DNA-Einzelstrangbruchreparatur auswirkt, wurde anhand der Reparaturkinetik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierter DNA-Strangbrüche untersucht. Der PARP-Inhibitor PJ-34 verlangsamte bei einer Konzentration von 20 µM die Reparatur der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüche, vor allem 10 min nach DNA-Schadensinduktion, wobei sich die Reparaturrate nach 30 min wieder der Kontrolle anglich. Eine ähnlich verlangsamte DNA-Einzelstrangbruchreparatur wurde ebenfalls in der Literatur beschrieben (Piberger et al., 2015; Ström et al., 2011). Hinsichtlich Co(II) wurde lediglich bei der Konzentration von 250 µM CoCl<sub>2</sub> eine leicht gehemmte DNA-Einzelstrangbruchreparatur festgestellt, die sich jedoch aufgrund der relativ hohen Standardabweichungen nicht signifikant von der Kontrolle unterschied. Somit scheint PARP-1 für die DNA-Einzelstrangbruchreparatur keine essentielle Rolle zu spielen, sondern lediglich für eine Beschleunigung der DNA-Reparatur verantwortlich zu sein. Unsere Hypothese ist es, dass im Falle einer Inhibierung von PARP-1 ein alternativer DNA-Reparaturweg eingeschlagen wird. Hinweise hierfür liefert eine Studie von Dantzer und Kollegen, die in PARP-1-defizienten Zellextrakten eine deutliche Inhibierung der *short-patch repair* beobachteten, während die *long-patch repair* nicht beeinflusst wurde (Dantzer et al., 2000). Da in unseren Untersuchungen lediglich eine Verlangsamung und in der Literatur entweder eine leicht inhibierte bis hin zu einer unveränderten DNA-Einzelstrangbruchreparatur beobachtet wurde, wäre es denkbar, dass die *short-patch repair* nach PARP-1-Inhibierung von der *long-patch repair* ersetzt wird, wie auch von Vodenicharov und Kollegen vermutet wird (Vodenicharov et al., 2000). Diese Hypothese wird zudem von der Tatsache bekräftigt, dass PARP-1-defiziente Mäuse keine erhöhte Tumorraten aufweisen (de Murcia et al., 1997; Masutani et al., 1999), wie man im Fall einer nicht funktionierenden BER vermuten würde. Unsere Hypothese ist es, dass die Inhibierung der DNA-Einzelstrangbruchreparatur durch PJ-34 dadurch zustande kommt, dass die inhibierte PARP-1 dennoch mit den Zinkfingern an den DNA-Schaden binden kann, da PJ-34 lediglich an das katalytische Zentrum bindet, und somit die Anlagerung weiterer DNA-Reparaturproteine blockiert. Co(II) hingegen könnte an den Zinkfinger I der PARP-1 binden. Im Gegensatz zur PJ-34-inhibierten PARP-1 ist die Cobalt-gehemmte PARP-1 nun nicht mehr in der Lage, an die DNA-Schäden zu binden, sodass Reparaturproteine schneller an die DNA-Schadensstelle binden und den alternativen DNA-Reparaturweg einleiten könnten, was die unbeeinflusste Reparatur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierter DNA-Schäden nach Cobalt-Behandlung erklären würde. Trotz der

stattfindenden DNA-Einzelstrangbruchreparatur reagieren PARP-1-defiziente Mäuse empfindlicher auf genotoxische Agenzien (Vodenicharov et al., 2000). Eventuell führt eine Inhibierung der PARP-1 zu einer Beeinflussung der Poly(ADP-Ribose)-vermittelten Signalkaskade und so zu einer Destabilisierung der genomischen Integrität. Viele Proteine werden durch die Poly(ADP-Ribosyl)ierung reguliert. Beispielsweise weist das Tumorsuppressorprotein p53 eine hohe Affinität gegenüber der Poly(ADP-Ribose) auf (Malanga et al., 1998). Wird PARP-1 gehemmt, so könnte die dadurch gehemmte Poly(ADP-Ribosyl)ierung zu einem Verlust der Proteinfunktion von p53, wie der Zellzyklusregulation, gestört werden und zu einer genomischen Instabilität führen.

As(III) inhibierte die DNA-Einzelstrangbruchreparatur nicht, sondern wirkte bei 0,5  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  sogar beschleunigend. Woran das liegt, kann nur spekuliert werden. Möglich wäre, dass die vermehrte Bildung von kurzen Poly(ADP-Ribose)-Ketten zu einer beschleunigten Rekrutierung von DNA-Reparaturproteinen führt. Alternativ könnte As(III) die Expression von DNA-Reparaturproteinen erhöhen. Dies sollte durch weitere Versuche abgeklärt werden.

Möglicherweise ist auch eine höhere Fehlerhäufigkeit der DNA-Reparatur in Gegenwart von PARP-Inhibitoren bzw. durch Veränderung der Poly(ADP-Ribose)-Kettenlänge gegeben. Deshalb wurden die Auswirkungen der Wechselwirkungen von PJ-34, Co(II) und As(III) mit PARP-1 auf die genomische Stabilität untersucht. Mutagene Effekte durch PJ-34 wurden keine beobachtet, was auf eine funktionierende BER hindeutet. Eine komutagene Wirkung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde ebenfalls nicht beobachtet. Es wurde sogar eine Abnahme der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -vermittelten Mutagenität durch PJ-34 verzeichnet, was jedoch durch die zytotoxische Wirkung der Koinkubation erklärt werden kann. Die Untersuchung der Mikrokerninduktion lieferte Hinweise auf eine aneugene Wirkung nach Hemmung der PARP-1. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass PJ-34 nicht nur PARP-1, sondern alle Enzyme der PARP-Familie mit einer katalytischen Domäne hemmt. So kann nur spekuliert werden, ob die Hemmung der PARP-1 oder anderer PARPs zur Aneuploidie geführt hat. Denkbar wäre eine durch die Inhibierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung gestörte Interaktion mit Proteinen des Spindelapparates. Indizien hierfür liefern mehrere Studien, in denen eine PARP-1-katalysierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung der Zentromerproteine Cenpa und Cenpb und des Spindelproteins Bub3 (Saxena et al., 2002), sowie eine Interaktion von PARP-1 mit dem Spindelcheckpoint-Protein BubR1 festgestellt wurden (Yang et al., 1992). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass PARP-1 nicht essentiell

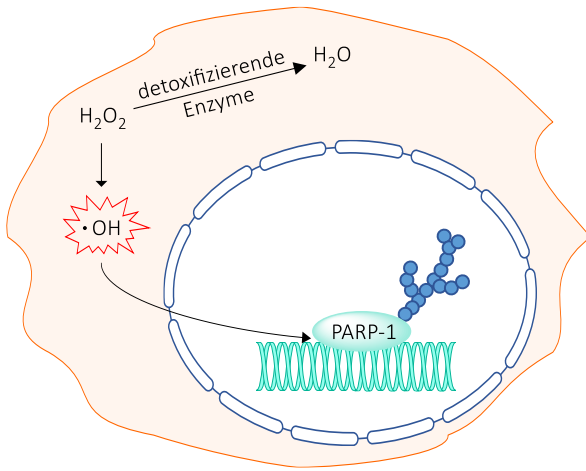
für die DNA-Einzelstrangbruchreparatur zu sein scheint, sich jedoch positiv auf die Schnelligkeit der Reparaturkinetik auswirkt. Unsere Hypothese ist es, dass eine Inhibierung von PARP-1 zwar keine Hemmung der DNA-Reparaturwege, sondern eine gestörte Regulation zellulärer Proteine mit sich zieht. Dies führt zu einer genomischen Instabilität, was sich beispielsweise in einer Aneuploidie äußern könnte.

Hinsichtlich Co(II) zeigten Zellzyklusuntersuchungen einen G<sub>2</sub>-Phasenarrest erst bei hohen zytotoxischen Konzentrationen von 400 µM und 500 µM Co(II), was auf eine Schädigung der DNA hindeutet. Während Co(II) weder mutagen noch komutagen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wirkte, konnte eine Induktion von Mikrokernen sowie von hypodiploiden Zellkernen ab der stark zytotoxischen Konzentration von 400 µM Co(II) beobachtet werden, was Indizien für eine klastogene und aneugene Wirkung durch hohe Konzentrationen an Co(II) liefert. Die niedrigeren Konzentrationen von 100 µM und 250 µM Co(II), welche eine deutliche inhibierende Wirkung auf die PARP-1 aufweisen, zeigten keine Auswirkung auf die ausgewählten Parameter der genomischen Stabilität. Zudem erhöhte die Koinkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Co(II) die klastogene und aneugene Wirkung nicht. Dadurch stellt sich die Frage, ob sich eine Inhibierung der PARP-1 überhaupt auf die genomische Stabilität auswirkt. Eventuell sind die alternativen DNA-Reparaturwege hinsichtlich der Reparatur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierter DNA-Schäden effektiv genug, sodass kein bleibender Schaden für die Zelle bestehen bleibt. Allerdings sind BRCA1- und BRCA2-defiziente Tumorarten, welche einen Defekt in der Homologen Rekombination aufweisen, sensitiv gegenüber PARP-Inhibitoren. Gleichzeitig erhöhen PARP-Inhibitoren die Zytotoxizität von ionisierender Strahlung (Chalmers et al., 2004; Schlicker et al., 1999), welche eine Kombination aus DNA-Einzelstrangbrüchen und DNA-Doppelstrangbrüchen induziert. Zusammen mit der Erkenntnis, dass die DNA-Einzelstrangbruchreparatur nahezu unbeeinflusst abläuft, wäre es plausibel, dass PARP-1 entbehrlich für die DNA-Einzelstrangbruchreparatur ist, aber eine wichtige Rolle in der DNA-Doppelstrangbruchreparatur spielt. Audebert sowie Iliakis und Kollegen entdeckten einen alternativen Weg des *non homologous end joinings* (NHEJ), der unabhängig von dem DNA-PK/XRCC4/Ligase IV-Komplex und abhängig von PARP-1 verläuft (Audebert et al., 2004; Audebert et al., 2008; Iliakis, 2009). Durch Inhibierung der PARP-1 wird dieser *backup*-Reparaturweg gehemmt, was die Empfindlichkeit von HR-defizienten Tumorarten und die Sensitivierung von ionisierender Strahlung gegenüber PARP-Inhibitoren erklären könnte. Zu erwähnen ist außerdem, dass Co(II) im Gegensatz zu PJ-34 bei den eingesetzten nicht-zytotoxischen Konzentrationen nicht zu einer aneugenen Wirkung

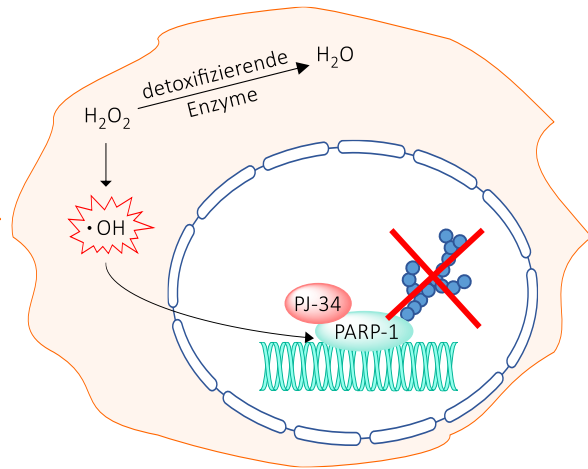
führt. Dies könnte auf einen unterschiedlichen Mechanismus der PARP-1-Inhibierung zurückzuführen sein. Der PARP-Inhibitor PJ-34 bindet PARP-1 am katalytischen Zentrum. Da dieses katalytische Zentrum hochkonserviert ist, ist dieses Zentrum in anderen Enzymen der PARP-Familie ebenfalls vorzufinden (Schreiber et al., 2006), sodass diese in gleichem Maße gehemmt werden. Co(II) dagegen bindet vermutlich an die Thiolgruppen der Zinkfinger-Strukturen der PARP-1, welche in dieser Form in keinem anderen Enzym der PARP-Familie vorzufinden sind. Lediglich PARP-7, PARP-12 und PARP-13 weisen weitere Zinkfinger auf, welche jedoch eine andere Struktur haben (CCCH im Vergleich zu CCHC der PARP-1) und nicht an die DNA, sondern an die RNA binden können (Schreiber et al., 2006). Somit wäre es denkbar, dass die PJ-34-vermittelte aneugene Wirkung auf eine Inhibierung eines anderen Enzyms der PARP-Familie zurückzuführen ist. Zusammengefasst führte Co(II) zu einer Inhibierung der PARP-1 und zu einer unbeeinflussten DNA-Einzelstrangbruchreparatur, was auf einen alternativen, PARP-1-unabhängigen DNA-Reparaturweg hindeutet. Unsere Hypothese ist es, dass PARP-1 eine wichtige Rolle in der DNA-Doppelstrangbruchreparatur spielt und deshalb die Zytotoxizität von DNA-Doppelstrangbruch-induzierenden und nicht von DNA-Einzelstrangbruch-induzierenden Agenzien erhöht. Ob eine Inhibierung der PARP-1 irgendwelche zellulären Störungen zur Folge hat sollte dennoch anhand anderer Parameter oder alternativer Methoden getestet werden, um die Auswirkung auf die genomische Stabilität ausreichend beurteilen zu können.

As(III) induzierte ebenfalls erst ab zytotoxischen Konzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  As(III) einen G<sub>2</sub>-Phasenarrest. Eine klastogene und aneugene Wirkung durch As(III) konnte nicht beobachtet werden; As(III) reduzierte sogar, vermutlich durch das Einleiten eines Zellzyklusarrests, die Rate an hypodiploiden Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Zudem wurde weder eine mutagene noch eine komutagene Wirkung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detektiert. Unsere Hypothese ist es, dass As(III) nicht direkt mit PARP-1 interagiert sondern das Poly(ADP-Ribose)-Profil allgemein durch sein zelluläres Schadensmuster, eventuell durch Wechselwirkung mit anderen Proteinen, verändert und so eine Signalkaskade auslöst, die eine beschleunigende Wirkung auf die DNA-Einzelstrangbruchreparatur ausübt. Inwieweit sich die vermehrte Bildung von kurzkettiger Poly(ADP)-Ribose auf die genomische Stabilität auswirkt, sollte durch weitere Versuche abgeklärt werden.

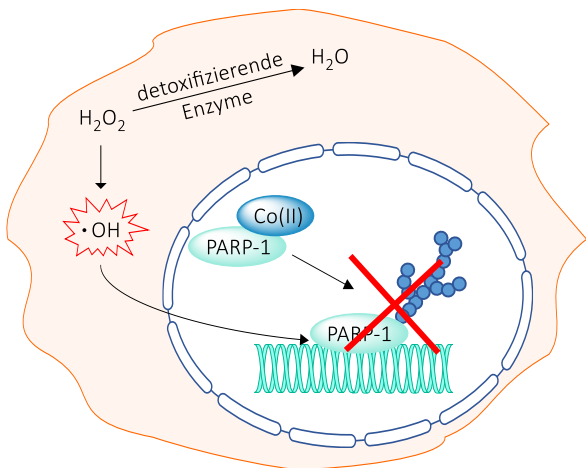
**A** PARylierung nach oxidativem Stress



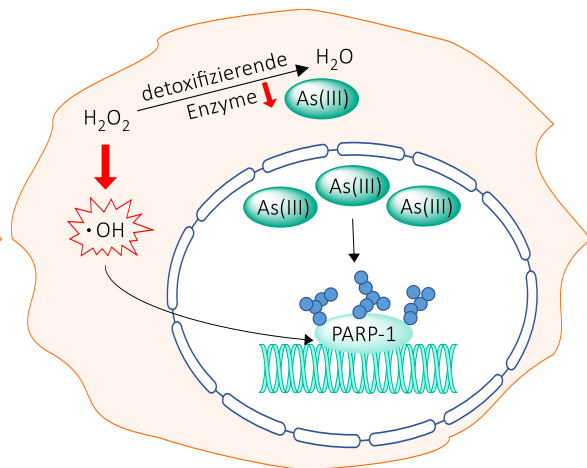
**B** Einfluss von PJ-34 auf die PARylierung




**C** Einfluss von Co(II) auf die PARylierung



**D** Einfluss von As(III) auf die PARylierung



 Poly(ADP-Ribose)

**Abbildung 58:** Schematische Zusammenfassung der vermuteten Wirkmechanismen des Einflusses von PJ-34,  $CoCl_2$  und  $NaAsO_2$  auf die  $H_2O_2$ -induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung (PARylierung). Dargestellt sind Zellen in Gegenwart von oxidativem Stress (A) unter normalen zellulären Bedingungen, (B) nach Behandlung mit PJ-34, (C)  $CoCl_2$  und (D)  $NaAsO_2$ .

