

# **Einfluss von Arsen auf die DNA-Doppelstrangbruchreparatur und damit assoziierte zelluläre Signalwege**

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

Rebecca Katharina Niemand

aus

Rheinstetten

KIT-Dekan: Prof. Dr. Reinhard Fischer

1. Referentin: Prof. Dr. Andrea Hartwig

2. Referent: Prof. Dr. Mikko Bunzel

Tag der mündlichen Prüfung: 05.02.2018



## **Eidesstattliche Versicherung**

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 08.01.2017

Rebecca Katharina Niemand



# Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	4
2.1	Arsen .....	4
2.1.1	Vorkommen und Verwendung von Arsen.....	4
2.1.2	Arsenaufnahme und -metabolismus.....	5
2.1.3	Toxikologie von Arsen.....	6
2.2	DNA-Reparaturmechanismen.....	11
2.2.1	Bedeutung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur .....	12
2.2.2	Induktion, Erkennung und Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen.....	13
2.2.3	Nicht-homologes <i>end-joining</i> .....	16
2.2.4	Homologe Rekombination .....	17
2.2.5	Einfluss von Arsen auf DNA-Reparaturmechanismen.....	19
2.2.5.1	Einfluss von Arsen auf die DNA-Einzelstrangbruchreparatur .....	19
2.2.5.2	Einfluss von Arsen auf die Basen-Exzisionsreparatur .....	21
2.2.5.3	Einfluss von Arsen auf die Nukleotid-Exzisionsreparatur.....	22
2.2.5.4	Einfluss von Arsen auf die Mismatch-Reparatur .....	24
2.2.5.5	Einfluss von Arsen auf die DNA-Doppelstrangbruchreparatur .....	25
3	Fragestellung .....	27
4	Material und Methoden .....	29
4.1	Material .....	29
4.2	Methoden .....	29
4.2.1	Verwendete Zelllinien .....	29
4.2.2	Kultivierung der Zelllinien.....	29
4.2.3	Kryokonservierung und Inkulturnahme der Zellen.....	30
4.2.4	Inkubation der HeLa S3-Zellen.....	30
4.2.5	Inkubation der TK6-Zellen.....	31
4.2.6	Bestrahlung der Zellen .....	31
4.2.7	Bestimmung der zellulären Aufnahme.....	31
4.2.7.1	Versuchsansatz.....	31
4.2.7.2	Aufschluss der Zellen.....	32
4.2.7.3	Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie.....	32
4.2.8	Zytotoxizitätsuntersuchungen in HeLa S3-Zellen .....	33
4.2.9	Pulsfeld-Gelelektrophorese .....	34
4.2.9.1	Versuchsansatz.....	34

4.2.9.2	Probenaufarbeitung .....	34
4.2.9.3	Gellauf und Auswertung.....	34
4.2.10	Immunfluoreszenzfärbung .....	35
4.2.10.1	Versuchsansatz.....	35
4.2.10.2	Fixierung und Färbung .....	35
4.2.10.3	Datenanalyse.....	36
4.2.11	Viabilitätsmessung und Zellzyklusphasenverteilung mittels Durchflusszytometer.....	37
4.2.11.1	Versuchsansatz.....	38
4.2.11.2	Probenaufarbeitung.....	39
4.2.11.3	Analyse am Durchflusszytometer.....	39
4.2.12	Genexpressionsanalyse mittels <i>High-Throughput RT-qPCR</i> .....	39
4.2.12.1	Versuchsansatz.....	40
4.2.12.2	RNA-Isolation.....	40
4.2.12.3	Synthese der cDNA.....	41
4.2.12.4	Preamplifikation und Exonukleaseverdau .....	41
4.2.12.5	Primer- und Probenvorbereitung.....	42
4.2.12.6	96x96 Dynamic Array IFC qPCR Analyse.....	42
4.2.12.7	Datenanalyse und Auswertung .....	42
4.2.13	Mikrokerntest am Durchflusszytometer.....	43
4.2.13.1	Versuchsansatz.....	43
4.2.13.2	Probenaufarbeitung.....	44
4.2.13.3	Analyse am Durchflusszytometer.....	45
4.2.14	PIG-A-Genmutationstest .....	45
4.2.14.1	<i>Relative increase in cell counts</i> .....	45
4.2.14.2	Abreicherung der TK6-Zellen .....	46
4.2.14.3	Versuchsansatz.....	46
4.2.14.4	Probenaufarbeitung.....	47
4.2.14.5	Analyse am Durchflusszytometer.....	47
4.2.15	Statistik .....	48
5	Ergebnisse und Diskussion.....	49
5.1	Zelluläre Aufnahme von Arsenit in HeLa S3-Zellen.....	49
5.2	Zytotoxizität von Arsenit in HeLa S3-Zellen.....	49
5.3	Einfluss von Arsenit auf die DNA-Doppelstrangbruchreparatur .....	52
5.3.1	Einfluss von Arsenit auf die Schadenserkennung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur .....	55

5.3.2.1	Einfluss von Arsenit auf phospho-ATM .....	55
5.3.1.2	Einfluss von Arsenit auf $\gamma$ H2AX .....	57
5.3.1.3	Einfluss von Arsenit auf 53BP1 .....	58
5.6.2	Einfluss von Arsenit auf das nicht-homologe <i>end-joining</i> .....	60
5.6.3	Einfluss von Arsenit auf die homologe Rekombination.....	63
5.6.3.1	Einfluss von Arsenit auf Rad51.....	63
5.6.3.2	Einfluss von Arsenit auf BRCA1 .....	67
5.6.3.3	Einfluss von Arsenit auf Rad54.....	70
5.4	Einfluss von Arsenit auf die Zellzyklusphasenverteilung.....	72
5.5	Einfluss von Arsenit auf die Viabilität .....	76
5.6	Einfluss von Arsenit auf die Genexpression.....	77
5.6.1	Einfluss von Arsenit auf das Genexpressionsmuster der DNA-Schadensantwort und -Reparatur.....	80
5.6.2	Einfluss von Arsenit auf das Expressionsmuster Zellzyklus-zugehöriger Gene .....	84
5.6.3	Einfluss von Arsenit auf das Expressionsmuster Apoptose-assoziiierter Gene.....	86
5.6.4	Einfluss von Arsenit auf das Genexpressionsmuster der oxidativen Stressantwort.....	86
5.7	Einfluss von Arsenit auf die genomische Stabilität.....	87
5.7.1	Einfluss von Arsenit auf die Induktion von Mikrokernen .....	88
5.7.2	Einfluss von Arsenit auf das Auftreten von Genmutationen .....	90
5.7.2.1	Einfluss von Arsenit auf den „ <i>Relative increase in cell counts</i> “ .....	91
5.7.2.2	Untersuchung des Einflusses von Arsenit auf das Auftreten von Genmutationen mittels PIG-A-Genmutationstest .....	92
6.	Zusammenfassende Diskussion .....	94
7	Literaturverzeichnis .....	103
8	Anhang.....	115
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	115
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	121
8.3	Tabellenverzeichnis .....	124
8.4	Verwendete Chemikalien und Kits .....	125
8.5	Antikörper, Puffer und Lösungen .....	128
8.5.1	Antikörper.....	128
8.5.2	Lösungen und Puffer.....	128
8.5.2.1	Zellkultur.....	128
8.5.2.2	Aufnahmeuntersuchung.....	129

8.5.2.3	Viabilitätsuntersuchung.....	129
8.5.2.4	Pulsfeldgelelektrophorese.....	129
8.5.2.5	Mikrokerntest .....	130
8.5.2.6	PIG-A-Genmutationstest.....	130
8.6	Verbrauchsmaterialien .....	131
8.7	Verwendete Geräte .....	133
8.8	Verwendete Software.....	134
8.9	Sequenzen der verwendeten Primer.....	135
8.10	Ergänzende Daten.....	141
8.10.1	Ergänzende Daten zur zellulären Aufnahme von Arsenit in HeLa S3-Zellen .....	141
8.10.2	Ergänzende Daten der Pulsfeld-Gelelektrophorese .....	142
8.10.3	Ergänzende Daten der Immunfluoreszenzfärbung .....	142
8.10.4	Ergänzende Daten zum Einfluss von Arsenit auf die Viabilität von HeLa S3-Zellen .....	143
8.10.5	Ergänzende Daten zum Einfluss von Arsenit auf das Genexpressionsmuster von HeLa S3-Zellen.....	143
8.10.2	Ergänzende Daten zum Einfluss von Arsenit auf den „ <i>Relative increase in cell counts</i> “ .....	146
9	Publikationsliste .....	147
10	Danksagung.....	150





## 1 Zusammenfassung

Arsen ist eine ubiquitär vorkommende Kontaminante. Weltweit sind daher 100 Millionen Menschen einer erhöhten Exposition durch verschiedene Arsenverbindungen über das Trinkwasser sowie Lebensmittel ausgesetzt. Diese Exposition gegenüber Arsen wird mit zahlreichen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Hierzu zählen unter anderem „*black foot disease*“, Arteriosklerose sowie das vermehrte Auftreten von Haut-, Lungen- und Blasenmolemen. Vor allem anorganische Arsenverbindungen, wie beispielsweise Natriumarsenit, weisen dabei ein hohes toxisches Potential auf. Es konnte gezeigt werden, dass arseninduzierten Schäden bereits in umweltrelevanten Konzentrationen auftreten können. Primär wird davon ausgegangen, dass die Induktion von oxidativem Stress und die Hemmung von DNA-Reparaturprozessen eine entscheidende Rolle in der arseninduzierten Kanzerogenese spielen. Bezüglich der DNA-Doppelstrangbruchreparatur gibt es bis dato jedoch nur wenig Untersuchungen, inwieweit Arsen diese beeinflusst.

Durch Untersuchung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Arsen selbst keine Doppelstrangbrüche induziert, jedoch den Reparaturvorgang strahlungsinduzierter DNA-Doppelstrangbrüche inhibiert. Pulsfeld-Gelelektrophorese visualisierte ein vermehrtes Auftreten von kleineren DNA-Fragmenten im Agarosegel infolge einer Arseninkubation. Dementgegen konnte, nach Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen, durch die Betrachtung von phospho-ATM-Foci (*ataxia-telangiectasia mutated*),  $\gamma$ H2AX-Foci sowie 53BP1-Foci (*p53 binding protein 1*) kein Einfluss auf die Schadenserkennung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur beobachtet werden, was auf eine Inhibition nach der Schadenserkennung schließen ließ. Zur detaillierten Betrachtung der beiden Hauptreparaturmechanismen von DNA-Doppelstrangbrüchen wurden Markerproteine ausgewählt. Hierbei standen DNA-PKcs (katalytische Untereinheit der DNA-abhängige Proteinkinase) für das NHEJ (nicht homologes *end-joining*) sowie Rad51 für die HR (homologe Rekombination) im Vordergrund. Es ergab sich eine Repression der Foci-Dissoziation von Rad51, woraufhin nachfolgend BRCA1 (*breast cancer 1*) sowie Rad54 als potentielle Targetproteine von Arsen untersucht wurden. Hieraus resultierte in beiden Fällen ein Einfluss auf die Assoziation der Proteine an induzierte DNA-Doppelstrangbrüche.

Die Untersuchung des Zellzyklus verdeutlichte einen konzentrationsabhängig eintretenden G<sub>2</sub>/M-Arrest durch Arsen, wobei bei hohen Dosen (ab 15  $\mu$ M NaAsO<sub>2</sub>) der Zellzyklusstopp

aufgehoben wurde. Eine kombinierte Behandlung mit Arsen und Bestrahlung wurde zusätzlich untersucht, da die Bestrahlung zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen dient. In Kombination mit Bestrahlung konnte der fehlende Zellzyklusstopp bei geringeren Konzentrationen (ab 10  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$ ) beobachtet werden. Eine Untersuchung der Viabilität zeigte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der apoptotischen Vorgänge in Anwesenheit von Arsen. Durch eine zusätzliche Bestrahlung zeigte sich kein vermehrtes Auftreten apoptotischer Vorgänge.

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Arsen auf die Genexpression in HeLa S3-Zellen untersucht. Dabei wurden 95 Gene betrachtet, die hinsichtlich der DNA-Schadensantwort eine bedeutende Rolle spielen. Diese können den Signalwegen Apoptose, Zellzyklusregulation und Proliferation, oxidativer Stressantwort und DNA-Reparatur zugeordnet werden. Zusätzlich wurden wichtige Transkriptionsfaktoren, die maßgeblich an der Regulation der untersuchten Gene beteiligt sind, berücksichtigt. Hierbei wurde ebenfalls der zusätzliche Einfluss von Röntgenstrahlung zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen in Kombination mit Arsen betrachtet. Eine Behandlung der Zellen mit Arsen führte zu zahlreichen Veränderungen des Genexpressionsmusters, wobei eine zusätzliche Bestrahlung keine additiven Effekte aufwies.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse auf eine Herabsetzung der genomischen Stabilität schließen. Strahlung alleine induziert DNA-Doppelstrangbrüche, die durch die NHEJ und die HR repariert wurden, wohingegen in Anwesenheit von Arsen die HR, als fehlerfreier DNA-Doppelstrangbruchreparaturmechanismus, inhibiert wurde. Ferner wurde der Zellzyklusstopp bei hohen Arsenkonzentrationen aufgehoben und viele stressinduzierte Gene in Anwesenheit von Arsen vermehrt exprimiert. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Arsen auf die genomische Stabilität mittels spezifischer Analysen näher betrachtet. Anhand der Mikrokernuntersuchung konnte ein klastogener Effekt von Arsen nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte eine Bestrahlung in Kombination mit Arsenbehandlung ein erhöhtes Aufkommen von Genmutationen.

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Arsen einen nachteiligen Effekt auf die genomische Stabilität in Kombination mit Strahlung besitzt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Arsen spezifisch die HR inhibiert, während das NHEJ nicht beeinträchtigt wird. Der fehlerfreie Reparaturweg kommt zum Erliegen, wodurch die durch Röntgenstrahlung induzierten DNA-Doppelstrangbrüche ausschließlich durch den

fehlerbehafteten Reparaturweg (NHEJ) repariert werden können. Die Inhibierung der DNA-Reparatur in Kombination mit der Aufhebung des Zellzyklusarrests verstärkt die Brisanz der Wirkungsweise von Arsen.

## 2 Einleitung

Zum thematischen Verständnis der vorliegenden Arbeit werden in diesem Kapitel die toxikologischen Grundlagen der verwendeten Substanz Arsen erläutert. Zur besseren Einordnung der erhaltenen Ergebnisse wird die DNA-Doppelstrangbruchreparatur detailliert dargestellt. Ferner wird spezifisch auf den aktuell bekannten Einfluss von Arsen auf die DNA-Reparatur eingegangen.

### 2.1 Arsen

#### 2.1.1 Vorkommen und Verwendung von Arsen

Das Element Arsen ist ein Halbmetall und steht mit den biologisch wichtigen Elementen Stickstoff und Phosphor in der 5. Hauptgruppe des Periodensystems. Es besitzt die Ordnungszahl 33. Arsen kommt elementar in der Oxidationsstufe 0 oder aufgrund seiner Valenzelektronenkonfiguration  $s^2p^3$  in Verbindungen in den Oxidationsstufen -3, +3 und +5 vor. Innerhalb der Hauptgruppe nimmt, mit steigender Ordnungszahl, die Stabilität der Oxidationsstufe +3 zu, wohingegen die Stabilität der Oxidationsstufe +5 abnimmt. Anorganische Arsen(III)-Verbindungen besitzen ein starkes toxisches Potential; bereits 0,1 g Arsenik können tödlich sein (IARC, 2012; BfR, 2014a; Riedel und Janiak, 2015). Die thermodynamisch stabilste, aber seltenste Modifikation ist das metallische Arsen (graues Arsen); am häufigsten findet es sich in Form von Arseniden (As(III)) (zusammengefasst in Mandal und Suzuki, 2002; Riedel und Janiak, 2015).

Arsen kommt ubiquitär vor und wird zusätzlich anthropogen in die Umwelt eingetragen. Das Halbmetall wurde hauptsächlich in Pestiziden verarbeitet, diese Verwendung ist jedoch in Deutschland seit 1974 verboten. In der Industrie wird es vielseitig in Legierungen und Halbleitern eingesetzt. Weiterhin dient es als Konservierungsmittel für Holz, wird Futtermitteln zugesetzt oder als Arzneimittel verwendet (PflSchAnwV, 1992; zusammengefasst in Mandal und Suzuki, 2002). Durch die verschiedenen Anwendungsbereiche sowie das natürliche Vorkommen im Boden reichert sich anorganisches Arsen vor allem aufgrund der Löslichkeit im Wasser an. In Deutschland gilt ein Grenzwert von 10  $\mu\text{g}/\text{L}$  Arsen in Trinkwasser (Richtlinie 98/83/EG). Die Einhaltung dieses Grenzwertes im Trinkwasser wird bereits seit 1993 von der *World Health Organisation* (WHO) empfohlen, konnte jedoch bis heute nicht weltweit gewährleistet werden. Vor allem in Ländern mit hohem natürlichem Vorkommen von Arsen im Boden, wie beispielsweise

Taiwan oder Indien, finden sich in der Folge auch hohe Arsenkonzentrationen im Grundwasser (WHO, 1993; WHO, 2011).

Eine Anreicherung von Arsen in Nahrungsmitteln erfolgt meist über das Wasser sowie das natürliche Vorkommen im Boden. Entsprechend des ALARA-Prinzips (*as low as reasonably achievable*) gilt es, die niedrigste, technisch mögliche Arsenkonzentration zu erreichen. Hohe Arsenkonzentrationen finden sich vor allem in Meeresfrüchten sowie in Reis und Reisprodukten (EFSA, 2009). Hierbei besitzen Reis und daraus hergestellte Produkte ein besonderes Gefahrenpotenzial. Während in Meeresfrüchten hauptsächlich organisches Arsen zu finden ist, reichert sich in Reis vorwiegend die anorganische Form an. Die Kultivierung von Reis erfolgt üblicherweise durch Nassanbau, dadurch wird anorganisches Arsen mobilisiert und kann effektiv, analog zu Silizium, aufgenommen werden. Dadurch sind die Reispflanzen ständig hohen Arsenkonzentrationen ausgesetzt. Die Akkumulation von Arsen ist von der Reissorte abhängig. Es konnten Spitzenkonzentrationen von 0,3 mg/kg nachgewiesen werden (Signes-Pastor *et al.*, 2016; zusammengefasst in Azam *et al.*, 2017). Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) empfiehlt eine Höchstmenge von 0,2 mg/kg Arsen in Reis (BfR, 2014b). Aufgrund der Neubewertung von Arsen in Nahrungsmitteln durch die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (*European Food Safety Authority*, EFSA) wurde 2015 die Verordnung (EU) 2015/1006 zur Änderung der Verordnung (EG) 1881/2006 hinsichtlich der Höchstgehalte für anorganisches Arsen in Lebensmitteln erlassen. Verordnung (EU) 2015/1006 setzt einen Grenzwert für Parboiled-Reis und geschälten Reis von 0,25 mg/kg fest. Ferner wird ein Grenzwert von 0,3 mg/kg Arsen in Reiskeksen, Reiswaffeln, Reiskräckern und Reiskuchen vorgegeben. Reis, der für die Herstellung von Lebensmitteln für Säuglinge und Kleinkinder bestimmt ist, darf einen Maximalgehalt von 0,1 mg/kg Arsen nicht überschreiten (EFSA, 2009; EU Nr. 2015/1006).

### **2.1.2 Arsenaufnahme und -metabolismus**

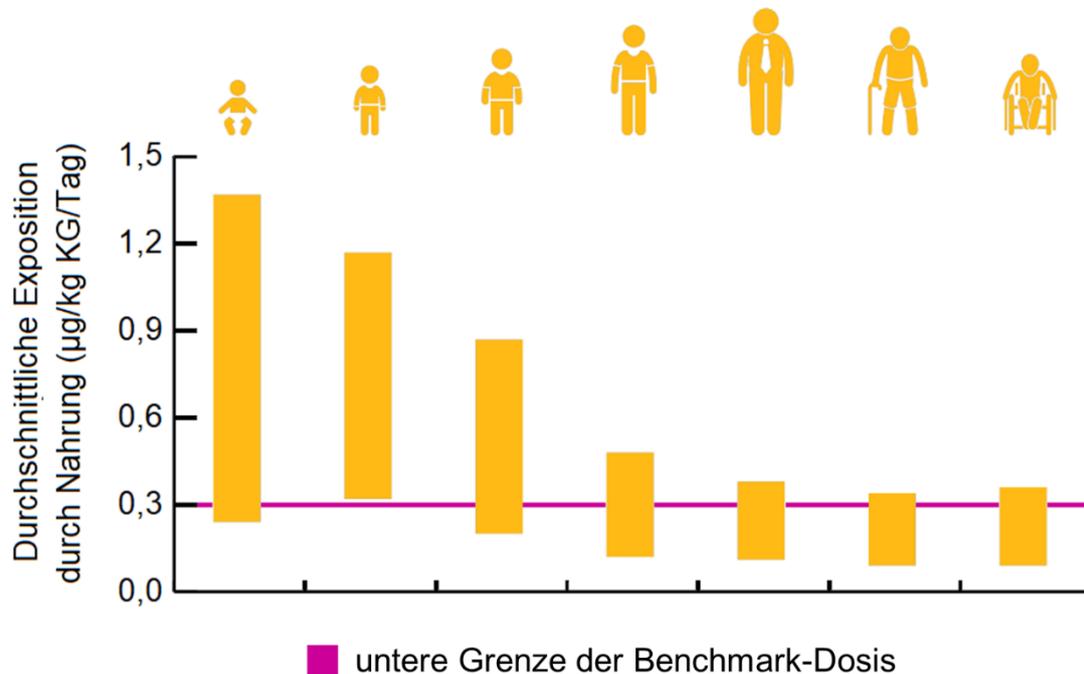
Arsen wird hauptsächlich oral oder inhalativ aufgenommen. Zur inhalativen Aufnahme kommt es vor allem am Arbeitsplatz oder bei Rauchern (WHO, 2010; DFG, 2014). Die Allgemeinbevölkerung nimmt Arsen oral über das Trinkwasser oder die Nahrung auf. Die Resorptionsrate ist dabei abhängig von der Löslichkeit der Arsenverbindung in Wasser. Je löslicher die Verbindung ist, desto besser wird sie aufgenommen; bei wasserlöslichen Verbindungen erfolgt die Resorption nahezu vollständig (ATSDR, 2007).

Die zelluläre Aufnahme erfolgt abhängig vom Oxidationsstatus der Arsenverbindung. Arsenite (As(III)) werden über zahlreiche Transporter aufgenommen. Die wichtigsten Transporter stellen dabei die Aquaglyceroporine sowie die Glukosetransporter dar. Im Gegensatz dazu werden Arsenate (As(V)) über den Phosphattransporter aufgenommen, da sie über eine strukturelle Ähnlichkeit zu Phosphaten verfügen (Calatayud *et al.*, 2012; zusammengefasst in Watanabe und Hirano, 2013).

Nach Aufnahme von anorganischem Arsen aus der Nahrung wird Arsenat (As(V)) schnell zu Arsenit (As(III)) reduziert. Dieser Vorgang erfolgt durch das in der Leber lokalisierte Enzym Arsenat-Reduktase. In den meisten Säugetieren wird Arsenit in der Folge zu Mono- und Dimethylverbindungen methyliert, wobei der Mensch zu den extensiven Methylierern zählt. Die Methylierung erfolgt durch eine Reihe von Oxidations- und Reduktionsreaktionen. Die Ausscheidung des Arsens erfolgt über den Urin, wobei der Metabolit Dimethylarsinsäure (DMA(V)) vermehrt vorkommt (zusammengefasst in Mandal und Suzuki, 2002; Drobna *et al.*, 2009; Sattar *et al.*, 2016).

### 2.1.3 Toxikologie von Arsen

Anorganisches Arsen ist ein Humankarzinogen. Es wurde international durch die Internationale Agentur für Krebsforschung (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) und in Deutschland durch die ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe (MAK-Kommission) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) in die Karzinogenitätskategorie 1 – karzinogen für den Menschen – eingestuft (IARC, 2009; DFG, 2014). Die Toxizität ist abhängig von der Oxidationsstufe sowie dem Expositionsweg und der Art der chemischen Verbindung. Toxikologisch relevant sind vor allem die dreiwertigen, anorganischen Arsenverbindungen. Bei einer Intoxikation mit Arsen kann es sowohl zu akuten als auch chronischen Effekten kommen. Bei akuten Effekten wird zwischen dem paralytischen und dem akuten gastrointestinalen Syndrom unterschieden (DFG, 2002; BfR, 2014a). Das paralytische Syndrom äußert sich durch eine Nervenschädigung sowie einen kardiovaskulären Kollaps. Beim akuten gastrointestinalen Syndrom treten zunächst Erbrechen, Durchfall sowie Schwindel auf, später kann es zu Muskelkrämpfen und Multiorganversagen führen. Chronische Effekte äußern sich zunächst durch Hautveränderungen. Hier treten Störungen der Pigmentierung und Hyperkeratosen der Handflächen und Fußsohlen auf; zudem können Tumoren der Haut auftreten. Chronische Arsenexposition kann darüber hinaus zu Lungen- oder Blasen-tumoren führen.



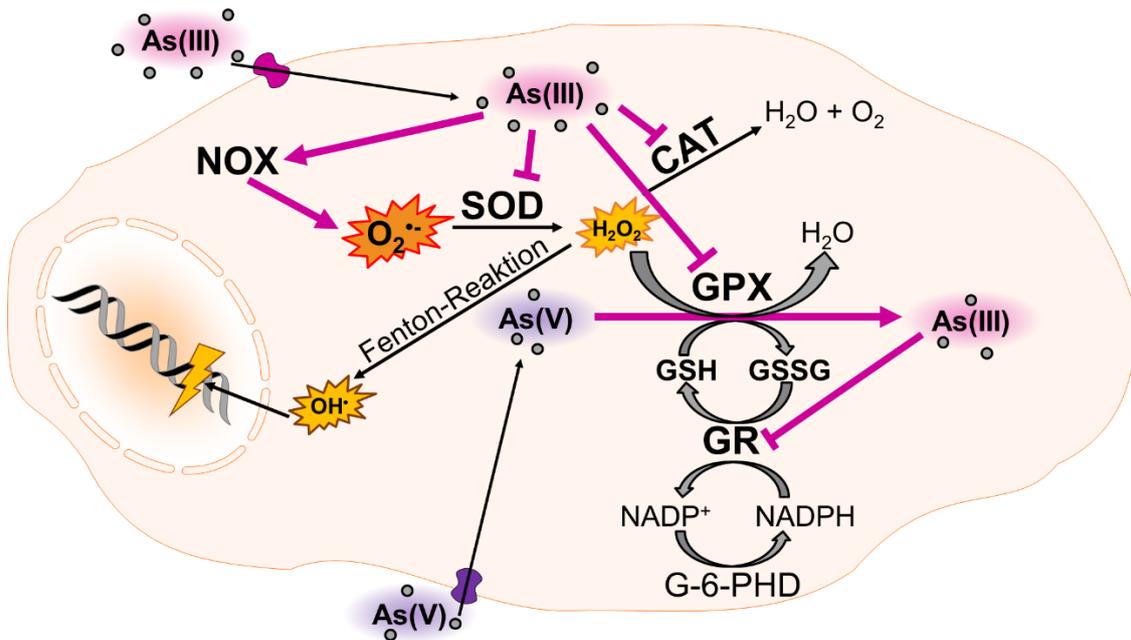
**Abbildung 1: Durchschnittliche Aufnahme von Arsen aus Lebensmitteln (EFSA, 2015).** Die Benchmark Dosis (BMD) basiert auf einer mathematischen Berechnung zur quantitativen Risikoabschätzung, bei der ein Effekt mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit auftreten kann. Für anorganisches Arsen beträgt die untere Grenze der BMD für ein 1 % erhöhtes Risiko von Hautläsionen oder Lungen-, Haut- und Blasen Tumoren  $0,3 \mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{Tag}$ . Diese untere Grenze der BMD wird vor allem durch Babys und Kleinkinder deutlich überschritten.

Weiterhin gibt es Hinweise auf die Induktion von Leber-, Nieren- und Prostata Tumoren durch chronische Exposition gegenüber Arsen. Weitere Effekte der chronischen Exposition sind Entwicklungsstörungen, neurotoxische Effekte sowie kardiovaskuläre Erkrankungen (DFG, 2002; WHO, 2010; IARC, 2012). Die Bewertung der EFSA ergab, dass kein sicherer Grenzwert für Arsen in Lebensmitteln gefunden werden konnte. Zur Risikobewertung konnte lediglich ein Dosisbereich abgeschätzt werden, bei dem wahrscheinlich nur ein leichter, jedoch messbarer Effekt auf Organe auftritt. Die sogenannte Benchmark Dosis (BMD) für ein erhöhtes Risiko von 1 % von Lungen-, Haut- und Blasen Tumoren sowie Hautläsionen wurde mit einem Bereich von  $0,3 - 8 \mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{Tag}$  berechnet (EFSA, 2009; 2015). Abbildung 1 verdeutlicht, dass die untere Grenze der BMD vor allem bei Babys und Kleinkindern deutlich überschritten wird. Die Exposition gegenüber Arsen variiert bis zu  $1,37 \mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{Tag}$ , abhängig vom Konsum reishaltiger Nahrungsmittel. Häufig sind Reis und dessen Produkte, wie beispielsweise Reiswaffeln, ein Grundnahrungsmittel für Kinder. Mit dem vergleichsweise geringen Körpergewicht der Babys und Kleinkinder erklärt sich deren hohe Arsenaufnahme aus Lebensmitteln (EFSA, 2015).

Der genaue Wirkmechanismus von Arsen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird diskutiert, dass die arseninduzierte Kanzerogenese auf der Inhibierung der DNA-Reparatur sowie der Induktion von oxidativem Stress beruht (zusammengefasst in Mandal, 2017). Unter oxidativem Stress wird im Allgemeinen eine Stoffwechsellage verstanden, bei der es zu einem vermehrten Vorkommen von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) kommt. Arsen wechselwirkt vor allem mit spezifischen Zink-bindenden Strukturen. In diesen wird das Zinkion über vier Cysteine oder Histidine koordinativ gebunden, wodurch sich eine schleifenförmige Struktur ausbildet. Zink-bindende Strukturen stellen ein potentielles Target für Arsen dar, da diese thiolreich sind und dreiwertiges Arsen eine hohe Affinität gegenüber Thiolgruppen aufweist (zusammengefasst in Emadi und Gore, 2010; Catrouillet *et al.*, 2015).

Bezüglich der DNA-Reparatur konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl der Reparaturmechanismen durch Arsen beeinträchtigt werden. Bereits in nanomolaren Arsenkonzentrationen konnte eine Hemmung der Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) nachgewiesen werden (Hartwig *et al.*, 2003). PARP-1 besitzt insgesamt drei Zink-bindende Strukturen und ist ein Enzym, welches vor allem eine wichtige Rolle in der DNA-Einzelstrangbruchreparatur einnimmt. Weiterhin wurde gezeigt, dass Arsen Einfluss auf das Protein XPA (*xeroderma pigmentosum, complementation group A*), ein Protein der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER), nimmt. Es verfügt ebenfalls über eine Zink-bindende Struktur. Ferner ist bekannt, dass Arsen weitere DNA-Reparaturproteine beeinträchtigt, hierauf wird in Kapitel 2.2.5 genauer eingegangen.

Oxidativer Stress wird durch Arsen auf verschiedenen Wegen induziert (Abbildung 2). Zum einen interagiert Arsen mit dem Tripeptid Glutathion (GSH), welches ein wichtiges zelluläres Antioxidans ist, das meist in hohen Konzentrationen vorliegt. GSH dient dabei als Reduktionsmittel von As(V) zu As(III). Das daraus entstandene As(III) wird wiederum schnell an GSH gebunden; die GSH-abhängige Reduktion sowie die Bindung sind zellulär direkt miteinander verknüpft. Durch die Reduktion von As(V) entsteht zudem ein GSH-Dimer (GSSG), welches durch die GSH-Reduktase wieder zu GSH reduziert werden muss. Diese Reduktase wird jedoch durch die GSH-As(III) Komplexe sowie die metabolisch entstandenen methylierten Arsenverbindungen inhibiert. Das erhöhte Auftreten von GSSG führt zu einer Änderung des intrazellulären GSH : GSSG Verhältnisses und somit zu einer Verschiebung des zellulären Redoxstatus. Natürlich entstehende ROS können in der Folge nicht mehr so effektiv detoxifiziert werden.



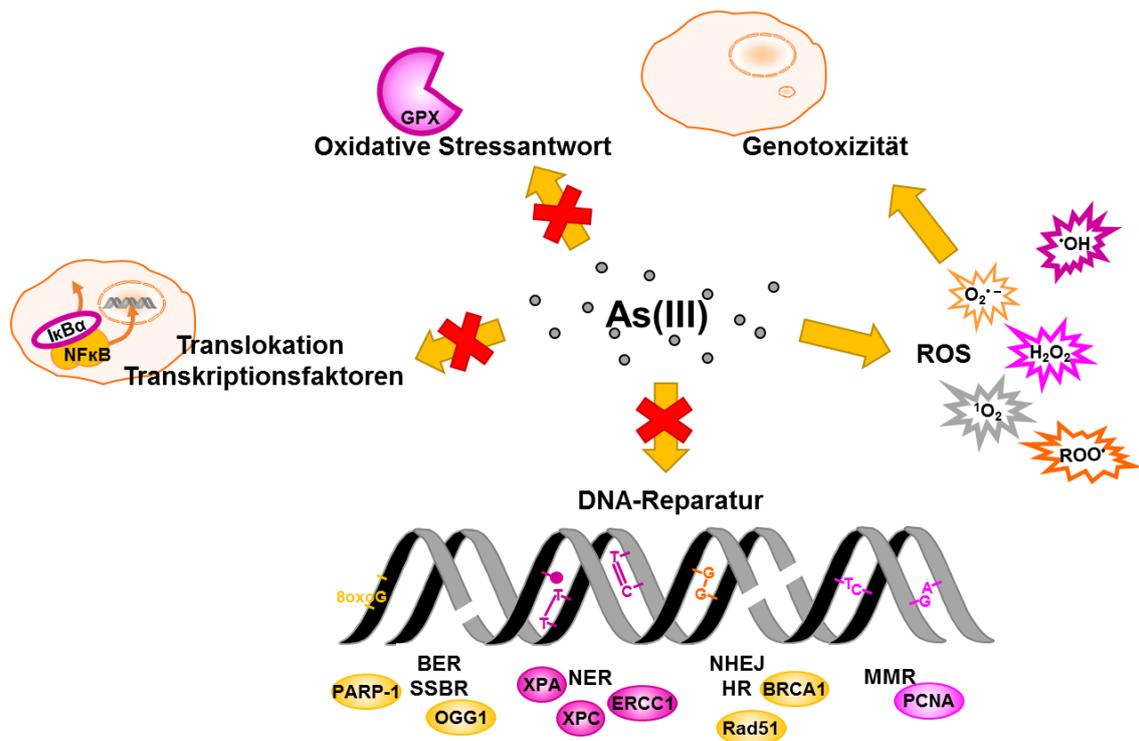
**Abbildung 2: Darstellung der oxidativen Stressantwort und Induktion von oxidativem Stress durch Arsen.** Arsen wird über Transporter aufgenommen. In der Zelle wird fünfwertiges Arsen (As(V)) durch Glutathion (GSH) direkt zu dreiwertigen Arsen (As(III)) reduziert. Dabei bildet sich ein GSH-Dimer (GSSG), welches durch die Glutathion-Reduktase (GR) wieder zu GSH reduziert werden muss. Diese Reduktase wird durch As(III) inhibiert. Darüber hinaus inhibiert Arsen die Katalase (CAT), die Superoxiddismutase (SOD) und die GSH-Peroxidase (GPX) (Thomas *et al.*, 2008; Romero *et al.*, 2014). Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie beispielsweise Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), können in der Folge nicht mehr ausreichend detoxifiziert werden. Durch die Fenton-Reaktion entsteht aus Wasserstoffperoxid ein Hydroxylradikal (OH•), welches unter anderem die DNA schädigen kann. Ferner induziert As(III) durch die NADPH-Oxidase (NOX) die Bildung des Superoxidradikals (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>), eine sehr potente ROS (Cou *et al.*, 2004; Lemarie *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2015).

Zum anderen inhibiert Arsen neben der GSH-Reduktase auch weitere antioxidative Enzyme, wie beispielsweise die Superoxiddismutase (SOD), die Katalase (CAT) und die GSH-Peroxidase (GPX) (zusammengefasst in Thomas, 2008; Romero *et al.* 2014).

Ein weiterer Mechanismus, der im Zusammenhang mit der Induktion von oxidativem Stress durch Arsen diskutiert wird, ist die Generierung von ROS infolge einer Induktion der NADPH-Oxidase (NOX). Es wurde gezeigt, dass Arsen unter anderem die Genexpression der NOX induziert und es auf Proteinebene zu einer Erhöhung von NOX-assoziierten Untereinheiten, wie beispielsweise p47<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup> kommt. Bei NOX handelt es sich um einen membrangebundenen Enzymkomplex, der Elektronen von NADPH (Nikotinamidadenindinukleotidphosphat) auf molekularen Sauerstoff überträgt; es bildet

sich ein Superoxidradikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), welches hochreaktiv ist (Chou *et al.* 2004, Lemarie *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2015).

Weiterhin ist bekannt, dass Arsen NF- $\kappa$ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) beeinflussen kann. NF- $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor, der Einfluss auf die Regulation der Zellproliferation und die Apoptose nimmt. Die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors ist abhängig von der I $\kappa$ B Kinase (IKK), da NF- $\kappa$ B zellulär an IKK gebunden vorkommt. Durch Phosphorylierung der Kinase wird NF- $\kappa$ B frei und wandert in den Zellkern, wo es seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausübt. Diese Funktion von NF- $\kappa$ B kann durch Arsen inhibiert werden, da es an ein Cystein im Aktivitätszentrum der IKK bindet und damit die Freisetzung von NF- $\kappa$ B inhibiert (zusammengefasst in Emadi und Gore, 2010).



**Abbildung 3: Bekanntes toxiologisches Wirkprofil von dreiwertigen anorganischem Arsen.** Die Toxizität von Arsen beruht auf einer Vielzahl von Mechanismen. Bisher ist bekannt, dass Arsen die oxidative Stressantwort inhibiert, die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) induziert, klastogen wirkt und die Translokation von Transkriptionsfaktoren in den Zellkern inhibiert (Shi *et al.*, 2004; Emadi und Gore, 2010; Flora *et al.*, 2011; Bustaffa *et al.*, 2014). Ferner konnte nachgewiesen werden, dass Arsen Proteine der DNA-Reparaturprozesse inhibiert (Hartwig *et al.*, 2003; Schwerdtle *et al.*, 2003a; Emadi und Gore, 2010; Zhang *et al.*, 2014; Tong *et al.*, 2015). Das hauptsächliche Target von Arsen stellen dabei thiolreiche Regionen dar, die in vielen Enzymen essentiell für die Tertiärstruktur und damit funktionsgebend sind (Catrouillet *et al.*, 2015).

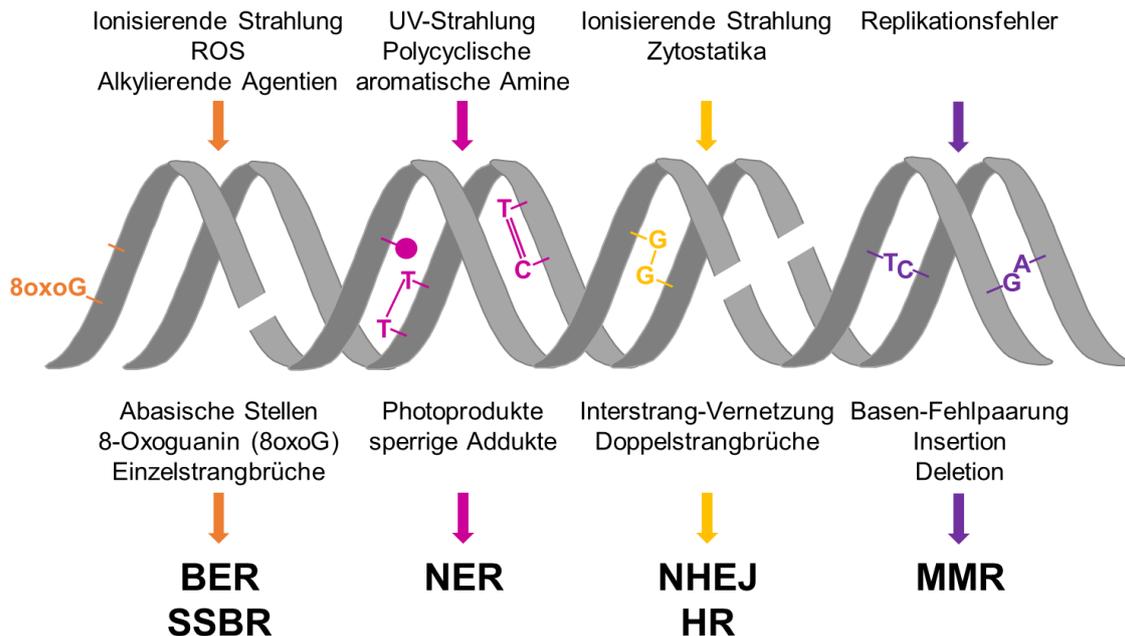
Wie bereits beschrieben, müssen die zugrundeliegenden Mechanismen der Karzinogenität von Arsen noch ausführlicher untersucht werden. Bisher ist bekannt, dass Arsen genotoxische Effekte besitzt. Es führt unter anderem zur Mikrokernbildung, zum Schwesterchromatidaustausch sowie zur Aneuploidie. Arsen selbst zeigt nur eine schwache mutagene Wirkung. In Kombination mit anderen genotoxischen Agenzien verstärkt Arsen jedoch deutlich die Mutagenität und die Genotoxizität dieser Substanzen. Es konnte gezeigt werden, dass eine simultane Behandlung mit mutagenen Stoffen oder mit UV C-Strahlung und dreiwertigen Arsenverbindungen eine Zunahme der mutagenen Wirkung verursacht (Li und Rossman, 1989; Yang *et al.*, 1992; Rossman *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2004). Einen Überblick über das derzeitige bekannte toxikologische Wirkprofil des dreiwertigen anorganischen Arsens ist in Abbildung 3 dargestellt.

## 2.2 DNA-Reparaturmechanismen

Die Stabilität und Integrität der DNA ist überlebensnotwendig. Jedoch ist die DNA nicht inert, sondern bietet zahlreiche Zielstrukturen für endogene und exogene Einflüsse. Hieraus können oxidative DNA-Schäden, DNA-Einzelstrangbrüche, DNA-Doppelstrangbrüche sowie zahlreiche andere Schäden resultieren (zusammengefasst in Clancy, 2008). schadensspezifische DNA-Reparaturprozesse wirken zusammen, um die Intaktheit der DNA sicherzustellen. Abbildung 4 zeigt eine Übersicht der möglichen DNA-Schäden sowie deren zugehörige Reparaturmechanismen.

Veränderungen der DNA-Basen, apurine Stellen und oxidative DNA-Schäden stellen kleine Schäden der DNA dar und werden durch die Basen-Exzisionsreparatur (BER) repariert. DNA-Einzelstrangbrüche werden durch die DNA-Einzelstrangbruchreparatur (*single strand break repair*, SSBR) behoben. Die NER entfernt ein breites Spektrum an DNA-Schäden, die zu einer Verzerrung der DNA-Helix führen. DNA-Doppelstrangbrüche werden durch die DNA-Doppelstrangbruchreparatur korrigiert. Die zwei Hauptreparaturwege der Doppelstrangbruchreparatur sind dabei das nicht-homologe *end-joining* (NHEJ) und die homologe Rekombination (HR). Die Mismatch-Reparatur (MMR) entfernt Basenfehlpaarungen, die infolge von Replikationsfehlern auftreten (zusammengefasst in Hoeijmakers, 2001).

In den folgenden Abschnitten dieses Kapitels wird die DNA-Doppelstrangbruchreparatur genauer erläutert und der Einfluss von Arsen auf die verschiedenen DNA-Reparaturwege detailliert dargestellt.



**Abbildung 4: Mögliche Schädigungen der DNA und deren Reparaturwege (nach Hoeijmakers, 2001).** Kleine DNA-Schäden werden durch die Basen-Exzisionsreparatur (BER) und Einzelstrangbrüche durch die DNA-Einzelstrangbruchreparatur (SSBR) repariert. Sperrige und DNA-Helix verzerrende Läsionen werden durch die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) behoben. Das nicht-homologe *end-joining* (NHEJ) und die homologe Rekombination (HR) stellen die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen sicher. Basenfehlpaarungen, die bei fehlerhafter Replikation auftreten können, werden durch die Mismatch-Reparatur (MMR) repariert.

### 2.2.1 Bedeutung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur

DNA-Doppelstrangbrüche stellen die schwerste Schädigung der DNA dar, da sie in hohem Maße genotoxische Effekte verursachen können. Während bei Basenmodifikationen und DNA-Einzelstrangbrüchen die genetische Information durch den komplementären Strang wieder hergestellt werden kann, geht diese Sequenzinformation bei einem DNA-Doppelstrangbruch verloren. Zusätzlich kann es zu einer räumlichen Trennung der Doppelstrangbruchenden kommen, wodurch eine Reparatur weitgehend erschwert wird (zusammengefasst in Hoeijmakers, 2001; Clancy, 2008). Wie bereits beschrieben, wird in der DNA-Doppelstrangbruchreparatur hauptsächlich zwischen dem NHEJ und der HR differenziert. Die Wahl des Reparaturweges ist sowohl von der Spezies als auch von der Zellzyklusphase abhängig. Der Zellzyklus unterteilt sich in zwei Phasen: Inter- und Mitosephase (M-Phase). Die Interphase unterteilt sich wiederum in drei Zellzyklusphasen, die G<sub>1</sub>-, die Synthese- (S-) sowie die G<sub>2</sub>-Phase. In der G<sub>1</sub>-Phase wird die Zelle auf die DNA-Synthese, die in der S-Phase stattfindet, vorbereitet. In der darauffolgenden G<sub>2</sub>-Phase

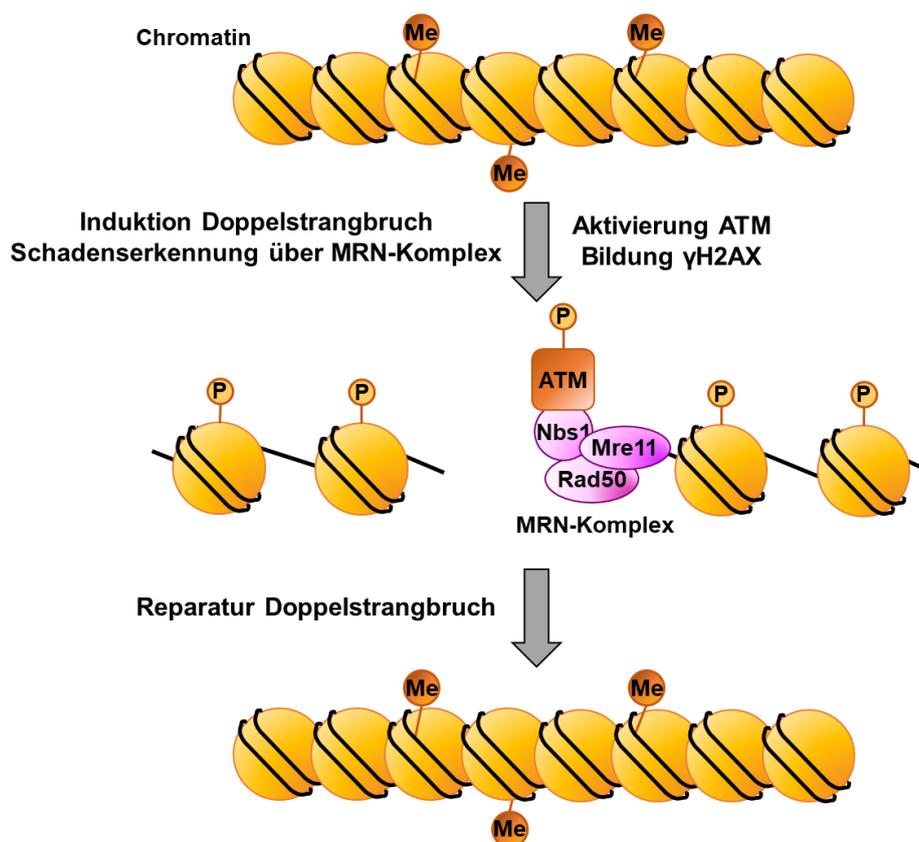
werden die Mitose vorbereitet und der Spindelapparat ausgebildet. Mit Hilfe Cyclin-abhängiger Kinasen erfolgt die Regulation des Zellzyklus. Im Falle einer Schädigung der DNA kommt es zum sogenannten Zellzyklusstopp, um die Reparatur, oder bei starker Schädigung die Apoptose, einzuleiten (zusammengefasst in Tessema *et al.*, 2004). In Hefen stellt die HR den Hauptreparaturmechanismus von DNA-Doppelstrangbrüchen dar, wohingegen beim Menschen DNA-Doppelstrangbrüche hauptsächlich durch das NHEJ repariert werden (zusammengefasst in Christmann *et al.*, 2003). Das NHEJ kann in jeder Zellzyklusphase stattfinden. Dementgegen kann die HR ausschließlich in der späten S- sowie der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus DNA-Doppelstrangbrüche reparieren, da ausschließlich in diesen Phasen das Schwesterchromatid vorliegt, welches als Matrize für die Reparatur dient (zusammengefasst in Christmann *et al.*, 2003; Beucher *et al.*, 2009). Nachfolgend wird auf die grundsätzliche Schadenserkenkung von DNA-Doppelstrangbrüchen sowie die einzelnen Reparaturmechanismen eingegangen.

### **2.2.2 Induktion, Erkennung und Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen**

DNA-Doppelstrangbrüche können beispielsweise durch ionisierende Strahlung oder  $\gamma$ -Strahlung induziert werden. Diese Strahlung besitzt eine ausreichende Ionisationsdichte, um Doppelstrangbrüche direkt zu verursachen. Die Schädigung der DNA erfolgt dabei hauptsächlich indirekt über ROS, gebildet aus Wasser; dabei entstehen komplexe DNA-Schäden. DNA-Doppelstrangbrüche entstehen durch zwei Einzelstrangbrüche, die sich maximal 12 bp gegenüberliegen. Nicht reparierte DNA-Einzelstrangbrüche können während der Replikation zudem zu Doppelstrangbrüchen führen. Nach einer Bestrahlung mit einer Dosis von 1 Gy können je Zelle circa 4.000 DNA-Schäden festgestellt werden. Am häufigsten vertreten sind dabei DNA-Basenschäden sowie DNA-Einzelstrangbrüche. Im Gegensatz dazu werden durchschnittlich nur 40 DNA-Doppelstrangbrüche je Zelle, abhängig vom Zelltyp sowie Zellzyklusphase, induziert (Hall, 2009; zusammengefasst in Ward, 1990; Goodhead, 1994; Ohnishi *et al.*, 2009).

Zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen steht der Zelle eine effiziente Signalkaskade zur Erkennung und Amplifizierung des Schadensignals zur Verfügung. Die Erkennung des Schadens erfolgt über Sensormoleküle sowie Mediatoren. Hieraus resultiert die Lockerung der Chromatinstruktur. Die posttranslationale Modifikation der vier vorherrschenden Histone H1-H4 spielt bei der Lockerung der Chromatinstruktur eine zentrale Rolle. Die posttranslationale Modifikation der Histone erfolgt durch Ubiquitinierung, Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung. Durch diese Reaktionen wird die Ladung einzelner

Aminosäuren verändert, wodurch es zur Lockerung der Chromatinstruktur durch Abstoßungsreaktionen kommt. Das Schadenssignal wird über Transduktoren, unter anderem *phosphatidyl 3-kinase-related kinases* (PI3K), weitergeleitet. Der DNA-Schaden entscheidet dabei, welche PI3K induziert wird; im Falle eines DNA-Doppelstrangbruchs kommt es zur Aktivierung von ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*). Nachfolgend wird das Signal an Effektorproteine der DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle und Apoptosevermittlung weitergeleitet (Kurz und Lees-Miller, 2004; zusammengefasst in Shiloh, 2001; Jenuwein und Allis, 2001; Harper und Elledge, 2007).



**Abbildung 5: Mechanismus der Schadenserkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen (modifiziert nach Ohnishi *et al.*, 2009).** Zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen verfügt die Zelle über eine effiziente Signalkaskade. Nach Auftreten eines Doppelstrangbruchs wird das Chromatin gelockert und es kommt zur Aktivierung von ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) durch Phosphorylierung. Die Kinase aktiviert weitere Reparaturfaktoren wie beispielsweise den MRN-Komplex, bestehend aus Mre11 (*Meiotic recombination protein 11*), Rad50 und Nbs1 (Nibrin 1). Weiterhin kommt es zur Phosphorylierung des Histons H2AX, wodurch γH2AX entsteht. Damit ist die Schadenserkennung abgeschlossen und weitere Reparaturproteine lagern sich an, es kommt zur Reparatur des DNA-Doppelstrangbruchs.

Zur Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen wird hauptsächlich die Phosphorylierung des Histons H2AX, als  $\gamma$ H2AX bezeichnet, am Serin 139 genutzt. Diese Modifikation erfolgt bereits wenige Minuten nach dem Auftreten eines DNA-Doppelstrangbruchs und wird hauptsächlich durch den Doppelstrangbruch selbst induziert (zusammengefasst in Kuo und Yang, 2008). Abbildung 5 zeigt den Mechanismus der Schadenserkennung eines DNA-Doppelstrangbruchs, der durch die Phosphorylierung von H2AX veranschaulicht wird.

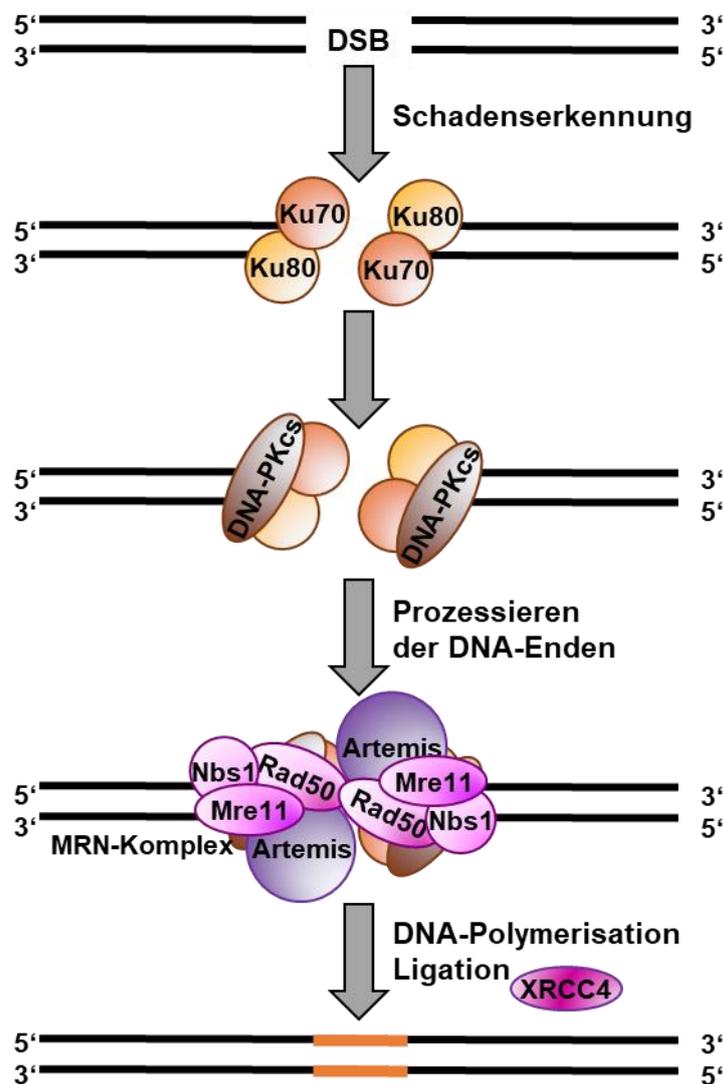
Zunächst lagern sich die Proteine *meiotic recombination 11* (Mre11), Nibrin (Nbs1) sowie Rad50 zum MRN-Komplex zusammen. Über Mre11 bindet der MRN-Komplex an die freien DNA-Enden. Mit Hilfe der *Coiled-coil* Domäne von Rad50 erfolgt die Überbrückung des DNA-Doppelstrangbruchs. Durch Nbs1 wird ATM phosphoryliert, was zu dessen Aktivierung führt. In der Folge kommt es zur Autophosphorylierung weiterer inaktiver ATM-Dimere, die dadurch als aktive Monomere vorliegen (de Jager *et al.*, 2001; Hopfner *et al.*, 2002; zusammengefasst in Kurz und Lees-Miller, 2004; McKinnon, 2004; Komatsu, 2016).

Die Kinasen ATR (*ataxia-telangiectasia and Rad3 related*) sowie DNA-PK (DNA-abhängige Proteinkinase) werden neben ATM ebenfalls aktiviert. Sie dienen als Signalüberträger und aktivieren eine Vielzahl anderer Proteine, weiterhin führen die Kinasen ATR und ATM zur Phosphorylierung des Histons H2AX. Hierbei wird in unmittelbarer Umgebung zum DNA-Doppelstrangbruch ein mehrere Megabasenpaar großer DNA-Bereich phosphoryliert, wodurch der DNA-Abschnitt nicht transkribiert oder translatiert werden kann. Dieser Bereich kann als Fokus im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden (Rogakou *et al.*, 1999; zusammengefasst in Kuo und Yang, 2008; Ohnishi *et al.*, 2009).

Eine weitere Möglichkeit zur Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels Fluoreszenzmikroskopie stellt die spezifische Färbung der rekrutierten Schadensproteine dar. Diese können als *irradiation induced foci* (IRIF) für den Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen genutzt werden. IRIF kolokalisieren mit den  $\gamma$ H2AX-Foci und ermöglichen eine Aussage entsprechend der Funktion des nachgewiesenen Proteins über den ablaufenden Reparaturweg sowie über das Maß der DNA-Schädigung (Paull *et al.*, 2000). Die Lokalisation von angefärbtem Rad51 signalisiert beispielsweise die ablaufende HR, da Rad51 an keinem anderen Reparaturweg beteiligt ist.

### 2.2.3 Nicht-homologes *end-joining*

Das NHEJ (Abbildung 6) stellt den einfachsten Reparaturweg für DNA-Doppelstrangbrüche dar. Die Reparatur erfolgt durch Ligation der freien DNA-Enden. Dadurch kann es zu Fehlverknüpfungen, Deletionen sowie Insertionen kommen. Trotz der Anfälligkeit gegenüber Fehlern stellt das NHEJ, wie bereits erläutert, den Hauptreparaturweg für DNA-Doppelstrangbrüche in Säugerzellen dar, da es in allen Zellzyklusphasen zur Verfügung steht (zusammengefasst in Christmann *et al.*, 2003; Schulte-Uentrop *et al.*, 2008).



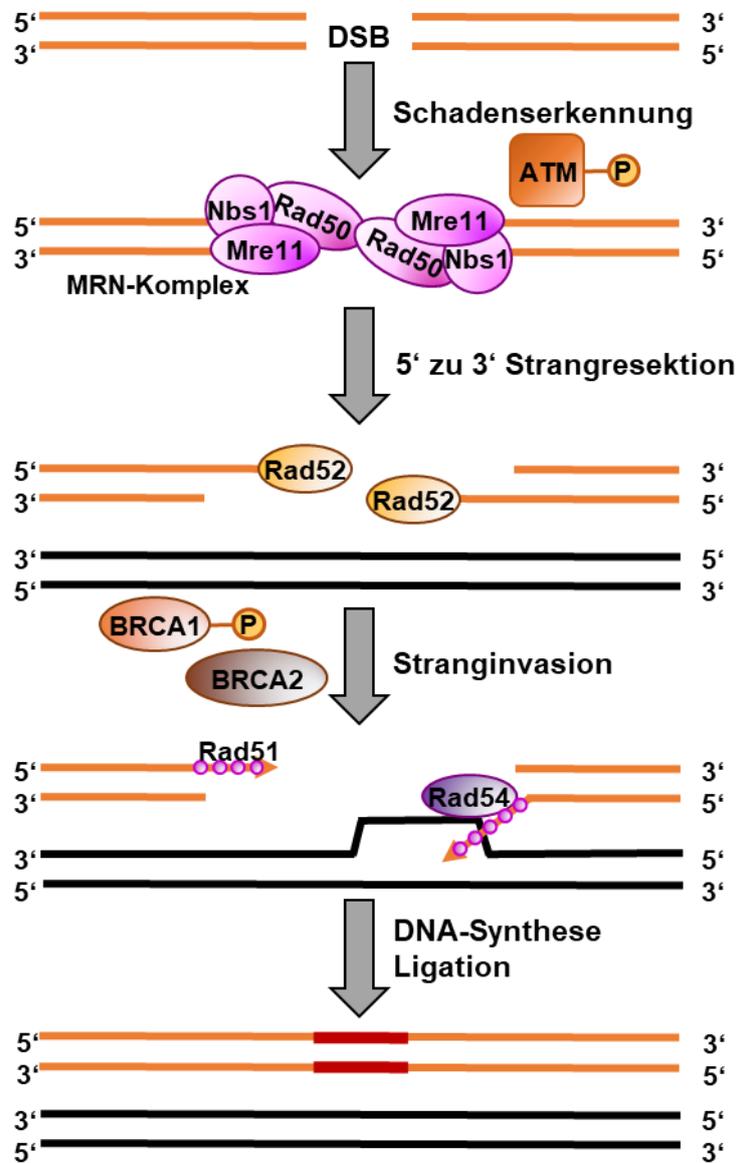
**Abbildung 6: Mechanismus des nicht-homologen *end-joining* (NHEJ) (modifiziert nach Jackson, 2002).** Infolge des Signals für einen DNA-Doppelstrangbruch (DSB) lagert sich das Heterodimer Ku70/Ku80 an den Doppelstrangbruch an. Nachfolgend wird die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs) rekrutiert. Es bildet sich ein Holoenzym, das die DNA-Enden verbindet. Zur Prozessierung werden der MRN-Komplex (Mre11/Rad50/Nbs1) sowie die Endonuklease Artemis rekrutiert. Die Ligation der DNA-Enden erfolgt durch einen Komplex aus XRCC4 (*X-ray repair cross-complementing protein 4*) und der DNA-Ligase IV.

Das Heterodimer Ku70/Ku80 induziert das NHEJ und bindet an die DNA-Enden. Das Heterodimer formt einen offenen Ring, der einerseits die DNA-Enden vor dem Abbau durch Exonukleasen schützt und andererseits weiteren Reparaturfaktoren die Anlagerung ermöglicht. An diesen offenen Ring wird die katalytisch aktive Untereinheit der DNA-PK (DNA-PKcs) rekrutiert. Durch die Bindung von DNA-PKcs an Ku70/Ku80 bildet sich die aktive DNA-PK, ein Holoenzym, das die DNA-Enden in einem synaptischen Komplex verbindet (zusammengefasst in Dynan und Yoo, 1998; Christmann *et al.*, 2003). Vor der anschließenden Ligation müssen die DNA-Enden prozessiert werden, da stumpfe Enden vorliegen müssen. Die häufig vorliegenden 3'- oder 5'-Überhänge werden durch den MRN-Komplex gebunden und vorwiegend durch die Endonuklease Artemis abgebaut (Niewolik *et al.*, 2006). Im Anschluss an das Prozessieren der DNA-Enden aktiviert DNA-PK XRCC4 (*X-ray repair cross-complementing protein 4*), welches zusammen mit der DNA-Ligase IV einen stabilen Komplex bildet. Dieser ist für die Ligation der DNA-Enden zuständig. Nach der Ligation dissoziieren die Reparaturproteine von der DNA ab (zusammengefasst in Lees-Miller und Meek, 2003).

#### 2.2.4 Homologe Rekombination

Die HR stellt den komplizierten und langwierigen Reparaturweg für DNA-Doppelstrangbrüche dar. Wie bereits beschrieben, wird für diesen Reparaturmechanismus eine homologe Sequenz benötigt. Aus diesem Grund kann die HR ausschließlich nach der DNA-Synthese in der späten S- und G<sub>2</sub>-Phase stattfinden, in denen das Schwesterchromatid des defekten Strangs vorliegt. Aufgrund der homologen Vorlage repariert die HR im Gegensatz zum NHEJ nahezu fehlerfrei. Es kann zu Fehlern kommen, wenn die verwendete Matrize nicht zu 100 % identisch ist (zusammengefasst in Shrivastav *et al.*, 2008; Iyama und Wilson, 2013). Der mechanistische Ablauf der HR wird in Abbildung 7 dargestellt.

Besonders bedeutend für die HR sind die Proteine der Rad52 Epistasiegruppe. Hierzu zählen Rad50 und Mre11 des MRN-Komplexes, Rad51 und dessen Paraloge, Rad52 sowie der sogenannte „Motor“ der HR Rad54 (zusammengefasst in Symington, 2002). Wird ein DNA-Doppelstrangbruch durch die HR repariert, erfolgt zunächst die Schadenserkennung durch den MRN-Komplex und dessen Bindung an die DNA-Enden. Hieraus resultiert, wie bereits in Kapitel 2.2.2 genauer beschrieben, die Aktivierung von ATM. ATM wiederum aktiviert weitere Faktoren wie das CtIP (*C-terminal binding protein interaction protein*).



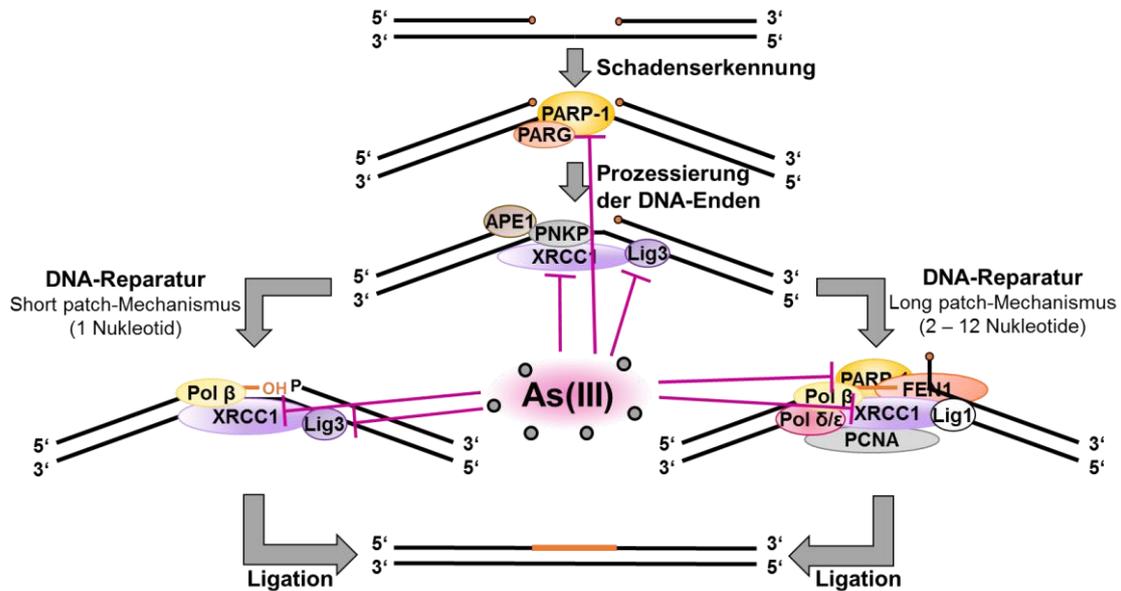
**Abbildung 7: Mechanismus der homologen Rekombination (HR) (modifiziert nach Jackson, 2002).** Nach Auftreten eines DNA-Doppelstrangbruchs (DSB) kommt es zur Schadenserkennung durch ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) und dem MRN Komplex (Mre11/Rad50/Nbs1). Der MRN-Komplex prozessiert die Enden des DNA-Doppelstrangbruchs, an welche sich Rad52 zur Stabilisierung anlagert. Mit Hilfe von BRCA1 (*breast cancer 1*) und BRCA2 wird Rad52 durch Rad51 verdrängt. Rad51 bildet ein Nukleotidfilament, welches in das Schwesterchromatid mit Hilfe von Rad54 eindringen kann. Nach erfolgreicher DNA-Synthese wird Rad51 durch Rad54 abgebaut und die DNA ligiert.

CtIP bewirkt durch die Bindung eine Konformationsänderung des MRN-Komplexes, sodass die Nukleasedomäne von Mre11 frei vorliegt. Weiterhin stimuliert CtIP die Endonukleaseaktivität von Mre11. Dadurch wird insgesamt die Sektion der DNA-Stränge durch den MRN-Komplex begünstigt. Die Modifikation der DNA-Enden führt zu 3'-Einzelstrangüberhängen, die von Rad52 sowie RPA (Replikationsprotein A) stabilisiert werden (Sartori *et al.*, 2007; zusammengefasst in San Filippo *et al.*, 2008). Rad51 ersetzt diese Proteine bei fortlaufender Reparatur. Rad51 wird mit Hilfe von BRCA2 (*breast cancer 2*) in Form eines Nukleotidfilaments an den Schaden angelagert. Dabei spielen zudem BRCA1 (*breast cancer 1*) und PALB2 (*partner and localizer of BRCA2*) eine wichtige koordinative Rolle (Sy *et al.*, 2009; zusammengefasst in Mazin *et al.*, 2010). Das Rad51 Nukleotidfilament wickelt sich um einzelsträngige DNA, sucht nach der homologen Sequenz und erlaubt die Stranginvasion. Für das Eindringen in den homologen Strang ist es wichtig, die homologe Sequenz durch Rad54 zu identifizieren. Rad54 besitzt ATPase-Aktivität (Adenosintriphosphat), die zum Energiegewinn für die Entwindung der DNA-Sequenz genutzt wird. Das Rad51-Nukleotidfilament dringt in das entwundene Schwesterchromatid ein, wodurch sich die D-Loop-Formation bildet. Im Anschluss kommt es zur Synthese des fehlenden Abschnitts des beschädigten DNA-Strangs durch die DNA-Polymerase in 3'-Richtung und zur Verknüpfung der DNA durch die DNA-Ligase. Hieraus resultiert eine sogenannte Holliday-Junction-Struktur, die wiederum aufgelöst werden muss, bevor anschließend zwei intakte DNA-Stränge vorliegen. Bei der Auflösung der Holliday-Junction kann sowohl ein *Crossing-Over*-Produkt als auch ein *Non-Crossing-Over*-Produkt entstehen. Beim *Crossing-Over*-Produkt kommt es zur Überlagerung beider Chromatiden und in der Folge zum gegenseitigen Austausch von DNA-Abschnitten (Mazin *et al.*, 2000; zusammengefasst in Jackson, 2002; Christmann *et al.*, 2003; Mazin *et al.*, 2010).

## **2.2.5 Einfluss von Arsen auf DNA-Reparaturmechanismen**

### **2.2.5.1 Einfluss von Arsen auf die DNA-Einzelstrangbruchreparatur**

DNA-Einzelstrangbrüche werden vor allem endogen durch ROS verursacht. Sie können direkt, durch Zerfall oxidierter Zucker, oder indirekt, im Zuge der Basen-Exzisionsreparatur von veränderten oder oxidierten DNA-Basen sowie abasischen Stellen, auftreten. Nicht reparierte DNA-Einzelstrangbrüche führen häufig zu einer Blockade oder einem Zusammenbruch der Replikationsgabel während der S-Phase. Dies kann zur Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen, genomischer Instabilität sowie zum Zelltod führen. Eine Reparatur dieser Schäden durch die direkte SSBR ist demnach essentiell (zusammengefasst in Caldecott, 2008).



**Abbildung 8: Mechanismus der direkten DNA-Einzelstrangbruchreparatur (SSBR) und der Einfluss von Arsen auf diesen Reparaturmechanismus (modifiziert nach Caldecott, 2008).** Die Schadenserkennung der SSBR erfolgt durch PARP-1 (Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1). Eine Inhibierung der PARP-1 durch Arsen konnte bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich nachgewiesen werden (Hartwig *et al.*, 2003). Ein wichtiges Protein der Schadens-Prozessierung ist XRCC1 (*X ray repair cross complementing 1*), da es mit zahlreichen anderen Proteinen, sowohl während des Short patch-, als auch während des Long patch-Mechanismus, interagiert. Die Ligation der DNA-Enden erfolgt durch Ligase 1 (Lig1) oder Ligase 3 (Lig3). Diesbezüglich konnten Ebert *et al.* (2011) zeigen, dass die Proteinmengen von XRCC1 und Lig3 durch Arsen reduziert wurden.

Auf die Reparatur der DNA-Einzelstrangbrüche, die durch den Prozess der BER auftreten, wird in Kapitel 2.2.5.2 näher eingegangen. Die SSBR lässt sich in vier Schritte unterteilen: Die Schadenserkennung, die Prozessierung der DNA-Enden, die DNA-Synthese und die Ligation (Abbildung 8).