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- Adamo AM, Zago MP, Mackenzie GG, Aimo L, Keen CL, Keenan A, Oteiza PI (2009) The role of zinc in the modulation of neuronal proliferation and apoptosis. *Neurotox Res* 17 (1), 1.
- Aizenman E, Stout AK, Hartnett KA, Dineley KE, McLaughlin B, Reynolds IJ (2000) Induction of neuronal apoptosis by thiol oxidation: putative role of intracellular zinc release. *J Neurochem* 75 (5), 1878-1888.
- Alarifi S, Ali D, Y AOS, Ahamed M, Siddiqui MA, Al-Khedhairy AA (2013) Oxidative stress contributes to cobalt oxide nanoparticles-induced cytotoxicity and DNA damage in human hepatocarcinoma cells. *Int J Nanomed* 8189-199.
- Amacher DE, Paillet SC (1980) Induction of trifluorothymidine-resistant mutants by metal ions in L5178Y/TK+/- cells. *Mutat Res* 78 (3), 279-288.
- Anard D, Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Belpaeme K, Lison D (1997) In vitro genotoxic effects of hard metal particles assessed by alkaline single cell gel and elution assays. *Carcinogenesis* 18 (1), 177-184.
- Andersen O (1983) Effects of coal combustion products and metal compounds on sister chromatid exchange (SCE) in a macrophagelike cell line. *Environ Health Perspect* 47239-253.
- Andreassi MG, Cioppa A, Manfredi S, Palmieri C, Botto N, Picano E (2007) Acute chromosomal DNA damage in human lymphocytes after radiation exposure in invasive cardiovascular procedures. *Eur Heart J* 28 (18), 2195-2199.
- Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A (2006) Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res* 5 (1), 196-201.
- Angel P, Hattori K, Smeal T, Karin M (1988) The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* 55 (5), 875-885.
- Angel P, Karin M (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072 (2-3), 129-157.
- Asmuss M, Mullenders LH, Eker A, Hartwig A (2000a) Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair. *Carcinogenesis* 21 (11), 2097-2104.
- Asmuss M, Mullenders LHF, Hartwig A (2000b) Interference by toxic metal compounds with isolated zinc finger DNA repair proteins. *Toxicol Lett* 112-113 (0), 227-231.
- ATSDR (2004) Toxicological profile for cobalt. Atlanta, Georgia.
- Audebert M, Salles B, Calsou P (2004) Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem* 279 (53), 55117-55126.
- Audebert M, Salles B, Calsou P (2008) Effect of double-strand break DNA sequence on the PARP-1 NHEJ pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 369 (3), 982-988.
- Bae S, Jeong HJ, Cha HJ, Kim K, Choi YM, An IS, Koh HJ, Lim DJ, Lee SJ, An S (2012) The hypoxia-mimetic agent cobalt chloride induces cell cycle arrest and alters gene expression in U266 multiple myeloma cells. *Int J Mol Med* 30 (5), 1180-1186.
- Bau DT, Gurr JR, Jan KY (2001) Nitric oxide is involved in arsenite inhibition of pyrimidine dimer excision. *Carcinogenesis* 22 (5), 709-716.
- Beyersmann D, Haase H (2001) Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *BioMetals* 14 (3), 331-341.

- BfR (2015) Reis und Reisprodukte enthalten viel anorganisches Arsen. Stellungnahme Nr. 018/2015 des BfR vom 24.06.2014.
- Bishop GM, Dringen R, Robinson SR (2007) Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes. *Free Radical Biol Med* 42 (8), 1222-1230.
- Bossak K, Goch W, Piatek K, Fraczyk T, Poznanski J, Bonna A, Keil C, Hartwig A, Bal W (2015) Unusual Zn(II) affinities of zinc fingers of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) nuclear protein. *Chem Res Toxicol* 28 (2), 191-201.
- Bozym RA, Chimienti F, Giblin LJ, Gross GW, Korichneva I, Li Y, Libert S, Maret W, Parviz M, Frederickson CJ, Thompson RB (2010) Free zinc ions outside a narrow concentration range are toxic to a variety of cells in vitro. *Exp Biol Med* 235 (6), 741-750.
- Brugnera E, Georgiev O, Radtke F, Heuchel R, Baker E, Sutherland GR, Schaffner W (1994) Cloning, chromosomal mapping and characterization of the human metal-regulatory transcription factor MTF-1. *Nucleic Acids Res* 22 (15), 3167-3173.
- Bürkle A, Brabeck C, Diefenbach J, Beneke S (2005) The emerging role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in longevity. *Int J Biochem Cell Biol* 37.
- Bürkle A, Chen G, Kupper JH, Grube K, Zeller WJ (1993) Increased poly(ADP-ribosylation) in intact cells by cisplatin treatment. *Carcinogenesis* 14 (4), 559-561.
- Caldecott KW (2001) Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair. *Bioessays* 23 (5), 447-455.
- Caldecott KW (2008) Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet* 9 (8), 619-631.
- Cantoni O, Murray D, Meyn RE (1986) Effect of 3-aminobenzamide on DNA strand-break rejoining and cytotoxicity in CHO cells treated with hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 867 (3), 135-143.
- Catena C, Conti D, Villani P, Nastasi R, Archilei R, Righi E (1994) Micronuclei and 3AB index in human and canine lymphocytes after in vitro X-irradiation. *Mutat Res/Environ Muta* 312 (1), 1-8.
- Chalmers A, Johnston P, Woodcock M, Joiner M, Marples B (2004) PARP-1, PARP-2, and the cellular response to low doses of ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58 (2), 410-419.
- Chang P, Jacobson MK, Mitchison TJ (2004) Poly(ADP-ribose) is required for spindle assembly and structure. *Nature* 432 (7017), 645-649.
- Chaoui A, Mazhoudi S, Ghorbal MH, El Ferjani E (1997) Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci* 127 (2), 139-147.
- Chevanne M, Zampieri M, Caldini R, Rizzo A, Ciccarone F, Catizone A, D'Angelo C, Guastafierro T, Biroccio A, Reale A, Zupi G, Caiafa P (2010) Inhibition of PARP activity by PJ-34 leads to growth impairment and cell death associated with aberrant mitotic pattern and nucleolar actin accumulation in M14 melanoma cell line. *J Cell Physiol* 222 (2), 401-410.
- Chimienti F, Seve M, Richard S, Mathieu J, Favier A (2001) Role of cellular zinc in programmed cell death: temporal relationship between zinc depletion, activation of caspases, and cleavage of Sp family transcription factors. *Biochem Pharmacol* 62 (1), 51-62.
- Choi AM, Alam J (1996) Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15 (1), 9-19.
- Chung MJ, Walker PA, Brown RW, Hogstrand C (2005) Zinc-mediated gene expression offers protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 205 (3), 225-236.



- Cima RR, Dubach JM, Wieland AM, Walsh BM, Soybel DI (2006) Intracellular Ca(2+) and Zn(2+) signals during monochloramine-induced oxidative stress in isolated rat colon crypts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290 (2), G250-261.
- Collins AR, Ai-guo M, Duthie SJ (1995) The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res/DNA Repair* 336 (1), 69-77.
- Corrier DE, Mollenhauer HH, Clark DE, Hare MF, Elissalde MH (1985) Testicular degeneration and necrosis induced by dietary cobalt. *Vet Pathol* 22 (6), 610-616.
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM (2002) Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci* 59 (4), 627-647.
- Criddle DN, Gillies S, Baumgartner-Wilson HK, Jaffar M, Chinje EC, Passmore S, Chvanov M, Barrow S, Gerasimenko OV, Tepikin AV, Sutton R, Petersen OH (2006) Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 281 (52), 40485-40492.
- Dantzer F, de La RG, Menissier-de Murcia J, Hostomsky Z, de Murcia G, Schreiber V (2000) Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochem* 39 (25), 7559-7569.
- Davidovic L, Vodenicharov M, Affar EB, Poirier GG (2001) Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp Cell Res* 268 (1), 7-13.
- de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walztinger C, Chambon P, de Murcia G (1997) Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (14), 7303-7307.
- Dean KM, Qin Y, Palmer AE (2012) Visualizing metal ions in cells: An overview of analytical techniques, approaches, and probes. *Biochim Biophys Acta* 1823 (9), 1406-1415.
- DFG (2016) MAK- und BAT-Werte-Liste 2016. Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. Mitteilung 46. Wiley-VCH, Weinheim.
- DGE (2015) D-A-CH-Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. Zink. 2. Auflage, Neustadt an der Weinstraße.
- Ding W, Liu W, Cooper KL, Qin XJ, de Souza Bergo PL, Hudson LG, Liu KJ (2009) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by arsenite interferes with repair of oxidative DNA damage. *J Biol Chem* 284 (11), 6809-6817.
- Dizdaroglu M, Rao G, Halliwell B, Gajewski E (1991) Damage to the DNA bases in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions. *Arch Biochem* 285 (2), 317-324.
- Domínguez I, Panneerselvam N, Escalza P, Natarajan AT, Cortés F (1993) Adaptive response to radiation damage in human lymphocytes conditioned with hydrogen peroxide as measured by the cytokinesis-block micronucleus technique. *Mutat Res Lett* 301 (2), 135-141.
- Drenichev MS, Mikhailov SN (2015) Poly(ADP-ribose)—a unique natural polymer structural features, biological role and approaches to the chemical synthesis. *Nucleosides Nucleotides Nucl Acids* 34 (4), 258-276.
- EFSA (2009) Scientific opinion on arsenic in food. *EFSA J* 7 (10), 1351-1442.
- EFSA (2014a) Dietary exposure to inorganic arsenic in the European population. *EFSA J* 12 (3), 3597-3663.
- EFSA (2014b) Scientific opinion on dietary reference values for zinc. *EFSA J* 12 (10), 3844.

- Ehleben W, Porwol T, Fandrey J, Kummer W, Acker H (1997) Cobalt and desferrioxamine reveal crucial members of the oxygen sensing pathway in HepG2 cells. *Kidney Int* 51 (2), 483-491.
- Eide DJ (2006) Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim Biophys Acta* 1763 (7), 711-722.
- Elgohary WG, Sidhu S, Krezoski SO, Petering DH, Byrnes RW (1998) Protection of DNA in HL-60 cells from damage generated by hydroxyl radicals produced by reaction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with cell iron by zinc-metallothionein. *Chem-Biol Interact* 115 (2), 85-107.
- Fagagna FdAd, Hande MP, Tong W-M, Lansdorp PM, Wang Z-Q, Jackson SP (1999) Functions of poly(ADP-ribose) polymerase in controlling telomere length and chromosomal stability. *Nat Genet* 23 (1), 76.
- Fahrer J, Kranaster R, Altmeyer M, Marx A, Burkle A (2007) Quantitative analysis of the binding affinity of poly(ADP-ribose) to specific binding proteins as a function of chain length. *Nucleic Acids Res* 35 (21), e143.
- Fanzo JC, Reaves SK, Cui L, Zhu L, Lei KY (2002) p53 protein and p21 mRNA levels and caspase-3 activity are altered by zinc status in aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 283 (2), C631-C638.
- Fanzo JC, Reaves SK, Cui L, Zhu L, Wu JYJ, Wang YR, Lei KY (2001) Zinc status affects p53, gadd45, and c-fos expression and caspase-3 activity in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 281 (3), C751-C757.
- Farah SB (1983) The in vivo effect of cobalt chloride in chromosomes. *Rev Bras Genet* 6 (3), 433-442.
- Fenech M, Crott J, Turner J, Brown S (1999) Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis* 14 (6), 605-612.
- Feng X, Koh DW (2013) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 or poly(ADP-ribose) glycohydrolase individually, but not in combination, leads to improved chemotherapeutic efficacy in HeLa cells. *Int J Oncol* 42 (2), 749-756.
- Figgitt M, Newson R, Leslie IJ, Fisher J, Ingham E, Case CP (2010) The genotoxicity of physiological concentrations of chromium (Cr(III) and Cr(VI)) and cobalt (Co(II)): An in vitro study. *Mutat Res/Fund Mol Mech Mut* 688 (1-2), 53-61.
- Fischer BM, Neumann D, Piberger AL, Risnes SF, Köberle B, Hartwig A (2016) Use of high-throughput RT-qPCR to assess modulations of gene expression profiles related to genomic stability and interactions by cadmium. *Arch Toxicol* 90 (11), 2745-2761.
- Fisher AE, Hochegger H, Takeda S, Caldecott KW (2007) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 accelerates single-strand break repair in concert with poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Mol Cell Biol* 27.
- FSA (2003) Safe upper levels for vitamins and minerals, expert group on vitamins and minerals. *Food Standards Agency, UK*.
- Gebel TW (2001) Genotoxicity of arsenical compounds. *Int J Hyg Environ Health* 203 (3), 249-262.
- Gobeil S, Boucher CC, Nadeau D, Poirier GG (2001) Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases. *Cell Death Differ* 8 (6), 588.
- Greim H (Ed.) (2007) Cobalt and its compounds (as inhalable dusts or aerosols). The MAK collection for occupational health and safety. Part I: MAK value documentations, vol. 23. Wiley-VCH, Weinheim.

- Gunther V, Lindert U, Schaffner W (2012) The taste of heavy metals: gene regulation by MTF-1. *Biochim Biophys Acta* 1823 (9), 1416-1425.
- Haase H, 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), 247-254.
- Haase H, Hebel S, Engelhardt G, Rink L (2006) Flow cytometric measurement of labile zinc in peripheral blood mononuclear cells. *Anal Biochem* 352 (2), 222-230.
- Haase H, Hebel S, Engelhardt G, Rink L (2015) The biochemical effects of extracellular Zn<sup>2+</sup> and other metal ions are severely affected by their speciation in cell culture media. *Metallomics* 7 (1), 102-111.
- Haase H, Mazzatti DJ, White A, Ibs KH, Engelhardt G, Hebel S, Powell JR, Rink L (2007) Differential gene expression after zinc supplementation and deprivation in human leukocyte subsets. *Mol Med* 13 (7-8), 362-370.
- Haase H, Rink L (2006) Focus on signal transduction research.
- Hamilton-Koch W, Snyder RD, Lavelle JM (1986) Mental-induced DNA damage and repair in human diploid fibroblasts and chinese hamster ovary cells. *Chem-Biol Interact* 59,17-28.
- Hartwig A (2001) Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: differential effects on structure and function. *Antioxid Redox Signal* 3 (4), 625-634.
- Hartwig A (2010) Zinc and its inorganic compounds. The MAK collection for occupational health and safety. Part I: MAK value documentations, vol. 49. Wiley-VCH, Weinheim.
- Hartwig A, Asmuss M, Blessing H, Hoffmann S, Jahnke G, Khandelwal S, Pelzer A, Bürkle A (2002) Interference by toxic metal ions with zinc-dependent proteins involved in maintaining genomic stability. *Food Chem Toxicol* 40 (8), 1179-1184.
- Hartwig A, Blessing H, Schwerdtle T, Walter I (2003a) Modulation of DNA repair processes by arsenic and selenium compounds. *Toxicology* 193 (1-2), 161-169.
- Hartwig A, Dally H, Schlepegrell R (1996) Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding. *Toxicol Lett* 88 (1), 85-90.
- Hartwig A, Dunkelberg H, Gebel T (2012) Vitamine und Spurenelemente. Bedarf, Mangel, Hypervitaminosen und Nahrungsergänzung. 1. Auflage, Weinheim.
- Hartwig A, Groblichhoff UD, Beyersmann D, Natarajan AT, Filon R, Mullenders LH (1997) Interaction of arsenic(III) with nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *Carcinogenesis* 18 (2), 399-405.
- Hartwig A, Kasten U, Boakye-Dankwa K, Schlepegrell R, Beyersmann D (1990) Uptake and genotoxicity of micromolar concentrations of cobalt chloride in mammalian cells. *Toxicol Environ Chem* 28 (4), 205-215.
- Hartwig A, Klyszcz-Nasko H, Schlepegrell R, Beyersmann D (1993) Cellular damage by ferric nitriolotriacetate and ferric citrate in V79 cells: interrelationship between lipid peroxidation, DNA strand breaks and sister chromatid exchanges. *Carcinogenesis* 14 (1), 107-112.
- Hartwig A, Köberle B, Michalke B (2013) Nutzen-Risiko-Bewertung von Mineralstoffen und Spurenelementen. Biochemische, physiologische und toxikologische Aspekte. KIT Scientific Publishing.
- Hartwig A, Pelzer A, Asmuss M, Bürkle A (2003b) Very low concentrations of arsenite suppress poly(ADP-ribosyl)ation in mammalian cells. *Int J Cancer* 104 (1), 1-6.
- Hartwig A, Schwerdtle T (2002) Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol Lett* 127 (1-3), 47-54.