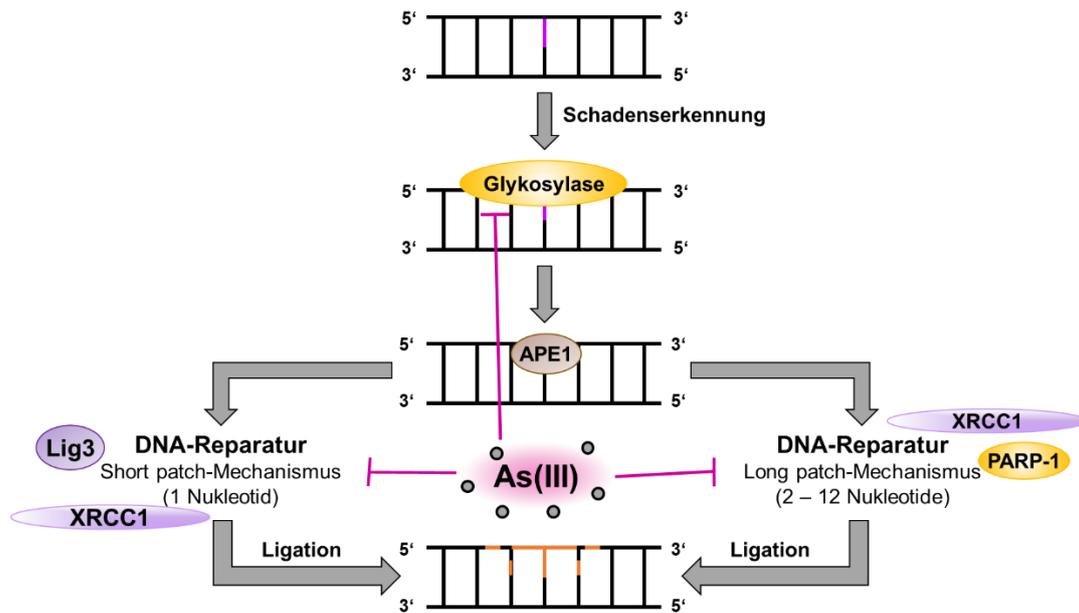
Die Schadenserkennung erfolgt durch PARP-1, wohingegen an der Prozessierung der DNA-Enden sowie an der DNA-Reparatur viele spezifische Proteine, wie beispielsweise APE1 (*apurinic / apyrimidinic endonuclease 1*), PNKP (*polynucleotide kinase 3'-phosphatase*) und FEN1 (*flap endonuclease 1*), beteiligt sind. XRCC1 (*X-ray repair cross complementing 1*) nimmt eine bedeutende Rolle in der SSBR ein. XRCC1 selbst besitzt keine enzymatische Aktivität, es bindet jedoch frühzeitig an den DNA-Schaden und interagiert mit zahlreichen Proteinen der SSBR. XRCC1-defiziente Zellen zeigten eine Hypersensibilität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien (Brem und Hall, 2005; zusammengefasst in Caldecott, 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass Arsen verschiedene Proteine der SSBR inhibiert: PARP-1, XRCC1 und Lig3 $\alpha$  (DNA-Ligase 3 $\alpha$ ) (Hartwig *et al.*, 2003; Ebert *et al.*, 2011). PARP-1 stellt das sensitivste Zielmolekül von Arsen dar. In HeLa S3-Zellen wurde nachgewiesen, dass dreiwertige Arsenverbindungen im nanomolaren Konzentrationsbereich zu einer Verminderung der Poly(ADP-ribosyl)ierung von Wasserstoffperoxid-induzierten DNA-Schäden durch PARP-1 führen (Hartwig *et al.*, 2003). Sun *et al.* (2014) konnten belegen, dass Arsen eine Freisetzung des Zinks aus der Zink-bindenden Struktur bewirkt, wodurch der Funktionalitätsverlust der PARP-1 resultiert. Ferner zeigten Ebert *et al.* (2011), dass eine Behandlung von A549-Zellen mit Arsenit in einer Reduktion der Proteinmenge von XRCC1 und Lig3 $\alpha$  resultiert. Arsen führt demnach zu einer effizienten Inhibierung der SSBR (Abbildung 8).

### **2.2.5.2 Einfluss von Arsen auf die Basen-Exzisionsreparatur**

Die BER dient der Reparatur einzelner DNA-Basen. Die entsprechenden oxidierten, alkylierten oder desaminierten DNA-Basen werden durch eine spezifische Glykosylase erkannt und entfernt; es entsteht eine AP-Stelle. APE1 schneidet das Zucker-Phosphat-Rückgrat ein und führt indirekt zu einem DNA-Einzelstrangbruch. Die daran anknüpfenden Reparaturschritte des Short patch- und des Long patch-Mechanismus erfolgen analog zur SSBR (Abbildung 9) (zusammengefasst in David *et al.* 2007; Caldecott, 2008).

Die Beeinträchtigung der Funktion von PARP-1 und die Reduktion der Proteinmengen von XRCC1 sowie Lig3 $\alpha$  durch Arsen wurden bereits beschrieben. Ferner konnten Ebert *et al.* (2011) nachweisen, dass Arsenit die Aktivität der OGG (Oxoguanin Glykosylase) in A549-Zellen konzentrationsabhängig senkt. Ebenso wurde die Aktivität der isolierten OGG1 in Anwesenheit von Arsen gehemmt. OGG ist eine spezifische Glykosylase der BER; sie dient der Entfernung der oxidierten DNA-Base 8-Oxoguanin (8-oxoG) (Abbildung 9). Aufgrund der Beteiligung teilweise gleicher Enzyme in der SSBR und der BER kann Arsen neben der SSBR auch die BER effizient inhibieren.



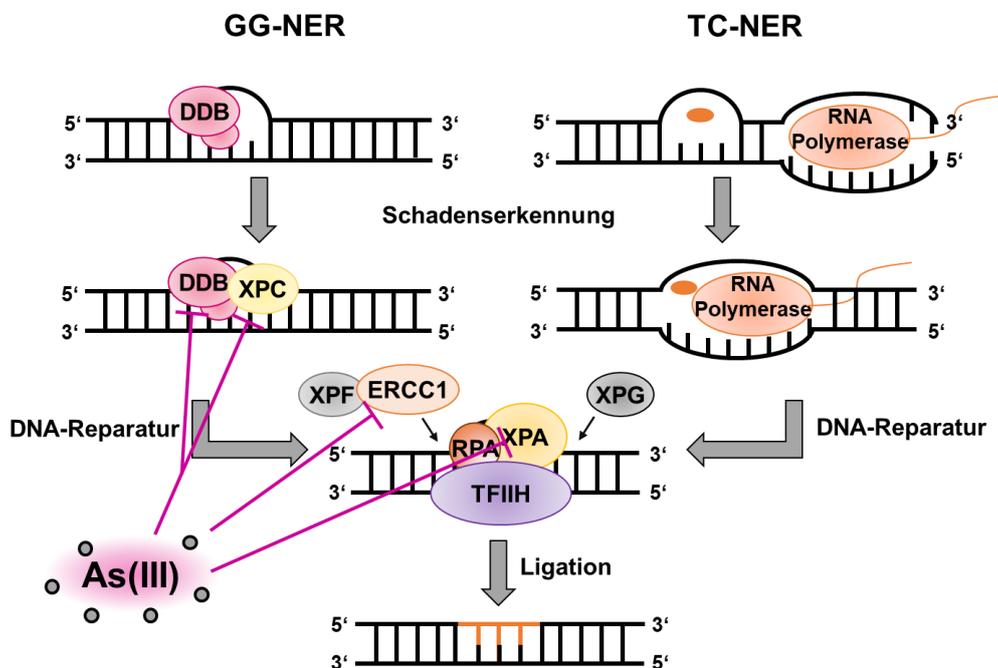
**Abbildung 9: Mechanismus der Basen-Exzisionsreparatur (BER) und der Einfluss von Arsen auf diesen Reparaturmechanismus (modifiziert nach David, 2007; Caldecott, 2008).** Die Schadenserkennung der BER erfolgt durch spezifische Glykosylasen. Zu diesen Glykosylasen zählt unter anderem OGG (Oxoguanin Glykosylase), die 8-Oxoguanin entfernt. Diese spezifische Glykosylase kann durch Arsen inhibiert werden (Ebert *et al.*, 2011). PARP-1 (Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1) und XRCC1 (*X ray repair cross complementing 1*) spielen, ebenso wie bei der DNA-Einzelstrangbruchreparatur, eine wichtige Rolle beim Short patch- und Long patch-Mechanismus der BER. Beide Proteine sowie die Ligase 3 (Lig3) werden durch Arsen inhibiert, womit Arsen die BER beeinträchtigen kann (Ebert *et al.*, 2011; Hartwig *et al.*, 2013).

### 2.2.5.3 Einfluss von Arsen auf die Nucleotid-Exzisionsreparatur

Sperrige DNA-Addukte und Helix verzerrende Läsionen werden durch die NER repariert. Bei diesem Reparaturmechanismus wird zwischen der globalen Genomreparatur (*global genome repair*, GG-NER) und der Transkriptions-gekoppelten Reparatur (*transcription-coupled repair*, TC-NER) unterschieden (Abbildung 10). Die GG-NER und die TC-NER unterscheiden sich durch die Schadenerkennung. Bei der TC-NER erfolgt die Schadenerkennung indirekt infolge der Blockierung der RNA Polymerase während der Transkription. Im Gegensatz dazu ereignet sich die Schadenerkennung der GG-NER aktiv durch DDB1 und 2 (*damaged DNA-binding protein*) sowie XPC. Durch die Anlagerung des XPC-Komplexes kommt es zur Krümmung der DNA und weitere Reparaturfaktoren lagern sich an. Zu diesen Reparaturfaktoren zählen TFIIH (*transcription factor IIIH*), RPA sowie XPA und XPG. Zusammen mit dem Heterodimer XPF-ERCC1 (*excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1*) bildet sich ein Präzisionskomplex und es kommt

zur Entwindung der DNA. XPF-ERCC1 und XPG schneiden den DNA-Strang spezifisch ein und entfernen den DNA-Schaden. Im Anschluss erfolgt die DNA-Synthese und die Ligation der DNA-Enden (zusammengefasst in van Hoffen *et al.* 2003).

Der Einfluss von Arsen auf die Reparaturkapazität der NER sowie die Proteine der NER wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht und wird in Abbildung 10 dargestellt. Hartwig *et al.* (1997) zeigten, dass in NER-profizienten VH16-Zellen eine erhöhte Zytotoxizität von UV C-Strahlung durch eine zusätzliche Arsenbehandlung auftrat. Dementgegen zeigte eine zusätzliche Behandlung mit Arsen in XPC-defizienten Fibroblasten keinen Einfluss auf die zytotoxische Wirkung von UV C-Strahlung.



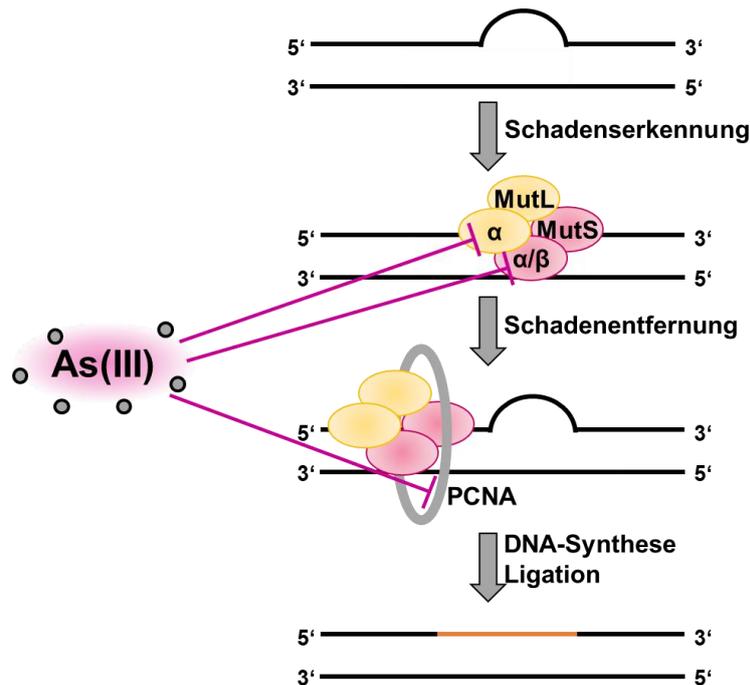
**Abbildung 10: Mechanismus der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) und der Einfluss von Arsen auf diesen Reparaturmechanismus (modifiziert nach van Hoffen *et al.*, 2003).** Bei der NER wird zwischen der globalen Genomreparatur (GG-NER) und der Transkriptions-gekoppelten Reparatur (TC-NER) unterschieden, die durch eine unterschiedliche Schadenserkennung charakterisiert sind. Die Schadenserkennung erfolgt bei der TC-NER indirekt durch die RNA-Polymerase, wohingegen die Schadenserkennung der GG-NER aktiv durch DDB (*damage DNA-binding protein*) und XPC (*xeroderma pigmentosum, complementation group C*) stattfindet. DDB besteht aus zwei Untereinheiten DDB1 und 2. Durch eine Arsenbehandlung konnte eine Verminderung der Transkriptmenge von DDB2, neben XPC, XPA und ERCC1 (*excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1*), nachgewiesen werden (zusammengefasst in Shen *et al.*, 2013). Ferner führt Arsen zu einer Reduktion der Proteinmenge von XPC. XPA besitzt eine Zink-bindende Struktur, aus der Arsen das Zink verdrängen kann (Schwerdtle *et al.*, 2003a; Holcomb *et al.*, 2017).

Ferner wurden die Inzision und die Ligation der UV-induzierten DNA-Schäden betrachtet. Bereits geringe Arsenkonzentrationen (2,5  $\mu\text{M}$ ) wirken sich nachteilig auf die Inzision aus. Holcomb *et al.* (2017) konnten nachweisen, dass Arsen zu einer Reduktion der Proteinmenge von XPC führt. Zusätzlich konnte eine verminderte Proteinmenge von XPA nachgewiesen werden. Bezüglich XPA konnte, mit Hilfe eines synthetisierten Peptids, die Interaktion der Zink-bindenden Struktur von XPA mit Arsen gezeigt werden. Hierbei wurde festgestellt, dass Arsen eine Freisetzung des Zinks aus der Zink-bindenden Struktur bewirkte (Schwerdtle *et al.*, 2003a). Basierend auf Genexpressionsanalysen wurde zudem gezeigt, dass die Transkriptmengen von *XPC*, *XPA*, *ERCC1* sowie *DDB2* durch Arsen reduziert wurden (zusammengefasst in Shen *et al.*, 2013). Infolge einer Arsenbehandlung kommt es demnach zu zahlreichen Interaktionspunkten, die die NER beeinträchtigen.

#### **2.2.5.4 Einfluss von Arsen auf die Mismatch-Reparatur**

Die MMR ist ein hochkonservierter DNA-Reparaturmechanismus, der Fehlpaarungen von DNA-Basen und Insertions-/Deletions-Schleifen korrigiert. Die MMR wurde in *E. coli* entdeckt und umfangreich erforscht. Sie basiert auf drei wesentlichen Schritten: Schadenserkennung, Schadensentfernung und DNA-Synthese (Abbildung 11). Diese drei Schritte sind in allen Spezies konserviert. In Säugerzellen erfolgt die Schadenserkennung durch MutS $\alpha$  (MSH2-MSH6) oder MutS $\beta$  (MSH2-MSH3). In der Folge wird MutL $\alpha$  (MLH1-PMS2) an den DNA-Schaden rekrutiert. MutL $\alpha$  verfügt über eine latente Endonukleaseaktivität, die zur Schadensentfernung durch das asymmetrisch bindende PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) aktiviert wird. Die DNA-Synthese erfolgt durch eine DNA-Polymerase und eine Ligase verknüpft die DNA-Enden miteinander (zusammengefasst in Liu *et al.*, 2017).

Die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) wird als ein phänotypischer Effekt einer defekten MMR angesehen. Bei Mikrosatelliten handelt es sich um kurze, sich wiederholende Sequenzen von 1 - 6 Nukleotiden, die die DNA-Polymerase in ihrer Funktion behindern. Ein Defekt in der MMR führt zu einer 100 - 1000-fach erhöhten Mutationsrate und damit zu einer gesteigerten MSI. Wu *et al.* (2017) konnten zeigen, dass durch Arsenit die MSI-Frequenz in MMR-defizienten HCT116-Zellen und in MMR-profizienten SW480-Zellen ansteigt. Beim Vergleich der beiden Zelllinien wurde deutlich, dass eine funktionierende MMR die arseninduzierte MSI senkte. Die erhöhte Induktion der MSI durch Arsenit konnte ebenfalls in Zebrafischen und in Ratten gezeigt werden (El-Ghor *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2017).



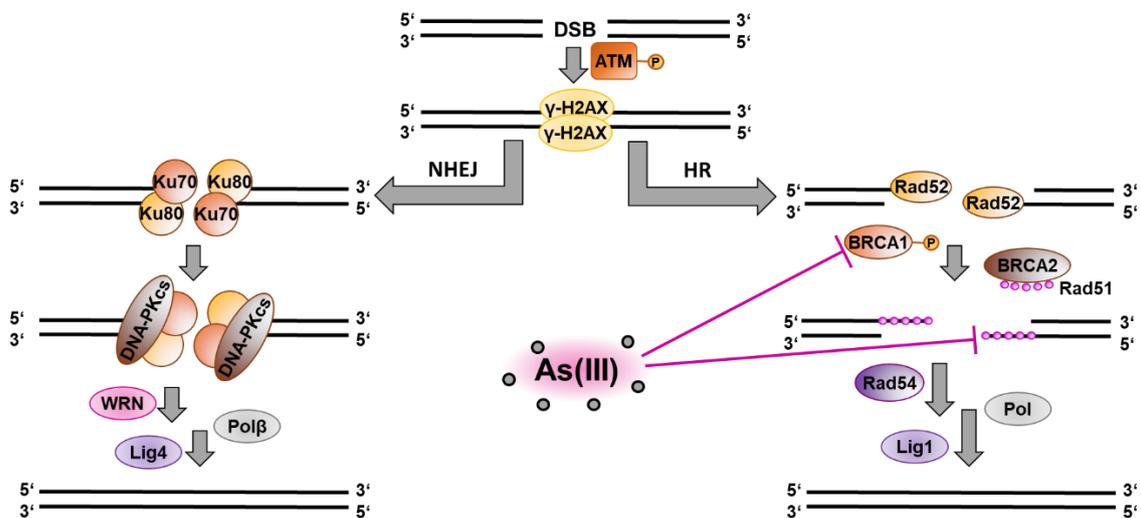
**Abbildung 11: Mechanismus der Mismatch-Reparatur (MMR) und der Einfluss von Arsen auf diesen Reparaturmechanismus (modifiziert nach Liu *et al.*, 2017).** Die Schadenserkennung der MMR erfolgt durch MutS $\alpha$  (MSH2-MSH3) und MutL $\alpha$  (MLH1-MSH6). Diese rekrutieren MutL $\alpha$  (MLH1-MSH6). Mittels Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass die Proteinmengen von MLH1, MSH2 und MSH6 durch Arsen gesenkt wurden (Treas *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2017). Die Schadensentfernung erfolgt durch das Binden von PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), das die latente Endonuklease von MutL $\alpha$  aktiviert. Tong *et al.* (2015) konnten nachweisen, dass Arsen ebenfalls das PCNA inhibiert.

Eine erhöhte MSI-Frequenz durch Arsen würde sich, wie bereits beschrieben, durch eine Inhibierung der MMR erklären lassen. Tong *et al.* (2015) konnten nachweisen, dass nicht behandelte HeLa-Zellen eine doppelt so hohe MMR-Kapazität besaßen als mit Arsen behandelte HeLa-Zellen. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung der MMR durch Arsen auf die Hemmung von PCNA zurückzuführen war. Eine Interaktion von Arsen mit MutS $\alpha$  oder MutL $\alpha$  konnte hingegen nicht festgestellt werden. Dementgegen konnte jedoch eine Reduktion der Proteinmenge von MLH1, MSH2 und MSH6, Proteine der MutS $\alpha$ - und MutL $\alpha$ -Heterodimere, mittels Gelelektrophorese gezeigt werden (Treas *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2017). Demzufolge kann Arsen die MMR effektiv inhibieren (Abbildung 11).

### 2.2.5.5 Einfluss von Arsen auf die DNA-Doppelstrangbruchreparatur

Abbildung 12 zeigt einen Gesamtüberblick der bereits in Kapitel 2.2.1 bis Kapitel 2.2.4 erläuterten DNA-Doppelstrangbruchreparatur. Zudem sind die bereits bekannten Interaktionen der Proteine der DNA-Doppelstrangbruchreparatur mit Arsen dargestellt.

Mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) konnte ein Einfluss von Arsen auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in chinesischen Hamsterzellen (CHO-K1) gezeigt werden. Dabei wurden DNA-Doppelstrangbrüche mit einer Strahlendosis von 40 Gy induziert und die Zellen mit Arsenkonzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  bis 1 mM inkubiert (Takahashi *et al.* 2000). Eine Unterscheidung der beiden Reparaturwege der Doppelstrangbruchreparatur ist mittels PFGE jedoch nicht möglich. Morales *et al.* (2016) transfizierten zu diesem Zweck U2OS-Zellen mit GFP-markierten (*green fluorescent protein*) Plasmiden. Im Falle eines DNA-Doppelstrangbruchs und darauf folgender spezifischer Reparatur kommt es zur Entstehung eines detektierbaren GFP-Signals. Mit Hilfe dieser Zellen konnte nach 72 h Behandlung mit  $\text{NaAsO}_2$  (1 - 5  $\mu\text{M}$ ) festgestellt werden, dass die HR inhibiert wurde und die NHEJ bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  nur leicht beeinflusst wurde. Ferner konnte in HeLa-Zellen nachgewiesen werden, dass bereits 5  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  nach 10 Minuten die Rekrutierung von BRCA1 und Rad51 an induzierte DNA-Doppelstrangbrüche verhindert (Zhang *et al.*, 2014). Arsen besitzt demzufolge ebenso eine inhibierende Wirkung auf die DNA-Doppelstrangbruchreparatur. Diesbezüglich sind jedoch noch weiter mechanistische Untersuchungen notwendig.



**Abbildung 12: Überblick der DNA-Doppelstrangbruchreparatur und der Einfluss von Arsen auf die zugehörigen Reparaturmechanismen (modifiziert nach Jackson, 2002).** Bei der DNA-Doppelstrangbruchreparatur wird zwischen dem nicht homologen *end-joining* (NHEJ) und der homologen Rekombination (HR) unterschieden. Die Schadenserkennung des DNA-Doppelstrangbruchs (DSB) verläuft analog. Bezüglich der NHEJ wurden bisher keine mechanistischen Einflüsse durch Arsen nachgewiesen. Dementgegen konnten Zhang *et al.* (2014) zeigen, dass durch Arsen die Anlagerung von Rad51 und BRCA1 (*breast cancer 1*) an den DSB inhibiert wurde.

### 3 Fragestellung

Anorganisches Arsen ist ein ubiquitär vorkommendes Humankarzinogen der Kategorie 1. Es wirkt vor allem indirekt über die Induktion von oxidativem Stress sowie die Inhibierung von DNA-Reparaturprozessen. Dabei ist mechanistisch vor allem die Bindung an kritische Thiolgruppen relevant. Durch die Bindung kann eine Änderung der Proteinfaltung und -funktionalität sowie eine damit assoziierte Instabilität der DNA-Integrität resultieren.

Bezüglich der oxidativen Stressantwort, der SSBR, der BER, der NER sowie der MMR konnten bereits zahlreiche inhibierende Wirkungen auf die daran beteiligten Proteine und Enzyme nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu liegen wenig mechanistische Betrachtungen der DNA-Doppelstrangbruchreparatur vor, obwohl DNA-Doppelstrangbrüche die gravierendste Schädigung der DNA darstellen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Fragestellung, ob Arsen die DNA-Doppelstrangbruchreparatur inhibiert. Dabei wird mechanistisch sowohl auf die NHEJ als auch auf die HR eingegangen. Diesbezüglich liegen für die NHEJ noch keinerlei spezifische Untersuchungen vor, wohingegen für die HR bereits eine Inhibierung der Anlagerung von BRCA1 und Rad51 festgestellt werden konnte (Zhang *et al.*, 2014). Diese inhibierende Wirkung wurde bei Konzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  nach einer Reparaturzeit von 10 Minuten nachgewiesen. Niedrige Konzentrationsbereiche sind aus toxikologischer Sicht für die Risikobewertung besonders relevant. Aus diesem Grund werden die mechanistischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit in einem geringeren Konzentrationsbereich (1  $\mu\text{M}$  – 5  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$ ) durchgeführt. Ferner werden längere Reparaturzeiträume von 2 h bis maximal 12 h betrachtet, da sich Rad51 in Abwesenheit von BRCA1 verlangsamt anlagern kann. Darüber hinaus soll durch die längere Reparaturzeit ebenso die Dissoziation der Reparaturfaktoren betrachtet werden. Zur Untersuchung der inhibierenden Wirkung von Arsen auf die DNA-Doppelstrangbruchreparatur bietet sich die kombinierte Untersuchung von Röntgenstrahlung und Arsen im zellulären System an, da Röntgenstrahlung exakt appliziert werden kann und eine gleichbleibende Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen induziert. Bisherige mechanistische Untersuchungen wurden in HeLa-Zellen durchgeführt, daher dienen HeLa S3-Zellen als vorrangiges Zellmodell zur Vergleichbarkeit der erhaltenen Ergebnisse.

Die Reparatur von DNA-Schäden nimmt Einfluss auf verschiedenste zelluläre Signalwege, aus diesem Grund befassen sich weitere Untersuchungen mit dem Einfluss von Arsen auf

die Zellzyklusphasenverteilung, die Zellviabilität sowie das Genexpressionsmuster in HeLa S3-Zellen. Das Zusammenspiel aus DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle und Apoptose dient der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität. Demzufolge widmen sich fortführende Untersuchungen der Induktion von Mikrokernen und Genmutationen durch Arsen im zellulären System. Die Untersuchung von Genmutationen erfolgt in TK6-Zellen, die sich dadurch auszeichnen, dass eine einzige Mutation auf dem X-Chromosom ausreicht, um eine phänotypische Veränderung zu detektieren.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

Eine Auflistung über die verwendeten Verbrauchsmaterialien, Lösungen, Medien, Geräte sowie die untersuchten Gene und die Sequenzen der Primer befindet sich im Anhang.

### 4.2 Methoden

#### 4.2.1 Verwendete Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden HeLa S3-Zellen sowie TK6-Zellen verwendet. Bei HeLa-Zellen handelt es sich um humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms. Die Zellen entstammen einer Gewebeprobe von Henriette Lacks. HeLa-Zellen stellen die erste kultivierte humane Zelllinie dar. Sie finden seit 1951 vielseitige Anwendung und sind sehr gut charakterisiert (Landry *et al.*, 2013). Aus diesem Grund eignen sie sich als Modellzelllinie zur ersten Untersuchung zellulärer Wirkmechanismen. HeLa S3-Zellen stellen einen Subklon der HeLa-Zellen dar. Sie weisen die gleiche typische Zellmorphologie der HeLa-Zellen auf. Eine erhöhte Wachstumsrate ist charakteristisch für HeLa S3-Zellen (Puck und Fisher, 1956). Bei TK6-Zellen handelt es sich um B-lymphoblastoide Zellen. Sie entstammen aus der Milz eines 5-jährigen kaukasischen Jungen mit erblich bedingter Sphärozytose (Amundson *et al.*, 1993). TK6-Zellen haben sich vielseitig für die Verwendung in gentoxischen Untersuchungen bewährt. Das *PIG-A*-Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert, daher reicht eine genotypische Mutation aus, um eine phänotypische Veränderung zu erzielen (zusammengefasst in Kirkland *et al.*, 2007). Alle Untersuchungen der Zellkultur sowie die Inkubationen wurden unter einer Sterilwerkbank der Stufe 2 (Flow Laminar) durchgeführt.

#### 4.2.2 Kultivierung der Zelllinien

Zur Kultivierung der Zelllinie HeLa S3 wurde das Zellkulturmedium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FKS) sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin verwendet. Die Zellen wuchsen adhärent als *Monolayer*-Schicht in Kulturgefäßen. Zur Kultivierung der TK6-Zellen wurde das Zellkulturmedium RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institut) unter Zusatz von 10 % FKS sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin verwendet. Die Zellen wuchsen in Suspension in Zellkulturflaschen (ZKF). Zur längerfristigen Lagerung wurden die Zelllinien in flüssigem Stickstoff bei -196 °C eingefroren (siehe Kapitel 4.2.3). Um eine konstante Zellqualität zu gewährleisten, wurden die Passagen

36 bis 56 der HeLa S3-Zellen und die Passagen 48 bis 55 der TK6-Zellen verwendet. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5 %. Um Konfluenz der HeLa S3-Zellen zu vermeiden, wurden diese alle 2 - 3 Tage passagiert. Die TK6-Zellen wurden mit einer Zelldichte zwischen  $0,08 - 1,00 \times 10^6$  Zellen/mL Medium subkultiviert.

Für das Subkultivieren der HeLa S3-Zellen wurde eine 0,25 % Trypsinlösung verwendet. Mit dieser wurden die Zellen zunächst gewaschen und im Anschluss abgelöst. Hierfür wurden die Zellen 2 - 3 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in DMEM aufgenommen, suspendiert und vereinzelt. Zur Subkultivierung der TK6-Zellen wurden diese suspendiert und vereinzelt. Die Anzahl lebender Zellen wurde am Casy® *Cell Counter* ermittelt. Zur Bestimmung der Anzahl der lebenden Zellen wurde jeweils der Mittelwert aus mindestens zwei Messungen, mit einer maximalen Abweichung von 5 %, gebildet. Abschließend wurde eine definierte Zellzahl in ein neues Kulturgefäß überführt.

### 4.2.3 Kryokonservierung und Inkulturnahme der Zellen

Zur längerfristigen Lagerung wurden die Zellen kryokonserviert. Hierbei wurden  $1,5 \times 10^6$  HeLa S3-Zellen oder  $4 \times 10^6$  TK6-Zellen in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (1300 rpm, 3 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in je 1 mL Einfriermedium (10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), 90 % FKS) aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Es erfolgte ein langsames Einfrieren (-1 °C/min) in einer Einfrierbox mit Isopropanolumgebung bei -80 °C. Die Lagerung erfolgte im Stickstofftank.

Für die Inkulturnahme wurden die Zellen zügig im Wasserbad (37 °C) aufgetaut und in 5 mL warmes Medium in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation (1300 rpm, 3 min, Raumtemperatur), der Überstand wurde abgenommen und die HeLa S3-Zellen in 5 mL DMEM, beziehungsweise die TK6-Zellen in 10 mL RPMI-1640, aufgenommen und suspendiert. Die Zellsuspension wurde in ZKF ( $\square 25 \text{ cm}^2$ , HeLa S3;  $\square 75 \text{ cm}^2$ , TK6) überführt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Nach zwei bis drei Passagen konnten die Zellen verwendet werden.

### 4.2.4 Inkubation der HeLa S3-Zellen

Die Inkubation der HeLa S3-Zellen erfolgte in der logarithmischen Wachstumsphase. Die Behandlung der HeLa S3-Zellen umfasste, abhängig vom durchgeführten Versuch, einen Arsenkonzentrationsbereich von 1  $\mu\text{M}$  bis 50  $\mu\text{M}$ . Zusätzlich wurden eine nicht behandelte Kontrolle mitgeführt sowie, abhängig vom durchgeführten Versuch, Staurosporin (STS),

Ethylmethansulfonat (EMS), Diethylstilbestrol (DES) und Etoposid als Positivkontrollen. Zur Behandlung mit Arsen wurde das jeweilig benötigte Volumen einer wässrigen Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mM NaAsO<sub>2</sub> für eine Endkonzentration bis zu 5 µM oder eine wässrige Stammlösung mit einer Konzentration von 10 mM NaAsO<sub>2</sub> für eine Endkonzentration ab 10 µM, direkt in das Medium gegeben. Es wurden Inkubationszeiten von 1 h - 48 h gewählt. Im Falle einer Bestrahlung (Kapitel 4.2.6) wurde eine Vorinkubationszeit von 18 h und eine Nachinkubation mit Arsen von 0 h - 12 h festgelegt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei den unter Kapitel 4.2.2 beschriebenen Bedingungen. Zum Abbruch der Inkubation wurden die Zellen mit 0,25 % Trypsinlösung gewaschen, abgelöst und abhängig von der nachfolgenden Analyse weiterbehandelt.

#### **4.2.5 Inkubation der TK6-Zellen**

Zur Inkubation der logarithmisch wachsenden TK6-Zellen wurde mit Arsenkonzentrationen von 0,5 µM bis 10 µM inkubiert. Weiterhin wurden eine nicht behandelte Kontrolle sowie EMS als Positivkontrolle mitgeführt. Die Behandlung mit Arsen erfolgte aus einer wässrigen Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mM für eine Endkonzentration bis zu 5 µM NaAsO<sub>2</sub> oder aus einer wässrigen Stammlösung mit einer Konzentration von 10 mM für eine Endkonzentration von 10 µM NaAsO<sub>2</sub>, direkt in das Medium. Es wurde eine Inkubationszeit von 26 h gewählt. Im Falle einer Bestrahlung (Kapitel 4.2.6) wurde eine Vorinkubationszeit von 18 h und eine Nachinkubation mit Arsen von 8 h festgelegt. Zum Abbruch der Inkubation wurden die Zellen zentrifugiert (250 g, 5 min, Raumtemperatur) und in frisches RPMI-1640 Medium aufgenommen, suspendiert und abhängig von der nachfolgenden Analyse weiterbehandelt.

#### **4.2.6 Bestrahlung der Zellen**

Zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen wurden HeLa S3-Zellen sowie TK6-Zellen mit der Röntgenröhre bestrahlt. Hierzu wurde das Röntgengerät Cell-Rad der Firma Faxitron (140 kV, 4,5 mA) verwendet. Zur Untersuchung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur mittels PFGE sowie für die zugehörigen Zytotoxizitätsanalysen wurden die Zellen mit 80 Gy bestrahlt; für alle weiteren Versuche wurde eine Bestrahlungsdosis von 1 Gy verwendet.

#### **4.2.7 Bestimmung der zellulären Aufnahme**

##### **4.2.7.1 Versuchsansatz**

Zur Bestimmung der zellulären Aufnahme von Arsen wurden je Kulturschale (Ø 100 mm) 1 x 10<sup>6</sup> HeLa S3-Zellen in 10 mL DMEM ausgestreut. Wie unter Kapitel 4.2.4 beschrieben, wurden die Zellen mit Arsenkonzentrationen von 1 µM, 5 µM und 10 µM in

Doppelbestimmung inkubiert. Hierbei wurden Inkubationszeiten von 1 h bis 48 h ohne Bestrahlung gewählt. Nach Abbruch der Inkubation und Trypsinierung der Zellen wurden diese in 5 mL phosphatgepufferte Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS), welche mit 10 % FKS versetzt wurde, aufgenommen, suspendiert und in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurde zentrifugiert (1250 rpm, 4 min, 4 °C), mit 5 mL PBS gewaschen und unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 5 mL PBS aufgenommen, davon wurden 4,5 mL der Zellsuspension in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. 4,5 mL der Zellsuspension wurden zentrifugiert (1250 rpm, 4 min, 4 °C), der Überstand entfernt, das Pellet in 1 mL PBS aufgenommen und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation (5000 rpm, 5 min, 4 °C) und der Überstand wurde entfernt und das erhaltene Zellpellet wurde aufgeschlossen. Aus den übrigen 0,5 mL der Zellsuspension wurde die Zellzahl sowie das mittlere Zellvolumen am Casy® *Cell Counter* ermittelt.

#### 4.2.7.2 Aufschluss der Zellen

Das Zellpellet wurde mittels 400 µL RIPA-Puffer (*Radioimmunoprecipitation assay buffer*) für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (150 rpm) lysiert. Es folgte das schrittweise Eindampfen der Lösung von 65 °C auf 95 °C, wobei die Temperatur stündlich um 10 °C erhöht wurde. Der saure oxidative Aufschluss erfolgte durch 500 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) und HNO<sub>3</sub> (69 %) (v/v : 1/1) ebenfalls durch schrittweises Erhitzen auf 95 °C. Der Rückstand wurde in 1 mL bidestilliertem Wasser aufgenommen und zur Analyse mittels Grafitrohr-AAS (Atomabsorptionsspektroskopie) verwendet.

#### 4.2.7.3 Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie

Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 193,70 nm und gegebenem Temperaturprogramm (Tabelle 1). Zur Untergrundkompensation wurde ein Matrixmodifier von je 0,005 mg Palladium und 0,003 mg Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> bei jeder Messung zugesetzt. Die Stromstärke der verwendeten Arsen-Hohlkathodenlampe betrug 350 mA.

Tabelle 1: Temperaturprogramm der Arsenbestimmung mittels Grafitrohr-AAS.

	Temperatur (°C)	Aufheizzeit (s)	Haltezeit (s)	Gasstrom (mL/min)	Gastyp
Trocknung 1	110	1	30	250	Argon
Trocknung 2	130	15	30	250	Argon
Pyrolyse	1200	10	20	250	Argon
Atomisierung	2000	0	5	0	

Ausheizen	2450	1	3	250	Argon
-----------	------	---	---	-----	-------

Zusätzlich wurden Blindwerte der Matrix und externe Standards zur Kontrolle mitgeführt. Weiterhin wurden Nachweis-, Bestimmungs- und Erfassungsgrenze nach DIN 32645 ermittelt (Anhang, Tabelle 3).

Die Aufnahmeuntersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Olga Wentland im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit „Untersuchung der zellulären Aufnahme von Arsen“ durchgeführt.

#### 4.2.8 Zytotoxizitätsuntersuchungen in HeLa S3-Zellen

Zur Zytotoxizitätsbestimmung von Arsen in HeLa S3 wurden die Parameter Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit (*colony forming ability*, CFA) untersucht. Die Zellen wurden in Zellkulturschalen (Ø 60 mm) mit einer definierten Zellzahl von  $0,5 \times 10^6$  Zellen je 5 ml Medium ausgestreut und, wie unter Kapitel 4.2.4 sowie Kapitel 4.2.6 beschrieben, mit Arsenkonzentrationen von  $1 \mu\text{M}$  bis  $50 \mu\text{M}$  in Doppelbestimmung inkubiert und teilweise mit 1 Gy oder 80 Gy bestrahlt. Die Gesamtinkubationszeit wurde auf 26 h festgelegt. Zur Bestimmung des Zytotoxizitätsparameters der Zellzahl wurden nach Ablauf der Gesamtinkubationszeit die Zellen mit 0,25 % Trypsinlösung gewaschen, abgelöst und, wie unter Kapitel 4.2.2 beschrieben, am Casy<sup>®</sup> Cell Counter gezählt. Um den Zytotoxizitätsparameter der Koloniebildungsfähigkeit zu untersuchen, wurden aus jeder Probe 300 Zellen in Zellkulturschalen (Ø 60 mm), unter Zusatz von 5 ml Medium, in Dreifachbestimmung überführt. Es erfolgte eine Kultivierung im Brutschrank für 7 - 10 Tage. Im Anschluss daran wurde das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und mit eiskaltem 96 % Ethanol für 5 Minuten fixiert. Die Färbung der fixierten Kolonien erfolgte durch Giemsa<sup>®</sup>-Färbelösung (1:20). Diese wurde für 2 h auf den Zellen belassen und anschließend mit destilliertem Wasser abgewaschen. Die gefärbten Kolonien wurden mit Hilfe eines Koloniezählgeräts (Colony Counter BZG-30) ausgezählt. Bei einer Bestrahlungsdosis von 80 Gy wurde die Koloniebildungsfähigkeit nicht untersucht.

Die Versuche der Zellzahlbestimmung mit 80 Gy Bestrahlung wurden in Zusammenarbeit mit Frau Vivien Haberland im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit „Einfluss von As(III)-oxid auf die Zellzyklus-abhängige Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen“ durchgeführt. Die Zytotoxizitätsuntersuchungen mit 1 Gy Bestrahlung wurden teilweise in Zusammenarbeit mit Frau Vivien Haberland und Frau Stephanie Ziemann im Rahmen ihrer Masterarbeit „Einfluss von Arsen auf wichtige Reparaturproteine der DNA-Doppelstrangbruchreparatur“ durchgeführt.

## 4.2.9 Pulsfeld-Gelelektrophorese

### 4.2.9.1 Versuchsansatz

Für die Untersuchung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur mittels PFGE wurden je  $2 \times 10^6$  HeLa S3-Zellen/10 mL DMEM in eine Kulturschale ( $\varnothing$  100 mm) in Doppelbestimmung ausgestreut und, wie in Kapitel 4.2.4 und Kapitel 4.2.6 beschrieben, mit Arsenkonzentration von  $1 \mu\text{M}$  bis  $10 \mu\text{M}$  inkubiert und teilweise mit 80 Gy bestrahlt. Es wurden Nachinkubationszeiten von 0 h, 4 h und 8 h festgelegt. Nach Abbruch der Inkubation wurden die Zellen in 5 mL kaltes PBS, versetzt mit 10 % FKS, aufgenommen und suspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und  $5 \times 10^6$  Zellen in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation (1300 rpm, 3 min,  $4^\circ\text{C}$ ), der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet wurde in 1 mL kaltem PBS aufgenommen und suspendiert. Es erfolgte erneut eine Zentrifugation unter den angegebenen Bedingungen und der Überstand wurde entfernt. Das erhaltene Zellpellet wurde maximal 4 Wochen bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 4.2.9.2 Probenaufarbeitung

Für die Probenaufarbeitung wurde das Kit *CHEF Mammalian Genomic DNA Plug* verwendet. Die Zellpellets wurden in  $75 \mu\text{L}$  Zellsuspensionspuffer aufgenommen und auf  $50^\circ\text{C}$  erwärmt. Die erwärmte Lösung wurde mit  $75 \mu\text{L}$  auf  $50^\circ\text{C}$  erwärmter *CleanCut* Agarose (2 %) versetzt.  $100 \mu\text{L}$  der erhaltenen Zellsuspension wurde in die Blöckchengießform überführt und bei  $-20^\circ\text{C}$  für 5 min erstarrt. Zur Lyse wurden die Blöckchen bei  $50^\circ\text{C}$  über Nacht in  $300 \mu\text{L}$  Extraktionspuffer (Proteinase K Stock : Proteinase K Reaktionspuffer / 1 : 25) inkubiert. Die Blöckchen wurden mit je 1 mL Waschpuffer dreimal gewaschen.

### 4.2.9.3 Gellauf und Auswertung

Für den Gellauf wurden die Blöckchen in  $200 \text{ mL } 0,8\%$  *Pulsed-field*-Agarose (in  $0,5\text{x TBE}$ -Puffer) eingebettet. Zur Detektion der DNA wurde der Fluoreszenzfarbstoff *GelRed* (1:10.000) zugesetzt. Das ausgehärtete Gel wurde in die CHEF-DR III-PFGE Apparatur eingesetzt. Als Laufpuffer diente  $0,5\text{x TBE}$ -Puffer ( $14^\circ\text{C}$ ), in dem das Gel für 30 min equilibriert wurde. Im Anschluss erfolgte der Gellauf unter andauernder Kühlung auf  $14^\circ\text{C}$ , einer Laufzeit von 92 h, einem Feldwinkel von  $120^\circ$  und einer Pulszeit von 5 - 5000 s. Die Auswertung über die Grauwerte erfolgte am LAS-3000 mit der Software *AIDA Image Analyzer*.

#### 4.2.10 Immunfluoreszenzfärbung

##### 4.2.10.1 Versuchsansatz

Für die indirekte Untersuchung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur mittels Immunfluoreszenzfärbung wurden je  $0,16 \times 10^6$  HeLa S3-Zellen/2 mL DMEM auf Deckgläschen ( $\varnothing$  12 mm) in eine Kulturschale ( $\varnothing$  35 mm) in Doppelbestimmung ausgestreut und, wie in Kapitel 4.2.4 und Kapitel 4.2.6 beschrieben, mit Arsenkonzentration von 1  $\mu$ M und 5  $\mu$ M inkubiert und teilweise mit 1 Gy bestrahlt. Es wurden Nachinkubationszeiten von 0 h - 12 h ausgewählt. Nach dem Abbruch der Inkubation wurden die Zellen auf den Deckgläschen fixiert.

##### 4.2.10.2 Fixierung und Färbung

Zur Fixierung der Zellen wurden diese mit 1 mL Formaldehyd (3,7 % in PBS) für 10 min fixiert. Der Formaldehyd wurde abgenommen und die Deckgläschen wurden dreimal mit je 1 mL PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1 mL Triton X-100 (0,2 % in PBS) für 5 min bei 4 °C permeabilisiert. Das Triton X-100 wurde abgesaugt und die Deckgläschen wurden dreimal mit je 1 mL FKS (1 % in PBS) gewaschen. Über Nacht wurden die freien Bindungsstellen mit 1 mL BSA (*bovine serum albumine*, Rinderserumalbumin) (2 % in PBS) bei 4 °C blockiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer. Hierfür wurde je ein spezifischer Antikörper eines Proteins der DNA-Doppelstrangbruchreparatur sowie eine Zentromerprotein F-Färbung (CENP-F) zur Markierung der Zellzyklusphase verwendet. Die Verdünnungen der Antikörper (in 2 % BSA in PBS) sind in Tabelle 2 angegeben. Die Antikörperinkubation der Deckgläschen erfolgte durch je 20  $\mu$ L Antikörperlösung. Im Anschluss wurden die Deckgläschen dreimal 10 min in je 1 mL BSA (2 % in PBS) gewaschen und es erfolgte die Inkubation mit den Sekundärantikörpern für 3 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Hierfür wurden die Deckgläschen mit 20  $\mu$ L Antikörperlösung (in 2 % BSA in PBS) versetzt. Die Verdünnungen sind in Tabelle 2 angegeben. Daraufhin erfolgte ein Waschriff mit 1 mL PBS, der insgesamt dreimal wiederholt wurde. Die Deckgläschen wurden in einen Tropfen *Vectashield Mounting Medium with DAPI* eingebettet und mit Nagellack auf den Objektträgern (76 x 26 mm) fixiert.

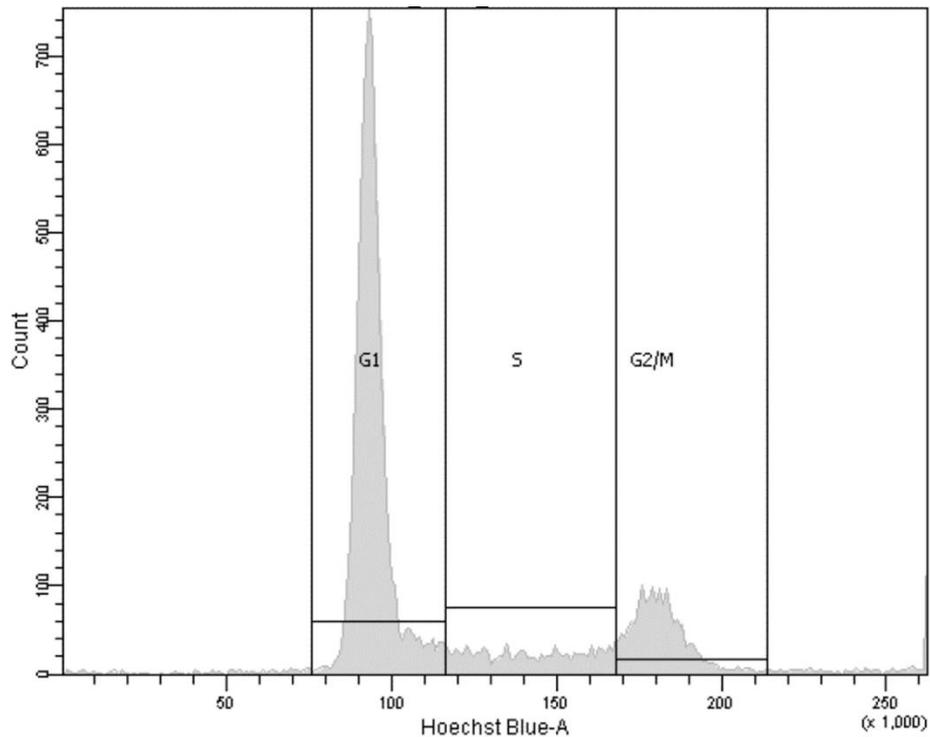
Tabelle 2: Verdünnung der verwendeten Antikörper.

Antikörper	Wirt	Art des Antikörpers	Verdünnung
anti-CENP-F	Kaninchen	primär	1:500
anti-CENP-F	Maus	primär	1:500
anti- $\gamma$ H2AX	Maus	primär	1:1000
anti-53BP1	Maus	primär	1:250
anti-phosphoATM	Maus	primär	1:250
anti-DNA-PKcs Phospho (Thr2609)	Maus	primär	1:1000
anti-Rad51	Kaninchen	primär	1:5000
anti-BRCA1	Maus	primär	1:5000
anti-Rad54	Maus	primär	1:1000
<i>Alexa Fluor<sup>®</sup></i> <i>488-conjugated</i> <i>anti-mouse</i>	Ziege	sekundär	1:500
<i>Cy3-conjugated</i> <i>anti-rabbit</i>	Ziege	sekundär	1:500

#### 4.2.10.3 Datenanalyse

Die fixierten Deckgläschen wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Objektiv 63x) ausgewertet. Hierfür wurden je Deckgläschen 40 Zellen der G<sub>2</sub>-Phase zur Auswertung der Foci-Anzahl herangezogen. Das Basisaufkommen der Foci des jeweiligen nicht bestrahlten Versuchsansatzes wurde von der Anzahl der auftretenden Foci des bestrahlten Versuchsansatzes subtrahiert.

Die Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ H2AX, BRCA1 sowie Rad54 wurden teilweise in Zusammenarbeit mit Frau Vivien Haberland im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit „Einfluss von As(III)-oxid auf die Zellzyklus-abhängige Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen“ durchgeführt. Die Immunfluoreszenzfärbung von ATM wurde in Zusammenarbeit mit Frau Stephanie Ziemann im Rahmen ihrer Masterarbeit „Einfluss von Arsen auf wichtige Reparaturproteine der DNA-Doppelstrangbruchreparatur“ durchgeführt.



**Abbildung 13: Exemplarische Darstellung eines Histogramms der Zellzyklusphasenverteilung.** Die DNA wird mittels Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. Die vom DNA-Gehalt abhängige Fluoreszenzintensität wird gegen die Zellzahl aufgetragen. Aufgrund der gleichen Emissionswellenlänge ist das DAPI-Signal als Hoechst-Signal im Histogramm dargestellt. Anhand der Intensität des DAPI-Signals erfolgt die Unterscheidung zwischen G<sub>1</sub>-, S- und G<sub>2</sub>/M-Phase.

#### 4.2.11 Viabilitätsmessung und Zellzyklusphasenverteilung mittels Durchflusszytometer

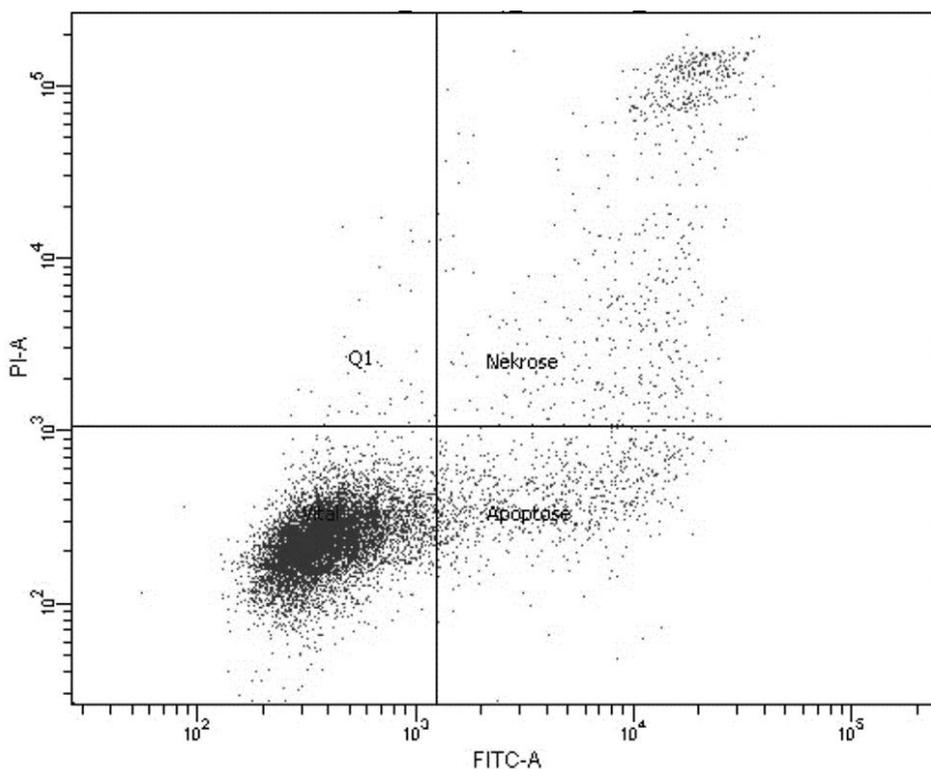
Zur parallelen Untersuchung der Zellzyklusphasenverteilung, der Apoptose und Nekrose am Durchflusszytometer wurden die Fluoreszenzfarbstoffe 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) sowie Annexin V als Fluorescein-Isothiocyanat-Konjugat (Annexin V-FITC) und Propidiumiodid (PI) verwendet. DAPI lagert sich vor allem an AT-reiche DNA-Regionen an. Der DNA-Gehalt der Zelle ermöglicht damit die Unterscheidung der Zellzyklusphasen (Abbildung 13).

Annexin V-FITC erlaubt die Unterscheidung zwischen toten und vitalen Zellen, da es an Phosphatidylserin (PS), welches sich normalerweise auf der Membranninnenseite befindet, bindet. Nekrotische Vorgänge bewirken einen Verlust der Membranintegrität, wodurch Annexin V-FITC innerhalb der Zelle an PS binden kann. Bei apoptotischen Vorgängen geht die Eigenschaft des asymmetrischen Membranaufbaus verloren und PS ist ebenso auf der Außenseite der Membran lokalisiert, wodurch eine Bindung von Annexin V-FITC erfolgen

kann. Die Unterscheidung zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen wird durch PI gewährleistet, da PI ausschließlich in Zellen mit geschädigter Membran eindringen kann und mit der DNA interkaliert. Nekrotische Zellen weisen demzufolge ein Annexin V-FITC- und ein PI-Signal auf, apoptotische Zellen ein Annexin V-FITC-Signal und vitale Zellen kein Fluoreszenzsignal (Abbildung 14).

#### 4.2.11.1 Versuchsansatz

Je Zellkulturschale (Ø 60 mm) wurden  $0,5 \times 10^6$  HeLa S3-Zellen in 5 mL DMEM ausgestreut. Die Zellen wurden, wie unter Kapitel 4.2.4 und Kapitel 4.2.6 beschrieben, mit Arsenkonzentrationen bis zu  $30 \mu\text{M}$  in Doppelbestimmung inkubiert und teilweise mit 1 Gy bestrahlt. Es wurde eine Gesamtinkubationszeit von 26 h eingehalten. Als Positivkontrolle für die Induktion der Apoptose wurde 500 nM STS verwendet.



**Abbildung 14: Exemplarische Darstellung eines Histogramms der Viabilitätsuntersuchung.** Zur Viabilitätsmessung erfolgt eine parallele Färbung mit Annexin V als Fluorescein-Isothiocyanat-Konjugat (Annexin V-FITC) und Propidiumiodid (PI). Die vitalen Zellen sind dabei PI und FITC negativ, da die Zellmembran intakt und asymmetrisch aufgebaut ist (links unten). Die apoptotischen Zellen weisen ein positives FITC-Signal auf sowie ein negatives PI-Signal, da die Zellmembran symmetrisch, jedoch intakt ist (rechts unten). Die nekrotischen Zellen weisen ein positives PI- und FITC-Signal auf, da deren Zellmembran nicht mehr intakt ist (rechts oben).

Nach Abbruch der Inkubation und Trypsinierung wurden die Zellen in 1 mL frischem DMEM aufgenommen und suspendiert. 150  $\mu$ L des Inkubationsmediums und 150  $\mu$ L der Zellsuspension wurden für die Viabilitätsmessung in ein Durchflusszytometer-Röhrchen überführt. Die restliche Zellsuspension für die Untersuchung der Zellzyklusphasenverteilung wurde in ein weiteres Durchflusszytometer-Röhrchen gegeben.

#### **4.2.11.2 Probenaufarbeitung**

Für die Viabilitätsmessung wurden die Proben mit 200  $\mu$ L Mastermix (1  $\mu$ L Annexin V-FITC und 50  $\mu$ g/ $\mu$ L PI in Ringerlösung) versetzt. Es erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 4 °C mit anschließender Messung am Durchflusszytometer. Für die Untersuchung der Zellzyklusphasenverteilung wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1300 rpm, 3 min, 4 °C), der Überstand abgesaugt und die Zellen in 1 mL kaltem PBS aufgenommen. Hierzu wurden 3 mL eiskaltes Ethanol (96 %) pipettiert und die Zellen bei -20 °C über Nacht fixiert. Es erfolgte eine Zentrifugation (2000 rpm, 5 min, 4 °C), der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 200  $\mu$ L DAPI-Färbelösung aufgenommen. Es erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 4 °C mit anschließender Messung am Durchflusszytometer.

#### **4.2.11.3 Analyse am Durchflusszytometer**

Für die Viabilitätsanalyse wurden jeweils 10.000 Zellen und für die Zellzyklusuntersuchung jeweils 30.000 Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers LRSII Fortessa untersucht. Hierbei wurde eine maximale Messgeschwindigkeit von 500 Events/s eingehalten. Die eingestellte Extraktionswellenlänge betrug für Annexin V-FITC und PI 488 nm und für DAPI 405 nm. Die Emissionsdetektion erfolgte bei 530/30 nm (Annexin V-FITC), 695/40 nm (PI) und 450/50 nm (DAPI). Zur Darstellung der Viabilitätsuntersuchung erfolgte eine Auftragung des FITC- gegen das PI-Signal. Zur Darstellung der Zellzyklusphasenverteilung erfolgte eine Darstellung der Zell-Counts gegen die DAPI-Intensität.

#### **4.2.12 Genexpressionsanalyse mittels *High-Throughput RT-qPCR***

Die Genexpressionsanalyse mittels *High-Throughput RT-qPCR* erlaubt die parallele Untersuchung von 95 Genen in 96 Proben. Die ausgewählten Gene spielen hinsichtlich der DNA-Schadensantwort eine bedeutende Rolle. Diese können in die Signalwege Apoptose, Zellzyklusregulation und Proliferation, oxidative Stressantwort und DNA-Reparatur eingeteilt werden. Zusätzlich wurden wichtige Transkriptionsfaktoren, die maßgeblich an der Regulation dieser Gene beteiligt sind, berücksichtigt. Insgesamt bietet die

*High-Throughput RT-qPCR* das Potential, komplexe Wirkprofile von toxischen und genotoxischen Substanzen aufzuzeigen (Fischer *et al.*, 2016).

#### 4.2.12.1 Versuchsansatz

HeLa S3-Zellen wurden mit einer Zelldichte von je  $0,5 \times 10^6$  Zellen pro 5 ml DMEM in Kulturschalen ( $\varnothing$  60 mm) ausgestreut. Die Inkubation mit Arsen erfolgte, nach Kapitel 4.2.4, mit Konzentrationen von 1  $\mu$ M bis 10  $\mu$ M. Hierbei wurden Inkubationszeiten von 8 h, 18 h, 26 h sowie 18 h Vorinkubation, Bestrahlung mit 1 Gy und 8 h Nachinkubation (siehe Kapitel 4.2.6) gewählt. Zum Abbruch der Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 0,25 % Trypsinlösung abgelöst. Die Aufnahme und Vereinzlung erfolgte in 3 ml PBS, welches mit 10 % FKS versetzt wurde. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (1300 rpm, 3 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 1 ml PBS gewaschen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (1300 rpm, 3 min, 4 °C). Der jeweilige Überstand wurde abgenommen und die Zellpellets bei -80 °C gelagert.

#### 4.2.12.2 RNA-Isolation

Zur Isolation der RNA wurde das Kit *MN NucleoSpin® Plus* verwendet. Nach den Angaben des Herstellers erfolgte die Isolation auf Eis unter möglichst sterilen Bedingungen, hierfür wurden die Arbeitsflächen mit 80 % Ethanol gereinigt und autoklaviertes Arbeitsmaterial verwendet. Die Zellpellets wurden in 350  $\mu$ L Lysepuffer (LBP) suspendiert, geschüttelt und auf die DNA-bindende Säule gegeben. Nach Zentrifugation (11.000 rpm, 30 s, 4 °C) wurden zum Eluat 100  $\mu$ L *Binding Solution* (BS) gegeben und suspendiert. Das Gemisch wurde auf die RNA-bindende Säule gegeben und zentrifugiert (11.000 rpm, 20 s, 4 °C). Hieraus resultierte die Abtrennung von störenden Proteinen und Salzen. Die gebundene RNA wurde mit 200  $\mu$ L Waschpuffer 1 (WB1) gewaschen und zentrifugiert (11.000 rpm, 20 s, 4 °C). Im Anschluss wurde die Säule auf ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben und der Durchgang verworfen. Es erfolgte ein zweiter Waschschriff mit 600  $\mu$ L Waschpuffer 2 (WB2) sowie eine Zentrifugation (11.000 rpm, 20 s, 4 °C). Im Anschluss an den dritten Waschschriff mit 250  $\mu$ L WB2 erfolgte erneut eine Zentrifugation (11.000 rpm, 2 min, 4 °C). Die Säule wurde auf ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben und der Durchgang verworfen. Die Elution der gebundenen RNA erfolgte mit 30  $\mu$ L RNase-freiem Wasser und Zentrifugation (11.000 rpm, 1 min, 4 °C). Das Eluat wurde erneut zur Elution der RNA verwendet und zentrifugiert (11.000 rpm, 1 min, 4 °C). Die extrahierte RNA wurde für maximal zwei Wochen bei -80 °C gelagert.

Die Bestimmung des RNA-Gehalts erfolgte am Tecan® durch photometrische Absorptionsmessung bei 260 nm. Zusätzlich wurde die Reinheit der RNA durch einen Absorptionsquotienten von 260 nm zu 280 nm nachgewiesen. Bei Werten >2,00 konnte eine optimale Reinheit zur weiteren Analyse gewährleistet werden.

#### 4.2.12.3 Synthese der cDNA

Die Synthese der cDNA erfolgte mit Hilfe des *qScript cDNA Synthese* Kit. Je Ansatz wurde 1 µg RNA mit je 5 µL Mastermix (1 µL *iScript Reverse Transcriptase* + 4 µL *Reaction Mix* (5x)) versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 20 µL mit PCR-geeignetem Wasser ergänzt. Die Proben wurden durchmischt und abzentrifugiert. Die cDNA-Synthese erfolgte im *Thermocycler* nach folgendem Temperaturprogramm: 25 °C für 5 min, 42 °C für 30 min, 85 °C für 5 min, 4 °C Endtemperatur. Die cDNA wurde für maximal zwei Wochen bei -20 °C gelagert.

#### 4.2.12.4 Preamplifikation und Exonukleaseverdau

Die Preamplifikation (*specific target amplification*, STA) dient der Gewährleistung einer ausreichenden Menge des *templates* der Zielgene und wurde nach den Herstellervorgaben durchgeführt. Hierfür wurden zunächst alle Primerpaare vereinigt und mit DNA-Suspensionspuffer eine Endkonzentration von 500 nM (*Pooled Primer Mix*) eingestellt. Der *Pooled Primer Mix* konnte bei -20 °C gelagert werden. Für einen 5 µL Reaktionsansatz der STA wurden je 1,25 µL synthetisierte cDNA mit 2,5 µL 2x TaqMan PreAmp Master Mix, 0,75 µL PCR-zertifiziertem Wasser und 0,5 µL *Pooled Primer Mix* versetzt, gemischt und nach unten zentrifugiert. Als Kontrolle wurde zudem eine nicht umgeschriebene RNA-Kontrolle (-RT) sowie eine Wasserkontrolle (NTC-STA) mitgeführt. Die STA erfolgte im *Thermocycler* nach folgendem Temperaturprogramm: 95 °C für 10 min, 12 Zyklen 95 °C für 15 s und 60 °C für 4 min, 4 °C Endtemperatur. Zum Verdau der ungebundenen Primer erfolgte ein Exonukleaseverdau nach den Herstellervorgaben. Hierfür wurden die Proben zunächst durchmischt, zentrifugiert und im Anschluss mit 1,4 µl PCR-zertifiziertem Wasser, 0,2 µl 10x Exonuklease I Reaktionspuffer und 0,4 µl Exonuklease I (20 Units/µL) versetzt. Es erfolgte erneut eine Durchmischung sowie eine Zentrifugation. Der Exonukleaseverdau erfolgte im *Thermocycler* nach folgendem Temperaturprogramm: 37 °C für 40 min, 80 °C für 15 min, 4 °C Endtemperatur. Die Proben wurden im Anschluss durchmischt, zentrifugiert und mit TE-Puffer 5-fach verdünnt. Die Proben wurden für maximal zwei Tage bei -20 °C gelagert.

#### 4.2.12.5 Primer- und Probenvorbereitung

Zur Vorbereitung der Primer wurden diese auf eine Arbeitskonzentration von 5  $\mu\text{M}$  verdünnt. Dazu wurden die *forward* und *reverse* Primer vereinigt und 2,5  $\mu\text{L}$  des Gemisches mit 25  $\mu\text{L}$  2x *Assay Loading Reagent* sowie 22,5  $\mu\text{L}$  DNA-Suspensionspuffer versetzt. Weiterhin wurde eine Wasserkontrolle (*no reaction control*, NRC) mitgeführt. Der vorbereitete Reaktionsmix der Primer wurde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Für die Probenvorbereitung wurden 2,25  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Probe mit 2,5  $\mu\text{L}$  2x *SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low ROX* und 0,25  $\mu\text{L}$  20x *DNA Sample Loading Reagent* versetzt, gemischt und zentrifugiert. Weiterhin wurde eine Wasserkontrolle (*no template control*, NTC) mitgeführt.

#### 4.2.12.6 96x96 Dynamic Array IFC qPCR Analyse

Nach den Vorgaben des Herstellers erfolgte die Vorbereitung und Beladung des *dynamic array IFC (integrated fluidic circuit)*. Hierfür wurden zunächst die Akkumulatoren des *dynamic array* mit 150  $\mu\text{L}$  Kontrollfluid befüllt, die Schutzfolie des Chips entfernt, der Chip in den *IFC Controller HX* gestellt und das Programm *Prime* (136x) gestartet. Hierdurch wurden die Mikrokanäle des Chips mit dem Fluid gespült. Innerhalb 1 h wurden je 5  $\mu\text{L}$  der vorbereiteten Proben und Primer möglichst luftblasenfrei in die Kavitäten des Chips pipettiert. Die Vermischung der Proben und Primer erfolgte im *IFC Controller HX* mit Hilfe des Programms *Load Mix* (136x). Eventuell anhaftende Staubpartikel auf der Chipoberfläche wurden durch einen Klebestreifen entfernt. Im Anschluss wurde der Chip in das BioMark™ HD System überführt. Die qPCR sowie die Schmelzkurvenanalyse erfolgte nach folgendem Temperaturprogramm:  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 2.400 s und  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 30 s für die thermale Durchmischung,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 60 s, 30 Zyklen  $96\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 5 s und  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 20 s,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 3 s gefolgt von einer Temperaturerhöhung von  $1\text{ }^{\circ}\text{C}/3\text{ s}$  auf  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  für die Schmelzkurvenanalyse.

#### 4.2.12.7 Datenanalyse und Auswertung

Die Datenanalyse und Auswertung der Genexpressionsanalyse wurde mit Hilfe der Programme *Fluidigm Real-Time PCR Analysis* und *GenEx* durchgeführt. Mittels *Fluidigm Real-Time PCR Analysis* konnte die gleichmäßige Beladung durch den Referenzfarbstoff ROX überprüft werden. Die  $C_q$ -Werte wurden anhand des Fluoreszenzfarbstoffs *EvaGreen®* ermittelt. Zur Präzisierung wurde die Schwellenwertmethode „*Auto detector*“ verwendet, die  $C_q$ -Werte als *Heat Map* dargestellt und als *Heat Map* extrahiert. Die erfolgreiche Durchführung der Analyse wurde zudem anhand

der Betrachtung der Negativkontrollen (-RT, NTC, NTC-STA und NRC) sichergestellt. Die weitere Verarbeitung der Daten erfolgte mittels *GenEx*.  $C_q$ -Werte über 25 wurden hierfür zunächst eliminiert. Im Anschluss erfolgte eine Normalisierung auf die Referenzgene (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB* und *HPRT1*). Zur Überprüfung der Güte der Referenzgene wurden die Funktionen *geNorm* und *Normfinder* angewandt. Im Anschluss wurde der  $C_q$ -Wert des Referenzgens vom  $C_q$ -Wert des Zielgens abgezogen und der  $\Delta C_q$ -Wert gebildet. Der  $\Delta C_q$ -Wert der Kontrolle wurde anschließend vom  $\Delta C_q$ -Wert der Behandlung abgezogen und der  $\Delta\Delta C_q$ -Wert erhalten. Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen Behandlung und der zugehörigen Kontrolle, normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, ergab sich aus der Formel  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  (Livak und Schmittgen, 2001). Für die weitere Auswertung wurde die relative Genexpression der Kontrolle auf 1 (lineare Darstellung), beziehungsweise auf 0 (logarithmische Darstellung) gesetzt. Veränderte sich die relative Genexpression aufgrund einer Behandlung um den Faktor 2, so wurde von einem relevanten Einfluss ausgegangen.

#### 4.2.13 Mikrokerntest am Durchflusszytometer

Zur Analyse von Mikrokerneln am Durchflusszytometer wurden ausschließlich Kerne vitaler Zellen betrachtet. Hierzu wurde die sogenannte Zweifarben-Fluoreszenz-Technik angewendet (Avlasevich *et al.*, 2006). Bei dieser Färbetechnik werden die Fluoreszenzfarbstoffe Ethidiummonoazid (EMA) und *SYTOX Green* verwendet. EMA kennzeichnet dabei apoptotische sowie nekrotische Zellen, da die Membran dieser Zellen für EMA durchlässig ist und es somit mit der DNA interkalieren kann. Eine kovalente Bindung des Farbstoffs an die DNA kann durch Photoaktivierung erreicht werden. Zur Analyse der Mikrokerne mussten die Zellen lysiert werden. Zusätzlich werden Zellkerne aller Zellen mittels *Sytox Green* angefärbt. Nekrotische und apoptotische Zellkerne weisen demzufolge ein EMA- und ein *Sytox Green*-Signal auf, Zellkerne vitaler Zellen ausschließlich ein *Sytox Green*-Signal.

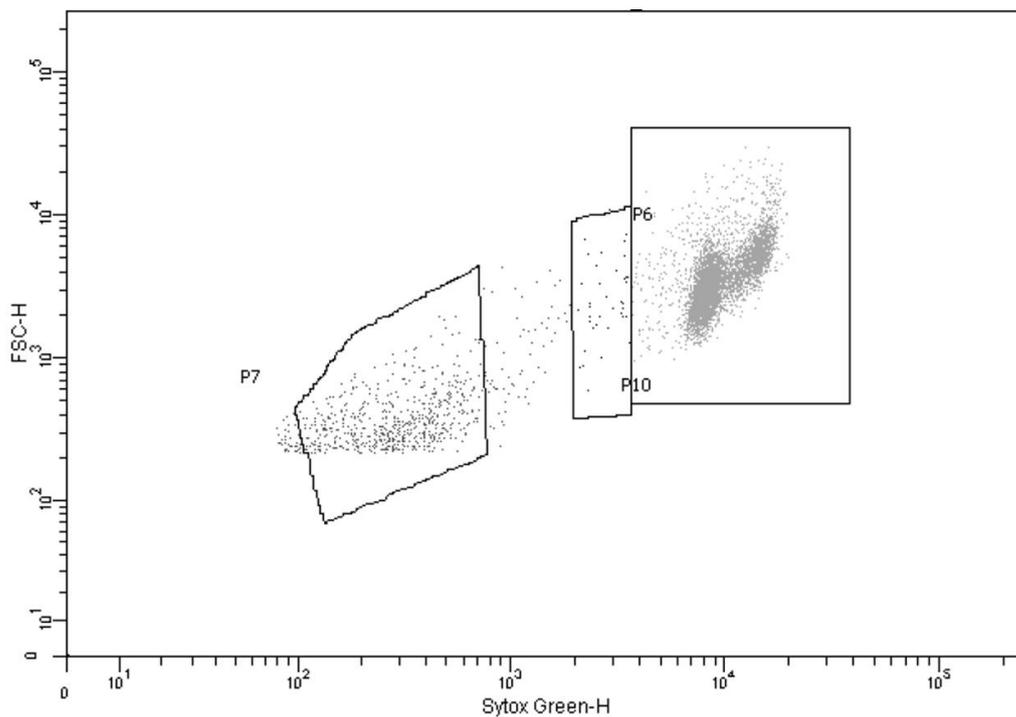
##### 4.2.13.1 Versuchsansatz

Es wurden je Ansatz  $1 \times 10^6$  HeLa S3-Zellen in eine Kavität ( $\square 1,86 \text{ cm}^2$ ) einer 24-Loch-Platte in je 1 mL DMEM ausgestreut. Die Zellen wurden mit je  $1 \mu\text{M}$  und  $5 \mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  in 1 mL frischem Medium, nach Kapitel 4.2.4, inkubiert. Es wurde eine Gesamtinkubationszeit von 26 h gewählt und die Zellen wurden teilweise mit 1 Gy bestrahlt (siehe Kapitel 4.2.6). Als Positivkontrolle für eine aneugene Wirkung wurden  $25 \mu\text{M}$  DES und für eine klastogene Wirkung  $0,025 \mu\text{M}$  Etoposid mitgeführt. Der Inkubationsabbruch erfolgte durch einen

Mediumwechsel. Es erfolgte eine weitere Nachinkubation ohne Arsen für 38 h im Inkubator, damit die Zellen den Zellzyklus mindestens einmal durchliefen.

#### 4.2.13.2 Probenaufarbeitung

Die 24-Loch Platte wurde 20 min auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt und je Kavität 300  $\mu\text{L}$  der Färbelösung A (enthält 8,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EMA) auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 15 min ohne Deckel auf Eis mit einer Kaltlichthalogenlampe (1.000 Watt) bestrahlt. Hierbei wurde ein Abstand von 15 cm zwischen der 24-Loch Platte und der Lampe eingehalten. Im Anschluss wurde Färbelösung A abgesaugt und mit 1 mL kaltem Puffer gewaschen. In jede Kavität wurden 500  $\mu\text{L}$  Lyselösung A (enthält 0,4  $\mu\text{M}$  SYTOX Green) gegeben. Die Zellen wurden nach vorsichtigem Schwenken für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 500  $\mu\text{L}$  Lyselösung B (enthält 0,4  $\mu\text{M}$  SYTOX Green) hinzupipettiert, vorsichtig geschwenkt und für weitere 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die erhaltene Suspension wurde in Durchflusszytometer-Röhrchen überführt.



**Abbildung 15: Exemplarische Darstellung eines Histogramms des Mikrokerneltests.** Zur Analyse der Mikrokerne werden nur vitale Zellen betrachtet. Nicht vitale Zellen werden durch Ethidiummonoazid (EMA)-Färbung ausgeschlossen. Weiterhin erfolgt eine DNA-Färbung mit SYTOX Green. Zellkerne vitaler Zellen sind vergleichsweise groß und weisen ein deutliches SYTOX Green-Signal auf (P6, rechts). Dementgegen sind Mikrokerne vergleichsweise klein und weisen ein geringes SYTOX Green-Signal auf (P7, links). Weiterhin findet sich eine Population, die ein etwas geringeres SYTOX Green-Signal aufweist als die normalen Zellkerne. Hierbei handelt es sich um die hypodiploiden Kerne (P10, Mitte).