- Hartwig A, Schwerdtle T (2009) Arsenic-induced carcinogenicity: new insights in molecular mechanism. *Metal Complex–DNA Interactions*. John Wiley & Sons.
- Hartwig A, Snyder RD, Schlegel R, Beyersmann D (1991) Modulation by Co(II) of UV-induced DNA repair, mutagenesis and sister-chromatid exchanges in mammalian cells. *Mutat Res* 248 (1), 177-185.
- Hei TK, Liu SX, Waldren C (1998) Mutagenicity of arsenic in mammalian cells: role of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (14), 8103-8107.
- Hempe JM, Cousins RJ (1991) Cysteine-rich intestinal protein binds zinc during transmucosal zinc transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (21), 9671-9674.
- Ho E (2004) Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. *J Nutr Biochem* 15 (10), 572-578.
- Ho E, Ames BN (2002) Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFkappa B, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (26), 16770-16775.
- Ho E, Courtemanche C, Ames BN (2003) Zinc deficiency induces oxidative DNA damage and increases p53 expression in human lung fibroblasts. *J Nutr* 133 (8), 2543-2548.
- Holleman N, Wiberg E (2008) *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, 102. Auflage.
- Honzatko RB, Crawford JL, Monaco HL, Ladner JE, Edwards BFP, Evans DR, Warren SG, Wiley DC, Ladner RC, Lipscomb WN (1982) Crystal and molecular structures of native and CTP-liganded aspartate carbamoyltransferase from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 160 (2), 219-263.
- Horton HR, Moran LA, Scrimgeour KG, Perry MD, Rawn JD (2008) *Biochemie*, 4. Auflage.
- Huang C, Ke Q, Costa M, Shi X (2004) Molecular mechanisms of arsenic carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 255 (1), 57-66.
- Huestis J, Zhou X, Chen L, Feng C, Hudson LG, Liu KJ (2016) Kinetics and thermodynamics of zinc(II) and arsenic(III) binding to XPA and PARP-1 zinc finger peptides. *J Inorg Biochem* 163, 45-52.
- IARC (2006) Cobalt in hard metals and cobalt sulfate, gallium arsenide, indium phosphide and vanadium pentoxide. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* 861-294.
- IARC (2012) Arsenic, Metals, Fibres and Dusts. A Review of Human Carcinogens. *IARC (100C)*.
- Iliakis G (2009) Backup pathways of NHEJ in cells of higher eukaryotes: cell cycle dependence. *Radiother Oncol* 92 (3), 310-315.
- Imlay JA, Linn S (1988) DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240 (4857), 1302-1309.
- Ivancsits S, Diem E, Pilger A, Rüdiger HW (2002) Induction of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by cobalt(II) and hydrogen peroxide in vitro. *J Toxicol Environ Health, A* 65 (9), 665-676.
- Ivanova S, Repnik U, Bojic L, Petelin A, Turk V, Turk B (2006) Lysosomes in apoptosis. *Methods Enzymol* 442.
- Jin H, Yoon HE, Lee J-S, Kim J-K, Myung SH, Lee Y-S (2015) Effects on G2/M phase cell cycle distribution and aneuploidy formation of exposure to a 60 Hz electromagnetic field in combination with ionizing radiation or hydrogen peroxide in L132 nontumorigenic human lung epithelial cells. *Korean J Physiol Pharmacol* 19 (2), 119-124.
- Jouan-Lanhouet S, Arshad MI, Piquet-Pellorce C, Martin-Chouly C, Le Moigne-Muller G, Van Herreweghe F, Takahashi N, Sergent O, Lagadic-Gossmann D, Vandenabeele P, Samson M, Dimanche-Boitrel MT (2012) TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation. *Cell Death Differ* 19 (12), 2003-2014.
- Jourdan M, Reme T, Goldschmidt H, Fiol G, Pantesco V, De Vos J, Rossi J-F, Hose D, Klein B (2009) Gene expression of anti- and pro-apoptotic proteins in malignant and normal plasma cells. *Br J Haematol* 145 (1), 45-58.

- Kaegi JHR, Schaeffer A (1988) Biochemistry of metallothionein. *Biochem* 27 (23), 8509-8515.
- Kambe T, Hashimoto A, Fujimoto S (2014) Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases. *Cell Mol Life Sci* 71 (17), 3281-3295.
- Kasprzak KS, Zastawny TH, North SL, Riggs CW, Diwan BA, Rice JM, Dizdaroglu M (1994) Oxidative DNA base damage in renal, hepatic, and pulmonary chromatin of rats after intraperitoneal injection of cobalt (II) acetate. *Chem Res Toxicol* 7 (3), 329.
- Kasten U, Mullenders LH, Hartwig A (1997) Cobalt(II) inhibits the incision and the polymerization step of nucleotide excision repair in human fibroblasts. *Mutat Res* 383 (1), 81-89.
- Kawanishi S, Inoue S, Yamamoto K (1994) Active oxygen species in DNA damage induced by carcinogenic metal compounds. *Environ Health Perspect* 102 (Suppl 3), 17-20.
- Keilin D, Mann T (1940) Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. *Biochem J* 34 (8-9), 1163-1176.
- Kligerman AD, Doerr CL, Tennant AH, Harrington-Brock K, Allen JW, Winkfield E, Poorman-Allen P, Kundu B, Funasaka K, Roop BC, Mass MJ, DeMarini DM (2003) Methylated trivalent arsenicals as candidate ultimate genotoxic forms of arsenic: Induction of chromosomal mutations but not gene mutations. *Environ Mol Mutag* 42 (3), 192-205.
- Kopera E, Schwerdtle T, Hartwig A, Bal W (2004) Co(II) and Cd(II) substitute for Zn(II) in the zinc finger derived from the DNA repair protein XPA, demonstrating a variety of potential mechanisms of toxicity. *Chem Res Toxicol* 17 (11), 1452-1458.
- Kordas K, Stoltzfus RJ (2004) New evidence of iron and zinc interplay at the enterocyte and neural tissues. *J Nutr* 134 (6), 1295-1298.
- Krężel A, Maret W (2006) Zinc-buffering capacity of a eukaryotic cell at physiological pZn. *J Biol Inorg Chem* 11 (8), 1049-1062.
- Krężel A, Maret W (2007) Dual nanomolar and picomolar Zn(II) binding properties of metallothionein. *J Am Chem Soc* 129 (35), 10911-10921.
- Kriss JP, Carnes WH, Gross RT (1955) Hypothyroidism and thyroid hyperplasia in patients treated with cobalt. *J Am Med Assoc* 157 (2), 117-121.
- Krüger CT, Hofmann M, Hartwig A (2015) The in vitro PIG-A gene mutation assay: mutagenicity testing via flow cytometry based on the glycosylphosphatidylinositol (GPI) status of TK6 cells. *Arch Toxicol* 89 (12), 2429-2443.
- Kruse-Jarres JD (1999) Pathobiochemistry of zinc metabolism and diagnostic principles in zinc deficiency. *J Lab Med* 23 (3), 141.
- Kruszewski M, Green MHL, Lowe JE, Szumiel I (1994) DNA strand breakage, cytotoxicity and mutagenicity of hydrogen peroxide treatment at 4°C and 37°C in L5178Y sublines. *Mutat Res/Fund Mol Mech Mutagen* 308 (2), 233-241.
- Kupper JH, de Murcia G, Burkle A (1990) Inhibition of poly(ADP-ribosylation) by overexpressing the poly(ADP-ribose) polymerase DNA-binding domain in mammalian cells. *J Biol Chem* 265 (31), 18721-18724.
- Langelier MF, Pascal JM (2013) PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis. *Curr Opin Struct Biol* 23 (1), 134-143.
- Langelier MF, Planck JL, Roy S, Pascal JM (2012) Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosylation) by human PARP-1. *Science* 336 (6082), 728-732.
- Lewis CP, Demedts M, Nemery B (1991) Indices of oxidative stress in hamster lung following exposure to cobalt(II) ions: in vivo and in vitro studies. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5 (2), 163-169.
- Li J-H, Rossman TG (1989) Mechanism of comutagenesis of sodium arsenite with methyl-n-nitrosourea. *Biol Trace Elem Res* 21 (1), 373-381.

- Li J-H, Rossman TG (1991) Comutagenesis of sodium arsenite with ultraviolet radiation in Chinese hamster V79 cells. *Biol Met* 4 (4), 197-200.
- Liu Y-C, Huang H (1997) Involvement of calcium-dependent protein kinase C in arsenite-induced genotoxicity in chinese hamster ovary cells. *J Cell Biochem* 64 (3), 423-433.
- Liuzzi JP, Cousins RJ (2004) Mammalian zinc transporters. *Annu Rev Nutr* 24 151-172.
- Lloyd DR, Phillips DH, Carmichael PL (1997) Generation of putative intrastrand cross-links and strand breaks in DNA by transition metal ion-mediated oxygen radical attack. *Chem Res Toxicol* 10 (4), 393-400.
- Lu X, Nguyen T-A, Moon S-H, Darlington Y, Sommer M, Donehower LA (2008) The type 2C phosphatase Wip1: an oncogenic regulator of tumor suppressor and DNA damage response pathways. *Cancer Metastasis Rev* 27 (2), 123-135.
- Magan N, Isaacs RJ, Stowell KM (2012) Treatment with the PARP-inhibitor PJ34 causes enhanced doxorubicin-mediated cell death in HeLa cells. *Anti-Cancer Drugs* 23 (6), 627-637.
- Malanga M, Pleschke JM, Kleczkowska HE, Althaus FR (1998) Poly(ADP-ribose) binds to specific domains of p53 and alters its DNA binding functions. *J Biol Chem* 273 (19), 11839-11843.
- Maret W (2000) The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J Nutr* 130 (5S Suppl), 1455s-1458s.
- Maret W (2001) Zinc biochemistry, physiology, and homeostasis – recent insights and current trends. *BioMetals* 14 (3), 187-190.
- Maret W, Li Y (2009) Coordination dynamics of zinc in proteins. *Chem Rev* 109 (10), 4682-4707.
- Maret W, Sandstead HH (2006) Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *J Trace Elem Med Biol* 20 (1), 3-18.
- Marquardt HS, S. (2004) Lehrbuch der Toxikologie, 2. Auflage, Stuttgart.
- Martello R, Mangerich A, Sass S, Dedon PC, Bürkle A (2013) Quantification of cellular poly(ADP-ribose) by stable isotope dilution mass spectrometry reveals tissue- and drug-dependent stress response dynamics. *ACS Chem Biol* 8 (7), 1567-1575.
- Martin L, Lodemann U, Bondzio A, Gefeller EM, Vahjen W, Aschenbach JR, Zentek J, 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. *J Nutr* 143 (8), 1205-1210.
- Masutani M, Nozaki T, Nishiyama E, Shimokawa T, Tachi Y, Suzuki H, Nakagama H, Wakabayashi K, Sugimura T (1999) Function of poly(ADP-ribose) polymerase in response to DNA damage: Gene-disruption study in mice. *Mol Cell Biochem* 149-152.
- Matsui H, Oyama TM, Okano Y, Hashimoto E, Kawanai T, Oyama Y (2010) Low micromolar zinc exerts cytotoxic action under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress: Excessive increase in intracellular Zn<sup>2+</sup> concentration. *Toxicology* 276 (1), 27-32.
- Mayer DR, Kosmus W, Poggitsch H, mayer D, Beyer W (1993) Essential trace elements in humans. *Biol Trace Elem Res* 37 (1), 27-38.
- McMahon RJ, Cousins RJ (1998) Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (9), 4841-4846.
- Meeusen JW, Nowakowski A, Petering DH (2012) Reaction of metal-binding ligands with the zinc proteome: zinc sensors and N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine. *Inorg Chem* 51 (6), 3625-3632.
- Mertens K, Lowes DA, Webster NR, Talib J, Hall L, Davies MJ, Beattie JH, Galley HF (2015) Low zinc and selenium concentrations in sepsis are associated with oxidative damage and inflammation. *Br J Anaesth* 114 (6), 990-999.

- Moorhouse CP, Halliwell B, Grootveld M, Gutteridge JMC (1985) Cobalt(II) ion as a promoter of hydroxyl radical and possible 'crypto-hydroxyl' radical formation under physiological conditions. Differential effects of hydroxyl radical scavengers. *Biochim Biophys Acta - Gen Subjects* 843 (3), 261-268.
- Nakano K, Balint E, Ashcroft M, Vousden KH (2000) A ribonucleotide reductase gene is a transcriptional target of p53 and p73. *Oncogene* 19 (37), 4283.
- Nakatani T, Tawaramoto M, Opare Kennedy D, Kojima A, Matsui-Yuasa I (2000) Apoptosis induced by chelation of intracellular zinc is associated with depletion of cellular reduced glutathione level in rat hepatocytes. *Chem-Biol Interact* 125 (3), 151-163.
- Nguewa PA, Fuertes MA, Valladares B, Alonso C, Pérez JM (2005) Poly(ADP-Ribose) polymerases: homology, structural domains and functions. Novel therapeutical applications. *Prog Biophys Mol Biol* 88 (1), 143-172.
- NRC (1999) Arsenic in drinking water. The National Academies Press, Washington, DC.
- NRC (2001) Arsenic in drinking water: 2001 update. The National Academies Press, Washington, DC.
- NTP (2016) Report on carcinogens. Monograph on cobalt and cobalt compounds that release cobalt ions in vivo.
- Olaussen KA, Adam J, Vanhecke E, Vielh P, Pirker R, Friboulet L, Popper H, Robin A, Commo F, Thomale J, Kayitalire L, Filipits M, Le Chevalier T, André F, Brambilla E, Soria J-C (2013) PARP1 impact on DNA repair of platinum adducts: preclinical and clinical read-outs. *Lung Cancer* 80 (2), 216-222.
- Palecek E, Brazdova M, Cernocka H, Vlk D, Brazda V, Vojtesek B (1999) Effect of transition metals on binding of p53 protein to supercoiled DNA and to consensus sequence in DNA fragments. *Oncogene* 18 (24), 3617-3625.
- Palit S, Ghosh AK, Sharma A, Talukder G (1991a) Modification of the clastogenic effects of cobalt by calcium in bone marrow cells of mice in vivo. *Cytologia* 56 (3), 373-377.
- Palit S, Sharma A, Talukder G (1991b) Chromosomal aberrations induced by cobaltous chloride in mice in vivo. *Biol Trace Elem Res* 29 (2), 139-145.
- Palit S, Sharma A, Talukder G (1991c) Cytotoxic effects of cobalt chloride on mouse bone marrow cells in vivo. *Cytobios* 68 (273), 85-89.
- Parat M-O, Richard M-J, Meplan C, Favier A, Béani J-C (1999) Impairment of cultured cell proliferation and metallothionein expression by metal chelator NNN' N'-tetrakis-(2-pyridylmethyl) ethylene diamine. *Biol Trace Elem Res* 70 (1), 51-68.
- Parat MO, Richard MJ, Beani JC, Favier A (1997) Involvement of zinc in intracellular oxidant/antioxidant balance. *Biol Trace Elem Res* 60 (3), 187-204.
- Park WH (2014) Anti-apoptotic effect of caspase inhibitors on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated HeLa cells through early suppression of its oxidative stress. *Oncol Rep* 31 (5), 2413-2421.
- Pavlica S, Gaunitz F, Gebhardt R (2009) Comparative in vitro toxicity of seven zinc-salts towards neuronal PC12 cells. *Toxicol In Vitro* 23 (4), 653-659.
- Piberger AL, Keil C, Platz S, Rohn S, Hartwig A (2015) Sulforaphane inhibits damage-induced poly (ADP-ribosyl)ation via direct interaction of its cellular metabolites with PARP-1. *Mol Nutr Food Res* 59 (11), 2231-2242.
- Plum LM, Rink L, Haase H (2010) The essential toxin: impact of zinc on human health. *Int J Env Res Public Health* 7 (4), 1342.
- Ponti J, Sabbioni E, Munaro B, Broggi F, Marmorato P, Franchini F, Colognato R, Rossi F (2009) Genotoxicity and morphological transformation induced by cobalt nanoparticles and cobalt chloride: an in vitro study in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Mutagenesis* 24 (5), 439-445.

- Prasad R, Dyrkheeva N, Williams J, Wilson SH (2015) Mammalian base excision repair: functional partnership between PARP-1 and APE1 in AP-site repair. *PLoS One* 10 (5), e0124269.
- Predki PF, Sarkar B (1992) Effect of replacement of "zinc finger" zinc on estrogen receptor DNA interactions. *J Biol Chem* 267 (9), 5842-5846.
- Pyriochou A, Olah G, Deitch EA, Szabo C, Papapetropoulos A (2008) Inhibition of angiogenesis by the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor PJ-34. *Int J Mol Med* 22 (1), 113-118.
- Qin X-J, Hudson LG, Liu W, Timmins GS, Liu KJ (2008) Low concentration of arsenite exacerbates UVR-induced DNA strand breaks by inhibiting PARP-1 activity. *Toxicol Appl Pharmacol* 232 (1), 41-50.
- Riedel E, Janiak C (2015) Anorganische Chemie, 9. Auflage, Berlin, Boston.
- Rolli V, O'Farrell M, Menissier-de Murcia J, de Murcia G (1997) Random mutagenesis of the poly(ADP-ribose) polymerase catalytic domain reveals amino acids involved in polymer branching. *Biochem* 36.
- Rossman TG, Stone D, Molina M, Troll W (1980) Absence of arsenite mutagenicity in E coli and chinese hamster cells. *Environ Mutagen* 2 (3), 371-379.
- Rouleau M, Patel A, Hendzel MJ, Kaufmann SH, Poirier GG (2010) PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat Rev Cancer* 10 (4), 293-301.
- Ruf A, Rolli V, de Murcia G, Schulz GE (1998) The mechanism of the elongation and branching reaction of poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and mutagenesis. *J Mol Biol* 278 (1), 57-65.
- Ryabokon NI, Cieslar-Pobuda A, Rzeszowska-Wolny J (2009) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activity affects its subcellular localization and DNA strand break rejoining. *Biochim Pol* 56 (2), 243-248.
- Ryu JR, Shin CY, Choi J-W, Min HW, Ryu JH, Choi C-R, Ko KH (2002) Depletion of intracellular glutathione mediates zinc-induced cell death in rat primary astrocytes. *Exp Brain Res* 143 (2), 257-263.
- Sarkar B (1995) Metal replacement in DNA-binding zinc finger proteins and its relevance to mutagenicity and carcinogenicity through free radical generation. *Nutrition* 11 (5), 646-649.
- Saxena A, Saffery R, Wong LH, Kalitsis P, Choo KH (2002) Centromere proteins Cenpa, Cenpb, and Bub3 interact with poly(ADP-ribose) polymerase-1 protein and are poly(ADP-ribosyl)ated. *J Biol Chem* 277 (30), 26921-26926.
- SCF (2003) Opinion of the scientific committee on food on the tolerable upper intake level of zinc.
- Schlicker A, Peschke P, Burkle A, Hahn EW, Kim JH (1999) 4-Amino-1,8-naphthalimide: a novel inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase and radiation sensitizer. *Int J Radiat Biol* 75 (1), 91-100.
- Schreiber V, Dantzer F, Ame J-C, de Murcia G (2006) Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 (7), 517-528.
- Schreiber V, Molinete M, Boeuf H, de Murcia G, Ménissier-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 J* 11 (9), 3263-3269.
- Schulze E (2014) Untersuchungen zum Einfluss von Zink auf die Aktivität der DNA-Reparaturproteine PARP-1, OGG1 und APE1. Dissertation.
- Schwerdtle T, Hamann I, Jahnke G, Walter I, Richter C, Parsons JL, Dianov GL, Hartwig A (2007) Impact of copper on the induction and repair of oxidative DNA damage, poly(ADP-ribosyl)ation and PARP-1 activity. *Mol Nutr Food Res* 51 (2), 201-210.