#### 4.2.13.3 Analyse am Durchflusszytometer

Für die Mikrokernanalyse wurden 10.000 vitale Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers LRSII Fortessa untersucht. Hierbei wurde eine maximale Messgeschwindigkeit von 1000 Events/s eingehalten. Die eingestellte Extraktionswellenlänge betrug 488 nm. Die Emissionsdetektion erfolgte bei 575/26 nm (EMA) und 530/30 nm (*SYTOX Green*). Zur Darstellung der Zell- und Mikrokernverteilung erfolgte eine finale logarithmische Auftragung des Vorwärtsstreulichts gegen das *SYTOX Green*-Signal, nachdem das EMA-Signal ausgeschlossen wurde. Durch die Auftragung des Vorwärtsstreulichts gegen das *SYTOX Green*-Signal lässt sich zwischen klastogenen und aneugenen Effekten unterscheiden (Abbildung 15). Bei Schädigung der Chromosomen (klastogener Effekt) entstehen Mikrokerne, die deutlich kleiner sind als normale Zellkerne. Bei Schädigung des Spindelapparates (aneugener Effekt) entstehen zudem hypodiploide Kerne, die ein etwas kleineres Größenverhältnis aufweisen als normale Zellkerne.

Die Mikrokernuntersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Stephanie Habel im Rahmen ihrer Masterarbeit „Induktion von Mikrokernen und Genmutationen durch Antimon und Arsen“ durchgeführt.

#### 4.2.14 PIG-A-Genmutationstest

Der PIG-A-Genmutationstest beruht auf dem Glycosylphosphatidylinositol-Status (GPI) von Säugerzellen. Das *PIG-A*-Gen ist dabei an der Synthese des GPI-Ankers beteiligt. Eine Mutation in diesem Gen führt daher zu einem Verlust der Synthese. An den GPI-Anker binden verschiedene Oberflächenproteine. Diese Oberflächenproteine lassen sich mit Hilfe von spezifischen Phycoerythrin (PE)-fluoreszenzgekoppelten Antikörpern am Durchflusszytometer nachweisen. GPI-positive Zellen weisen demnach ein Fluoreszenzsignal auf, wohingegen GPI-negative Zellen keine Fluoreszenz aufweisen. Pseudomutanten werden mittels Allophycocyanin (APC)-Färbung von der Analyse ausgeschlossen (Krüger *et al.*, 2015).

##### 4.2.14.1 *Relative increase in cell counts*

Zur Festlegung eines geeigneten Konzentrationsbereichs für den PIG-A-Genmutationstests von Arsen in TK6-Zellen wurde die relative Zellzahlzunahme (*relative increase in cell counts*, RICC) bestimmt. Die höchste Behandlungsdosis sollte dabei einen RICC von 10 % bis 20 % nicht unterschreiten. Als Positivkontrolle wurde 200 µM EMS mitgeführt. Es wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in 10 mL RPMI-1640 pro Ansatz in eine ZKF ( $\square$  75 cm<sup>2</sup>) ausgestreut und, wie unter Kapitel 4.2.5 beschrieben, in Doppelbestimmung inkubiert und, wie unter

Kapitel 4.2.6 beschrieben, teilweise mit 1 Gy bestrahlt. Es wurde eine Gesamtinkubationszeit von 26 h festgelegt. Nach Abbruch der Inkubation durch Zentrifugation (250 g, 5 min, Raumtemperatur) wurde die Zellzahl bestimmt und 50.000 Zellen/500 µL in eine 24-Loch-Platte pipettiert. Jeder Ansatz wurde im Triplikat angesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde erneut die Zellzahl ermittelt und daraus die relative Zellzahlzunahme nach folgender Formel berechnet:

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

Die Festlegung eines geeigneten Konzentrationsbereichs für den PIG-A-Genmutationstests mittels RICC wurden in Zusammenarbeit mit Frau Stephanie Habel im Rahmen ihrer Masterarbeit „Induktion von Mikrokernen und Genmutationen durch Antimon und Arsen“ durchgeführt.

#### 4.2.14.2 Abreicherung der TK6-Zellen

Die Sensitivität des PIG-A-Genmutationstests ist abhängig von der Anzahl vorhandenen Mutationen im *PIG-A*-Gen. Aus diesem Grund muss zuvor eine Abreicherung der GPI-negativen Zellen erfolgen. Hierfür wurden Cellstar Zellkulturschalen (Ø 30 mm) mit je 1 mL Sekundärantikörper *Goat-anti-mouse* IgG (1:50 in PBS) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und mit 1 mL BSA-Lösung für 1 h bei Raumtemperatur auf der Schwenkplatte inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt und mit 1 mL der Primärantikörperlösung (1:50 in PBS) für 1 h auf der Schwenkplatte bei Raumtemperatur inkubiert. Als Primärantikörper dienten *Mouse-anti-human* CD59, *Mouse-anti-human* CD55 oder eine Kombination aus beiden. Nach der Inkubation wurde der Überstand abgesaugt und mit 1 mL PBS gewaschen. Je Schale wurden  $1 \times 10^6$  TK6-Zellen in 1 ml RPMI-1640 pipettiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und viermal vorsichtig mit 1 mL RPMI-1640 gewaschen. Darauf folgend wurden die Zellen viermal mit einem 1 mL RPMI-1640 abgelöst, suspendiert und in eine ZKF (□ 75 cm<sup>2</sup>) mit 10 mL vorgelegtem RPMI-1640 überführt. Das Ablösen der Zellen wurde kontinuierlich mikroskopisch kontrolliert. Die abgereicherten Zellen wurden subkultiviert und anschließend kryokonserviert (siehe Kapitel 4.2.3).

#### 4.2.14.3 Versuchsansatz

Es wurden abgereicherte TK6-Zellen aufgetaut und für maximal 7 Tage kultiviert. Je Versuchsansatz wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in 10 ml RPMI-1640 in eine ZKF (□ 75 cm<sup>2</sup>)

ausgestreut und, wie unter Kapitel 4.2.5 beschrieben, in Doppelbestimmung inkubiert und, wie unter Kapitel 4.2.6 beschrieben, teilweise mit 1 Gy bestrahlt. Es wurde eine Gesamtkubationszeit von 26 h gewählt. Als Positivkontrolle wurde 200  $\mu$ M EMS mitgeführt. Nach Abbruch der Inkubation durch Zentrifugation (250 g, 5 min, Raumtemperatur) wurde die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden 10 Tage subkultiviert.

#### 4.2.14.4 Probenaufarbeitung

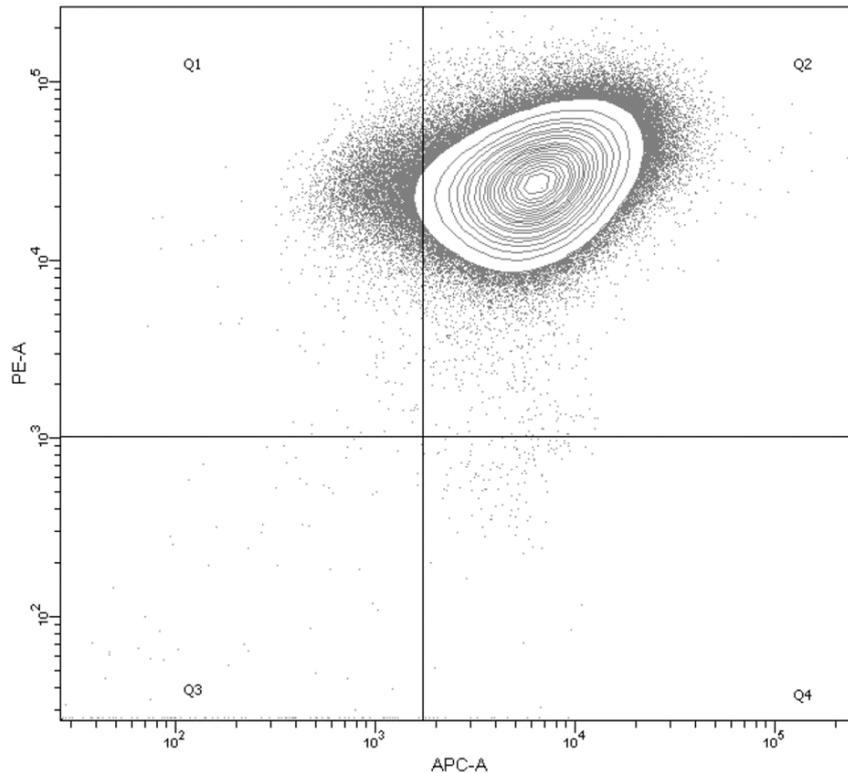
Nach Bestimmung der Zellzahl wurden je Ansatz  $8 \times 10^6$  Zellen in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (250 g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und anschließend unter nicht sterilen Bedingungen, jedoch im Dunkeln und auf Eis, gefärbt. Hierfür wurden die Zellen in 3 mL Färbepuffer aufgenommen und dreimal je 750  $\mu$ L der Zellsuspension in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden zentrifugiert (250 g, 5 min, 4 °C), der Überstand entfernt und auf den Rückstand 150  $\mu$ L Färbepuffer gegeben. Es wurde 20 s mittels Tischzentrifuge zentrifugiert und 15  $\mu$ L Antikörperlösung (3  $\mu$ L CD19, 6  $\mu$ L CD55, 6  $\mu$ L CD59) hinzupipettiert. Es wurde 20 s auf dem Schüttler Vortex-Genie® 2 geschüttelt und für 15 min auf der Schwenkplatte im Dunkeln auf Eis inkubiert. Der Vorgang der Zentrifugation, des Schüttelns und der Inkubation wurde wiederholt und im Anschluss wurde erneut zentrifugiert (250 g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgeschüttelt und der Rückstand mit je 1 mL Färbepuffer gewaschen. Hierfür wurde 40 s auf dem Schüttler geschüttelt, zentrifugiert (250 g, 5 min, 4 °C) und der Überstand entfernt. Der Rückstand wurde in 500  $\mu$ L 7-AAD Puffer aufgenommen, 20 s auf dem Schüttler belassen und 8 min im Dunkeln auf Eis auf der Schwenkplatte inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert (250 g, 5 min, Raumtemperatur) und die Zellen jedes Reaktionsgefäßes einzeln fixiert. Hierfür wurde der Überstand entfernt und je 200  $\mu$ L Fixierpuffer und 2,5  $\mu$ L Actinomycin D-Lösung (10 mg/mL in DMSO) hinzugefügt. Es wurde 3 s geschüttelt und die Reaktionsgefäße im Dunkeln auf Eis gelagert. Für die Messung am Durchflusszytometer wurde gründlich suspendiert und die Lösung in ein Durchflusszytometer-Röhrchen überführt.

#### 4.2.14.5 Analyse am Durchflusszytometer

Für die Analyse der *PIG-A*-Mutationsfrequenz wurden 1.000.000 Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers LRSII Fortessa untersucht. Hierbei wurde eine maximale Messgeschwindigkeit von 10.000 Events/s eingehalten. Die eingestellte Extraktionswellenlänge betrug 488 nm für PE und 640 nm für APC. Die Emissionsdetektion erfolgte bei 575/26 nm (PE) und 670/14 nm (APC). Zur Darstellung der Mutationsfrequenz

erfolgte eine finale logarithmische Auftragung des PE- gegen das APC-Signal (Abbildung 16).

Der PIG-A-Genmutationstest wurden in Zusammenarbeit mit Frau Stephanie Habel im Rahmen ihrer Masterarbeit „Induktion von Mikrokernen und Genmutationen durch Antimon und Arsen“ durchgeführt.



**Abbildung 16: Exemplarische Darstellung eines Histogramms des PIG-A-Genmutationstests.** Zur Analyse der Glykosylphosphatidylinositol-defizienten (GPI) Zellen werden nicht vitale-Zellen mittels 7-Aminoactinomycin D (7-AAD)-Färbung ausgeschlossen. Die Färbung des GPI-Ankers erfolgt durch Pycoerythrin (PE)-Kopplung. Falsch positive Ergebnisse werden durch Allophycocyanin (APC)-Kopplung ausgeschlossen. GPI-positive Zellen weisen damit ein PE- und APC-Signal (Q2, recht oben) und GPI-negative Zellen ein APC- aber kein PE-Signal (Q4, rechts unten) auf.

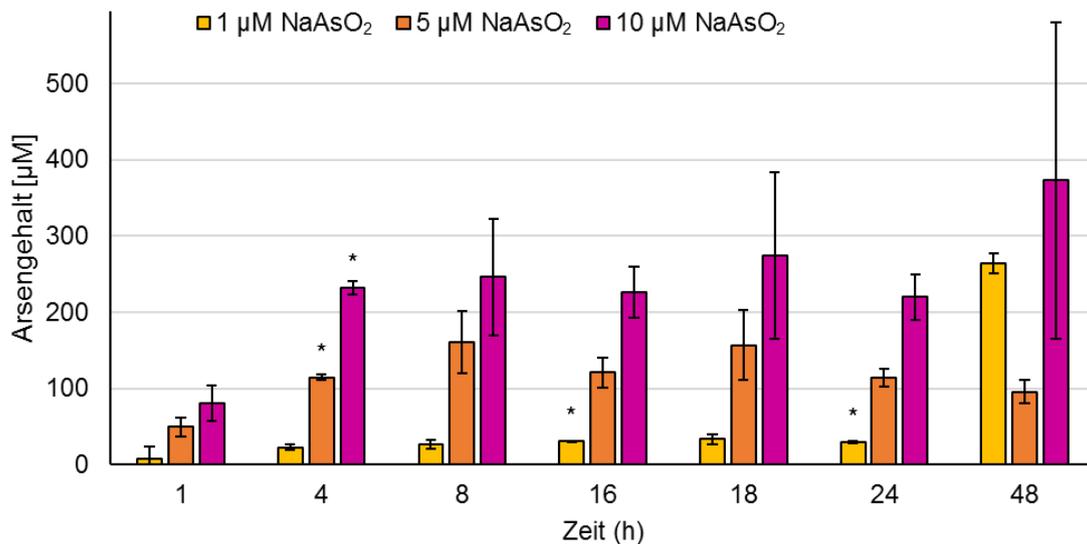
#### 4.2.15 Statistik

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Die Mittelwerte wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) verglichen. Im Falle einer Varianzhomogenität wurde der Dunnett's T' als Post-Hoc-Test verwendet, im Falle einer Inhomogenität der Varianz Dunnett's T3.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Zelluläre Aufnahme von Arsenit in HeLa S3-Zellen

Zur Ermittlung der zellulären Aufnahme von Arsen wurden HeLa S3-Zellen zeit- und konzentrationsabhängig inkubiert (Abbildung 17). Eine Arsenkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  zeigte bereits nach 8 h die maximale zelluläre Aufnahme. Dementgegen konnte bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  NaAsO<sub>2</sub> eine maximale zelluläre Aufnahme erst nach 18 h beobachtet werden. Vorangegangene Untersuchungen innerhalb des Arbeitskreises erfolgten ebenfalls mit einer Inkubationsdauer von 18 h in HeLa S3-Zellen (Hartwig *et al.*, 2003; Schwerdtle *et al.*, 2003b). Für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde daher eine Vorinkubationszeit von 18 h gewählt. Eine etwaige Bestrahlung erfolgte anschließend.



**Abbildung 17: Zelluläre Aufnahme von Arsenit in HeLa S3-Zellen.** HeLa S3-Zellen wurden mit Arsenkonzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  bis 10  $\mu\text{M}$  für 1 h bis 48 h inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens vier Bestimmungen aus mindestens drei Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (\* $p \leq 0,05$ ).

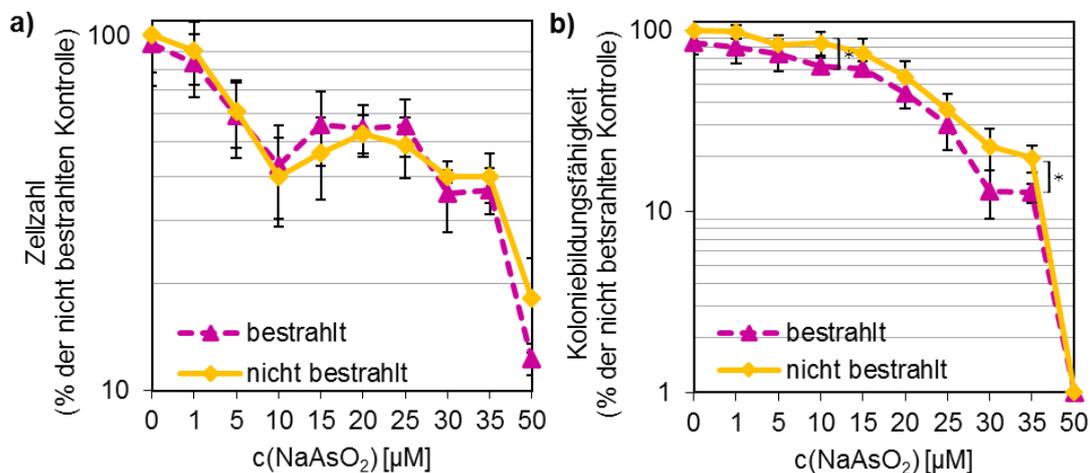
### 5.2 Zytotoxizität von Arsenit in HeLa S3-Zellen

Für nachfolgende Experimente musste ein geeigneter Konzentrationsbereich zur Behandlung mit Arsenit festgelegt werden. Hierfür wurden die Parameter der Zellzahl sowie der Koloniebildungsfähigkeit, zur Untersuchung der Zytotoxizität, herangezogen. Zur Untersuchung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur mussten Doppelstrangbrüche durch Röntgenstrahlung induziert werden, daher wurden sowohl nicht bestrahlte als auch

bestrahlte Proben betrachtet. Für die Zytotoxizitätsanalysen wurde eine Nachinkubationszeit von 8 h gewählt. Hieraus ergab sich für Arsen eine Gesamtinkubationszeit von 26 h. Abbildung 18 zeigt die erhaltenen Ergebnisse der Zytotoxizitätsanalysen.

Die Zellzahl nahm konzentrationsabhängig durch Arsenit ab (Abbildung 18 a). Bereits eine Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  führte zur einer Reduktion um 10 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Zellzahl reduzierte sich bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  um weitere 50 % und lag im zytotoxischen Bereich. Inkubationen mit 15  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$  Arsenit zeigten gegenüber 10  $\mu\text{M}$  Arsenit einen leichten Anstieg der Zellzahl, wohingegen bei 30  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  erneut eine Zellzahl von 40 % im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden konnte.

Die konzentrationsabhängige Abnahme der Zellzahl bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  konnte bereits in anderen Arbeiten in HeLa sowie HeLa S3-Zellen gezeigt werden (Hartwig *et al.*, 2003; Ting *et al.*, 2010; Islam *et al.*, 2015). Die leichte Zunahme der Zellzahl ab einer Konzentration von 15  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  könnte durch ein Aussetzen des Zellzyklusarrests begründet sein. Jiang *et al.* (2013) konnten dies bereits für Arsentrioxid, jedoch nicht für Natriumarsenit, in A549-Zellen feststellen.



**Abbildung 18: Einfluss von Arsenit auf die Zellzahl (a) und Koloniebildungsfähigkeit (b) von HeLa S3-Zellen.** Die Zellen wurden für 26 h mit Arsenkonzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  bis 50  $\mu\text{M}$  inkubiert und ausgezählt; eine Bestrahlung (1 Gy) erfolgte nach 18 h. Zur Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit wurde für weitere 7 - 10 Tage subkultiviert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der nicht bestrahlten Probe nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (\*  $p \leq 0,05$ ). Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der y-Achsen.

Hier nahm bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$   $\text{As}_2\text{O}_3$  der Zellanteil in der  $G_1$ -Phase wieder zu. In der vorliegenden Arbeit kam es nach Inkubation mit 30  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  zu einer deutlichen Abnahme der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle, was vermutlich aus der Zunahme der apoptotischen Vorgänge resultiert. Bei einer Konzentration von 8  $\mu\text{M}$   $\text{As}_2\text{O}_3$  ergab sich in bisherigen Untersuchungen in humanen Brustkrebszellen (MCF-7) eine Steigerung der Apoptose um 30 % (Wang *et al.*, 2011). Diesbezüglich sollten in der vorliegenden Arbeit weiterführende, spezifische Untersuchungen folgen, um den Einfluss der Apoptose auf die Abnahme der Zellzahl zu verifizieren. Ebenso sollten die Effekte auf den Zellzyklus genauer betrachtet werden.

Die zusätzlich bestrahlten Proben zeigten einen analogen Einfluss auf die Zellzahl. Eine Bestrahlung ohne Arseninkubation bewirkte dabei lediglich eine Reduktion der Zellzahl um 5 % im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle.

Anhand der Koloniebildungsfähigkeit (Abbildung 18 b) war, wie bei der Zellzahluntersuchung, ein konzentrationsabhängiger Rückgang durch Arsenit zu beobachten. Das Ergebnis, das bei den nicht bestrahlten Proben beobachtet wurde, konnte die Ergebnisse bereits vorangegangene Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe bestätigen (Hartwig *et al.*, 2003; Schwerdtle *et al.*, 2003a). Im Konzentrationsbereich von 1  $\mu\text{M}$  bis 10  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  konnten moderat toxische Einflüsse auf die Koloniebildungsfähigkeit von maximal 15 % festgestellt werden. Ab einer Konzentration von 15  $\mu\text{M}$  zeigten sich deutliche zytotoxische Effekte.

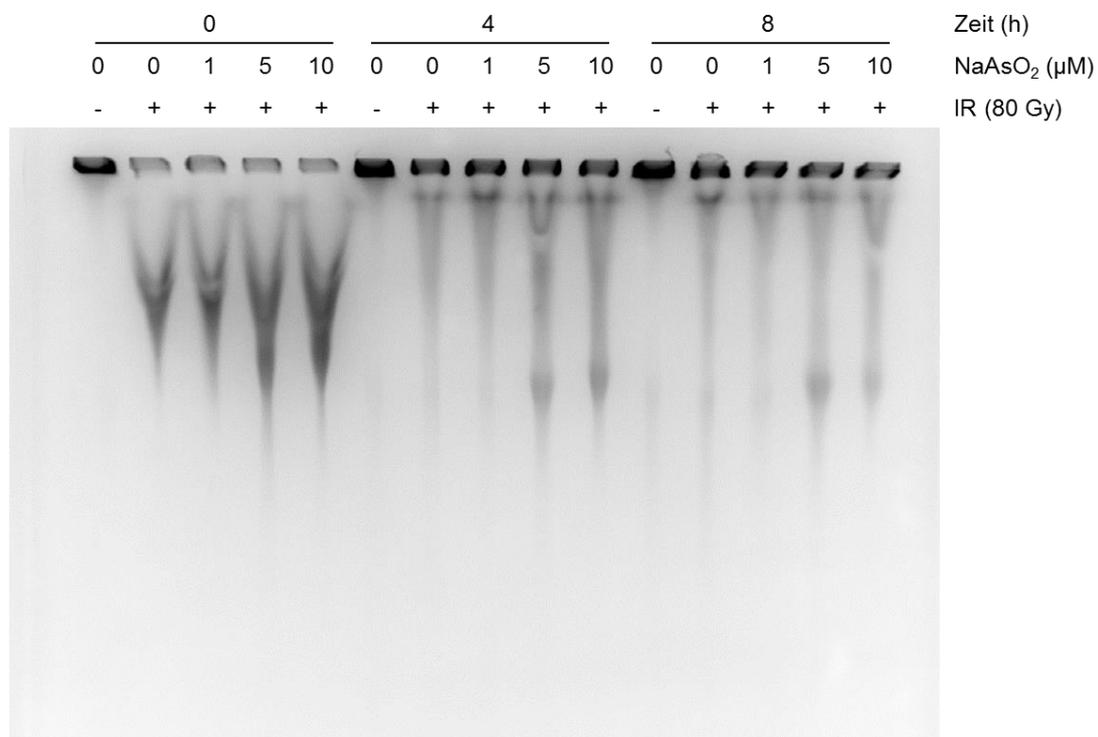
Eine alleinige Bestrahlung führte zu einer Reduktion der Koloniebildungsfähigkeit um 15 % im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle. Durch eine kombinierte Bestrahlung mit Arsenbehandlung konnte, ebenso wie bei der Zellzahl, kein additiver Effekt nachgewiesen werden.

Beide Parameter verdeutlichen, dass eine Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Arsenit nicht toxisch für die verwendeten HeLa S3-Zellen war. Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  ließen sich ebenfalls nur moderat toxische Effekte verzeichnen. Demzufolge konnten die beiden Konzentrationen 1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  für alle Folgeversuche verwendet werden. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Arsenit zeigte sich anhand der Zellzahl ein zytotoxischer Effekt; durch die Koloniebildungsfähigkeit jedoch nicht. Diese Konzentration wurde daher nicht für sensitive Methoden, wie beispielsweise die Immunfluoreszenzfärbung, verwendet.

### 5.3 Einfluss von Arsenit auf die DNA-Doppelstrangbruchreparatur

Einleitend wurde detailliert auf die Interaktionen von Arsen mit spezifischen Proteinen der verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen eingegangen. Bei den bisherigen Untersuchungen wurden vor allem Proteine der SSBR und der BER, der NER sowie der MMR betrachtet (Hartwig *et al.*, 1997; Hartwig *et al.*, 2003; Schwerdtle *et al.*, 2003a; Ebert *et al.*, 2011; Treas *et al.*, 2013; Holcomb *et al.* 2017; Wu *et al.*, 2017). Wie bereits dargestellt, ist sowohl über den Einfluss von Arsen auf die DNA-Doppelstrangbruchreparatur generell als auch auf die Reparaturproteine im Spezifischen nur wenig bekannt. Hierbei konnte bisher gezeigt werden, dass Arsen die Anlagerung von BRCA1 und Rad51 inhibiert (Zhang *et al.*, 2014).

Um den allgemeinen Einfluss auf beide Reparaturwege der DNA-Doppelstrangbruchreparatur zu untersuchen, wurde zunächst die PFGE durchgeführt. Hierbei können DNA-Doppelstrangbrüche direkt über ein Agarosegel detektiert werden. Die PFGE ermöglicht ein Auftrennen von DNA-Abschnitten bis zu einer Größe von 10 Mbp; die konventionelle Gelelektrophorese erlaubt eine Auftrennung von DNA-Fragmenten von maximal 50 kbp (Herschleb *et al.*, 2007).

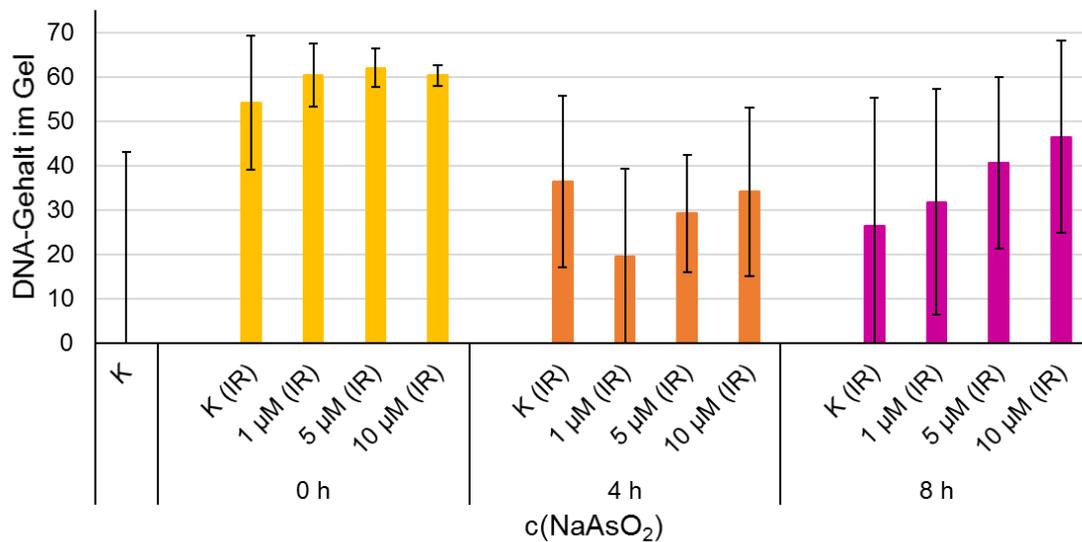


**Abbildung 19: Exemplarisches Agarosegel einer Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE).** Dargestellt ist ein repräsentatives Gel nach 18 h Vorinkubation der HeLa S3-Zellen mit Arsen (1 - 10 μM), Bestrahlung (IR) mit 80 Gy und 0 h bis 8 h Nachinkubation. Eine nicht bestrahlte Kontrolle wurde mitgeführt.

Bei der PFGE handelt es sich um eine direkte Nachweismethode, für die jedoch Strahlendosen von 80 Gy zur Induktion der DNA-Doppelstrangbrüche benötigt werden. Im untersuchten Zeitraum führte die hohe Strahlendosis zu keinem signifikanten Unterschied der Zellzahl im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle (Anhang, Abbildung 51). Abbildung 19 zeigt einen repräsentativen Gellauf der PFGE zur Untersuchung des Einflusses von Arsenit auf die DNA-Doppelstrangbruchreparatur.

Nach 0 h Reparaturzeit war ein hohes Maß der DNA-Schädigung durch die Bestrahlung sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit von Arsen ersichtlich. Dies äußerte sich anhand eines niedrigen DNA-Gehalts in der Geltasche, wohingegen viel DNA im Gel detektiert werden konnte. Eine Reparatur der induzierten DNA-Doppelstrangbrüche wurde anhand der bestrahlten Kontrolle verdeutlicht. Die anteilige DNA der bestrahlten Kontrolle im Gel nahm über den zeitlichen Verlauf ab und die anteilige DNA in der Tasche zu. Es ist zudem deutlich zu erkennen, dass es zu einer konzentrationsabhängigen Beeinflussung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur nach 4 h Reparaturzeit durch Arsen kam. Im Fall der bestrahlten Kontrolle sowie der 1  $\mu\text{M}$  Arsenitbehandlung waren deutlich weniger DNA-Fragmente im Agarosegel erkennbar als bei Konzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$ . Dieser Effekt war weiterhin nach einer Reparaturzeit von 8 h zu beobachten. Dies zeigte ein erhöhtes Vorkommen nicht reparierter DNA-Doppelstrangbrüche bei Inkubation mit höheren Arsenkonzentrationen (ab 5  $\mu\text{M}$ ) an. Die quantitative Auswertung über den DNA-Gehalt im Gel wird in Abbildung 20 dargestellt; bei fortschreitender Reparatur nimmt der DNA-Gehalt im Gel ab.

Die quantitative Auswertung der PFGE zeigt, dass die Bestrahlung mit 80 Gy nach 0 h Reparaturzeit eine Zunahme des DNA-Gehalts im Gel um 55 % verursachte. Diese Zunahme konnte sowohl in der bestrahlten Kontrolle als auch in den bestrahlten Arsenbehandlungen (1  $\mu\text{M}$  – 10  $\mu\text{M}$ ) gleichermaßen beobachtet werden. Anhand der bestrahlten Kontrolle konnte im zeitlichen Verlauf eine Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche über die Reduktion des DNA-Gehalts im Gel detektiert werden. Nach 0 h Reparaturzeit befanden sich 55 %, nach 4 h nur noch 35 % und nach 8 h 25 % der DNA im Gel. Nach 8 h Reparaturzeit konnten die beobachteten Effekte im Gellauf auch quantitativ eindeutig erfasst werden. Demnach zeigte sich eine von der Arsenkonzentration abhängige Zunahme des DNA-Gehalts im Gel. Obwohl diese Zunahme aufgrund der Schwankungen nicht signifikant war, konnte durch die quantitative Auswertung verdeutlicht werden, dass Arsen die Mechanismen der DNA-Doppelstrangbruchreparatur beeinflusst.



**Abbildung 20: Quantitative Auswertung der Pulsfeldgelelektrophorese über den DNA-Gehalt im Gel.** HeLa S3-Zellen wurden für 18 h mit Arsen ( $1 \mu\text{M}$  –  $10 \mu\text{M}$ ) vorinkubiert, bestrahlt (80 Gy) und für 0 h, 4 h oder 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  Standardabweichung.

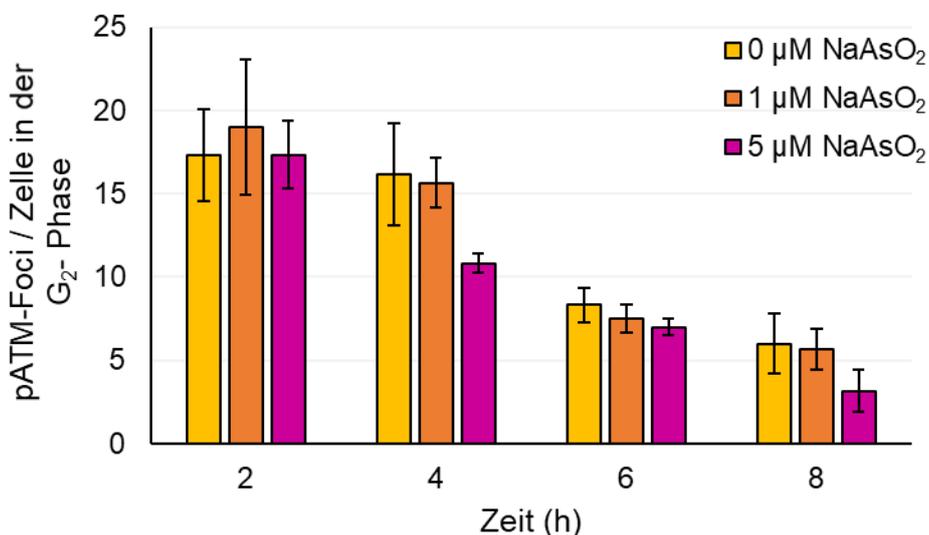
Die Beeinflussung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur via PFGE konnte ebenfalls in chinesischen Hamsterzellen gezeigt werden. In dieser Studie von Takahashi *et al.* (2000) wurden DNA-Doppelstrangbrüche mit einer Strahlendosis von 40 Gy induziert. Aufgrund der Behandlung mit Arsen zeigte sich eine verminderte Reparatur der vorhandenen DNA-Doppelstrangbrüche. Dieser Effekt war in den Zellen des chinesischen Hamsters deutlicher als in den HeLa S3-Zellen der vorliegenden Arbeit.

Bei der PFGE ist eine Unterscheidung zwischen den beiden Reparaturwegen – NHEJ und HR – nicht möglich. Aus diesem Grund wurde die Immunfluoreszenzfärbung als sensitive, indirekte Nachweismethode herangezogen. Hierfür wurden in der vorliegenden Arbeit zur gleichzeitigen Untersuchung beider Reparaturwege Zellen in der  $G_2$ -Phase ausgewertet. Dies begründet sich darin, dass die NHEJ in beiden Zellzyklusphasen stattfinden kann, wohingegen die HR auf das Vorliegen des Schwesterchromatids in der  $G_2$ -Phase angewiesen ist. Zudem konnte mittels Immunfluoreszenzfärbung der nicht bestrahlten Proben gezeigt werden, dass Arsen alleine keine DNA-Doppelstrangbrüche verursacht (siehe Anhang, Abbildung 52). Mei *et al.* (2003) wiesen in GM43-Zellen ebenfalls nach, dass eine Arsenbehandlung zu keiner signifikanten Steigerung von DNA-Doppelstrangbrüchen führte.

### 5.3.1 Einfluss von Arsenit auf die Schadenserkennung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur

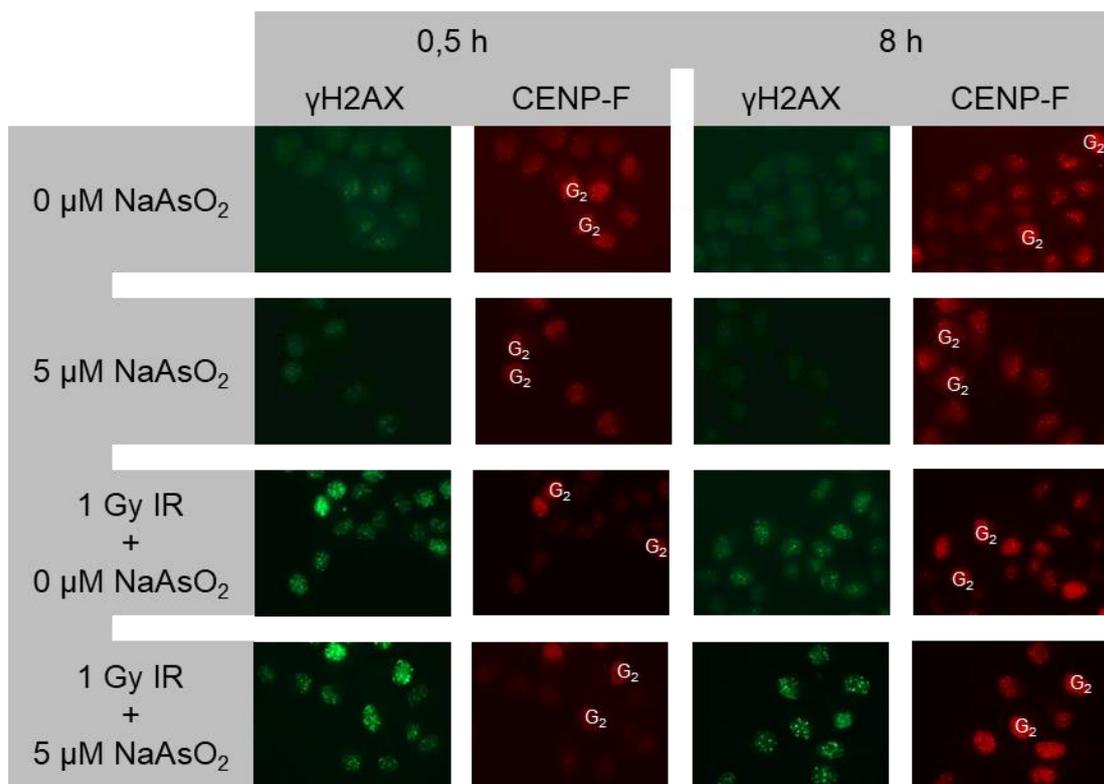
#### 5.3.2.1 Einfluss von Arsenit auf phospho-ATM

Einleitend wurde bereits beschrieben, dass die wichtigsten Transduktoren zur Weiterleitung des Schadenssignals die PI3K sind. Im Falle eines DNA-Doppelstrangbruchs ist ATM die aktivierte Kinase. ATM kommt zellulär inaktiv als Dimer vor. Die Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung. Infolge von Röntgenbestrahlung erfolgt die Phosphorylierung an Serin 367, 1893, 1981 und 2996. Zudem gibt es eine Phosphorylierungsstelle am Threonin 1885, die jedoch nicht durch Röntgenstrahlung aktiviert wird. Das aktivierte ATM startet die Signalkaskade und phosphoryliert unter anderem das Histon H2AX; es entsteht  $\gamma$ H2AX, der am häufigsten verwendete DNA-Doppelstrangbruchmarker (Kurz und Lees-Miller, 2004; Martin und Bonner, 2006; zusammengefasst in Shiloh, 2001; Redon *et al.*, 2010; 2011). Zur Untersuchung der korrekten Signalweiterleitung durch ATM an H2AX in Anwesenheit von Arsen wurde daher zunächst die Aktivierung von ATM am Serin 1981 durch die Immunfluoreszenzfärbung mit einem spezifischen Antikörper betrachtet (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Einfluss von Arsenit auf die Reparatur induzierter DNA-Doppelstrangbrüche in der G<sub>2</sub>-Phase mittels Immunfluoreszenzfärbung von phospho-ATM.** HeLa S3-Zellen wurden für 20 h - 26 h mit Arsenit (1  $\mu$ M – 5  $\mu$ M) inkubiert. DNA-Doppelstrangbrüche wurden nach 18 h durch Röntgenstrahlung (1 Gy) induziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. Diese Analyse wurde unter Anleitung von Rebecca Niemand von Frau Stephanie Ziemann im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

In der nicht behandelten Kontrolle zeigte sich eine Reduktion der Foci-Anzahl von 17 Foci nach 2 h auf 6 Foci nach 8 h Reparaturzeit. Auch in Anwesenheit von Arsen konnte der gleiche Abbau der phospho-ATM-Foci detektiert werden. Es ergab sich zu keinem betrachteten Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und den Arsenbehandlungen. Das erhaltene Ergebnis deutet darauf hin, dass die Aktivierung von ATM nicht durch Arsen beeinträchtigt wird. Ob die Signalweiterleitung in der Folge korrekt abläuft, musste mittels Immunfluoreszenzfärbung weiterer DNA-Doppelstrangbruchmarker verifiziert werden.

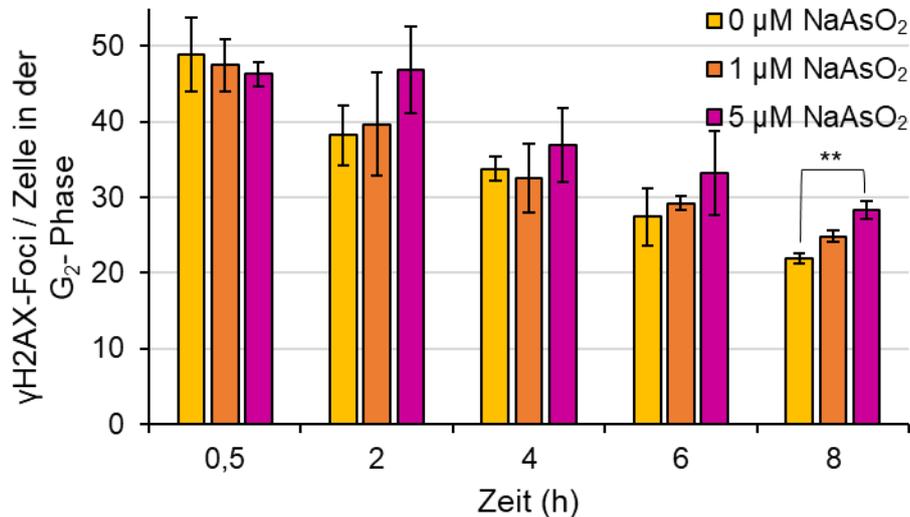


**Abbildung 22: Exemplarische Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ H2AX in HeLa S3-Zellen.** Die Zellen wurden für 18 h mit Arsen (0  $\mu$ M, 5  $\mu$ M) inkubiert, mit 1 Gy zur DNA-Doppelstrangbruchinduktion bestrahlt (IR) oder nicht bestrahlt und für maximal 8 h mit Arsen nachinkubiert. Die Zellen wurden gegen  $\gamma$ H2AX angefärbt und die Zellzyklusphase wurde mittels CENP-F-Färbung identifiziert. Diese Analyse wurde unter Anleitung von Rebecca Niemand von Frau Vivien Haberland im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt.

### 5.3.1.2 Einfluss von Arsenit auf $\gamma$ H2AX

Wie bereits erläutert, wird  $\gamma$ H2AX am häufigsten für den Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels Immunfluoreszenzfärbung verwendet (Martin und Bonner, 2006; zusammengefasst in Redon *et al.*, 2010; 2011). Zu Beginn der spezifischen mechanistischen Untersuchung der NHEJ und der HR wurde aus diesem Grund ebenfalls der Einfluss von Arsen auf die Phosphorylierung des Histons H2AX untersucht. Die Phosphorylierung zu  $\gamma$ H2AX erfolgt aufgrund entstandener DNA-Doppelstrangbrüche. Jeweils ein Focus repräsentiert dabei einen DNA-Doppelstrangbruch (zusammengefasst in Kuo und Yang, 2008). Abbildung 22 zeigt eine Übersicht der Foci-Formation von  $\gamma$ H2AX.

Der Vergleich der nicht bestrahlten  $5 \mu\text{M}$  Arsenitbehandlung mit der nicht behandelten Kontrolle verdeutlichte, dass durch Arsen alleine keine detektierbaren  $\gamma$ H2AX-Foci und damit auch keine DNA-Doppelstrangbrüche entstehen. Dementgegen konnten durch die Bestrahlung mit 1 Gy DNA-Doppelstrangbrüche induziert werden. Es ist deutlich ersichtlich, dass bei einer Reparaturzeit von 0,5 h bereits Foci detektiert werden konnten.



**Abbildung 23: Einfluss von Arsenit auf die Reparatur induzierter DNA-Doppelstrangbrüche in der  $G_2$ -Phase mittels Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ H2AX.** HeLa S3-Zellen wurden für 18,5 h - 26 h mit Arsenit ( $1 \mu\text{M}$  –  $5 \mu\text{M}$ ) inkubiert. DNA-Doppelstrangbrüche wurden nach 18 h durch Röntgenstrahlung (1 Gy) induziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der zugehörigen Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (\*\*  $p \leq 0,01$ ). Diese Analyse wurde unter Anleitung von Rebecca Niemand von Frau Vivien Haberland im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt.

Nach fortschreitender Reparaturzeit (8 h) war eine deutliche Abnahme der Foci-Anzahl ersichtlich. Hierbei schien eine 5  $\mu\text{M}$  Behandlung mit Arsen einen leichten Einfluss auf die Reparatur der DNA zu nehmen, da eine erhöhte Foci-Anzahl im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle zu erkennen war. Die quantitative Auswertung (Abbildung 23) unterstützt diese Beobachtung. In der bestrahlten Kontrolle ergab sich im zeitlichen Ablauf eine deutliche Reduktion der Foci von etwa 50 auf circa 20 innerhalb der  $G_2$ -Phase. Bei einer Behandlung der Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  Arsen zeigte sich im Reparaturverlauf eine leichte Erhöhung auf 25 Foci nach 8 h Reparaturzeit. Diesem Trend folgend zeigte sich bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  eine Erhöhung auf etwa 30 Foci.

Beucher *et al.* (2009) postulierten, dass in der  $G_2$ -Phase DNA-Doppelstrangbrüche zunächst über das NHEJ repariert werden. Die HR repariert demnach nur circa 15 % der DNA-Doppelstrangbrüche. Im Allgemeinen handelt es sich bei dem NHEJ um den schnellen Reparaturmechanismus und bei der HR um den langsamen. Daraus lässt sich schließen, dass das NHEJ die frühzeitige Reparatur (2 Stunden – 4 Stunden) und die HR die späte Reparatur (8 Stunden) von DNA-Doppelstrangbrüchen übernimmt. Darauf basierend könnte der 8 h Punkt einen Hinweis darauf geben, dass die HR durch Arsen inhibiert wird.

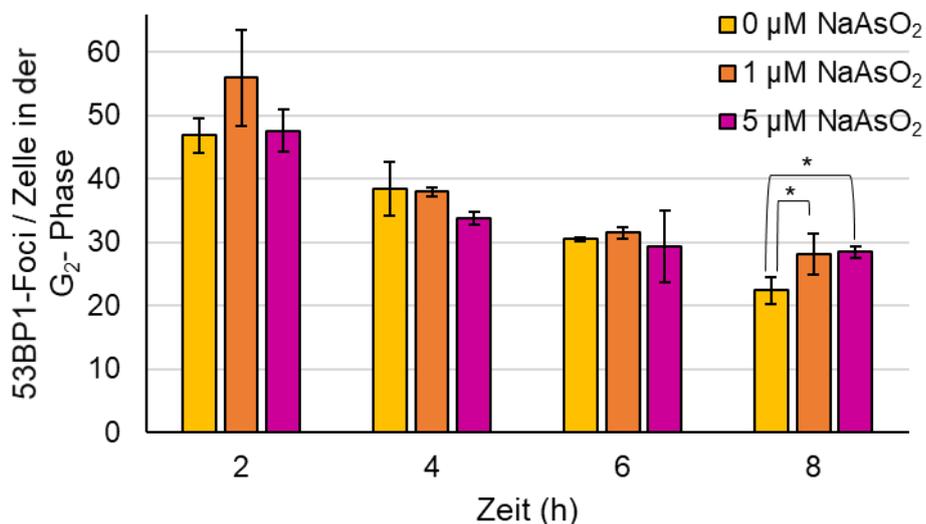
Die Phosphorylierung des Histons H2AX kann jedoch auch durch oxidative Effekte induziert werden. Am Beispiel von Wasserstoffperoxid wurde beschrieben, dass normalerweise sehr wenig DNA-Doppelstrangbrüche detektiert werden. Jedoch kommt es bei hohen Dosen zur massiven Schädigung der DNA durch Einzelstrangbrüche. Diese DNA-Einzelstrangbrüche überlappen und damit ist ihre Reparatur abhängig von den Reparaturwegen für DNA-Doppelstrangbrüche. In der Folge wird H2AX phosphoryliert (zusammengefasst in Löbrich *et al.*, 2010).

### 5.3.1.3 Einfluss von Arsenit auf 53BP1

Um weiterführend abzusichern, dass durch die Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma\text{H2AX}$  ausschließlich die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen berücksichtigt wurde, wurde ebenfalls 53BP1 (p53 *binding protein* 1) zur Untersuchung der initialen DNA-Doppelstrangbruchreparatur herangezogen. 53BP1 kolokalisiert mit  $\gamma\text{H2AX}$ -Foci sowie mit Mre11/Rad50/Nbs1-Foci. Es bindet bereits nach 5 - 15 min an den DNA-Doppelstrangbruch. Nach einer Reparaturzeit von 15 - 50 min lassen sich Foci in behandelten HeLa-Zellen detektieren (Schultz *et al.*, 2000; Suchánková *et al.*, 2015). Die Reparaturkinetik von 53BP1 wird in Abbildung 24 dargestellt.

In der bestrahlten Kontrolle konnte eine fortschreitende Reparatur der induzierten DNA-Doppelstrangbrüche beobachtet werden. Die Foci-Anzahl nahm kontinuierlich über den zeitlichen Verlauf von 47 Foci auf 22 Foci innerhalb der G<sub>2</sub>-Phase ab. In den frühen Reparaturzeitpunkten (2 h – 6 h) zeigte sich keine Beeinflussung durch Arsen. Nach einer Reparaturzeit von 8 h konnte hingegen eine konzentrationsunabhängige leichte Erhöhung der Foci-Anzahl auf 28 festgestellt werden. Dieser Einfluss auf 53BP1 kräftigt die erhaltenen Ergebnisse des Einflusses auf  $\gamma$ H2AX. Es konnte gezeigt werden, dass die Schadenserkennung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur nicht durch Arsenit beeinflusst wurde.

Beide Reparaturfaktoren zeigten eine nur leichte Erhöhung der Foci-Anzahl nach einer Reparaturzeit von 8 h infolge einer Behandlung mit Arsenit. Wie bereits beschrieben, könnte dies nach Beucher *et al.* (2009) darauf hindeuten, dass die späte DNA-Doppelstrangbruchreparatur im Vergleich zur frühen DNA-Doppelstrangbruchreparatur durch Arsen beeinflusst wird. Dementsprechend wäre die NHEJ durch Arsen nicht beeinflusst, die HR hingegen schon. Um den Einfluss von Arsen auf die einzelnen Reparaturwege genauer zu untersuchen, wurden spezifische Markerproteine betrachtet.

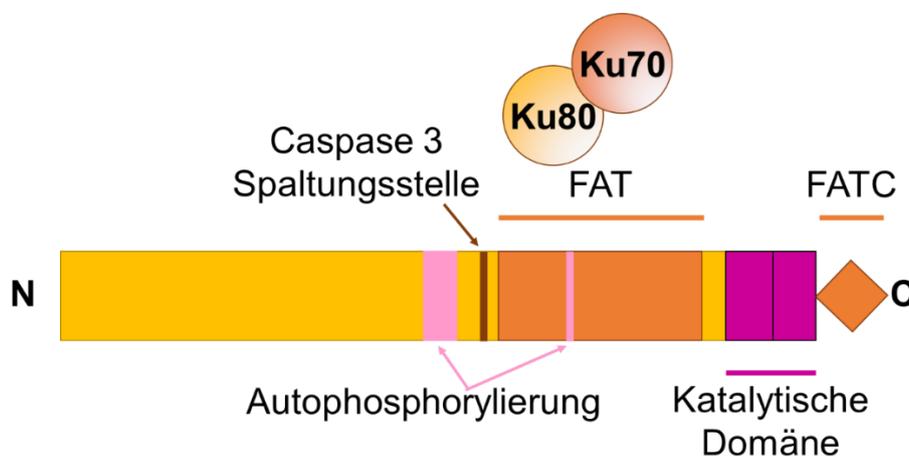


**Abbildung 24: Einfluss von Arsenit auf die Reparatur induzierter DNA-Doppelstrangbrüche in der G<sub>2</sub>-Phase mittels Immunfluoreszenzfärbung von 53BP1.** HeLa S3-Zellen wurden für 20 h - 26 h mit Arsenit (1  $\mu$ M – 5  $\mu$ M) inkubiert. DNA-Doppelstrangbrüche wurden nach 18 h durch Röntgenstrahlung (1 Gy) induziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (\*  $p \leq 0,05$ ).

### 5.6.2 Einfluss von Arsenit auf das nicht-homologe *end-joining*

Um den spezifischen Einfluss von Arsen auf das NHEJ mittels Immunfluoreszenzfärbung zu untersuchen, wurde die katalytische Untereinheit der DNA-PK als Marker des Reparaturwegs betrachtet. Bei DNA-PKcs handelt es sich um ein Protein, das ausschließlich an dem Reparaturweg des NHEJ beteiligt ist. DNA-PKcs besitzt ein Molekulargewicht von 469 kDa und stellt damit die größte Proteinkinase dar (Abbildung 25). Zudem ist sie die einzige Kinase, die spezifisch durch Bindung an doppelsträngige DNA-Enden aktiviert wird (zusammengefasst in Dobbs *et al.*, 2010; Lieber, 2010).

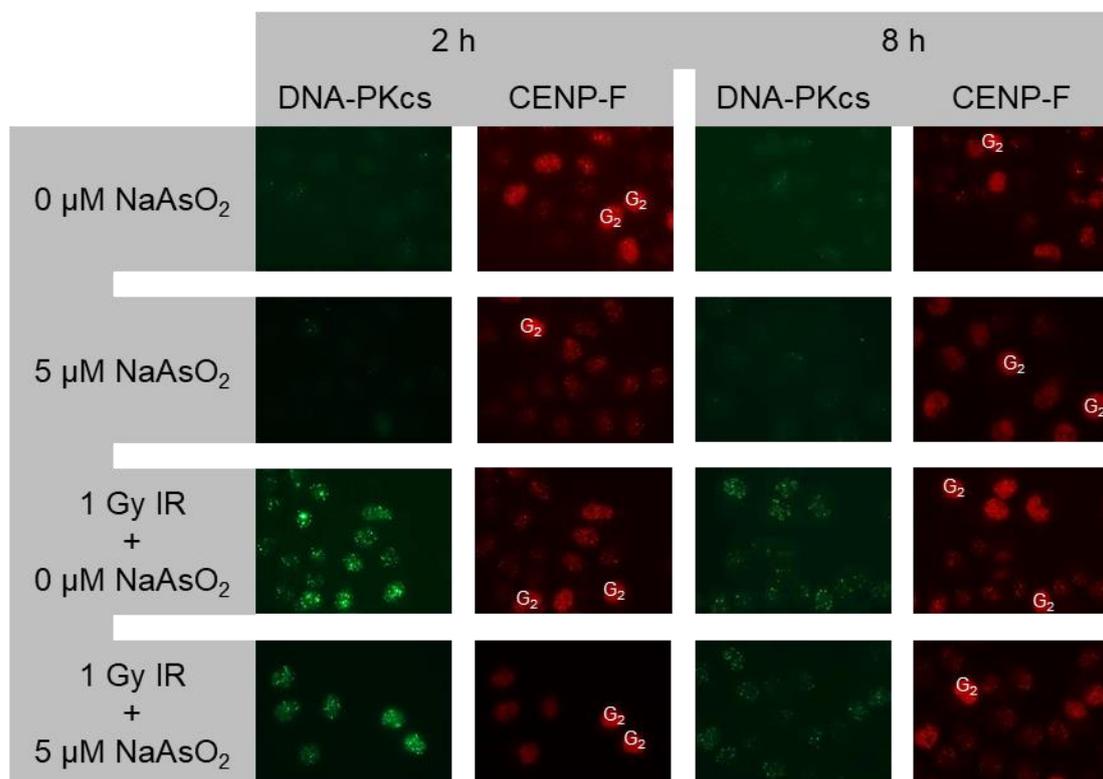
DNA-PKcs verfügt über die Eigenschaft, sich selbst in Clustern zu autophosphorylieren, wodurch die Affinität zur DNA abnimmt und die Kinaseaktivität abgeschaltet wird. Diese Affinitätsänderung ergibt sich aus einer Konformationsänderung. DNA-PKcs fungiert damit als sogenannter „Gatekeeper“ (Uematsu *et al.*, 2007). Im nicht phosphorylierten Zustand beeinträchtigt DNA-PKcs aufgrund seiner Molekülgröße die Ligation der DNA-Enden und verfügt über eine Dissoziationsgleichgewichtskonstante von  $3 \times 10^{-9}$  M. Durch die Konformationsänderung werden die DNA-Enden jedoch wieder zugänglich. DNA-PKcs schützt damit die DNA-Enden vor vorzeitigem Prozessieren und Ligation (Uematsu *et al.*, 2007; zusammengefasst in Lieber, 2010).



**Abbildung 25: Proteinstruktur der katalytischen Untereinheit der DNA-Proteinkinase (DNA-PKcs) (modifiziert nach Rivera-Calzada *et al.*, 2005; Lieber, 2010).** DNA-PKcs verfügt über zwei Autophosphorylierungsdomänen und eine Caspase 3-Spaltungsstelle im mittleren Bereich. Am C-terminalen Ende befindet sich die FATC-Region. Hierbei handelt es sich um eine Erweiterung der katalytischen Domäne, die das Ende des C-Terminus bildet. Im Anschluss an die katalytische Domäne befindet sich die FAT-Region. Diese Region besitzt eine schwache Konservierung, jedoch eine hohe Ku-Bindungs-fähigkeit.

Zusammen mit dem Heterodimer Ku70/Ku80 bildet DNA-PKcs die aktive DNA-PK. Hierbei wird die Bindung von DNA-PKcs an die DNA-Enden verstärkt. Die Dissoziationsgleichgewichtskonstante beträgt innerhalb des Komplexes  $3 \times 10^{-11}$  M. DNA-PKcs ist essentiell für den korrekten Ablauf des NHEJ. Inhibitoren oder Mutationen, die zum Verlust der Kinaseaktivität führen, resultieren in einer gesteigerten Sensitivität gegenüber Strahlung sowie in Defekten der DNA-Doppelstrangbruchreparatur (zusammengefasst in Dobbs *et al.*, 2010).

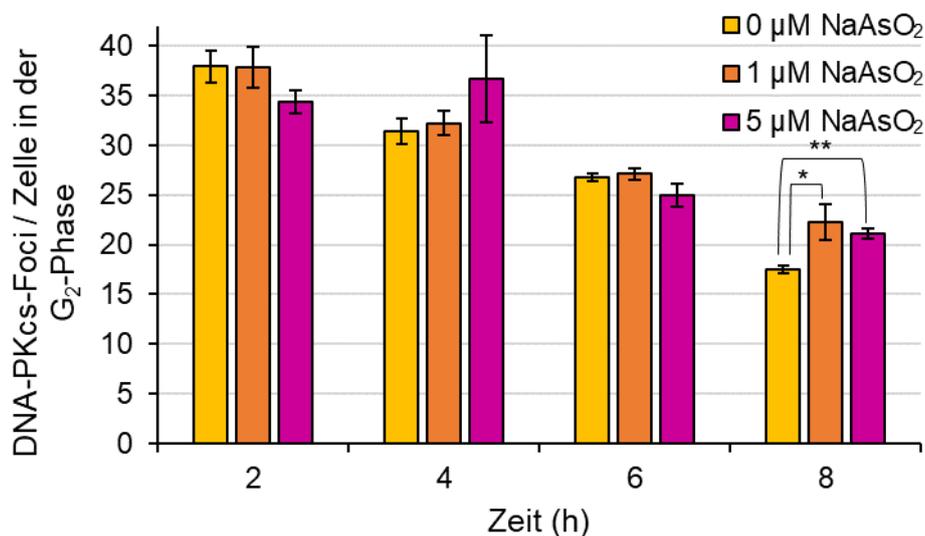
Eine weitere Besonderheit dieses Reparaturfaktors besteht darin, dass infolge eines DNA-Doppelstrangbruchs DNA-PKcs am Threonin 2609 phosphoryliert wird, wodurch die Detektion als IRIF ermöglicht wird (Chan *et al.*, 2002). Aus diesem Grund wurde ein Antikörper spezifisch für diese Phosphorylierung verwendet. Die Übersicht der zeit- und konzentrationsabhängigen Formation der Foci wird in Abbildung 26 dargestellt.



**Abbildung 26: Exemplarische Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung von DNA-PKcs in HeLa S3-Zellen.** Die Zellen wurden für 18 h mit Arsen (0 µM, 5 µM) inkubiert, mit 1 Gy zur DNA-Doppelstrangbruchinduktion bestrahlt (IR) oder nicht bestrahlt und für maximal 8 h mit Arsen nachinkubiert. Die Zellen wurden gegen DNA-PKcs angefärbt und die Zellzyklusphase wurde mittels CENP-F-Färbung identifiziert.

Anhand der exemplarischen Aufnahmen wird deutlich, dass Arsen alleine nicht zu einer Ausbildung von DNA-PKcs-Foci beiträgt; dies bestätigt erneut, dass Arsen keine DNA-Doppelstrangbrüche induziert. Nach 2 h Reparaturzeit konnte im Falle einer Bestrahlung eine Ausbildung von Foci nachgewiesen werden. Die Inkubation mit Arsen beeinflusste diesen Vorgang nicht. Im zeitlichen Verlauf (2 h – 8 h) wurde eine Abnahme der Foci deutlich. Auch hierbei zeigte die Inkubation mit Arsen keinen Einfluss. In Abbildung 27 wird die quantitative Auswertung der Reparaturkinetik von DNA-PKcs dargestellt.

Die Kontrolle zeigte im zeitlichen Ablauf eine Reduktion der Foci in der G<sub>2</sub>-Phase von 38 auf 17. Es konnte kein Einfluss durch eine Inkubation mit Arsen bei den kürzeren Reparaturzeiten (2 h – 6 h) festgestellt werden. Erst bei einer Reparaturzeit von 8 h ergab sich ein konzentrationsunabhängiger Einfluss durch Arsen. Hierbei wurden circa 5 Foci mehr detektiert als in der zugehörigen Kontrolle. Aufgrund der Immunfluoreszenzfärbung von DNA-PKcs lässt sich daher schließen, dass Arsen keinen oder nur einen sehr schwachen Einfluss auf den Reparaturverlauf der NHEJ nimmt.



**Abbildung 27: Einfluss von Arsenit auf die Reparatur induzierter DNA-Doppelstrangbrüche in der G<sub>2</sub>-Phase mittels Immunfluoreszenzfärbung von DNA-PKcs.** HeLa S3-Zellen wurden für 20 h - 26 h mit Arsenit (1 μM – 5 μM) inkubiert. DNA-Doppelstrangbrüche wurden nach 18 h durch Röntgenstrahlung (1 Gy) induziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen ± Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (\* p ≤ 0,05, \*\* p ≤ 0,01).

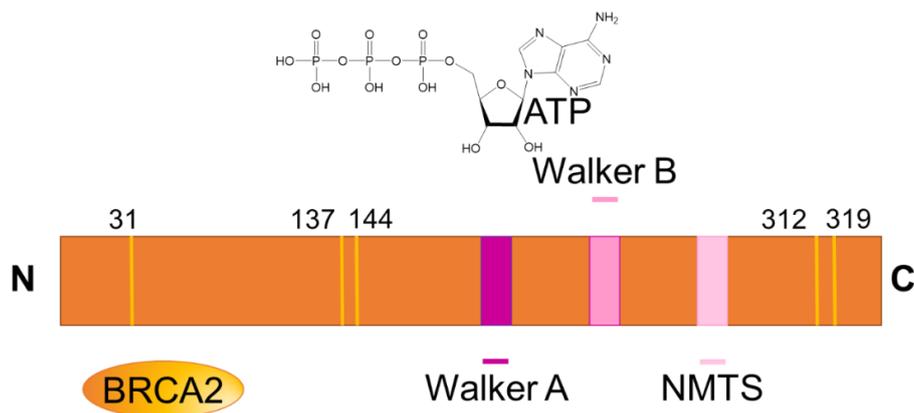
Die erhaltenen Ergebnisse werden durch Versuche mit EJ5-GFP-Zellen unterstützt. Hierbei handelt es sich um die bereits beschriebenen transfizierten U2OS-Zellen. Das transfizierte GFP-markierte Plasmid beinhaltet zudem einen GFP-signalhemmenden Abschnitt, welcher im Falle eines DNA-Doppelstrangbruchs und darauf folgender Reparatur durch das NHEJ entfernt wird; es kommt zu einem detektierbaren GFP-Signal. Mit Hilfe dieser Zellen konnte nach 72 h Behandlung mit  $\text{NaAsO}_2$  (1 - 5  $\mu\text{M}$ ) festgestellt werden, dass die Reparaturkapazität durch das NHEJ bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  nur leicht beeinflusst wurde (Morales *et al.*, 2016).

### 5.6.3 Einfluss von Arsenit auf die homologe Rekombination

#### 5.6.3.1 Einfluss von Arsenit auf Rad51

Um den Einfluss von Arsen auf die HR zu untersuchen, wurde zunächst Rad51 als spezifischer Marker betrachtet. Rad51 eignet sich als kennzeichnendes Markerprotein, da es ausschließlich an der HR beteiligt ist und die HR ohne Rad51 zum Erliegen kommt (Sak *et al.*, 2005; zusammengefasst in Heyer *et al.*, 2010).

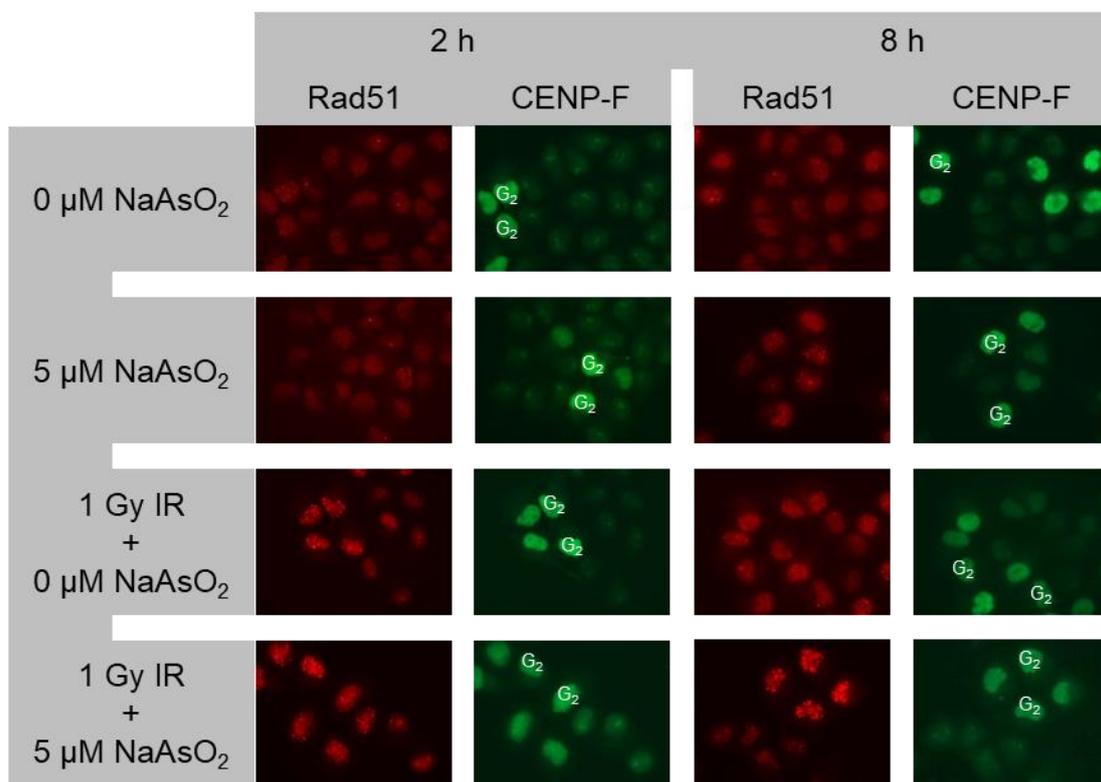
Rad51 (Abbildung 28) stellt das humane Homologe zur *E. coli* Rekombinase RecA dar. Durch Studien in den 1960er Jahren konnte gezeigt werden, dass RecA eine bedeutende Rolle bei der HR einnimmt sowie die Sensitivität der Zellen gegenüber DNA-schädigenden Agenzien beeinflusst. 1992 wurde das erste RecA-Homologe in Eukaryoten nachgewiesen.



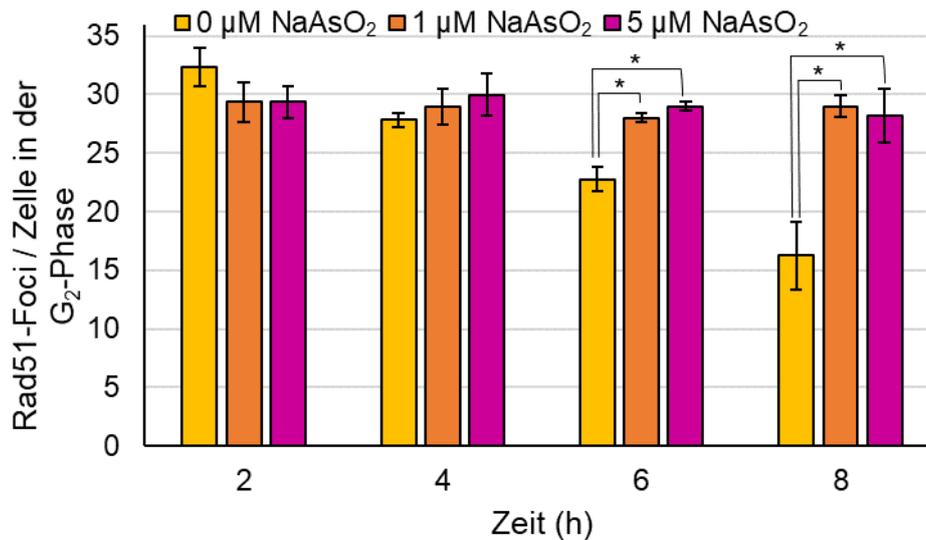
**Abbildung 28: Proteinstruktur von Rad51 (modifiziert nach Mladenov *et al.*, 2009; Modesti *et al.*, 2007).** Rad51 verfügt über ein Walker A- und ein Walker B-Motiv sowie eine ATP-Bindungsstelle im mittleren Proteinbereich. Eher am C-terminalen Ende lokalisiert, findet sich eine *nuclear matrix targeting signal* (NMTS)-Region. NMTS-Regionen sind wichtig für die Funktionalität von Proteinen und ermöglichen die Kommunikation mit der Kernmatrix. Meistens stimmen sie unter anderem mit der DNA-Bindungsstelle überein. Die Interaktion mit BRCA2 (*breast cancer 2*) erfolgt am N-terminalen Ende. Weiterhin verfügt Rad51 über fünf Thiolgruppen, welche für die Ausbildung des Nukleotidfilaments wichtig sind.

Bei Rad51 handelt es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von 36,9 kDa. Das Protein kann sowohl einzel- als auch doppelsträngige DNA binden und weist eine DNA-abhängige ATPase Aktivität auf (Baumann *et al.*, 1996; zusammengefasst in Baumann und West, 1998). Ebenso wie die bakterielle Rekombinase RecA übernimmt Rad51 eine essentielle Funktion bei der HR. Rad51 bindet dabei über fünf Cysteine an die prozessierten DNA-Überhänge, windet sich als Nukleotidfilament um diese und vermittelt die Paarung der homologen Sequenzen sowie den Strangaustausch (Baumann *et al.*, 1996; Modesti *et al.*, 2007; zusammengefasst in Mazin *et al.*, 2010).

Abbildung 29 zeigt mikroskopische Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung von Rad51 in HeLa S3-Zellen. Wie bei der Untersuchung von  $\gamma$ H2AX und DNA-PKcs ist wiederum ersichtlich, dass Arsen keine DNA-Doppelstrangbrüche induziert.



**Abbildung 29: Exemplarische Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung von Rad51 in HeLa S3-Zellen.** Die Zellen wurden für 18 h mit Arsen (0  $\mu$ M, 5  $\mu$ M) inkubiert, teilweise mit 1 Gy bestrahlt (IR) und für maximal 8 h mit Arsen nachinkubiert. Die Zellen wurden gegen Rad51 und CENP-F gefärbt.



**Abbildung 30: Einfluss von Arsenit auf die Reparatur induzierter DNA-Doppelstrangbrüche in der G<sub>2</sub>-Phase mittels Immunfluoreszenzfärbung von Rad51.** HeLa S3-Zellen wurden für 20 h - 26 h mit Arsenit (1  $\mu\text{M}$  – 5  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. DNA-Doppelstrangbrüche wurden nach 18 h durch Röntgenstrahlung (1 Gy) induziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (\*  $p \leq 0,05$ ).

Der frühe Fixierzeitpunkt (2 h) verdeutlicht, dass Arsen die Anlagerung von Rad51 an den DNA-Doppelstrangbruch nicht beeinflusste. Dementgegen ist anhand des späten Fixierpunkts (8 h) deutlich zu erkennen, dass durch die Inkubation mit Arsen der Abbau der Rad51-Foci inhibiert wurde; in den mit 5  $\mu\text{M}$  Arsen behandelten Zellen sind deutlich mehr Foci zu erkennen, als in den Zellen der bestrahlten Kontrolle.