- Schwerdtle T, Walter I, Hartwig A (2003a) Arsenite and its biomethylated metabolites interfere with the formation and repair of stable BPDE-induced DNA adducts in human cells and impair XPA $\zeta$  and Fpg. *DNA Repair* 2 (12), 1449-1463.
- Schwerdtle T, Walter I, Mackiw I, Hartwig A (2003b) Induction of oxidative DNA damage by arsenite and its trivalent and pentavalent methylated metabolites in cultured human cells and isolated DNA. *Carcinogenesis* 24 (5), 967-974.
- Scott N, Hatlelid KM, MacKenzie NE, Carter DE (1993) Reactions of arsenic(III) and arsenic(V) species with glutathione. *Chem Res Toxicol* 6 (1), 102-106.
- Selene CH, Chou J, De Rosa CT (2003) Case studies – Arsenic. *Int J Hyg Environ Health* 206 (4), 381-386.
- Sethi R, Jain S (2014) PARP: Novel therapeutic target to treat cancer and inflammatory diseases. *World J Pharm Pharm Sci* 3 (12), 469-494.
- Sharif R, Thomas P, Zalewski P, Fenech M (2012) Zinc deficiency or excess within the physiological range increases genome instability and cytotoxicity, respectively, in human oral keratinocyte cells. *Genes & nutrition* 7 (2), 139-154.
- Shi H, Shi X, Liu KJ (2004) Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 255 (1), 67-78.
- Smith LJ, Holmes AL, Kandpal SK, Mason MD, Zheng T, Wise JP, Sr. (2014) The cytotoxicity and genotoxicity of soluble and particulate cobalt in human lung fibroblast cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 278 (3), 259-265.
- Smulson ME, Pang D, Jung M, Dimtchev A, Chasovskikh S, Spoonde A (1998) Irreversible binding of poly(ADP)ribose polymerase cleavage product to DNA ends revealed by atomic force microscopy: possible role in apoptosis. *Cancer Res* 58.
- Soldani C, Lazze MC, Bottone MG, Tognon G, Biggiogera M, Pellicciari CE (2001) Poly(ADP-ribose) polymerase cleavage during apoptosis: when and where? *Exp Cell Res* 269.
- Song Y, Leonard SW, Traber MG, Ho E (2009) Zinc deficiency affects DNA damage, oxidative stress, antioxidant defenses, and DNA repair in rats. *J Nutr* 139 (9), 1626-1631.
- Sousa MM, Steen KW, Hagen L, Slupphaug G (2011) Antibody cross-linking and target elution protocols used for immunoprecipitation significantly modulate signal-to noise ratio in downstream 2D-PAGE analysis. *Proteome Sci* 945.
- Speijers GJA, Krajnc EI, Berkvens JM, van Logten MJ (1982) Acute oral toxicity of inorganic cobalt compounds in rats. *Food Chem Toxicol* 20 (3), 311-314.
- Steinebach OM, Wolterbeek HT (1993) Effects of zinc on rat hepatoma HTC cells and primary cultured rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 118 (2), 245-254.
- Ström CE, Johansson F, Uhlén M, Szigyarto CA-K, Erixon K, 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 Res* 39 (8), 3166-3175.
- Sun X, Zhou X, Du L, Liu W, Liu Y, Hudson LG, Liu KJ (2014) Arsenite binding-induced zinc loss from PARP-1 is equivalent to zinc deficiency in reducing PARP-1 activity, leading to inhibition of DNA repair. *Toxicol Appl Pharmacol* 274 (2), 313-318.
- Suzuki Y, Shimizu H, Nagae Y, Fukumoto M, Okonogi H, Kadokura M (1993a) Micronucleus test and erythropoiesis: effect of cobalt on the induction of micronuclei by mutagens. *Environ Mol Mutagen* 22 (2), 101-106.
- Suzuki Y, Shimizu H, Nagae Y, Fukumoto M, Okonogi H, Kadokura M (1993b) Micronucleus test and erythropoiesis: Effect of cobalt on the induction of micronuclei by mutagens. *Environ Mol Mutag* 22 (2), 101-106.
- Swindall A, Stanley J, Yang E (2013) PARP-1: friend or foe of DNA damage and repair in tumorigenesis? *Cancers* 5 (3), 943.

- Tallman MS (2004) Acute promyelocytic leukemia as a paradigm for targeted therapy. *Semin Hematol* 41:27-32.
- Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, Shiraishi K, Fukuda S, Matsui K, Takei Y, Nakamura Y (2000) A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* 404 (6773), 42-49.
- Tang F, Liu G, He Z, Ma WY, Bode AM, Dong Z (2006) Arsenite inhibits p53 phosphorylation, DNA binding activity, and p53 target gene p21 expression in mouse epidermal JB6 cells. *Mol Carcinog* 45 (11), 861-870.
- Tice RR, Yager JW, Andrews P, Creclius E (1997) Effect of hepatic methyl donor status on urinary excretion and DNA damage in B6C3F1 mice treated with sodium arsenite. *Mutat Res/Rev Mutat Res* 386 (3), 315-334.
- Tinwell H, Stephens SC, Ashby J (1991) Arsenite as the probable active species in the human carcinogenicity of arsenic: mouse micronucleus assays on Na and K arsenite, orpiment, and Fowler's solution. *Environ Health Perspect* 95:205-210.
- Turan B, Fliss H, Desilets M (1997) Oxidants increase intracellular free Zn<sup>2+</sup> concentration in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol* 272 (5 Pt 2), H2095-2106.
- Vega L, Gonshebbatt ME, Ostrosky-Wegman P (1995) Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes in vitro: an individual susceptibility effect detected. *Mutat Res/Environ Muta* 334 (3), 365-373.
- Vodenicharov MD, Sallmann FR, Satoh MS, Poirier GG (2000) Base excision repair is efficient in cells lacking poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Nucleic Acids Res* 28 (20), 3887-3896.
- Walter I, Schwerdtle T, Thuy C, Parsons JL, Dianov GL, Hartwig A (2007) Impact of arsenite and its methylated metabolites on PARP-1 activity, PARP-1 gene expression and poly(ADP-ribose)ylation in cultured human cells. *DNA Repair* 6 (1), 61-70.
- Wang J, Song Y, Elsherif L, Song Z, Zhou G, Prabhu SD, Saari JT, Cai L (2006) Cardiac metallothionein induction plays the major role in the prevention of diabetic cardiomyopathy by zinc supplementation. *Circulation* 113 (4), 544-554.
- Wang TS, Huang H (1994) Active oxygen species are involved in the induction of micronuclei by arsenite in XRS-5 cells. *Mutagenesis* 9 (3), 253-257.
- Wang Y-C, Chaung R-H, Tung L-C (2004a) Comparison of the cytotoxicity induced by different exposure to sodium arsenite in two fish cell lines. *Aquat Toxicol* 69 (1), 67-79.
- Wang Y, Lorenzi I, Georgiev O, Schaffner W (2004b) Metal-responsive transcription factor-1 (MTF-1) selects different types of metal response elements at low vs. high zinc concentration. *Biol Chem* 385 (7), 623.
- WHO (2001) Arsenic and arsenic compounds. International Programme on Chemical Safety Environmental Health Criteria 224, Genf.
- Witkiewicz-Kucharczyk A, Bal W (2006) Damage of zinc fingers in DNA repair proteins, a novel molecular mechanism in carcinogenesis. *Toxicol Lett* 162 (1), 29-42.
- Yager JW, Wiencke JK (1997) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase by arsenite. *Mutat Res - Rev Mut Res* 386 (3), 345-351.
- Yang J-L, Chen M-F, Wu C-W, Lee T-C (1992) Posttreatment with sodium arsenite alters the mutational spectrum induced by ultraviolet light irradiation in chinese hamster ovary cells. *Environ Mol Mutag* 20 (3), 156-164.
- Yang L, Huang K, Li X, Du M, Kang X, Luo X, Gao L, Wang C, Zhang Y, Zhang C, Tong Q, Huang K, Zhang F, Huang D (2013) Identification of poly(ADP-ribose) polymerase-1 as a cell cycle regulator through modulating Sp1 mediated transcription in human hepatoma cells. *PLoS One* 8 (12), e82872.

- Yih L-H, Lee T-C (1999) Effects of exposure protocols on induction of kinetochore-plus and -minus micronuclei by arsenite in diploid human fibroblasts. *Mutat Res/Genet Toxicol Environ Mutagen* 440 (1), 75-82.
- Zalewski PD, Forbes IJ, Betts WH (1993) Correlation of apoptosis with change in intracellular labile Zn(II) using zinquin [(2-methyl-8-toluenesulphonamido-6-quinolyloxy acetic acid), a new specific fluorescent probe for Zn(II)]. *Biochem J* 296 (2), 403-408.
- Zhou X, Sun X, Cooper KL, Wang F, Liu KJ, Hudson LG (2011) Arsenite interacts selectively with zinc finger proteins containing C3H1 or C4 motifs. *J Biol Chem* 286 (26), 22855-22863.
- Ziegler-Skylakakis K, Andrae U (1987) Mutagenicity of hydrogen peroxide in V79 Chinese hamster cells. *Mutat Res Lett* 192 (1), 65-67.
- Zodl B, Zeiner M, Sargazi M, Roberts NB, Marktl W, Steffan I, Ekmekcioglu C (2003) Toxic and biochemical effects of zinc in Caco-2 cells. *J Inorg Biochem* 97 (4), 324-330.

## 8. ANHANG

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
ADP	Adenosindiphosphat
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>
AMD	Automodifikationsdomäne
APE1	<i>apurinic/aprimidinic endonuclease 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
APTX	<i>aprataxin 1</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basenexzisionsreparatur
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bidest.	Bidestilliert
BMDL	<i>benchmark dose level</i>
BRCT	<i>breast cancer C-terminal domain</i>
BS <sup>3</sup>	Bis(sulfosuccinimidyl)suberat
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
BP	Basenpaare
CDKN	Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren
cDNA	komplementäre DNA
CFA	Kolonieformationsassay
CoCl <sub>2</sub>	Cobalt(II)chlorid
Cq	<i>cycle of quantification</i>
CRIP	<i>cysteine-rich intestinal protein</i>
CSB	<i>cockayne syndrome group B</i>
Cys	Cystein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagles Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	DNA-Doppelstrangbrüche

EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EMA	Ethidiummonoazidbromid
F-AAS	Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie
FEN	<i>flap endonuclease 1</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht
GCL	$\gamma$ -Glutamat-Cystein-Ligase
gDNA	genomische DNA
GF-AAS	Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie
Gly	Glycin
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
His	Histidin
HRP	<i>horseradish-peroxidase</i>
HSP	Hitzeschockprotein
ICP-OES	<i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
IFC	<i>integrated fluidic circuit</i>
IFC	<i>integrated fluidic circuit-controller</i>
KD	Katalytische Domäne
KP-Puffer	Kaliumphosphat-Puffer
LDH	Lactatdehydrogenase
LIG	DNA-Ligase
M	molar
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
MRE	<i>metal response element</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MT	Metallothionein
MTF-1	<i>metal-responsive transcription factor 1</i>
MW	Mittelwert
N	normal
NaAsO <sub>2</sub>	Natriumarsenit(III)

NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid
NaP-Puffer	Natriumphosphat-Puffer
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	<i>non homologous end joining</i>
NLS	Kernlokalisationssequenz
NoRT	nicht umgeschriebene RNA-Kontrolle
NRC	<i>no reaction control</i>
NTP	<i>National Toxicology Program</i>
NTC-STA	Wasser-Kontrolle ohne <i>template</i>
PAR	Poly(ADP-Ribose)
PARG	Poly(ADP-Ribose)-Glycohydrolase
PARPL	ADP-Ribosylproteinlyase
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PARylierung	Poly(ADP-Ribosyl)ierung
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>proliferating-cell-nuclear-antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PJ-34	N-(6-Oxo-5,6-dihydrophenanthridin-2-yl)-(N,N-dimethylamino)acetamide
PKcs	<i>proliferation cell nuclear antigen</i>
PNKP	<i>polynucleotid knase 3'-phosphatase</i>
Polβ	Polymerase β
Polδ	Polymerase δ
Polε	Polymerase ε
RLU	relative Lichteinheit
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SH	Thiol
SSB	DNA-Einzelstrangbruch
SSBR	DNA-Einzelstrangbruchreparatur

SSC	Seitwärtsstreulicht
STA	<i>specific target amplification</i> (Präamplifikation)
Strep	Streptavidin
TEA	Triethylamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TF	Transkriptionsfaktor
TPEN	N,N,N',N'-Tetrakis(2-Pyridylmethyl)-ethylendiamin
tRNA	transfer-RNA
UV	Ultraviolett
XPA	<i>xeroderma pigmentosum A</i>
XRCC1	<i>X-ray repair cross-complementing protein 1</i>
ZIP	<i>zinc/iron-regulated transporter-like protein</i>
Zn1	Zinkfinger 1
ZnCl <sub>2</sub>	Zink(II)chlorid
ZnT	<i>zinc-transporter</i>

## 8.2 Verwendete Chemikalien

10x Activated DNA	Trevigen (Helgerman)
10x PARP Cocktail	Trevigen (Helgerman)
10x Strep-Diluent	Trevigen (Helgerman)
20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco)
20x PARP Buffer	Trevigen (Helgerman)
2x Assay Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco)
2x TaqMan® PreAmp Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt)
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
3-Aminobenzamide	Trevigen (Helgerman)
7-Aminoactinomycin D	Biolegend (Koblenz)
AAS-Magnesium-Matrixmodifier	Perkin Elmer (Rodgau)
AAS-Palladium-Matrixmodifier	Perkin Elmer (Rodgau)
Acetonitril LC-MS <i>grade</i>	Roth (Karlsruhe)
Acridin-Orange	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Actinomycin D	Roth (Karlsruhe)
Acrylamid 40 % (37,5:1)	Roth (Karlsruhe)
Alkalische Phosphatase	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ammoniumacetat	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat	Roth (Karlsruhe)
Antikörper Anti-PARP-1 H250	Santa Cruz (Dallas)
Antikörper donkey-anti-rabbit, HRP-gekoppelt	Santa Cruz (Dallas)
Anti-Maus-Antikörper, FITC-gekoppelt (Herkunft: Ziege)	Santa Cruz (Dallas)
Anti-PAR-Antikörper 10H (Herkunft: Maus)	Isolation AK Hartwig
BSA Albumin Fraktion V	Merck (Darmstadt)
Calciumchlorid	Roth (Karlsruhe)
CasyTon©	Roche (Mannheim)
Citronensäure	Roth (Karlsruhe)
Cobaltchlorid Hexahydrat	Alfa Aesar (Karlsruhe)
di-Kaliumhydrogenphosphat, ≥ 99 %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO), ≥ 99,9 %	Sigma-Aldrich (Steinheim)
di-Natriumhydrogenphosphat, ≥ 99%, p.A.	Roth (Karlsruhe)
DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DNA Away	Roth (Karlsruhe)



DNA Suspension Buffer	TEKnova (Kristiansand)
DNase	Sigma-Aldrich (Steinheim)
EMA	Invitrogen
Ethanol 80 %ig und 96 %ig	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Exonuklease I (20 U/ $\mu$ L) New England	BioLabs (Frankfurt)
Exonuklease Reaktionspuffer New England	BioLabs (Frankfurt)
Fetales Kälberserum 10 %ig (FKS)	Invitrogen (Darmstadt)
FluoZin-3 AM	Life Technologies (Eugene)
Formaldehydlösung, 37%, p.a.	Roth (Karlsruhe)
Giemsa®-Stammlösung	Roth (Karlsruhe)
Glycin ( $\geq 99$ %)	Roth (Karlsruhe)
<i>Goat-anti-mouse</i> IgG, polyclonal	Biolegend (Koblenz)
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Hydroxylapatit, high resolution	Calbiochem (Läufelfingen)
Igepal	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Immersionsöl	Zeiss (Oberkochen)
Kaliumdihydrogenphosphat, $\geq$ %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Kaliumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
LumiGlo	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Magnesiumacetat	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Methanol ( $\geq 99,5$ %)	Roth (Karlsruhe)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
<i>Mouse-anti-human</i> CD19-APC (HIB19)	Biolegend (Koblenz)
<i>Mouse-anti-human</i> CD55-PE (JS11)	Biolegend (Koblenz)
<i>Mouse-anti-human</i> CD59-PE (p282)	Biolegend (Koblenz)
<i>Mouse-anti-human</i> CD55	Biolegend (Koblenz)
<i>Mouse-anti-human</i> CD59	Biolegend (Koblenz)
Natriumarsenit	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumazid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumchlorid, $\geq 99,5$ %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat, $\geq 99$ %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid, $\geq$ %, p.A.	Roth (Karlsruhe)