Die quantitative Auswertung der Rad51-Foci (Abbildung 30) zeigte einen kontinuierlichen Reparaturverlauf der Kontrolle. Im Gegensatz dazu zeigte sich aufgrund der Behandlung mit Arsen ein konzentrationsunabhängiger Einfluss auf die Dissoziation des Reparaturproteins. Nach 8 h stellte sich ein signifikanter Unterschied der behandelten Proben von 15 Foci im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle ein. Arsen inhibierte demnach konzentrationsunabhängig den Abbau der Foci, jedoch nicht die Anlagerung von Rad51 nach 2 h Reparaturzeit. Diese Ergebnisse widersprechen der Studie von Zhang *et al.*, (2014). In dieser Studie wurden HeLa-Zellen für 8 h mit Arsenkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  inkubiert. DNA-Doppelstrangbrüche wurden gezielt mittels Laser (Pulsdauer: 3 ns, Pulsfrequenz: 10 Hz, Wellenlänge: 365 nm, Leistung: 0,7 nW) induziert. Nach einer Reparaturzeit von 10 min wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Die Betrachtung unter dem Mikroskop

zeigte, dass bereits eine Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  die Assoziation von Rad51 vollständig inhibierte (Zhang *et al.*, 2014). Im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit wurden in der Studie von Zhang *et al.* (2014) deutlich kürzere Reparaturzeiten betrachtet, da mittels Laserbestrahlung gezielt einzelne DNA-Doppelstrangbrüche in der Zelle induziert werden konnten. Die gezielte Induktion ermöglicht die Betrachtung früherer Reparaturzeitpunkte, da sich der Reparaturfaktor nur an wenige DNA-Doppelstrangbrüche anlagern muss und sich somit schnell Foci ausbilden. Durch Röntgenbestrahlung werden hingegen eine Vielzahl DNA-Doppelstrangbrüche erzeugt, demnach kann erst zu späteren Zeitpunkten eine Foci-Bildung beobachtet werden, da sich der Reparaturfaktor an viele Doppelstrangbrüche anlagern muss. Diesbezüglich zeigte Liu (2002) dass nach einer Bestrahlung mit 8 Gy und einer Nachinkubationszeit von 30 min in V79-Zellen keine Rad51-Foci detektiert werden konnten, nach einer Reparaturzeit von 2 h jedoch schon. Weiterhin konnten ebenfalls keine Rad51-Foci nach einer Bestrahlung mit 10 Gy und einer Fixierzeit von 1 h in humanen Fibroblasten detektiert werden (Raderschall *et al.*, 1999).

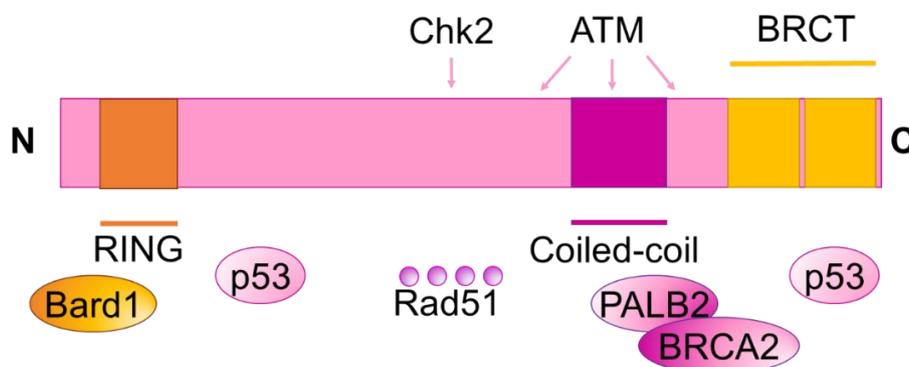
Zhang *et al.* (2014) untersuchten in ihrer Studie weiterhin BRCA1, welches für die korrekte und schnelle Anlagerung von Rad51 verantwortlich ist. Hierbei wurde ebenfalls als Folge einer 5  $\mu\text{M}$  Arsenbehandlung keine Anlagerung von BRCA1 festgestellt. Der dargestellte Effekt von Arsen auf Rad51 könnte daher auf einer veränderten Anlagerung von Rad51 durch das vorangeschaltete Protein BRCA1 beruhen. Zur Anlagerung an den Schaden wird Rad51 an BRCA2 gebunden. BRCA2 wiederum interagiert über das Brückenprotein PALB2 mit BRCA1. BRCA1 übernimmt die Aufgabe der Stabilisierung von PALB2 am DNA-Schaden (Sy *et al.*, 2009). Um die Zusammenhänge des Einflusses von Arsen auf Rad51 eingehender zu untersuchen, wurde daher der Effekt von Arsen auf BRCA1 untersucht.

Eine weitere mögliche Erklärung für die Auswirkungen einer Arsenbehandlung auf die Rad51-Foci könnte im falschen oder nicht vorhandenen Abbau von Rad51 durch das nachgeschaltete Protein Rad54 begründet sein. Rad54 stabilisiert die Rad51-Bindung an einzel- und doppelsträngige DNA und ist für dessen Abbau verantwortlich. Rad54 verfügt, wie bereits beschrieben, über eine Zink-bindende Struktur und könnte daher selbst durch Arsen beeinflusst werden (zusammengefasst in Mazin *et al.*, 2010). Aus diesem Grund wurde nachfolgend die Beeinflussung von Rad54 durch Arsen untersucht.

### 5.6.3.2 Einfluss von Arsenit auf BRCA1

*BRCA1* ist ein Tumorsuppressorgen. Das dadurch codierte gleichnamige Protein BRCA1, mit einem Molekulargewicht von 220 kDa, spielt eine wichtige Rolle als Transkriptionsfaktor, bei der Zellzykluskontrolle sowie der DNA-Schadensantwort und der DNA-Reparatur (zusammengefasst in Miki *et al.*, 1994; O'Donovan und Livingston, 2010). BRCA1 kann in drei funktionelle Regionen eingeteilt werden (Abbildung 31).

Am C-terminalen Ende befindet sich zwei tandemförmige BRCT-Domänen (*BRCA1 carboxy terminus*). Diese Domänen ermöglichen Protein-Protein Interaktionen mit beispielsweise Phosphopeptiden der Zellzykluskontrolle und Proteinen der DNA-Schadensantwort. Weiterhin ist über die BRCT-Domänen eine indirekte Bindung an die DNA möglich (zusammengefasst in Jiang und Greenberg, 2015). Am N-terminalen Ende findet sich die RING-Domäne (*really interesting new gene*). Strukturell wird diese Domäne durch sieben Cysteine und ein Histidin sowie zwei komplexierte Zinkionen koordiniert. RING-Domänen interagieren meist mit RING-Domänen anderer Ringfingerproteine. BRCA1 bildet beispielsweise ein Heterodimer mit BARD1 (*BRCA1-associated RING Domain-1*); dieses Heterodimer stellt eine E3-Ubiquitinligase dar.



**Abbildung 31: Proteinstruktur von *breast cancer 1* (BRCA1) (modifiziert nach Rosen, 2013; Mark *et al.*, 2005; O'Donovan und Livingston, 2010).** Am N-terminalen Ende von BRCA1 befindet sich die *really interesting new gene* (RING)-Domäne. Hier ist die Interaktion mit BARD1 (*BRCA1-associated RING domain-1*) möglich. Zellulär kommt BRCA1 als Heterodimer mit BARD1 vor. Im mittleren Bereich befinden sich die Phosphorylierungsstellen von Chk2 (*Checkpoint kinase 2*) und ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*), wodurch eine Aktivierung von BRCA1 erfolgt. Zudem befindet sich die Bindungsstelle für Rad51 im mittleren Proteinbereich. Die *coiled-coil* Domäne dient zur Bindung von PALB2 (*partner and localizer of BRCA2*), das Brückenprotein für BRCA1 und BRCA2. Am C-terminalen Ende sind die tandemförmigen *BRCA-terminal* (BRCT)-Domänen zu finden. Weiterhin verfügt BRCA1 über zwei Bindungsstellen für p53.

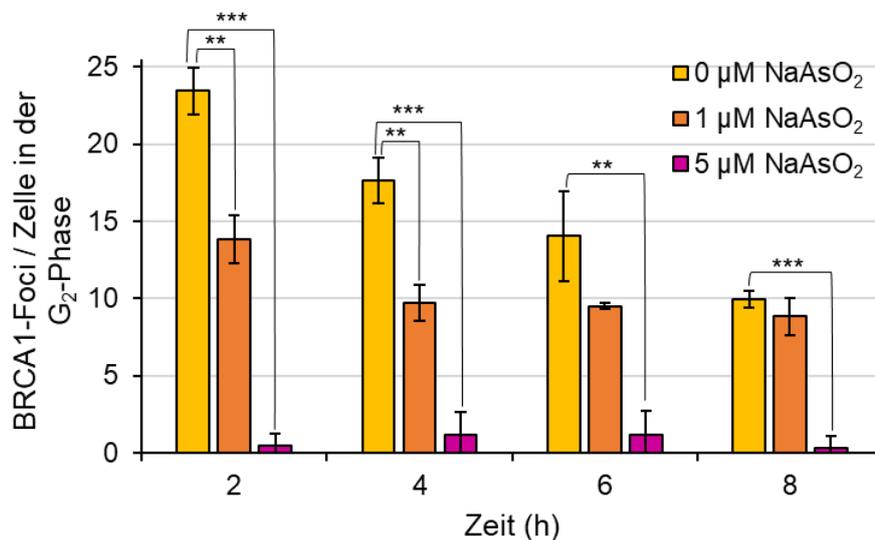
Weiterhin stellt das Heterodimer die Stabilität von BRCA1 sicher, da nicht gebundenes BRCA1 intrazellulär instabil ist und einem schnellen Abbau unterliegt (zusammengefasst in O'Donovan und Livingston, 2010; Jiang und Greenberg, 2015). Im mittleren Bereich des Proteins befinden sich die Bindungsstellen verschiedener Proteine. Unter anderem kommt es in diesem Bereich zur Bindung von PALB2 an die *coiled-coil* Bindungsstelle. PALB2 ist ein wichtiges Brückenprotein zwischen BRCA1 und BRCA2. Der aus BRCA1, BRCA2 und PALB2 gebildete Komplex stellt, wie bereits beschrieben, die korrekte Anlagerung von Rad51 während der HR sicher. Hierdurch kommt es zu einer indirekten Bindung an die DNA (zusammengefasst in O'Donovan und Livingston, 2010; Prakash *et al.*, 2015). Die Funktion von BRCA1 bei der HR konnte mittels BRCA1-defizienten Zellen gezeigt werden. Hierbei wurde eine wesentliche Verminderung der HR-Kapazität festgestellt (Moynahan *et al.* 1999; 2001). Es wird weiterhin vermutet, dass BRCA1 zusätzlich zur Rad51-Anlagerung auch für die Resektion der DNA-Enden zuständig ist (zusammengefasst in Prakash *et al.*, 2015).

BRCA1 ist, wie bereits beschrieben, verantwortlich für die korrekte Anlagerung des Komplexes von BRCA2 und Rad51 (Sy *et al.*, 2009). Die HR kann jedoch auch ohne BRCA1 ablaufen, allerdings stark verlangsamt (Parvin *et al.*, 2011; Towler *et al.*, 2013). Parvin *et al.* (2011) fanden eine Reduktion der HR um das acht- bis zehnfache in HeLa-Zellen in Abwesenheit von BRCA1. Bei einer Beeinflussung von BRCA1 durch Arsen wäre es denkbar, dass die BRCA1-Foci ebenfalls persistieren oder die Anlagerung inhibiert wird. BRCA1 verfügt über einen RING-Finger, dessen Bindung an BARD1 wichtig ist für die korrekte Anlagerung von Rad51 (zusammengefasst in Deans und West, 2011; Ohta *et al.*, 2011). Zinkionen werden im RING-Finger, genauso wie in den bereits beschriebenen Zink-bindenden Strukturen, über Cysteine und Histidine komplexiert. Eine Interaktion mit der RING-Finger Domäne wäre denkbar, da eine Wechselwirkung von Arsen mit Proteinen, die Zink-bindenden Strukturen oder RING-Finger besitzen bereits gezeigt werden konnte (Hartwig *et al.*, 2003; Ebert *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014). Die Reparaturkinetik von BRCA1 ist in Abbildung 32 dargestellt.

Nach einer Reparaturzeit von 2 h konnten etwa 25 Foci in der bestrahlten Kontrolle detektiert werden. Die Foci-Anzahl nahm kontinuierlich bis zum Reparaturzeitpunkt von 8 h auf 10 Foci ab. In Gegenwart von Arsen war ein deutlicher Einfluss auf die Reparaturkapazität der Zelle ersichtlich. Durch eine 1  $\mu$ M Arsenbehandlung zeigte sich bereits nach 2 h eine deutliche Reduktion der Foci-Anzahl. Im Vergleich zur bestrahlten

Kontrolle reduzierte sich die Anzahl um 10 Foci. Ab einem Reparaturzeitpunkt von 4 h wurde bei dieser Konzentration ( $1 \mu\text{M NaAsO}_2$ ) eine konstante Foci-Anzahl von etwa 10 detektiert; es ergab sich eine Persistenz der IRIF. Eine Behandlung mit  $5 \mu\text{M}$  Arsenit inhibierte zu jedem betrachteten Reparaturzeitpunkt (2 h – 8 h) eine Anlagerung von BRCA1 an die induzierten DNA-Doppelstrangbrüche. Arsen zeigte somit einen signifikanten Einfluss auf die Entstehung von BRCA1-Foci. Weiterhin zeigen die dargestellten Ergebnisse, dass die BRCA1-Foci im Gegensatz zu den Rad51-Foci nicht persistieren. Es ist jedoch aus der Literatur bekannt, dass trotz BRCA1-Defizienz eine Assoziation, und damit eine Ausbildung von Rad51-Foci möglich ist. Dies wurde in HCC1937-Zellen, welche eine Mutation im *BRCA1*-Gen tragen, gezeigt (Yuan *et al.*, 1999).

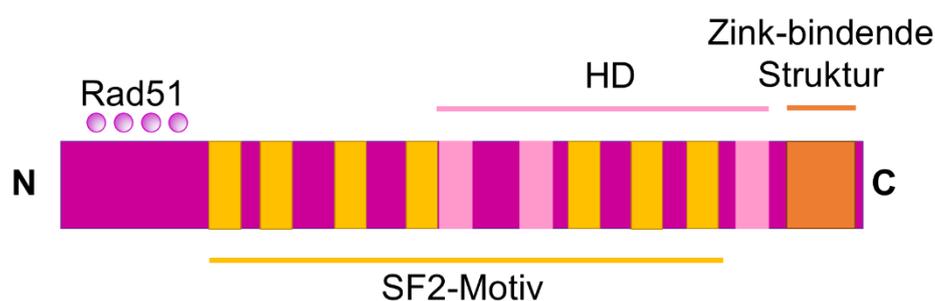
Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Effekt auf den Reparaturverlauf der BRCA1-Foci stimmt mit den bereits dargestellten Ergebnissen von Zhang *et al.* (2014) überein. Demnach würde die Datenlage der beiden Arbeiten bekräftigen, dass Arsen aufgrund der Interaktion mit BRCA1 die Anlagerung von Rad51 verlangsamt. Die Ursache der persistierenden Rad51-Foci läge damit im inhibierten Abbau durch Rad54, was nachfolgend untersucht wurde.



**Abbildung 32: Einfluss von Arsenit auf die Reparatur induzierter DNA-Doppelstrangbrüche in der G<sub>2</sub>-Phase mittels Immunfluoreszenzfärbung von BRCA1.** HeLa S3-Zellen wurden für 20 h - 26 h mit Arsenit ( $1 \mu\text{M} - 5 \mu\text{M}$ ) inkubiert. DNA-Doppelstrangbrüche wurden nach 18 h durch Röntgenstrahlung (1 Gy) induziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (\*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

### 5.6.3.3 Einfluss von Arsenit auf Rad54

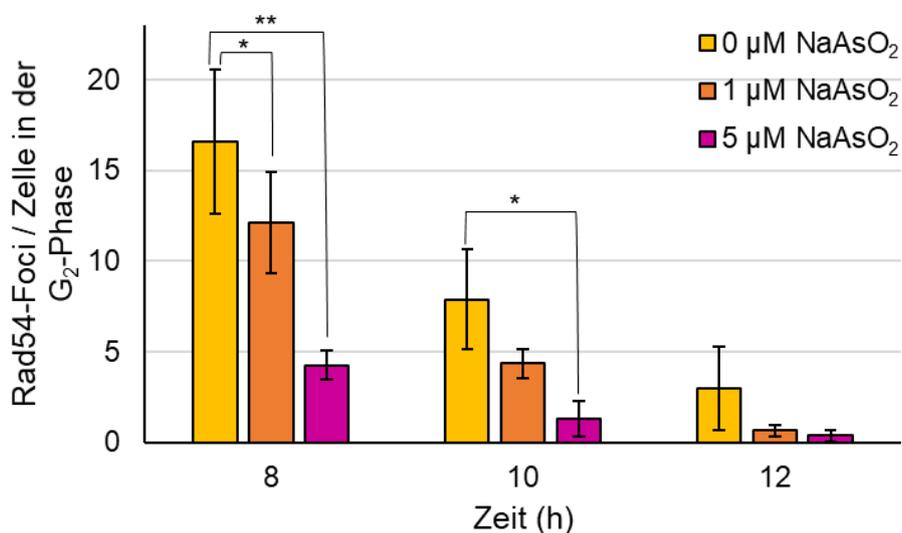
Rad54 verfügt über ein Molekulargewicht von 84 kDa und ist ein Mitglied der *super family 2* (SF2) der Helikasen. Diese entwinden unter ATP-Verbrauch die DNA und sind daher unter anderem essentiell für Vorgänge der DNA-Reparatur. Eine schematische Darstellung der Proteinstruktur von Rad54 wird in Abbildung 33 dargestellt. Rad54 verfügt über sieben klassische Bereiche der SF2-Helikasen, die Konformationsänderungen innerhalb der Proteinstruktur ermöglichen. Es wird vermutet, dass durch die helikalen Domänen die Separation der DNA-Stränge sowie die Rückbildung der Chromatinstruktur ermöglicht wird. Am N-terminalen Ende befindet sich die Bindungsstelle für Rad51. Wie bereits erläutert, bildet Rad51 ein Nukleotidfilament und Rad54 ist für die Stranginvasion in das Schwesterchromatid zuständig. Der zentrale Bereich des Proteins erlaubt die direkte DNA-Bindung (Agarwal *et al.*, 2011; Deakyne *et al.*, 2013; zusammengefasst in Mazin *et al.*, 2010). Rad54 verfügt weiterhin über eine Zink-bindende Struktur am C-terminalen Ende; diese dient der Stabilisierung des gesamten Proteins. Das Zinkion wird hierbei über zwei Cysteine und zwei Histidine koordiniert (Thoma *et al.*, 2005; zusammengefasst in Mazin *et al.*, 2010). Diese Zink-bindende Struktur könnte Rad54 zu einem potentiellen Zielmolekül von Arsen machen. Die Funktion von Rad54 bei der HR ist nicht auf die Stranginvasion limitiert; Rad54 ist zudem für den Abbau von Rad51 nach der Stranginvasion verantwortlich. Aufgrund der zahlreichen Funktionen bei der HR wird es häufig als der „Motor“ der HR bezeichnet (Mason *et al.*, 2015; zusammengefasst in Mazin *et al.*, 2010).



**Abbildung 33: Proteinstruktur von Rad54 (modifiziert nach Mazin *et al.*, 2010).** Das N-terminale Ende von Rad54 verfügt über einen einzigartigen strukturellen Aufbau und dient der Interaktion mit Rad51. Im mittleren Bereich finden sich sieben typische Bereiche der *super family-2* (SF2)-Helikasen. Mit Hilfe dieser Bereiche kann Rad54 die DNA entwinden. Weiterhin besitzt Rad54 zwei helikale Domänen (HD) im mittleren Bereich sowie eine am C-terminalen Ende. Diese dienen der Separation der DNA-Stränge. Zur Stabilisierung der Proteinstruktur dient die Zink-bindende Struktur am C-terminalen Ende.

Wie bereits ausführlich beschrieben, interagiert Rad54 in vielerlei Hinsicht mit Rad51. In Anwesenheit von Arsen konnte eine fehlende Dissoziation von Rad51 nachgewiesen werden (Kapitel 5.6.3.1). Ferner wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass BRCA1 durch Arsen eine reduzierte Assoziation an den DNA-Doppelstrangbruch aufwies (Kapitel 5.6.3.2). Dies begründete jedoch nicht die Persistenz der Rad51-Foci. Demzufolge kann die Ursache aus dem fehlerhaften Abbau von Rad51 durch Rad54 resultieren. Abbildung 34 stellt die Reparaturkinetik von Rad54 in An- und Abwesenheit von Arsen dar.

Während die Kontrolle einen normalen Verlauf der Reparaturkinetik zeigte, war bereits ab einer Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  Arsen eine verminderte Anlagerung von Rad54 zu erkennen. Hierbei handelte es sich um einen konzentrationsabhängigen Effekt. Bei einer Reparaturzeit von 8 h konnten in der Kontrolle 15 DNA-Doppelstrangbrüche detektiert werden, wohingegen bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  NaAsO<sub>2</sub> lediglich 3 Foci auszumachen waren. Unter Einfluss von Arsen kam es demnach zu einer reduzierten Anlagerung von Rad54. Die Störung der Anlagerung könnte auf einer direkten Wechselwirkung der Zink-bindenden Struktur mit Arsen beruhen, da dieser Wirkmechanismus von Arsen vielfach nachgewiesen wurde (Schwerdtle *et al.*, 2003a ; zusammengefasst in Hartwig, 2001).



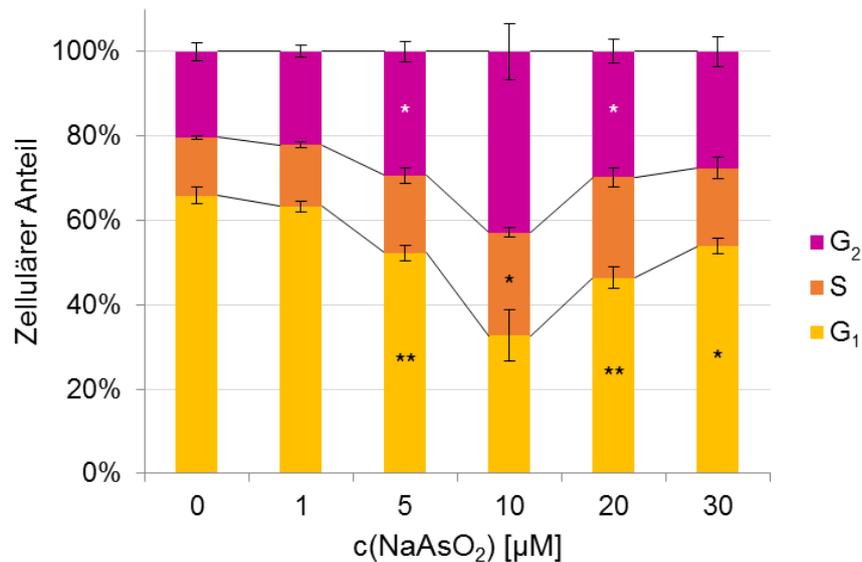
**Abbildung 34: Einfluss von Arsenit auf die Reparatur induzierter DNA-Doppelstrangbrüche in der G<sub>2</sub>-Phase mittels Immunfluoreszenzfärbung von Rad54.** HeLa S3-Zellen wurden für 26 h - 30 h mit Arsenit (1  $\mu\text{M}$  – 5  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. DNA-Doppelstrangbrüche wurden nach 18 h durch Röntgenstrahlung (1 Gy) induziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ ).

Infolge der erhaltenen Ergebnisse sowie der Ergebnisse von Zhang *et al.* (2014) lässt sich schließen, dass Arsen sowohl mit BRCA1 als auch mit Rad54 direkt interagiert. Diese Interaktion beruht vermutlich auf den Zink-bindenden Strukturen innerhalb der Moleküle. Durch die Wechselwirkung mit BRCA1 kam es zu einer verzögerten Anlagerung von Rad51. Aufgrund der Inhibition von Rad54 wurde Rad51 nicht abgebaut. Daraus ergab sich eine Persistenz des angelagerten Rad51-Proteinfilaments und ein Erliegen der HR. Wie bereits erläutert, handelt es sich bei der HR um den fehlerfreien Reparaturweg von DNA-Doppelstrangbrüchen, diese stellen jedoch eine sehr starke Schädigung der DNA dar (zusammengefasst in Clancy, 2008; Shrivastav *et al.*, 2008; Iyama und Wilson, 2013). Ein Verlust der HR infolge einer Arsenbehandlung könnten im Zusammenwirken mit weiteren zellulären Signalwegen in genomischer Instabilität resultieren. Fortführend wurde der Einfluss von Arsen auf den Zellzyklus untersucht.

#### **5.4 Einfluss von Arsenit auf die Zellzyklusphasenverteilung**

Um den Einfluss von Arsen auf die Zellzyklusphasenverteilung zu untersuchen, wurden unter Verwendung des Farbstoffes DAPI Analysen am Durchflusszytometer durchgeführt. Hierbei sollte vor allem untersucht werden, ob durch Arsen ein Zellzyklusstopp induziert wird und dieser bei höheren Arsenkonzentrationen eventuell ausbleibt. Der Farbstoff DAPI ist ein DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff. In der G<sub>2</sub>/M-Phase liegt nach der Replikation der doppelte DNA-Gehalt im Vergleich zur G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase vor. Hieraus ergibt sich eine Zunahme der Intensität des verwendeten Farbstoffs. Der DNA-Gehalt und damit auch die Intensität der DAPI-Färbung der S-Phase befindet sich zwischen der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>- und der G<sub>2</sub>/M-Phase (zusammengefasst in Kapuscinski, 1995; Tessema *et al.*, 2004). Abbildung 35 zeigt die erhaltenen Ergebnisse der nicht bestrahlten HeLa S3-Zellen nach Behandlung mit Arsen sowie die zugehörige Kontrolle.

Die Kontrolle zeigte, dass sich die Zellzyklusphasenverteilung in HeLa S3-Zellen wie folgt ergab: 65 % der Zellen befanden sich in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase, 15 % der Zellen in der S-Phase und 20 % der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase. Durch die Behandlung mit Arsen zeigte sich bis zu einer Konzentration von 10 µM ein konzentrationsabhängiger Einfluss auf die Zellzyklusphasenverteilung. Bei dieser Konzentration ergab sich folgendes Verteilungsmuster: 33 % der HeLa S3-Zellen waren in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase, 24 % in der S-Phase und 43 % der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase. Arsen induzierte demnach bis zu einer Konzentration von 10 µM einen konzentrationsabhängigen G<sub>2</sub>/M-Arrest.



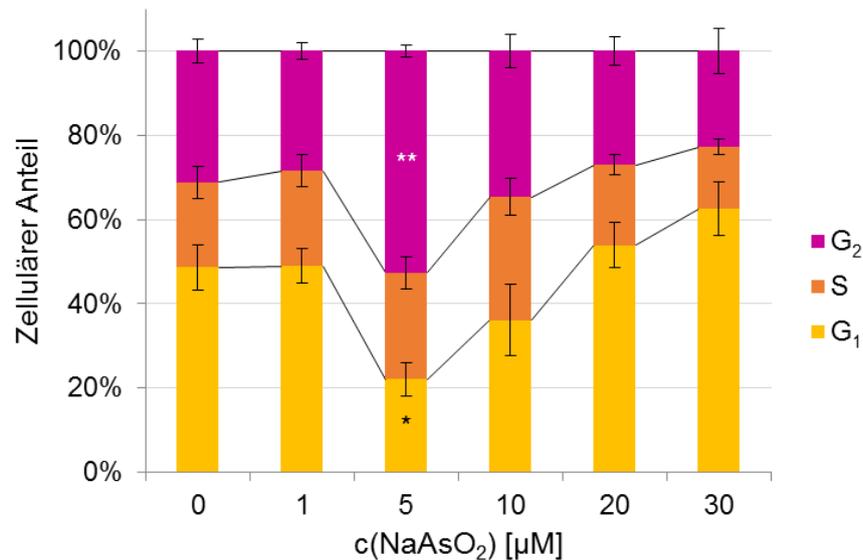
**Abbildung 35: Einfluss von Arsenit auf die Zellzyklusphasenverteilung der HeLa S3-Zellen.** HeLa S3-Zellen wurden für 26 h mit Arsenit (1 µM – 30 µM) behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen ± Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ ).

In U937-Zellen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Arsenit einen Einfluss auf die Zellzyklusphasenverteilung nahm. Hierbei zeigte sich ein verspäteter Eintritt in die S-Phase sowie eine Verlängerung dieser um circa 4 - 6 h nach einer 8 h Behandlung mit 5 µM Arsenit. Der empfindlichste Parameter stellte hierbei die G<sub>2</sub>/M-Phase dar, wobei nicht nur der Übergang von der M- in die G<sub>1</sub>-Phase deutlich verlangsamt wurde, sondern vor allem auch der Übergang der G<sub>2</sub>- in die M-Phase (McCollum *et al.*, 2005). Eine Induktion des G<sub>2</sub>-Arrests durch Arsenit konnte zudem in CGL2-Zellen gezeigt werden. Bei diesen Zellen handelt es sich um eine Zelllinie, die aus einem HeLa Hybrid (ESH5) abgeleitet wurde. Getestet wurden Konzentrationen von 0 µM bis 10 µM Arsen über einen Behandlungszeitraum von 24 h. In der Kontrolle befanden sich circa 60 % der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase, 15 % in der S-Phase und 25 % in der G<sub>2</sub>/M-Phase. Eine Zunahme der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase sowie eine damit verbundene Abnahme der G<sub>1</sub>-Phase konnte bereits bei einer Konzentration von 2 µM Arsen nachgewiesen werden. Die maximale Zunahme der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase konnte bei einer Konzentration von 4 µM Arsen detektiert werden. Hier befanden sich etwa 80 % der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase (Yih *et al.*, 2005).

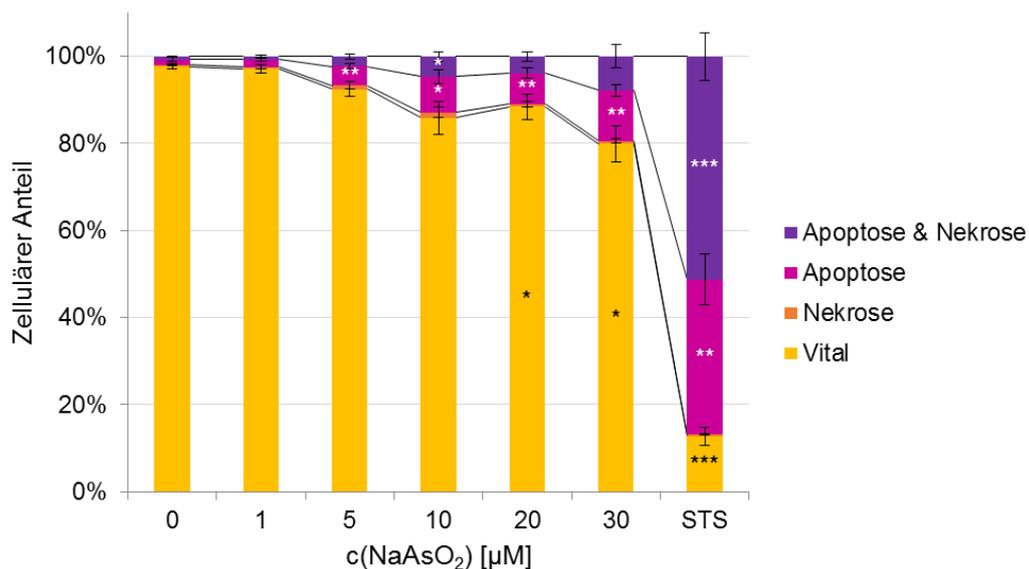
In der vorliegenden Arbeit war deutlich zu erkennen, dass der zelluläre Anteil in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase nach einer Behandlung mit einer Konzentration von 20 µM NaAsO<sub>2</sub> auf 47 % zunahm, wohingegen dieser Anteil bei einer 10 µM Arsenitbehandlung bei nur 24 % lag (Abbildung 35). Die Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase nahmen hingegen in Anwesenheit von 20 µM NaAsO<sub>2</sub> auf 30 % ab. Anhand der Ergebnisse der Zellzyklusuntersuchung konnte demnach nachgewiesen werden, dass es ab einer Konzentration von 20 µM Arsen zum Ausbleiben des Zellzyklusarrests kam. Der leichte Aufwärtstrend innerhalb der Zellzahl (Kapitel 5.2) konnte hierdurch begründet werden. Die Aufhebung des Zellzyklusphasenarrests konnte ebenfalls in CGL2-Zellen beobachtet werden. Ab einer Konzentration von 6 µM Arsen zeigte sich eine leichte Abnahme der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase und ein leichter Anstieg der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase. Bei einer Konzentration von 10 µM Arsen war nach 24 h Behandlung nahezu die ursprüngliche Zellzyklusphasenverteilung vorhanden (Yih *et al.*, 2005).

Die Zellzyklusphasenverteilung der bestrahlten Zellproben ist in Abbildung 36 dargestellt. Im Vergleich der nicht bestrahlten und der bestrahlten Analysen konnte festgestellt werden, dass die Bestrahlung mit 1 Gy einen G<sub>2</sub>/M-Phase Arrest induziert. Hierbei ergab sich folgende Zellzyklusphasenverteilung: 50 % der Zellen befanden sich in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase, 20 % in der S-Phase und 30 % der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase. Im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle zeigte sich demnach ein Rückgang der Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase um 15 % sowie eine Zunahme der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase um 10 %. Die Induktion des G<sub>2</sub>/M-Arrest durch Röntgenstrahlung wurde bereits durch Kaminaga *et al.* (2015) beschrieben.

Der strahlungsinduzierte G<sub>2</sub>/M-Phasenarrest wurde durch 10 µM NaAsO<sub>2</sub> aufgehoben. Höhere Konzentrationen glichen sich wiederum dem Verteilungsmuster der nicht bestrahlten Proben an. Anhand der Zellzyklusphasenverteilung wurden durch Arsen demnach sowohl mit als auch ohne Bestrahlung die gleichen Effekte verursacht. Die geschädigten Zellen unterliegen durch die Aufhebung des Zellzyklusarrests keinerlei Kontrolle. In Kombination mit der inhibierenden Wirkung auf die DNA-Reparaturprozesse könnte dies zu einem nachteiligen Effekt auf die genomischen Stabilität führen. Ein weiterer wichtiger Faktor der genomischen Stabilität ist die Apoptose; sie verhindert, dass zu stark geschädigte Zellen überleben. Aus diesem Grund wurden Viabilitätsuntersuchungen am Durchflusszytometer durchgeführt.



**Abbildung 36: Einfluss von Arsenit in Kombination mit Bestrahlung auf die Zellzyklusphasenverteilung der HeLa S3-Zellen.** HeLa S3-Zellen wurden für 26 h mit Arsen (1 µM – 30 µM) inkubiert; eine Bestrahlung (1 Gy) erfolgte nach 18 h. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen ± Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ ).



**Abbildung 37: Einfluss von Arsenit auf die Viabilität der HeLa S3-Zellen.** HeLa S3-Zellen wurden für 26 h mit Arsen (1 µM – 30 µM) inkubiert. Als Positivkontrolle wurde Staurosporin (STS) mitgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen ± Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

## 5.5 Einfluss von Arsenit auf die Viabilität

Apoptose bezeichnet den programmierten Zelltod, bei dem es nicht, wie bei der Nekrose, zu einer Auswirkung auf die umliegenden Zellen kommt; sie kann entweder extrinsisch oder intrinsisch ablaufen. Die Apoptose ist von essentieller Bedeutung innerhalb eines Organismus, da sehr stark geschädigte Zellen gezielt eliminiert werden können, um die genomische Stabilität zu gewährleisten (zusammengefasst in Ulukaya *et al.*, 2011).

Eine Unterscheidung zwischen lebenden, apoptotischen sowie nekrotischen Zellen am Durchflusszytometer wurde durch eine simultane Färbung mit Propidiumiodid (PI) und Annexin V-FITC erreicht. Letzterer Farbstoff bindet spezifisch an Phosphatidylserin (PS). Dieses befindet sich in der zytoplasmatischen Membran der Zelle. Aufgrund des meist asymmetrischen Aufbaus von Zellmembranen ist PS häufig auf der Innenseite der Membran lokalisiert. Durch Apoptose sowie Nekrose kommt es zu Externalisierung des PS, wodurch Annexin V-FITC binden kann. Eine Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen erfolgte durch PI. Nekrotische Zellen besitzen geschädigte Plasmamembranen, die PI passieren kann, wodurch es anschließend mit der DNA interkaliert (Darzynkiewicz und Bedner, 2000; Munoz *et al.*, 2013). Abbildung 37 zeigt die Ergebnisse der nicht bestrahlten Proben.

Die Analysen zeigten, dass es keinen Einfluss von Arsen auf die Induktion der Nekrose gab, wohingegen apoptotische Vorgänge konzentrationsabhängig zunahm. Ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  ergab sich eine Erhöhung der apoptotischen Zellen um mehr als 10 %. Dieser Effekt verdoppelte sich bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  Arsenit.