Natronlauge 0,1 N	Roth (Karlsruhe)
Natronlauge 4 N	Roth (Karlsruhe)
<i>PageRuler prestained</i> , Größenmarker	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
PARP-HSA (10 U/μL)	Trevigen (Helgerman)
<i>PCR Certified Water</i>	TEKnova (Kristiansand)
Penicillin-Streptomycin-Lösung (P.: 5000 U/ml, S.: 5 mg/l)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Phenylmethylsulfonylfluorid	Roth (Karlsruhe)
Phosphodiesterase	Affymetrix (Santa Clara)
Primer Fluidigm	Fluidigm (San Francisco)
Protease-Inhibitor	Roche (Basel)
Proteinase K	Sigma-Aldrich (Steinheim)
<i>RNase Away</i>	VWR (Darmstadt)
RNase	Sigma-Aldrich (Steinheim)
RPMI-Medium	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Saccharose	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure 0,1 N	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure 4 N	Roth (Karlsruhe)
SDS 10 %	Roth (Karlsruhe)
SsoFast™ EvaGreen® Supermix mit Low ROX	BioRad (München)
Strep-HRP	Trevigen (Helgerman)
SYBR Green Supermix	VWR (Darmstadt)
SYTOX Green	Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien)
TACS-Sapphire	Trevigen (Helgerman)
TE-Puffer	TEKnova (Kristiansand)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
Trichloressigsäure	Roth (Karlsruhe)
Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat, ≥ 99,5 %	Roth (Karlsruhe)
Tris, ≥ 99,5 %	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100 10% Lsg.	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Trypsin, 0,25 % Trypsin in EDTA	Sigma-Aldrich (Steinheim)
<i>VECTASHILD Mounting Medium</i> mit DAPI	Vector Laboratories Inc.
Wasserstoffperoxid Suprapur® (30%)	Merck Millipore (Darmstadt)
Zinkchlorid, 99,9 %	Sigma-Aldrich (Steinheim)
β-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)

## 8.3 Lösungen und Puffer

### 4.1.1 Lösungen und Puffer

#### Zellkultur

PBS (pH 7,4)                    0,1 M NaCl  
    0,0045 M KCl  
    0,007 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
    0,003 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

PBS-EDTA (pH 7,4)            0,5 mM EDTA in PBS

Trypsin-Lösung                0,25 % Trypsin in PBS-EDTA

#### Aufnahmeuntersuchungen

RIPA-Puffer                    10 mM Tris (pH 7,6)  
    150 mM NaCl  
    1 mM EDTA  
    1 % TritonX-100  
    1 % DOC  
    0,1 % SDS  
    1 mM PMSF (in Isopropanol)  
    1x Protease Inhibitor Cocktail

#### Gewinnung des Antikörpers 10H

Auftaumedium AK 10H        125 mL DMEM + 10 % FKS  
    120 mL RPMI  
    5 mL NCTC  
    5 mL Aminosäuren  
    0,25 mL Mercaptoethanol

Western Blot

Sammelgel 4 %	2,93 mL bidest. H <sub>2</sub> O 500 µL Tris 1 M pH 6,8 40 µL 10%iges SDS 80 µL 0,1 M EDTA 400 µL 40%iges Acrylamid 10 µL TEMED 40 µL 10%iges APS
Trenngel 10 %	2,245 mL bidest. H <sub>2</sub> O 1,25 mL Tris 1,5 M pH 8,8 50 µL 10%iges SDS 50 µL Glycerol 100 µL 0,1 M EDTA 1,25 mL 40%iges Acrylamid 5 µL TEMED 50 µL 10%iges APS
Probenpuffer	Tris-HCl, 200 mM (pH 6,8); SDS 8 %; Glycerol 40 %; Bromphenolblau 0,1 %; β-Mercaptoethanol 4 %
10x Puffer:	0,25 M Tris 1,92 M Glycin 1 L H <sub>2</sub> O bidest. auffüllen, pH 8,5
Laufpuffer:	100 ml 10x Puffer 890 ml Aqua bidest. 10 ml 10%iges SDS

## Anhang

---

Transferpuffer:	100 ml 10x Puffer 200 ml MeOH 700 ml Aqua bidest.
Antikörper (primär)	4 µL AK H250 / 4000 µL Blockierlsg.
Antikörper (sekundär)	4 µL <i>donkey-anti-rabbit</i> HRP gekoppelt / 4000 µL Blockierlsg.
Blockierlösung	5 % Magermilchpulver in PBST

### Proteinbestimmung nach Bradford

Lysepuffer	Tris-HCl, 50 mM; NaCl, 250 mM; EDTA, 1 mM; Triton X-100, 0,1 %
------------	---

### Quantifizierung zellulärer Poly(ADP-Ribose) mittels Immunofluoreszenz

Antikörper (primär)	25 µL AK 10H / 500 µL Blockierlösung
Antikörper (sekundär)	10 µL <i>anti mouse IgG antibody</i> / 500 µL Blockierlsg.
Blockierlösung	5 % Magermilchpulver in PBST
PBS; pH 7,4	NaCl, 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 7 mM KCl, 4,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 3 mM
PBST	Tween, 0,05 % in PBS

### Alkalische Entwindung

Alkalische Lösung	2,6252 g NaCl 1,5 mL NaOH, 1 M
-------------------	-----------------------------------

## Anhang

---

	1 mL Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 M aufgefüllt auf 50 mL bidest. H <sub>2</sub> O
Hydroxylapatit-Lösung	pro Säule: 0,1 g Apatit und 1,0 mL 0,01 M NaP
0,15 M KP-Puffer	15,3 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,5 M 14,7 mL K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 M aufgefüllt auf 100 mL bidest. H <sub>2</sub> O
0,35 M KP-Puffer	37,5 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,5 M 34,3 mL K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 M aufgefüllt auf 100 mL bidest. H <sub>2</sub> O
0,5 M KP-Puffer	51 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,5 M 49 mL K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 M
0,1 M NaP-Puffer	1,96 mL Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 M 2,04 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,5 M aufgefüllt auf 200 mL bidest. H <sub>2</sub> O
<u>Mikrokerntest</u>	
Puffer	PBS + 2 % FKS
Färbelösung	8,5 µg/ml EMA in Puffer
Lyselösung 1	58,4 mg/100 ml NaCl 114 mg/100 ml Natrium-Citrat-Dihydrat 30 µl/100 ml Igepal
Lyselösung A	Lyselösung 1 + 0,4 µM SYTOX Green + 0,5 mg/ml RNase
Lyselösung 2	8,56 g/100 ml Saccharose 1,5 g/100 ml Zitronensäure
Lyselösung B	Lyselösung 2 + 0,4 µM SYTOX Green

Abreicherung von GPI(-) Zellen

BSA-Lösung	2 % BSA (m/v) in PBS
Antikörperlösung	10 µl (5 µg) <i>Goat-anti-mouse</i> IgG + 990 µl PBS
	10 µl (5 µg) <i>Mouse-anti-human</i> CD59-AK-Lösung + 990 µl PBS
	10 µl (5 µg) <i>Mouse-anti-human</i> CD55-AK-Lösung + 990 µl PBS

PIG-A Genmutations-Assay

Färbepuffer	PBS + 1 % BSA (w/v) + 0,1 % Natriumazid (w/v)
Antikörperlösung	6 µl <i>Mouse-anti-human</i> CD19-APC (0,175 µg) + 3 µl <i>Mouse-anti-human</i> CD55-PE (0,6 µg) + 6 µl <i>Mouse-anti-human</i> CD59-PE (2,4 µg)
7-AAD-Puffer	Färbepuffer mit 0,7 µg/ml 7-AAD (m/v)
Fixierungspuffer	PBS + 1 % Formaldehyd (v/v) + 2,5 µg/ml Actinomycin D

8.4 Verwendete Kits

HAT Universal Colorimetric PARP Assay Kit	Trevigen (Helgerman)
i/qScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad (München)
NucleoSpin® RNA Plus Kit	Macherey-Nagel (Düren)
Protein A Antibody Purification Kit	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Roche High Pure mRNA Isolation Kit	Roche (Mannheim)

## 8.5 Verbrauchsmaterialien

24 well Platten	TPP (Trasadingen)
96-Well-Platte, transparent	TPP (Trasadingen, CH)
Casy-Cups	Roche (Mannheim)
Deckgläschen, Ø 15 mm	Roth (Karlsruhe)
Dynamic Array IFC	Fluidigm (San Francisco)
Einmalspritzen (5 mL)	Terumo (Eschborn)
Eppendorf-Reaktionsgefäße, 1,5 mL und 2 mL	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Glasfilterfritte 1 cm	Whatman (Maidstone)
Histone-Coated Clear Strip Wells	Trevigen (Helgerman)
Kryoröhrchen mit Gewinde, 1,8 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Objektträger	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Parafilm	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Pipettenspitzen 10 µL	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen 100-1000 µL – autoklavierbar	Brandt (Wertheim)
Pipettenspitzen 100-1000 µL	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen 1-200 µL	Ratiolab (Deieck)
Pipettenspitzen 5 mL	Eppendorf (Hamburg)
Plastik-Zentrifugenröhrchen, 15 mL und 50 mL	Sarstedt (Nümbrecht)
Wägeschiffchen	Roth (Karlsruhe)
Whatman-Papier, 3 mm	Whatman (Maidstone)
Zellkulturflasche, 150 cm <sup>2</sup>	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturflasche, 25 cm <sup>2</sup>	TTP (Trasadingen, CH)
Zellkulturflasche, 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturschalen (Ø 15 cm, Ø 10 cm, Ø 6 cm)	TTP (Trasadingen, CH)
Zellschaber	VWR (Darmstadt)
Zellzählcups	Roche (Mannheim, D)



## 8.6 Verwendete Geräte und Software

### LC-DAD-MS/MS-System:

Pumpe, Autosampler Waters 2690	Waters (Milford, USA)
Säulenofen	Beckman Coulter (Krefeld)
Diodenarraydetektor 996 PDA D	Waters (Milford, USA)
Micromass Quattro Micro Tandem Quadrupol MS	Waters (Milford, USA)

### Sonstige Geräte:

Atomabsorptionsspektrometer PinAAcle 900 T	Perkin Elmer (Waltham)
Axio Imager Z2	Zeiss (Oberkochen)
Axiovert 40 C	Zeiss (Oberkochen)
Biomark	Fluidigm (San Francisco)
Blotting Kammer	Peqlab (Erlangen)
Brutschrank B15	Thermo Scientific (Langenselbold)
Brutschrank Heracell 150i	Thermo Scientific (Langenselbold)
Casy® TTC Cell Couter & Analyser System	Roche (Mannheim)
Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Colony Counter BZG-30	WTW (Weilheim)
Cryo 1°C Cooler	VWR International (Darmstadt)
Durchflusszytometer LSR Fortessa	Becton-Dickinson (Heidelberg)
Eppendorf Pipette 1000-5000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 100-1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 10-100 µl	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 2,5-10 µl	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 20-200 µl	Eppendorf (Hamburg)
Evaporator	Thermo Scientific (Langenselbold)
Feinwaage BP 61 S	Sartorius (Göttingen)
Galaxy Mini Centrifuge	VWR International (Darmstadt)
Glaspipetten 5, 10, 20 ml	Roth (Karlsruhe)
Heißluftsterilisator	Memmert (Büchenbach)
Heizschüttler SH 26	Cat (Staufen)
Hypersil Gold aQ column, 150 mm x 2.1 mm, Partikelgröße 3 µm	Thermo Scientific (Langenselbold)
IFC Controller HX	Fluidigm (San Francisco)

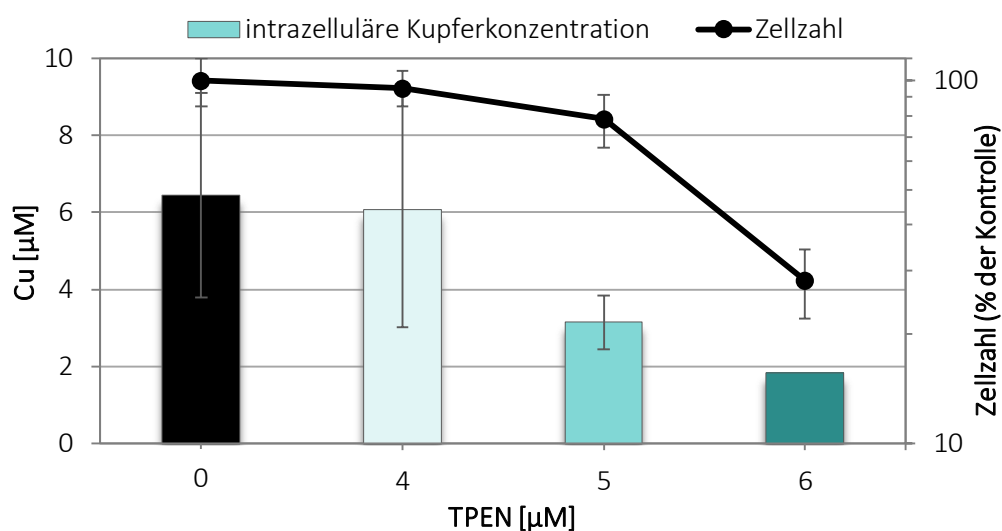
Laborspülmaschine Professional G7883	Miele (Güterloh)
LAS 3000	raytest (Straubenhardt)
Megafuge 1.0	Heraeus (Hanau)
MicroCentrifuge	Roth (Karlsruhe)
Mikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss AG (Feldbach)
Multipipette Pipete Lite XLS® 0,5-10 µl	Mettler Toledo (Gießen)
NanoQuant Platte	Tecan Group (Crailsheim)
PCR Workstation Pro	Peqlab (Erlangen)
pH-Meter 3210	WTW (Weilheim)
Pinzette für Deckgläschen	Roth (Karlsruhe)
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Reinstwasseranlage Milli-Q	Merck Millipore (Darmstadt)
Rotator	Labinco B.V. (Bredastadt)
Rotor-Shake-Genie	Scientific Industries (New York)
Shaker DOS-10 L	neoLab (Heidelberg)
Software „BD FACSDiva“	Becton-Dickinson (Heidelberg)
Software „Fluidigm Real Time PCR Analysis“	Fluidigm (San Francisco)
Software „GenEx“	MultiD Analyses (Göteborg)
Software „IBM SPSS Statistics 22“	SPSS Statistics (Chicago)
Sonifizierungsapparatur Sonifier W-250 D	Branson Ultrasonics (Danbury)
Sterilindikatorband Autoklav	Roth (Karlsruhe)
Sterilindikatorband Heißluft	Roth (Karlsruhe)
Sterilwerkbank HERAsafeKS	Thermo Scientific (Langenselbold)
Taumler	Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel)
Tecan Infinite M200 PRO	Tecan Group (Crailsheim)
Tischzentrifuge Eppireaktionsgefäße	VWR International (Darmstadt)
Vortex-Genie 2T	Scientific Industries (New York)
Waage VWR 1502	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	Memert (Schwabach)

## 8.7 Ergänzende Daten

### 8.7.1. UNTERSUCHUNGEN ZUM ZELLULÄREN ZINK- UND KUPFERSTATUS

#### 8.7.1.1. ERMITTLUNG DER ZELLULÄREN GESAMTKONZENTRATION AN KUPFER NACH TPEN-BEHANDLUNG

TPEN reduzierte neben der zellulären Zinkkonzentration ebenfalls die Kupferkonzentration in HeLa S3-Zellen bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  und 6  $\mu\text{M}$  (Abbildung 59).



**Abbildung 59: Einfluss von TPEN auf die zelluläre Gesamtkonzentration an Kupfer.** HeLa S3- Zellen wurden jeweils 24 h mit TPEN behandelt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von mindestens drei Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Bei dem Wert von 6  $\mu\text{M}$  TPEN sind keine Standardabweichungen dargestellt, da zwei Versuche eine Zinkkonzentration unterhalb der Bestimmungsgrenze lieferten.

#### 8.7.1.2. OPTIMIERUNG DER MESSMETHODE VON „FREIEM“ ZINK MITTELS FLUOZIN-3

Nach einstündiger Inkubation mit  $\text{ZnCl}_2$  bzw. TPEN wurde die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zeit gemessen. Die Fluoreszenzintensität stieg dabei zunächst an, erreichte jedoch bei 90 min Messzeit ein Plateau (Abbildung 60). Für die weiteren Versuche wurden daher die Fluoreszenzwerte nach 90 min für die Auswertung der „freien“ Zinkkonzentration herangezogen.

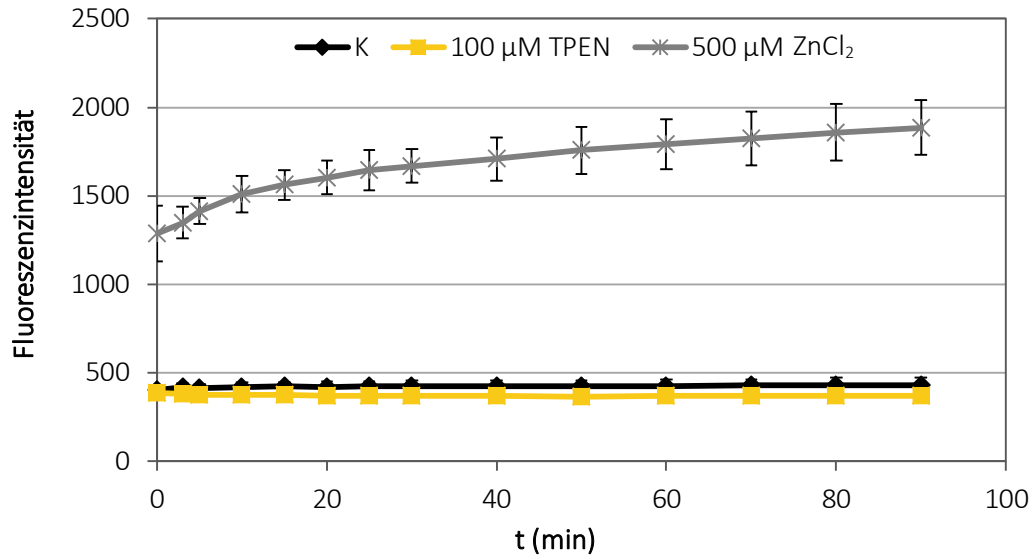


Abbildung 60: Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit nach einstündiger Inkubation mit 500  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  und 100  $\mu\text{M}$  Pyrithion oder 100  $\mu\text{M}$  TPEN in HeLa S3-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von acht Bestimmungen aus vier unabhängigen Versuchen.

#### 8.7.1.3. EINFLUSS DER ZELLULÄREN ZINKKONZENTRATION AUF DIE AKTIVITÄT ISOLIERTER PARP-1

Eine Zinkdepletion beeinflusste die Aktivität isolierter PARP-1 nicht (Abbildung 61). So konnte bei Konzentrationen von 4  $\mu\text{M}$  bis 6  $\mu\text{M}$  TPEN keine Auswirkung auf den Einbau biotinylierter ADP-Ribose festgestellt werden.

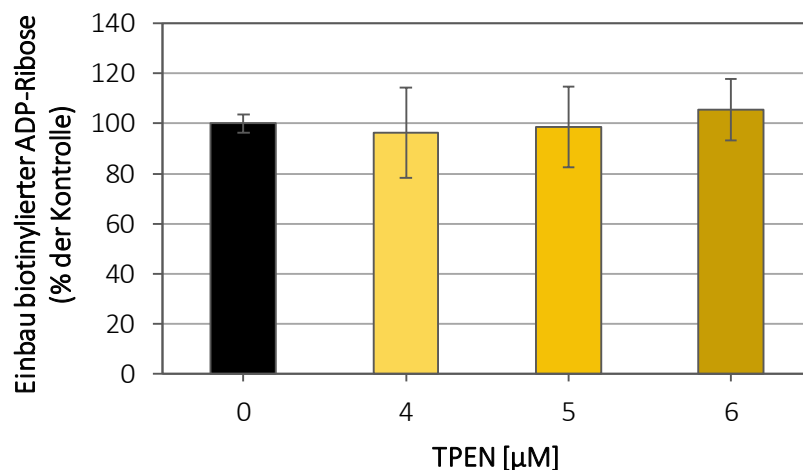


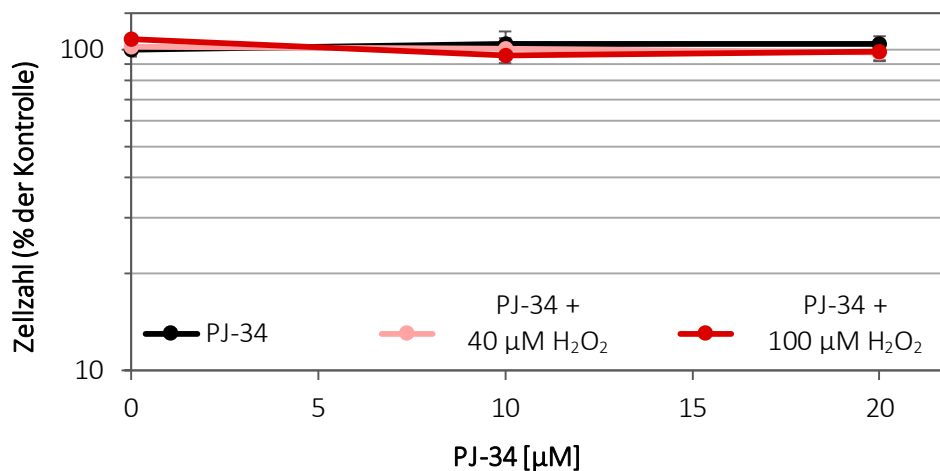
Abbildung 61: Einfluss einer einstündigen Inkubation von TPEN auf den PARP-1-katalysierten Einbau von biotinylierter ADP-Ribose. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen.

## 8.7.2. UNTERSUCHUNGEN ZU PJ-34

## 8.7.2.1. ZYTOTOXIZITÄTSUNTERSUCHUNGEN

Untersuchung der Zellzahl von HeLa S3-Zellen

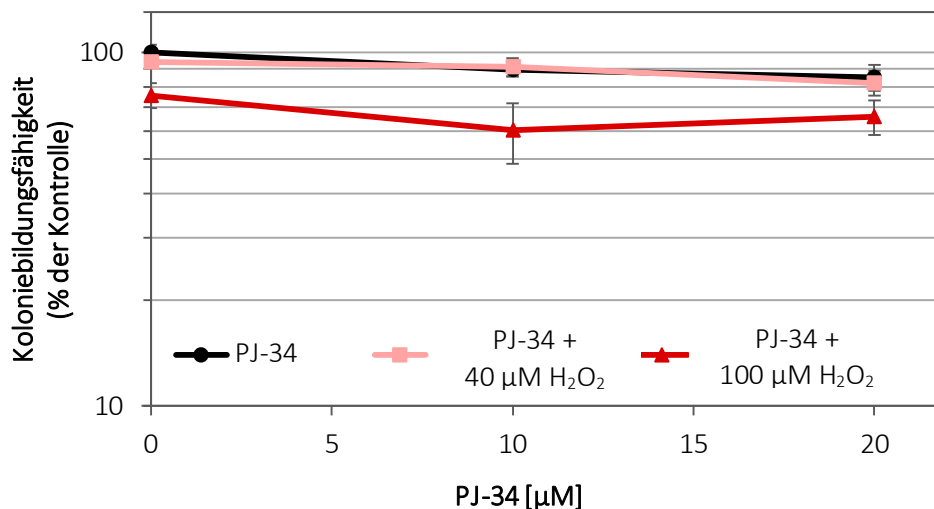
Die akute Zytotoxizität von PJ-34, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PJ-34 mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in HeLa S3-Zellen wurde anhand der Zellzahl untersucht (Abbildung 62). Dabei konnte bei keinen der eingesetzten Testsubstanzen eine Abnahme der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden.



**Abbildung 62:** Einfluss von PJ-34 bzw. PJ-34 mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Zellzahl von HeLa S3-Zellen. Die Zellen wurden 2 h mit PJ-34 vorinkubiert und 5 min mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 koinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen.

Untersuchung der Koloniebildungsfähigkeit von HeLa S3-Zellen

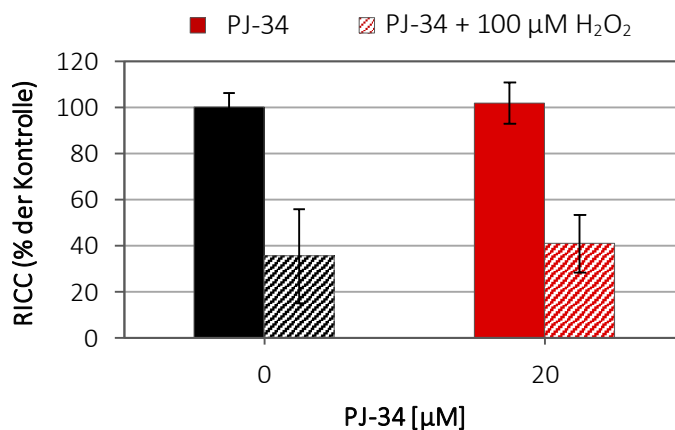
PJ-34 reduzierte bei einer Konzentration von 10 µM die Koloniezahl der Kontrolle um etwa 10 %, während durch 20 µM PJ-34 die Koloniebildungsfähigkeit um circa 20 % gesenkt wurde (Abbildung 63). Die Inkubation mit 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wirkte sich nicht auf die Koloniebildungsfähigkeit der Kontrolle aus und verstärkte auch nicht die PJ-34-vermittelte Zytotoxizität. Dahingegen reduzierten 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Koloniebildungsfähigkeit auf circa 75 %. Die zytotoxische Wirkung der Koinkubation von PJ-34 mit 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> setzte sich additiv aus der Zytotoxizität von PJ-34 und 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zusammen.



**Abbildung 63:** Einfluss von PJ-34 bzw. PJ-34 mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Koloniebildungsfähigkeit von HeLa S3-Zellen. Die Zellen wurden 2 h mit PJ-34 vorinkubiert und 5 min mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von mindestens sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen.

#### Untersuchung der Zellteilungsfähigkeit in TK6-Zellen

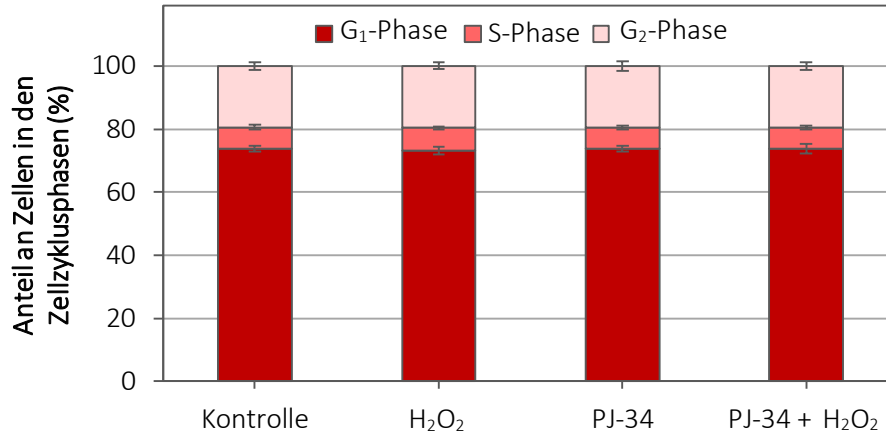
Der Einfluss von PJ-34, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. PJ-34 mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Zellteilungsfähigkeit der TK6-Zellen wurde mittels des RICC bestimmt (Abbildung 64). PJ-34 beeinflusste die Zellteilungsfähigkeit der TK6-Zellen weder nach alleiniger Inkubation noch nach Koinkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nicht. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein führte hingegen zu einer Abnahme des RICC auf 40 %.



**Abbildung 64:** Einfluss von PJ-34 bzw. PJ-34 mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Zellteilungsfähigkeit von TK6-Zellen. Die Zellen wurden 2 h mit PJ-34 vorinkubiert und 5 min mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen als RICC.

## 8.7.2.2. UNTERSUCHUNG DES ZELLYKLUS

Weiterführende Untersuchungen zur Zellzyklusverteilung nach 2-stündiger PJ-34-Inkubation zeigte keinen Einfluss im Vergleich zur Kontrolle.  $\text{H}_2\text{O}_2$  wirkte sich bei einer Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  ebenfalls nicht auf die Zellzyklusverteilung aus (Abbildung 65).



**Abbildung 65:** Einfluss von PJ-34,  $\text{H}_2\text{O}_2$  sowie PJ-34 mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf die Zellzyklusphasenverteilung in HeLa S3-Zellen. Die Zellen wurden 2 h mit 20  $\mu\text{M}$  PJ-34 bzw. 5 min mit 40  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  inkubiert und deren Verteilung in den Zellzyklusphasen am FACS mittels Sytox-Green-Färbung bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von zehn Werten aus fünf unabhängigen Versuchen.

8.7.3. UNTERSUCHUNGEN ZU  $\text{CoCl}_2$ 8.7.3.1. EINFLUSS VON  $\text{CoCl}_2$  AUF DIE REPARATURKINETIK  $\text{H}_2\text{O}_2$ -INDUZIERTER DNA-STRANGBRÜCHE

Die Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  beeinflusste die DNA-Einzelstrangbruchreparatur nicht (Abbildung 66). Bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 250  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  wurden die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbrüche tendenziell langsamer repariert, jedoch lagen die DNA-Strangbruchwerte aufgrund der relativ großen Standardabweichung im Schwankungsbereich der Kontrolle.

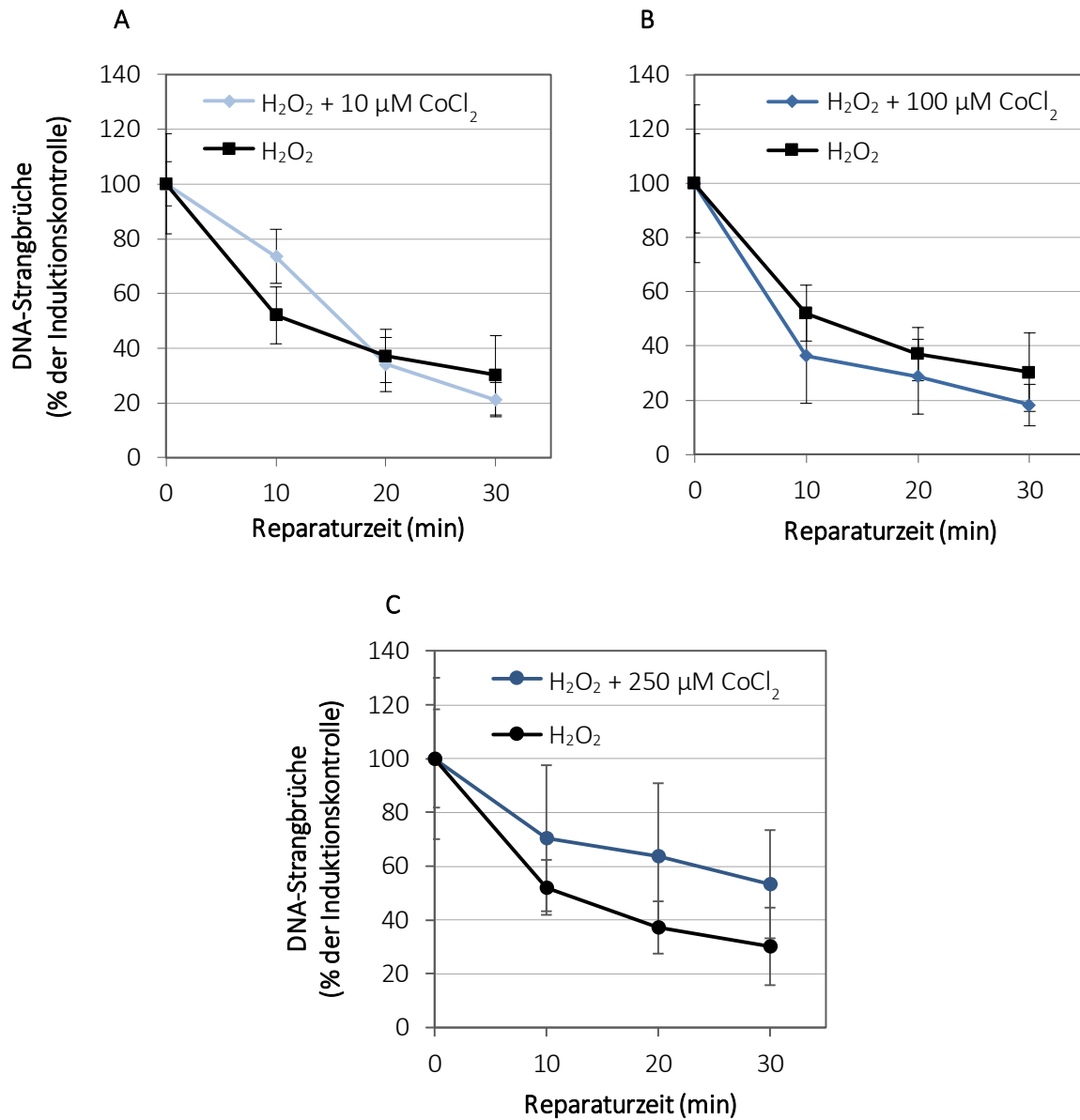


Abbildung 66: Einfluss von  $\text{CoCl}_2$  auf die Reparatur von  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbrüchen in HeLa S3-Zellen. Inkubiert wurde 24 h mit (A) 10  $\mu\text{M}$ , (B) 100  $\mu\text{M}$  und (C) 250  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ . Die Schadensinduktion erfolgte mit 40  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  für 5 min. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von mindestens sechs Werten aus zwei unabhängigen Versuchen.



8.7.4. UNTERSUCHUNGEN ZU  $\text{NaAsO}_2$ 8.7.4.1. EINFLUSS VON  $\text{NaAsO}_2$  AUF DIE REPARATURKINETIK  $\text{H}_2\text{O}_2$ -INDUZIERTER DNA-STRANGBRÜCHE

Eine Behandlung von HeLa S3-Zellen mit  $0,1 \mu\text{M}$  bis  $5 \mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  verlangsamte die Reparatur der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbrüche nicht (Abbildung 67 A-D). Bei den eingesetzten Konzentrationen von  $0,5 \mu\text{M}$  und  $1 \mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  kam es sogar zu einer beschleunigten DNA-Reparatur nach 10 min bzw. 20 min Reparaturzeit (Abbildung 67 B und C).

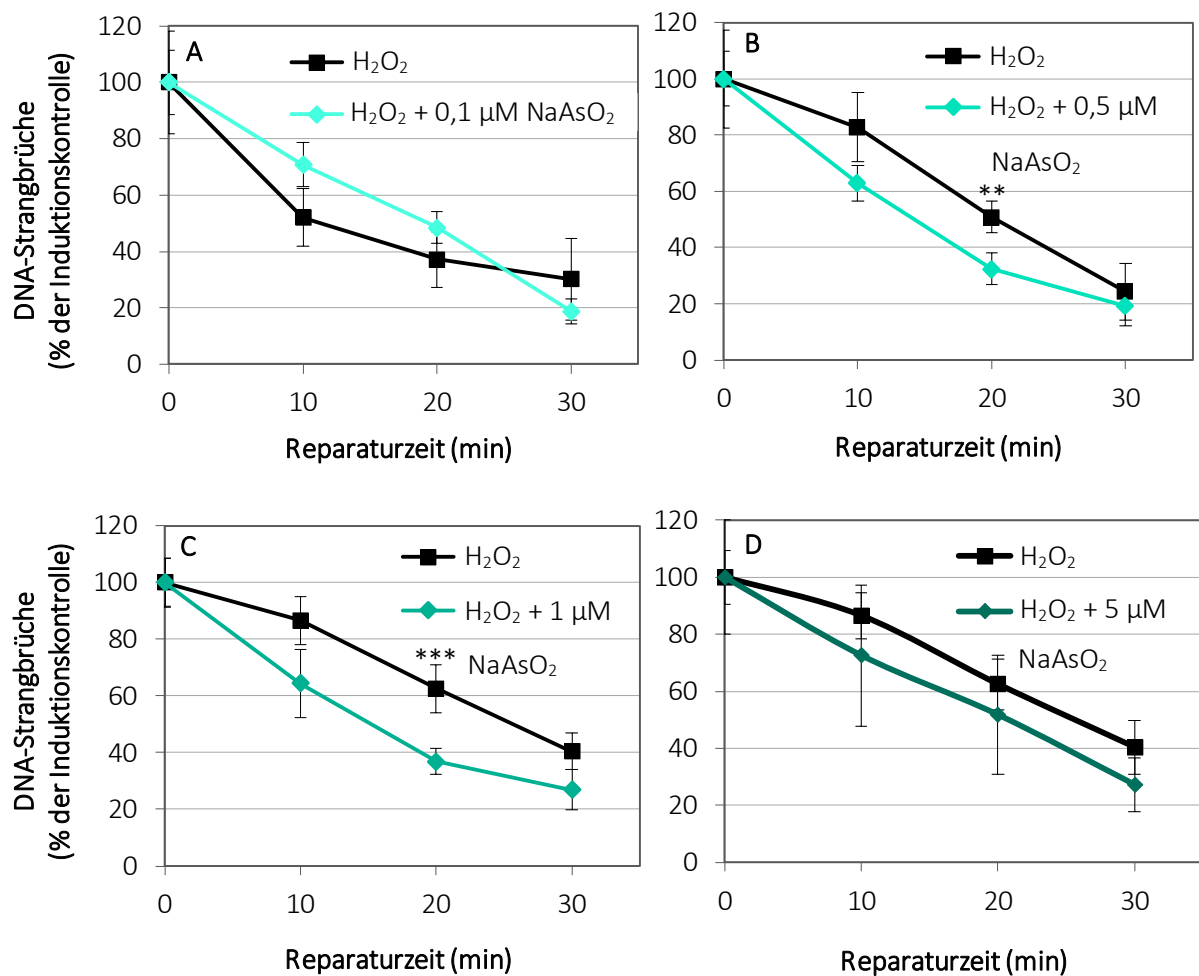


Abbildung 67: Einfluss von  $\text{NaAsO}_2$  auf die Reparatur von  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbrüchen in HeLa S3-Zellen. Inkubiert wurde 18 h mit (A)  $0,1 \mu\text{M}$ , (B)  $0,5 \mu\text{M}$ , (C)  $1 \mu\text{M}$  und (D)  $5 \mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$ . Die Schadensinduktion erfolgte mit (A)  $40 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , (B)  $60 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  und (C, D)  $80 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  für 5 min. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von mindestens sechs Werten aus zwei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle mit T-Test (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ).

### 8.7.5. LC-MS/MS

#### HPLC-Bedingungen:

Säule: Hypersil GOLD aQ 150 mm x 2,1 mm, Partikelgröße 3 µm

Ofentemperatur: 30 °C

DAD: Anfangswellenlänge 200 nm

Endwellenlänge 400 nm

Flussrate: 0,4 mL/min

#### Gradientenprogramm HPLC:

Die Auftrennung der Analyten erfolgte für 25 min mit 98,5 % 8 mM NH<sub>4</sub>Ac und 1,5 % Acetonitril. Anschließend wurde 5 min mit 30 % 8 mM NH<sub>4</sub>Ac und 1,5 % Acetonitril gespült und die Säule 10 min mit den Anfangsbedingungen äquilibriert.

#### MS-Bedingungen:

Tabelle 6: MS-Bedingungen.

<b>Source</b>	
Capillary	0,50
Cone (V)	27
Extractor (V)	2
RF lens (V)	0,1
Source temperature (°C)	120
Desolvation temperature (°C)	400
Cone gas flow (L/Hr)	90
Desolvation gas flow (L/Hr)	1000
<b>Analyzer</b>	
LM1 resolution	15
HM 2 resolution	15

Ion energy 1	0,5
Entrance	2
Collision	25
Exit	1
LM 2 resolution	15
HM 2 resolution	15
Ion energy 2	1
Multipller	300

### 8.7.6. GENEXPRESSION

#### 8.7.6.1. NAMEN DER CODIERTEN PROTEINE DER AUSGEWÄHLTEN GENE

Es wurden folgende Gene untersucht:

Tabelle 7: Übersicht der untersuchten Gene.

Gen	codiertes Protein
<i>ABCB1</i>	<i>multidrug resistance protein 1 (MDR1)</i>
<i>ABCC1</i>	<i>multidrug resistance associated protein 1 (MRR1)</i>
<i>ACTB</i>	<i>B-actin (ACTB)</i>
<i>ADH1B</i>	<i>alcohol dehydrogenase subunit beta (ADH)</i>
<i>ALDH1A1</i>	<i>aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1)</i>
<i>APAF1</i>	<i>apoptotic protease activating factor (APAF1)</i>
<i>APEX1</i>	<i>apurinic-apyrimidinic endonuclease 1 (APEX1/Ref-1)</i>
<i>ATM</i>	<i>ataxia telangiectasia mutated (ATM)</i>
<i>ATR</i>	<i>ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR)</i>
<i>AXIN2</i>	<i>axin 2 (AXIN2)</i>

---

<i>B2M</i>	<i>beta-2-microglobin (B2M)</i>
<i>BAX</i>	<i>bcl2-associated x protein (bax)</i>
<i>BBC3</i>	<i>p53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA)</i>
<i>BCL2</i>	<i>b-cell cll/lymphoma 2 (bcl-2)</i>
<i>BCL2L1</i>	<i>bcl2-like 1 (bcl-xL)</i>
<i>BRCA1</i>	<i>breast cancer 1, early onset (BRCA1)</i>
<i>BRCA2</i>	<i>breast cancer 2, early onset (BRCA2)</i>
<i>BTRC</i>	<i>transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase, beta (<math>\beta</math>-TrCP)</i>
<i>CAT</i>	<i>catalase (CAT)</i>
<i>CCND1</i>	<i>cyclin D1 (CCND1)</i>
<i>CDKN1A</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)</i>
<i>CDKN1B</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27)</i>
<i>CDKN2B</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15)</i>
<i>CYP1A1</i>	<i>cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 (CYP1A1)</i>
<i>DDB1</i>	<i>damage-specific DNA binding protein 1 (DDB1)</i>
<i>DDB2</i>	<i>damage-specific DNA binding protein 2 (DDB2)</i>
<i>DDIT3</i>	<i>growth arrest and DNA damage-inducible protein (GADD153)</i>
<i>E2F1</i>	<i>E2F transcription factor 1 (E2F1)</i>
<i>EGFR</i>	<i>epidermal growth factor receptor (EGFR)</i>

---

<i>EPHX1</i>	<i>epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic) (EPHX1)</i>
<i>ERCC1</i>	<i>excision repair cross- complementation group 1 (ERCC1)</i>
<i>ERCC2</i>	<i>excision repair cross- complementation group 2 (XPD)</i>
<i>ERCC4</i>	<i>excision repair cross- complementation group 4 (XPF)</i>
<i>ERCC5</i>	<i>excision repair cross- complementation group 5 (XPG)</i>
<i>FTH1</i>	<i>ferritin, heavy polypeptide 1 (FTH1)</i>
<i>G6PD</i>	<i>glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)</i>
<i>GADD45A</i>	<i>growth arrest and DNA-damage- inducible, alpha (GADD45A)</i>
<i>GAPDH</i>	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)</i>
<i>GCLC</i>	<i>glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit (GCL)</i>
<i>GPX1</i>	<i>glutathione peroxidase 1 (GPX1)</i>
<i>GPX2</i>	<i>glutathione peroxidase 2 (GPX2)</i>
<i>GSR</i>	<i>glutathione reductase (GSR)</i>
<i>GSTP1</i>	<i>glutathione S-transferase pi 1 (GSTP1)</i>
<i>GUSB</i>	<i>glucuronidase, beta (GUSB)</i>
<i>HMOX1</i>	<i>heme oxygenase (decycling) 1 (HO1)</i>
<i>HPRT1</i>	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)</i>
<i>HSPA1A</i>	<i>heat shock 70kDa protein 1A (hsp70)</i>

---

<i>IL8</i>	<i>interleukin 8 (IL8)</i>
<i>JUN</i>	<i>jun proto-oncogene (c-jun)</i>
<i>KEAP1</i>	<i>kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)</i>
<i>LIG1</i>	<i>ligase I, DNA, ATP-dependent (LIG1)</i>
<i>LIG3</i>	<i>ligase III, DNA, ATP-dependent (LIG3)</i>
<i>MAP3K5</i>	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 (MAP3K5/ASK1)</i>
<i>MDM2</i>	<i>Mouse double minute 2 homolog proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase (Mdm2)</i>
<i>MGMT</i>	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)</i>
<i>MLH1</i>	<i>mutL homolog 1 (MLH1)</i>
<i>MSH2</i>	<i>mutS homolog 2 (MSH2)</i>
<i>MT1X</i>	<i>metallothionein 1X (MT1X)</i>
<i>MT2A</i>	<i>metallothionein 2A (MT2A)</i>
<i>MYC</i>	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (c-myc)</i>
<i>NAT1</i>	<i>N-acetyltransferase 1 (arylamine N- acetyltransferase) (NAT1)</i>
<i>NFE2L2</i>	<i>nuclear factor, erythroid 2-like 2 (Nrf2)</i>
<i>NFKB1</i>	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B- cells 1 (p50/p105)</i>
<i>NFKB2</i>	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B- cells 2 (p49/p100)</i>

---

<i>NFKBIA</i>	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (IKBA)</i>
<i>NQO1</i>	<i>NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (NQO1)</i>
<i>OGG1</i>	<i>8-oxoguanine DNA glycosylase (hOGG1)</i>
<i>PARP1</i>	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1)</i>
<i>PCNA</i>	<i>proliferating cell nuclear antigen (PCNA)</i>
<i>PLK3</i>	<i>polo-like kinase 3 (PLK3)</i>
<i>PMAIP1</i>	<i>phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (Noxa)</i>
<i>POLB</i>	<i>polymerase (DNA directed), beta (POLB)</i>
<i>POLD1</i>	<i>polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit (POLD1)</i>
<i>PPM1D</i>	<i>protein phosphatase, mg2+/Mn2+ dependent, 1D (PPM1D)</i>
<i>PRDX1</i>	<i>peroxiredoxin 1 (Prx1)</i>
<i>RAD50</i>	<i>RAD50 homolog (S. cerevisiae) (RAD50)</i>
<i>RAD51</i>	<i>RAD51 recombinase (RAD51)</i>
<i>RRM2B</i>	<i>ribonucleotide reductase M2B (TP53 inducible) (p53R2)</i>
<i>SEPP1</i>	<i>selenoprotein P, plasma, 1 (SEPP1)</i>
<i>SIRT2</i>	<i>sirtuin 2 (SIRT2)</i>
<i>SLC30A1</i>	<i>solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1 (ZnT1)</i>
<i>SOD1</i>	<i>superoxide dismutase 1, soluble (SOD1)</i>

---

<i>SOD2</i>	<i>superoxide dismutase 2, mitochondrial (SOD2/MnSOD)</i>
<i>SULT1A</i>	<i>sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1 (SULT1A1)</i>
<i>TFRC</i>	<i>transferrin receptor (TFR)</i>
<i>TNFRSF10B</i>	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b (DR5)</i>
<i>TP53</i>	<i>tumor protein p53 (p53)</i>
<i>TXN</i>	<i>thioredoxin (Txr)</i>
<i>TXNRD1</i>	<i>thioredoxin reductase 1 (TxrR)</i>
<i>UGT1A1</i>	<i>UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1 (UGT1A1)</i>
<i>VEGFA</i>	<i>vascular endothelial growth factor A (VEGFA)</i>
<i>XIAP</i>	<i>X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)</i>
<i>XPA</i>	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group A (XPA)</i>
<i>XPC</i>	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group C (XPC)</i>
<i>XRCC5</i>	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (XRCC5)</i>



8.7.6.2. ERGÄNZENDE GENEXPRESSIONSDATEN ZU  $ZnCl_2$  UND TPEN

Hinsichtlich der Gene, die für die Faktoren der (oxidativen) Schadensantwort codieren, wurden durch TPEN *HSPA1A* und *MT1X* im Vergleich zur Kontrolle verändert. Eine Überversorgung mit 250  $\mu M$   $ZnCl_2$  führte zu einer veränderten Genexpression von *HMOX1*, *MT1A* sowie *MT2A* (Abbildung 68).

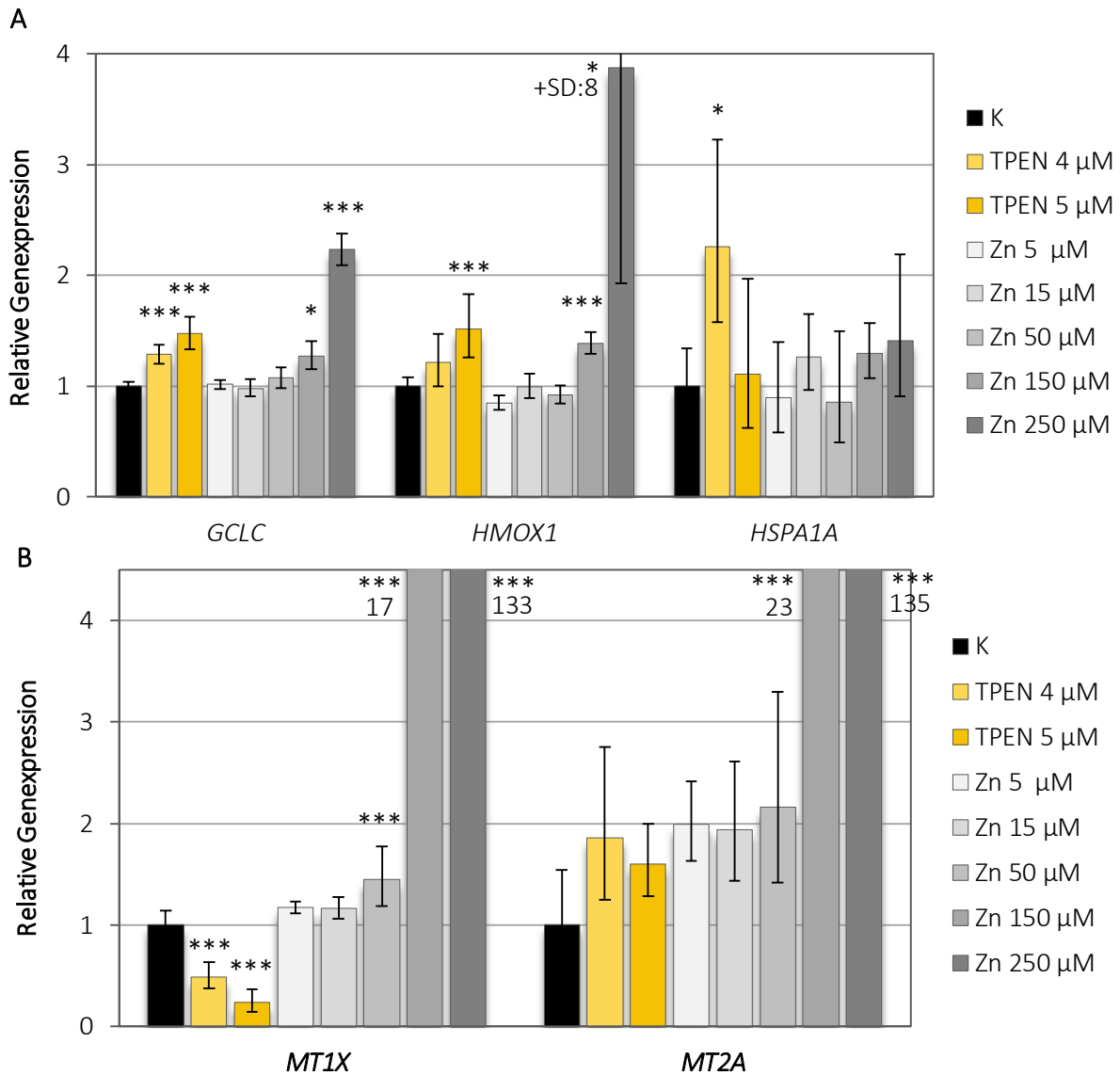


Abbildung 68: Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit  $ZnCl_2$  und TPEN in HeLa S3-Zellen auf die relative Genexpression von Genen, die mit der (oxidativen) Schadensantwort assoziiert sind. Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  SD von sechs Bestimmungen aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Bei den Genen, die mit der Zellzyklusregulation und Proliferation assoziiert sind, wurden durch 5  $\mu M$  TPEN *CDKN1A* und *PPM1D* hochreguliert und *E2F1* und *MYC* herunterreguliert. Eine

Zinkübersversorgung mit 250  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  führte zur Hochregulierung des Gens *CDKN1A* (Abbildung 69).

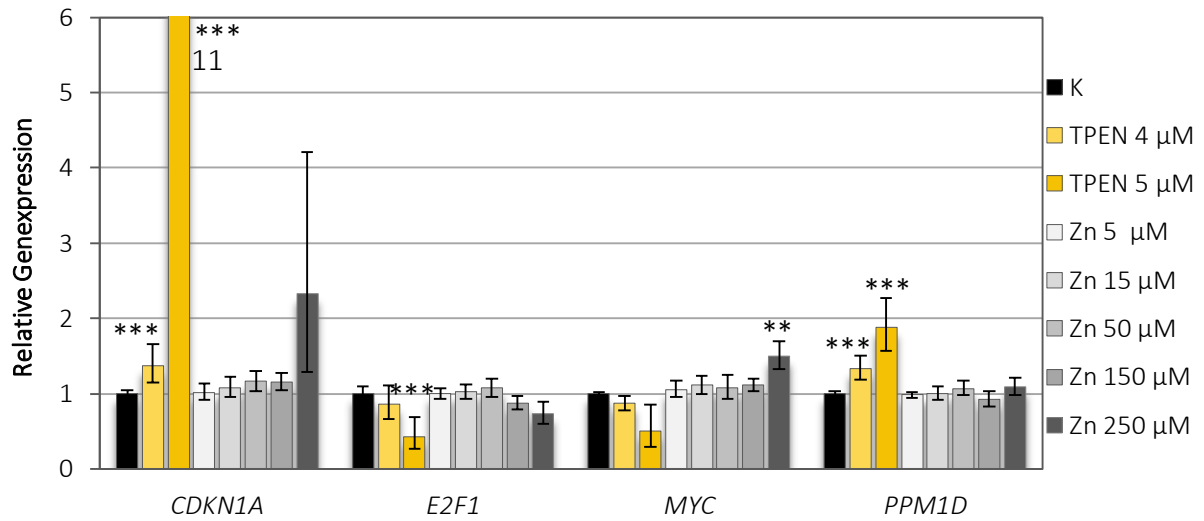


Abbildung 69: Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit  $\text{ZnCl}_2$  und TPEN in HeLa S3-Zellen auf die relative Genexpression von Genen, die mit der Zellzyklusregulation und der Proliferation assoziiert sind. Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  SD von sechs Bestimmungen aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test (\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Die Gene der DNA-Schadensantwort und –Reparatur wurden lediglich durch die höchste Konzentration von TPEN (5  $\mu\text{M}$ ) verändert (Abbildung 70).

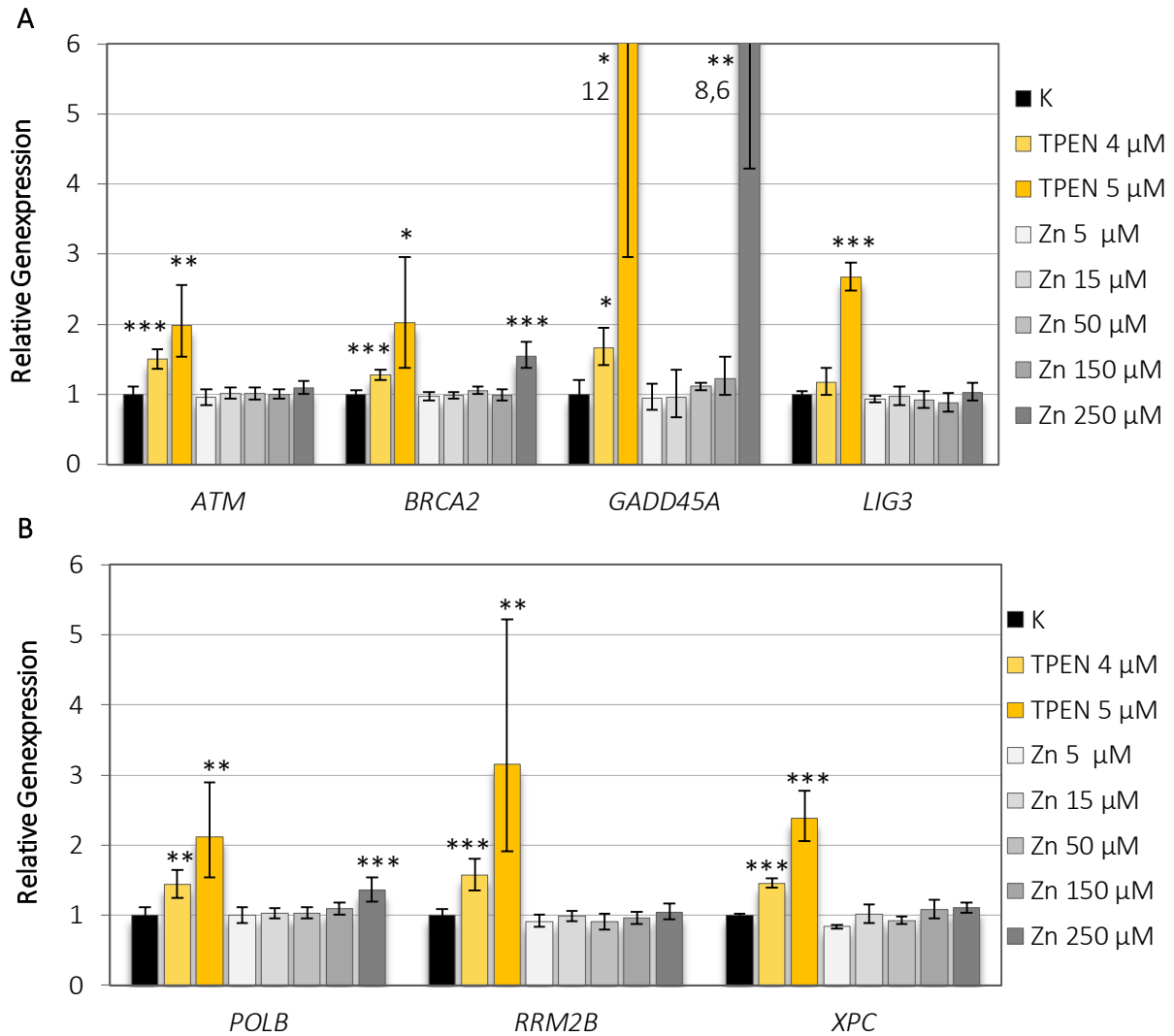


Abbildung 70: Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit  $\text{ZnCl}_2$  und TPEN in HeLa S3-Zellen auf die relative Genexpression von Genen, die mit der DNA-Schadensantwort und -Reparatur assoziiert sind. Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  SD von sechs Bestimmungen aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Im Falle einer TPEN-Behandlung wurden die Gene *APAF1*, *BAX*, *BCL2*, *PMAIP1* sowie *TNFRSF10B* in ihrer Expression im proapoptotischen Sinne verändert. Im Gegensatz dazu wurde die Expression der antiapoptotischen Gene *BCL2L1* und *XIAP* verdoppelt. Die Zinkübersorgung mit 250  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  führte zu einer Hochregulierung der Gene *BCL2L1* und *PMAIP1* (Abbildung 71).

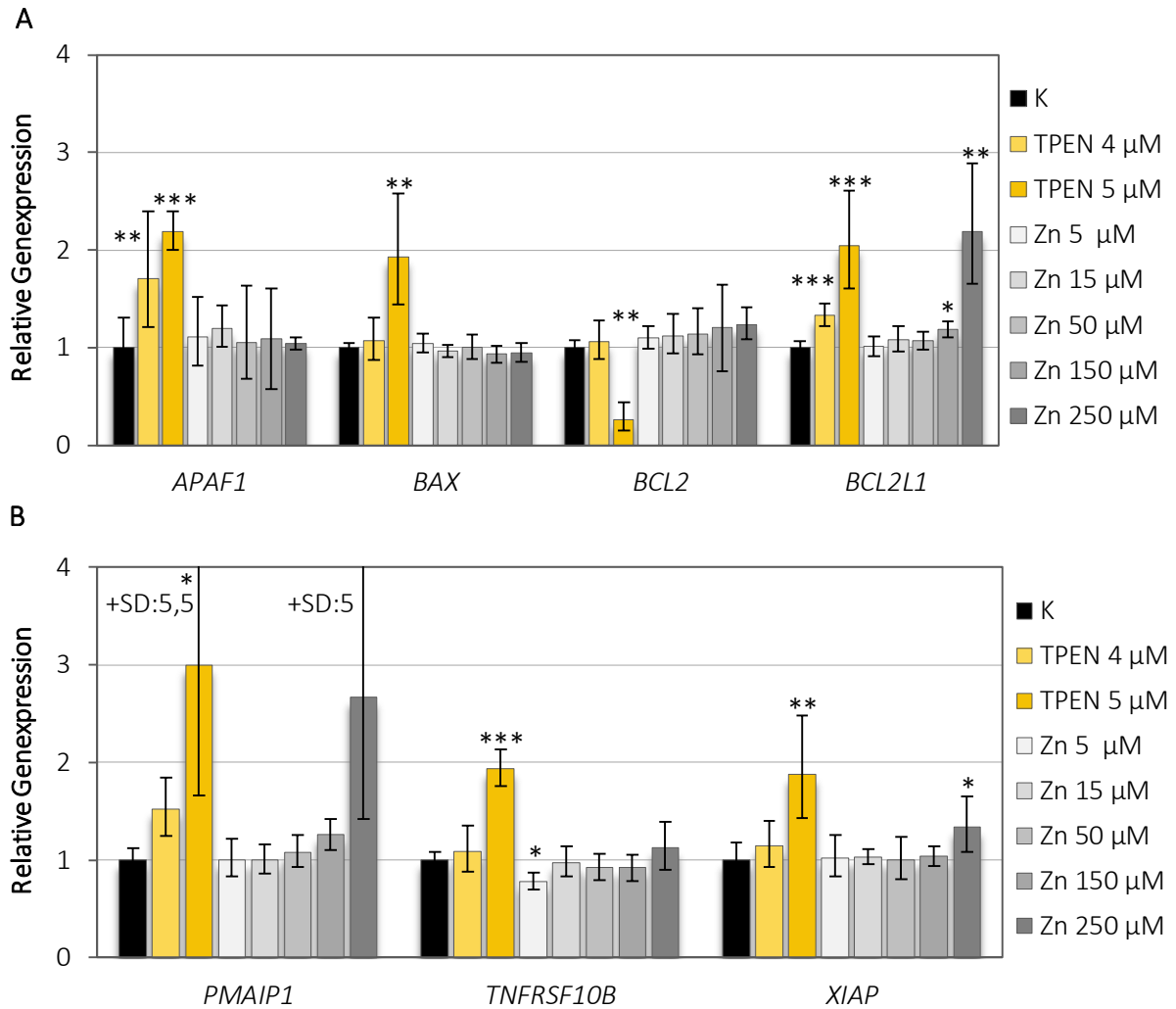


Abbildung 71: Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit  $\text{ZnCl}_2$  und TPEN in HeLa S3-Zellen auf die relative Genexpression von Genen, die mit der Regulation der Apoptose assoziiert sind. Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  SD von sechs Bestimmungen aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

## 9. PUBLIKATIONSLISTE

### Publikationen in Vorbereitung

- N. Wedler, B. Köberle, B. Koch, A.-L. Miller, G. Nemecek, J. Podlech, A. Hartwig  
*“Mutagenicity and genotoxicity of Alternaria mycotoxins in mammalian cells”*
- B. M. Strauch, N. Wedler, T. Matthäus, A. Hartwig *“TPEN - a specific chelator for zinc? The zinc chelator TPEN affects not only cellular zinc but also copper status”*
- N. Wedler, B. Koch, L. Stark, M. Kunzmann, A. Hartwig *“Impact of PJ-34, Co(II) and As(III) on poly(ADP-ribosylation) and genomic stability”*
- N. Wedler, B. M. Strauch, T. Matthäus, A. Hartwig *“Impact of the cellular zinc status on PARP activity”*

### Beiträge auf Fachtagungen

- 44. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Karlsruhe 14.-16. September 2015  
Lebensmittelchemische Gesellschaft, Fachgruppe der GDCh  
*„Genotoxizität von Alternaria-Toxinen“*  
N. Wedler, S. Fleck, M. Metzler, A. L. Piberger, A. Hartwig
- 38<sup>th</sup> Mycotoxin Workshop, Berlin 02.05.-04.05.2016  
Society of Mycotoxin Research  
*“Mechanism of the genotoxic potential of Alternaria mycotoxins“*  
N. Wedler, S. Fleck, M. Metzler, A. L. Piberger, A. Hartwig
- 39<sup>th</sup> Mycotoxin Workshop, Bydgoszcz, Polen 18.06.- 21.06.2017  
Society of Mycotoxin Research  
*“Mutagenicity and genotoxicity of Alternaria toxins in mammalian cells”*  
N. Wedler, B. Koch, A. L. Miller, G. Nemecek, J. Podlech, A. Hartwig
- German-French DNA-Repair Meeting, Köln 21.09.-23.09.2017  
Deutsche Gesellschaft für DNA-Reparaturforschung  
*“Impact of PJ-34, arsenite and cobalt chloride on poly(ADP-ribosylation) and DNA single-strand break repair”*  
N. Wedler, A. Mangerich, L. Stark, A. Hartwig

## 10. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei all denen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt und begleitet haben.

Allen voran gilt mein Dank meiner Doktormutter Prof. Dr. Andrea Hartwig für die Möglichkeit meine Arbeit unter ihrer Anleitung anzufertigen. Du hast mir durch dein großes Vertrauen stets wissenschaftlichen Freiraum gelassen und mich auch immer unterstützt.

Für die finanzielle Unterstützung während der Promotionszeit in Karlsruhe bedanke ich mich bei der Landesgraduiertenförderung Baden-Württemberg.

Auch meinem Diplomanden Lukas Stark, meinen Diplomandinnen Ay-Lin Miller und Mareike Kunzmann sowie meiner Masterandin Tizia Matthäus danke ich aufrichtig für ihre Mühe und ihren Fleiß, mit der sie für mich gearbeitet haben, nicht nur während der Abschlussarbeit, sondern auch in ihrer folgenden Zeit als Hilfwissenschaftler.

Außerdem möchte ich dem ganzen AK Hartwig für die gute Zusammenarbeit danken. Das betrifft sowohl Matze, Sarah, Paul, Elena, Doro, Vivien, Wera und Rebecca als auch die Ehemaligen Kollegen Barbara, Betty, Chris, Sarah, Liza und Elisa. Ein besonderer Dank gilt meinem Bürokollegen Matze, der mir in den drei Jahren das Fränkeln näherbrachte und, was vor allem gegen Ende der Promotion wichtig wurde, stets für guten Kaffee sorgte. Ein großes Dankeschön geht außerdem an PD Dr. Beate Köberle für ihre herausragende und freundliche Unterstützung bei Fragen sowie das Korrekturlesen dieser Arbeit. Vielen Dank auch an Sonya für die großartige administrative Unterstützung während meiner Promotion.

Auch beim Arbeitskreis von Prof. Dr. Bunzel möchte ich mich für die herzliche Aufnahme und die Kollegialität bedanken sowie die Bereitstellung der LC-MS. Ich danke Martin für seine große Hilfsbereitschaft bei der Bedienung der LC-MS und seine Geduld, wenn die Messung mal wieder nicht so funktionierte wie sie sollte.

Ich bedanke mich besonders bei meiner Familie für die Unterstützung während der ganzen Jahre meines Studiums und der Promotion. Außerdem danke ich C-Bob für seine positive und lustige Art, mit der er mich immer aufheitern konnte.

Zudem möchte ich mich bei meinen ehemaligen Kommilitonen und Freunden für die schöne Zeit in Karlsruhe bedanken. Ihr habt für mich die Studien- und Promotionszeit unvergesslich gemacht.

Der größte Dank gilt meinem Mann Nils, der mir all die Jahre den Rücken freigehalten hat, stets ein offenes Ohr für mich hatte und immer verständnisvoll war. Ohne seine Zuversicht und die guten Ratschläge wäre ich sicherlich nicht dort gelandet, wo ich jetzt stehe. Deshalb habe ich meine Dissertation ihm gewidmet.