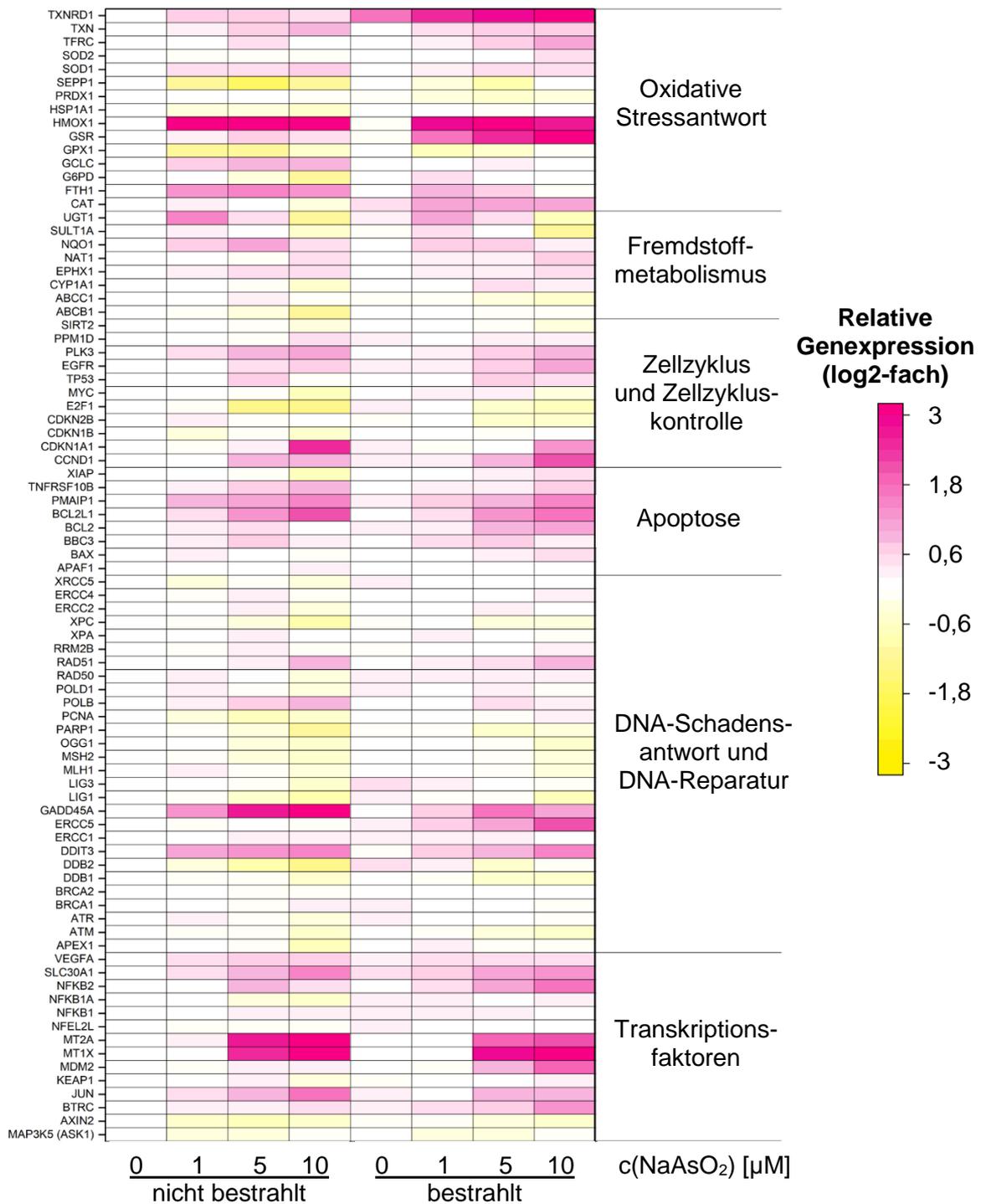
Die Ergebnisse bestätigen bereits vorliegende Literaturdaten. Es wurde in HeLa-Zellen gezeigt, dass eine Behandlung mit 7  $\mu\text{M}$  Arsenit über 72 h zu einem Anstieg der apoptotischen Zellpopulation um nahezu 50 % führte (Han *et al.* 2008). Im Vergleich zu den vorliegenden Ergebnissen handelt es sich dabei um eine stärkere Induktion der Apoptose. Dies könnte zum einen durch das verwendete Lösungsmittel, 1,65 M Natronlauge, verursacht worden sein. Zum anderen wurde eine Inkubationszeit von 72 h gewählt, was ebenfalls zu einer Erhöhung der apoptotischen Vorgänge führt. In der vorliegenden Arbeit wurde demgegenüber Wasser als Lösungsmittel verwendet und eine Inkubationszeit von nur 26 h gewählt. Eine Induktion der Apoptose wurde unter anderem auch in verschiedenen Leukämie-Zelllinien beobachtet. Bereits bei geringen Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  und 2  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  zeigte sich nach 24 h Behandlung ein Anstieg der apoptotischen Zellen um nahezu 5 % (Calviño *et al.*, 2011).

Die Untersuchungen der bestrahlten Zellen zeigten ein ähnliches Ergebnis (Anhang, Abbildung 53). Anhand der apoptotischen Vorgänge war demnach kein additiver Effekt durch die kombinierte Behandlung mit Röntgenstrahlung und Arsen erkennbar.

Zusammenfassend ergaben die durchgeführten Untersuchungen, dass Arsen, unabhängig von zusätzlicher Bestrahlung mit 1 Gy, die Apoptose in HeLa S3-Zellen konzentrationsabhängig induziert. Ferner zeigten die bisherigen Ergebnisse, dass Arsen die DNA-Doppelstrangbruchreparatur, in Form der HR, und die Zellzyklusregulation negativ beeinträchtigt. Um das Spektrum des Wirkungsmechanismus von Arsen weitergehend zu untersuchen, wurde die arseninduzierte Veränderung des Genexpressionsmusters betrachtet.

### 5.6 Einfluss von Arsenit auf die Genexpression

Die Einstufung und Charakterisierung toxischer Substanzen ist meist aufgrund der komplexen mechanistischen Wirkungsweisen sehr schwierig. Es kommt zu zahlreichen Einflüssen innerhalb verschiedener zellulärer Signalwege. Zum Erlangen eines Überblicks über die beeinflussten Signalwege wird daher ein Analysenverfahren mit hohem Probendurchsatz benötigt. Zu diesem Zweck wurde in unserer Arbeitsgruppe eine *High-throughput RT qPCR*-Methode etabliert, mit der systematisch und quantitativ der Einfluss von potentiell toxischen und genotoxischen Substanzen auf zelluläre Signalwege untersucht werden kann. Dafür wurden 95 Gene, die hinsichtlich der DNA-Schadensantwort eine bedeutende Rolle innehaben, ausgewählt. Diese können in die Signalwege Apoptose, Zellzyklusregulation und Proliferation, oxidative Stressantwort und DNA-Reparatur eingeteilt werden. Zusätzlich wurden wichtige Transkriptionsfaktoren, die maßgeblich an der Regulation dieser Gene beteiligt sind, berücksichtigt. Diese Methode erlaubt die Untersuchung der Transkription, indem die RNA der Zellen isoliert wird und mittels RNA-abhängiger DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) in DNA umgeschrieben wird. Ferner lassen sich durch diese Methode konzentrations- und zeitabhängige Analysen durchführen. Insgesamt bietet die *High-throughput RT qPCR*-Technik das Potential, komplexe Wirkprofile von toxischen und genotoxischen Substanzen aufzuzeigen (Fischer *et al.*, 2016). Abbildung 38 zeigt einen Gesamtüberblick des Einflusses von Arsen auf das Genexpressionsmuster von HeLa S3-Zellen. Eine detailliertere Darstellung der oxidativen Stressantwort, des Zellzyklus und der Zellzyklusregulation, der Apoptose sowie der DNA-Schadensantwort und DNA-Reparatur wird in Kapitel 5.6.1 bis Kapitel 5.6.4 gegeben.



**Abbildung 38: Heat Map der relativen Genexpression in HeLa S3-Zellen in Anwesenheit von Arsenit.** HeLa S3-Zellen wurden für 26 h mit Arsenkonzentrationen von 1 μM bis 10 μM behandelt. Eine Bestrahlung mit 1 Gy erfolgte nach 18 h. Dargestellt sind die Mittelwerte (log<sub>2</sub>-fach) aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen. Eine Induktion der untersuchten Gene wird durch eine rosa Farbgebung, eine Repression der untersuchten Gene durch eine gelbe Farbgebung gekennzeichnet.

Hinsichtlich der oxidativen Stressantwort war besonders auffällig, dass Arsen eine Induktion der stressinduzierten Gene bewirkte, wohingegen detoxifizierende Gene meist eine Repression anzeigten. Ein gutes Beispiel stellen hierfür *HMOX1* und *G6PD* dar. *HMOX1* codiert für die Hämoxygenase und wird infolge von oxidativem Stress transkribiert. Dieses Gen wurde bereits durch eine Behandlung mit  $1\ \mu\text{M NaAsO}_2$  auf eine relative Genexpression von über 8 induziert. Demgegenüber wurde *G6PD* konzentrationsabhängig reprimiert. *G6PD* codiert für die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, welche einen Kofaktor der Glutathionreduktase darstellt. Bei der Glutathionreduktase handelt es sich um ein Protein, das GSSG zu GSH reduziert, wodurch GSH erneut als Antioxidans zur Verfügung steht. Wie bereits einleitend erläutert, besteht ein bekannter Wirkmechanismus von Arsen darin, ROS zu induzieren und antioxidative Enzyme zu inhibieren. Das erhaltene Ergebnis bestätigt demnach die bereits vorliegenden Arbeiten (zusammengefasst in Emadi und Gore, 2010; Hartwig, 2013; Mandal, 2017).

Bezüglich des Fremdstoffmetabolismus war ersichtlich, dass die Phase I- und Phase III-Enzyme konzentrationsabhängig herunterreguliert wurden, wohingegen die Phase II-Enzyme, ebenfalls konzentrationsabhängig, durch Arsen induziert wurden. Die Induktion der Phase II-Enzyme ergab sich wahrscheinlich aus dem bereits bekannten Metabolismus von Arsen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Arsen mehrfach durch Phase II-Enzyme metabolisiert wird (zusammengefasst in Drobna *et al.*, 2009).

Die Gruppierung der Gene des Zellzyklus und Zellzyklusregulation bestätigt die dargestellten Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zellzyklusuntersuchung (Kapitel 5.4). Das Expressionsmuster der Gene des Zellzyklus und der Zellzyklusregulation weisen ebenfalls auf einen  $G_2$ -Arrest hin. *CDKN1A1* zeigte hierbei die stärkste Induktion bei einer Konzentration von  $10\ \mu\text{M NaAsO}_2$ . *CDKN1A1* codiert für das Protein p21, dieses kann sowohl zu einem  $G_1$ -, also auch einem  $G_2$ -Arrest führen (Ando *et al.*, 2001). Ferner wurde die Transkriptmenge von *E2F1* stark reprimiert. Das durch *E2F1*-codierte Protein ist für die Induktion eines  $G_1$ -Arrests verantwortlich, eine Repression weist demnach auf einen  $G_2$ -Arrest hin.

Im Signalweg Apoptose zeigten vor allem pro-apoptotische Gene, wie beispielsweise *TNFRSF10B* und *PMAP1*, eine konzentrationsabhängige Induktion. Die Genexpressionsergebnisse bestätigen daher wiederum die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung der Apoptose (Kapitel 5.5).

Hinsichtlich der DNA-Schadensantwort und der DNA-Reparatur ergab sich hauptsächlich eine Repression der untersuchten Gene der DNA-Reparatur und eine Induktion der Gene der DNA-Schadensantwort. Beispielsweise wurde *GADD45A* durch Arsen konzentrationsabhängig induziert; es wurden relative Genexpressionswerte von über 8 erreicht. *GADD45A* wird infolge einer DNA-Schädigung induziert und weist demnach auf ein erhöhtes Vorkommen von Schäden durch Arsen hin (Shan *et al.*, 2012). Dies bestätigt wiederum die Ergebnisse der PFGE und der Immunfluoreszenzfärbung der vorliegenden Arbeit (Kapitel 5.3) sowie die Ergebnisse vorangegangener Arbeiten (Schwerdtle *et al.*, 2003a; Hartwig *et al.*, 2003; Ebert *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014).

Anhand der Betrachtung des Genexpressionsmusters der Transkriptionsfaktoren zeigte sich eine deutliche Induktion der für Metallothionein-codierenden Gene. Bei Metallothionein handelt es sich um ein Speicherprotein für physiologisch relevante Metalle, wie beispielsweise Kupfer oder Zink. Es konnte jedoch auch als Bindungspartner von Arsen identifiziert werden (Ngu und Stillman, 2006), demzufolge kommt es zu einer Induktion der entsprechenden Gene.

Eine Bestrahlung der HeLa S3-Zellen bewirkte, mit der Ausnahme von *TXNRD1*, keine deutlichen Veränderungen des Genexpressionsmusters im Vergleich zu den nicht bestrahlten Analysen. Die Induktion von *TXNRD1* könnte durch zusätzlichen oxidativen Stress durch Bestrahlung resultieren. *TXNRD1* codiert für die Thioredoxin-Reduktase, welche Thioredoxin, ein zelluläres Antioxidans, reduziert. Darüber hinaus wurden gegenteilige Effekte bei *CAT* detektiert. *CAT* codiert für die Katalase und deren Transkriptmenge wurde durch Arsen alleine reduziert, wohingegen es durch eine kombinierte Behandlung zu einer Induktion der Transkription kam. Diese gegenteilige Beobachtung könnte ebenfalls aus der zusätzlichen Induktion von oxidativem Stress durch Bestrahlung resultieren (Ogawa *et al.*, 2003).

### **5.6.1 Einfluss von Arsenit auf das Genexpressionsmuster der DNA-Schadensantwort und -Reparatur**

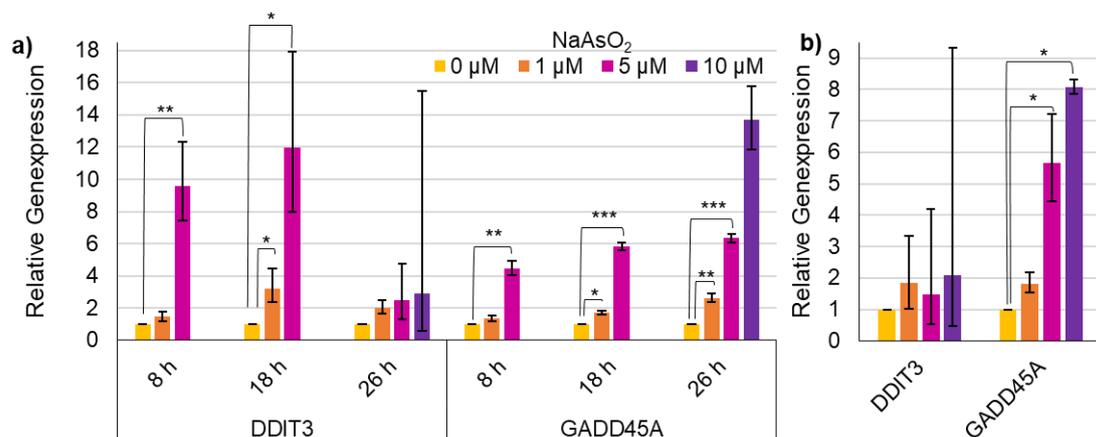
Die DNA-Schadensantwort ist essentiell für die Zelle zur Erkennung von DNA-Schäden. In dieser Gruppierung zeigten sowohl *DDIT3* als auch *GADD45A* eine zeit- und konzentrationsabhängige Induktion der Transkriptmenge (Abbildung 39 a).

Bereits nach 8 h Inkubation mit Arsen war in den nicht bestrahlten HeLa S3-Zellen eine Induktion der beiden Gene festzustellen. *GADD45A* zeigte eine etwa 4-fache Erhöhung der Transkriptmenge bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M Arsenit; *DDIT3* sogar eine

Verzehnfachung. Die Induktion der Gene konnte sich nach 18 h weiter auf das 6-fache der Kontrolle von *GADD45A* und das 12-fache der Kontrolle von *DDIT3* steigern. Im Falle der Expression von *DDIT3* ließ dieser Effekt nach 26 h Behandlung mit Arsen nach. Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  fand sich eine 2,5-fache Transkriptmenge. Hinsichtlich *GADD45A* ließ sich auch nach 26 h Arsenbehandlung eine 6,5-fache Erhöhung der relativen Genexpression detektieren. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Arsenit kam es zu einer weiteren Steigerung der Transkriptmenge von *GADD45A*. Beide Faktoren werden in Folge einer DNA-Schädigung induziert (Fornace Jr *et al.*, 1989; Bento *et al.*, 2009; Shan *et al.*, 2012).

Die Induktion der beiden Gene deutete demnach auf eine Schädigung der DNA durch Arsen hin. Bei den bestrahlten HeLa S3-Zellen war nach gleicher Inkubationszeit ein etwas abgeschwächter Effekt ersichtlich (Abbildung 39 b).

Die DNA-Reparaturgene zeigten einen gegenteiligen Effekt. Hierbei wurden nahezu alle Genen, wie bereits in Kapitel 5.3 angedeutet, im Vergleich zur Kontrolle reprimiert (Abbildung 40). Nach 26 h Behandlung mit Arsen zeigten vor allem *DDB2*, *XPC*, *LIG1* sowie *PARP1* eine zweifach verminderte Genexpression.

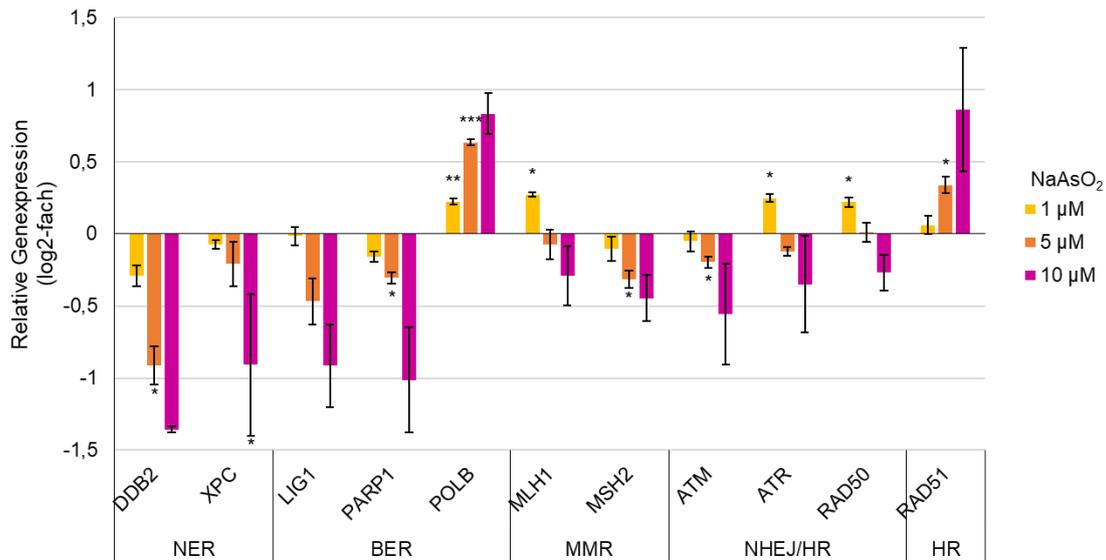


**Abbildung 39: Einfluss von Arsenit auf die relative Expression der mit der DNA-Schadensantwort assoziierten Gene *DDIT3* und *GADD45A*.** HeLa S3-Zellen wurden für 8 h, 18 h und 26 h mit Arsen (1  $\mu\text{M}$  – 10  $\mu\text{M}$ ) inkubiert (a) und zusätzlich mit 1 Gy nach 18 h bestrahlt (b). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der relativen Genexpression der Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Zu berücksichtigen ist die unterschiedliche Skalierung der y-Achse.

*DDB2* und *XPC* codieren für Proteine der NER, dabei ist *DDB2* innerhalb eines Proteinkomplexes für die Bindung von 6-4-Photoaddukten und *XPC* für die generelle Schadenserkennung der GG-NER zuständig. *LIG1* und *PARP1* codieren hingegen für wichtige Proteine der BER, beziehungsweise der SSBR. *PARP-1* katalysiert die ADP-Ribosylierung von Chromatinproteinen, während Ligase 1 die gebrochenen, neu synthetisierten DNA-Stränge verknüpft. Die Repression des Gens *XPC* durch Arsen konnte bereits in humanen Fibroblasten nach 24 h Inkubation beobachtet werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die tatsächliche Proteinmenge von *XPC* durch Arsen abnimmt (Nollen *et al.*, 2009). Wie bereits einleitend beschrieben, wurde in HeLa S3-Zellen nachgewiesen, dass sehr geringe Dosen von dreiwertigen Arsenverbindungen zu einer Verminderung der Poly(ADP-ribosyl)ierung von Wasserstoffperoxid-induzierten DNA-Schäden durch *PARP-1* führen (Hartwig *et al.*, 2003; Walter *et al.*, 2007). In diesem Kontext konnte jedoch keine Verminderung der Expression von *PARP1* festgestellt werden. Dies könnte darin begründet sein, dass lediglich eine Konzentration von 1  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  für eine Inkubationszeit von 18 h getestet wurde (Walter *et al.*, 2007), wohingegen in der vorliegenden Arbeit auch höhere Dosen von 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  bei einer Inkubationsdauer von 26 h betrachtet wurden. Anhand der Herabregulation der Gene der Exzisionsreparatur lässt sich demnach eine Verminderung dieser Reparaturwege vermuten.

*MLH1* sowie *MSH2*, beides codierende Gene der MMR, wurden ebenfalls durch Arsen konzentrationsabhängig reprimiert. Demzufolge schien ebenso die MMR negativ beeinflusst. Laut Treas *et al.* (2013) konnte bereits eine 10-fache Herabregulation von *MLH1* in der humanen, nicht tumorösen Zelllinie RWPE-1 durch 10 ng/mL Arsen beobachtet werden. Hierbei wurde ebenfalls der Einfluss auf den Proteinstatus von *MLH1* mittels Western Blot-Analyse untersucht; es konnte ein Abfallen der Proteinmenge in Anwesenheit von Arsen festgestellt werden.

Bezüglich der DNA-Doppelstrangbruchreparatur ist der gleiche Effekt der Repression bei *ATM*, *ATR* sowie *RAD50* ersichtlich. Dies deutet auf einen negativen Einfluss auf die HR und die NHEJ hin. Unterstützend wurde gezeigt, dass Arsen in *ATM*-defizienten Zellen einen erhöhten zytotoxischen Effekt aufwies als in *ATM*-profizienten Zellen. Dementgegen konnte dies aber nicht in *Nbs1*-, *XRCC2*-, *XRCC3*- sowie *DNA-PK*-defizienten Zellen festgestellt werden (Mei *et al.*, 2003). Fortführend konnte gezeigt werden, dass dreiwertige Arsenverbindungen den *Fanconi anaemia*/BRCA-Weg stören können (Peremartí *et al.*, 2014).



**Abbildung 40: Einfluss von Arsenit auf die relative Expression von Genen, die mit der DNA-Reparatur assoziiert sind.** HeLa S3-Zellen wurden für 26 h mit Arsenit ( $1 \mu\text{M}$  –  $10 \mu\text{M}$ ) inkubiert. Untersucht wurden Gene aller DNA-Reparaturmechanismen: *DDB2* und *XPC* der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER), *LIG1*, *PARP1* und *POLB* der Basen-Exzisionsreparatur (BER), *MLH1* und *MSH2* der Mismatch-Reparatur (MMR) sowie *ATM*, *ATR*, *RAD50* und *Rad51* des nicht-homologen *end-joining* (NHEJ) und der homologen Rekombination (HR). Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\log_2$ -fach) aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der relativen Genexpression der Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Bei *Fanconi anaemia* handelt es sich um eine seltene genetische Erkrankung, die zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Tumoren führt. An diesem zellulären Signalweg sind ebenso Reparaturproteine der DNA-Doppelstrangbruchreparatur beteiligt, darunter zählen unter anderem BRCA1, BRCA2, ATM sowie Nbs1. Es wird angenommen, dass der *Fanconi anaemia*/BRCA-Weg die DNA-Doppelstrangbruchreparatur reguliert (zusammengefasst in D'Andrea und Grompe, 2003). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte mittels Immunfluoreszenzfärbung kein Einfluss auf ATM-Foci detektiert werden (Kapitel 5.3.2.1). Die Genexpressionsanalysen weisen jedoch auf ein vermindertes Vorkommen von ATM hin, das sich demnach nicht auf dessen Funktionalität auswirkt. Ferner zeigten die Genexpressionsanalysen eine Induktion der Transkriptionsmenge von *RAD51*. Diese erhöhte Transkriptionsmenge von *RAD51* kann mittels der Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung erklärt werden (Kapitel 5.6.3.1); hier wurde eine Persistenz der Rad51-Foci beobachtet. Die Persistenz der Rad51-Foci führt zu einer Reduktion des zellulär frei vorliegenden Rad51, was in einer Steigerung der Transkriptionsmenge resultiert.

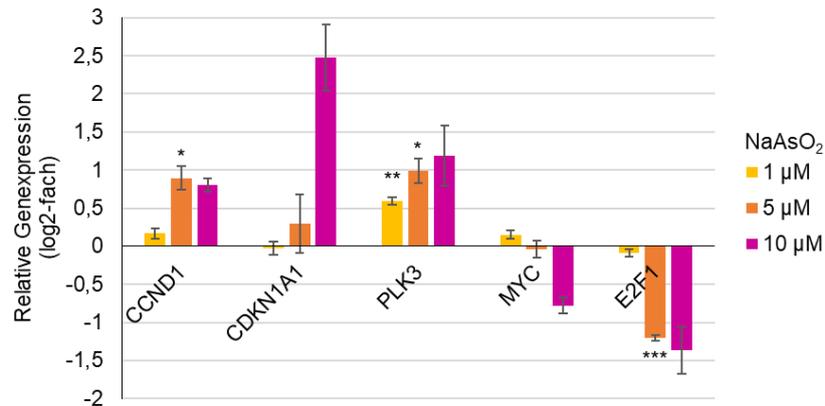
Die bestrahlten HeLa S3-Zellen wiesen nur geringfügige Abweichungen zu den nicht bestrahlten Proben auf (Anhang, Abbildung 54). Hierbei kam es zu einer stärkeren Repression von *ATR* sowie einer geringeren Herabregulation der Transkriptmengen von *PARP1* und *XPC*.

### 5.6.2 Einfluss von Arsenit auf das Expressionsmuster Zellzyklus-zugehöriger Gene

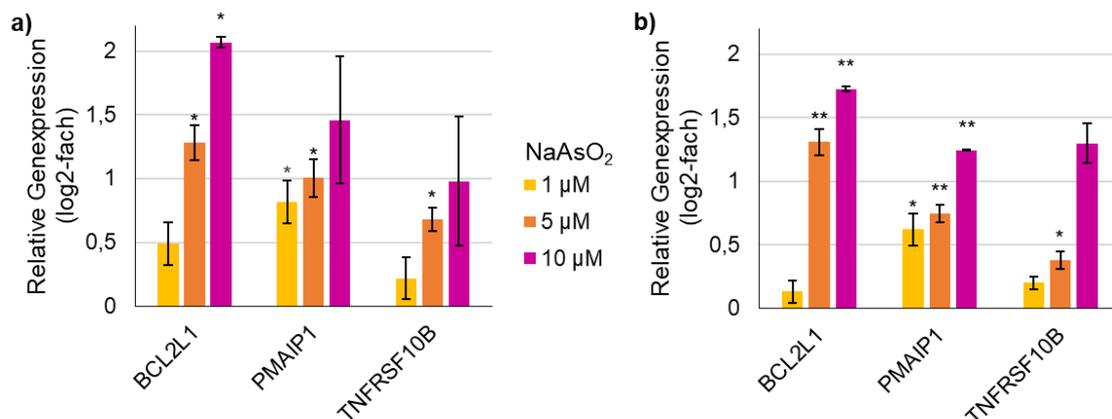
Bei den Genen des Zellzyklus sowie der Zellzyklusregulation zeigten *CCND1*, *CDKN1A1* und *PLK3* eine Induktion, wohingegen *MYC* sowie *E2F1* eine Repression zeigten. Abbildung 41 stellt den Ausschnitt des Genexpressionsmusters der am Zellzyklus beteiligten Gene der nicht bestrahlten Proben dar.

Sowohl die Transkriptmenge von *CCND1* als auch von *PLK3* wurde bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  verdoppelt. *CCND1* codiert für Cyclin D1, welches im Komplex mit CDK4 (*Cyclin-dependent Kinase 4*) den Übergang von der  $G_1$ - in die S-Phase fördert. Das durch *PLK3* codierte Protein ist verantwortlich für die Regulation des  $G_2$ -Checkpoints. Die Induktion der beiden Gene durch Arsen deutet demnach auf einen  $G_2$ -Arrest hin. *CDKN1A1* erfuhr eine mehr als 5-fache Induktion der Transkriptmenge bei gleicher Konzentration. Die Steigerung der Transkriptmenge von *CDKN1A1* durch Arsen konnte ebenfalls in HFW-Zellen gezeigt werden (Yih und Lee, 2000). Dementgegen führte Arsen in W138-Zellen zu keiner Induktion von *CDKN1A1* (Vogt und Rossman, 2001). *CDKN1A1* codiert, wie bereits beschrieben, für p21, ein Protein, welches unter anderem den Cyclin D-CDK4-Komplex inhibiert. Die Induktion dieses Gens deutet demnach auf einen  $G_1$ -Arrest hin. Weiterhin gibt es Untersuchungen, die gezeigt haben, dass durch p21 ebenfalls ein  $G_2$ /M-Arrest induziert werden kann (Ando *et al.*, 2001). Dies verstärkt die Vermutung, dass durch Arsen ein  $G_2$ -Arrest induziert wird. Die Genexpressionsanalysen umfassten einen Konzentrationsbereich von 1  $\mu\text{M}$  bis 10  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$ . In diesem Konzentrationsbereich konnte durch die Daten der vorliegenden Arbeit ein eindeutiger  $G_2$ -Arrest durch Arsen in HeLa S3-Zellen, mit Hilfe des Durchflusszytometers, nachgewiesen werden.

Die zusätzlich bestrahlten Proben zeigten vergleichbare Veränderungen des Genexpressionsmusters wie die nicht bestrahlten Proben (Anhang, Abbildung 55). Dies bekräftigt wiederum die erhaltenen Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse, die zeigten, dass eine Kombination der Bestrahlung und Arsenbehandlung keinen zusätzlichen Effekt auf den Zellzyklus nimmt.



**Abbildung 41: Einfluss von Arsenit auf die relative Expression der mit der Proliferation und der Zellzykluskontrolle assoziierten Gene.** HeLa S3-Zellen wurden für 26 h mit Arsen (1 μM – 10 μM) inkubiert. Untersucht wurden *CCND1*, *CDKN1A1*, *PLK3*, *MYC* und *E2F1*. Dargestellt sind die Mittelwerte (log2-fach) aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen ± Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der relativen Genexpression der Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).



**Abbildung 42: Einfluss von Arsenit auf die relative Expression von Genen, die mit der Apoptose assoziiert sind.** HeLa S3-Zellen wurden für 26 h mit Arsen (1 μM – 10 μM) inkubiert (a) und zusätzlich mit 1 Gy nach 18 h bestrahlt (b). Es wurde *BCL2L1* sowie die pro-apoptotischen Gene *PMAIP1* und *TNFRSF10B* betrachtet. Dargestellt sind die Mittelwerte (log2-fach) aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen ± Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der relativen Genexpression der Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ ).

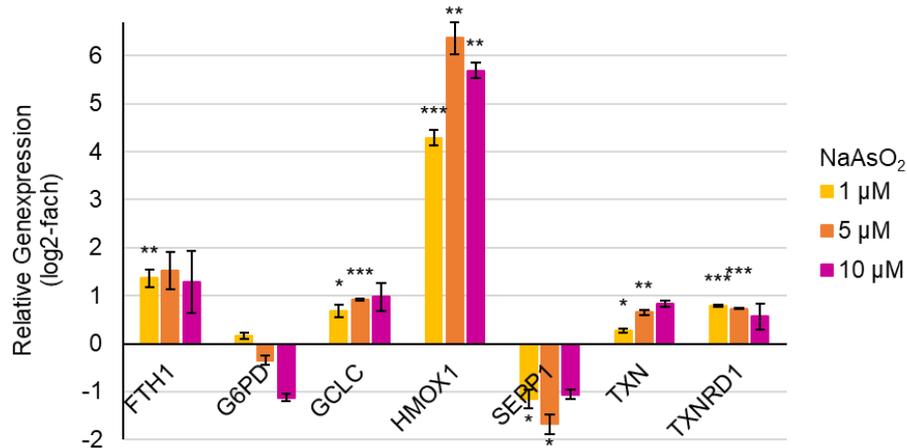
### 5.6.3 Einfluss von Arsenit auf das Expressionsmuster Apoptose-assoziiierter Gene

Abbildung 42 a stellt einen Ausschnitt des Genexpressionsmusters der nicht bestrahlten HeLa S3-Zellen nach Inkubation mit Arsenit dar. *BCL2L1*, *PMAIP1* sowie *TNFRSF10B* zeigten eine konzentrationsabhängige Induktion der Transkriptionsmenge nach 26 h Gesamtinkubationszeit. *BCL2L1* zeigte die stärkste Induktion um den Faktor 4 bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Arsenit. Hierbei ist zu beachten, dass es zwei Splicevarianten von *BCL2L1* gibt; eine wirkt anti-apoptotisch, eine pro-apoptotisch. Eine Unterscheidung ist mittels der Sequenz der gewählten Primer jedoch nicht möglich. Weiterhin wurde das pro-apoptotische Gen *PMAIP1*, welches für das Protein NOXA codiert, um den Faktor 2,8 bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  induziert. Die Transkriptmenge des pro-apoptotischen *TNFRSF10B*-Gens, welches für den Todesrezeptor 5 des extrinsischen Apoptosewegs codiert, wurde verdoppelt.

Das Genexpressionsmusters der bestrahlten HeLa S3-Zellen ergab ein ähnliches Bild (Abbildung 42 b). Hierbei zeigten *BCL2L1* und *PMAIP1* eine geringere Induktion, *TNFRSF10B* jedoch eine gleichbleibende Induktion wie die nicht bestrahlten Zellen. Die Genexpressionsanalysen festigen daher die Ergebnisse der Viabilitätsuntersuchungen am Durchflusszytometer. Sowohl mit als auch ohne Bestrahlung konnte dabei ein gleiches Maß an apoptotischen sowie vitalen Zellen detektiert werden. Andere Veröffentlichungen zeigten ebenfalls, dass Arsen apoptotische Vorgänge induzieren kann (Efferth und Kaina, 2004; zusammengefasst in Mandal, 2017).

### 5.6.4 Einfluss von Arsenit auf das Genexpressionsmuster der oxidativen Stressantwort

Die relativen Genexpressionsveränderungen der Gene der oxidativen Stressantwort sind in Abbildung 43 dargestellt. *HMOX1* zeigte dabei bereits ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  nach 26 h Inkubation eine 16-fache Induktion der relativen Genexpression im Vergleich zur Kontrolle. Zudem konnte bei gleicher Konzentration eine Verdopplung der Transkriptmengen von *FTH1* und *TXNRD1* detektiert werden. *TXN* zeigte eine Verdopplung der relativen Genexpression nach einer Arsenbehandlung mit 10  $\mu\text{M}$ . *HMOX1* codiert, wie bereits beschrieben, für die Hämoxygenase und wird infolge von oxidativem Stress induziert. Die starke Induktion deutet demnach auf starken oxidativem Stress durch Arsen hin. *FTH1* codiert für Ferritin, ein Eisenspeicherprotein. Arsen sowie dessen metabolische Verbindungen können mit Ferritin interagieren, Eisen freisetzen und dadurch oxidativen Stress induzieren (Kitchin und Ahmad, 2003; Kitchin und Wallace, 2008).



**Abbildung 43: Einfluss von Arsenit auf die relative Expression der durch oxidativen Stress induzierbaren Gene.** HeLa S3-Zellen wurden für 26 h mit Arsen (1  $\mu\text{M}$  – 10  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Zur Untersuchung der oxidativen Stressantwort wurden folgende Gene herangezogen: *FTH1*, *G6PD*, *GCLC*, *HMOX1*, *SEPP1*, *TXN* und *TXNRD1*. Dargestellt sind die Mittelwerte (log2-fach) aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der relativen Genexpression der Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

*TXNRD1* codiert für die Thioredoxin-Reduktase und *TXN* für Thioredoxin selbst. Im Gegensatz dazu wurden *G6PD* und *SEPP1* durch Arsen reprimiert. Die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, codiert durch *G6PD*, ist ein wichtiger Kofaktor des GSH-Redoxzyklus. *SEPP1* codiert für Selenoprotein P. Die erhaltenen Ergebnisse bekräftigen, dass Arsen oxidativen Stress induziert und die anti-oxidativen Enzyme beeinflusst. Diesbezüglich konnte bereits gezeigt werden, dass Arsen vor allem Einfluss auf den GSH-Redoxzyklus nimmt und auch selbst ROS, über eine Induktion von NOX, induzieren kann (Chou *et al.* 2004, Lemarie *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2015; zusammengefasst in Thomas, 2008; Romero *et al.* 2014).

Eine zusätzliche Bestrahlung zur Arseninkubation führte zu ähnlichen Veränderungen der relativen Genexpression in HeLa S3-Zellen (Anhang, Abbildung 56) und demnach zu keiner zusätzlichen Induktion von oxidativem Stress.

## 5.7 Einfluss von Arsenit auf die genomische Stabilität

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Arsen den fehlerfreien Reparaturmechanismus (HR) der DNA-Doppelstrangbruchreparatur inhibiert, wohingegen der fehlerbehaftete Reparaturweg (NHEJ) unbeeinträchtigt blieb. Ferner konnte gezeigt werden, dass zwar die Apoptose konzentrationsabhängig durch Arsen induziert wurde, jedoch der Zellzyklusstopp bei hohen Konzentrationen übersprungen wurde. Im geringeren

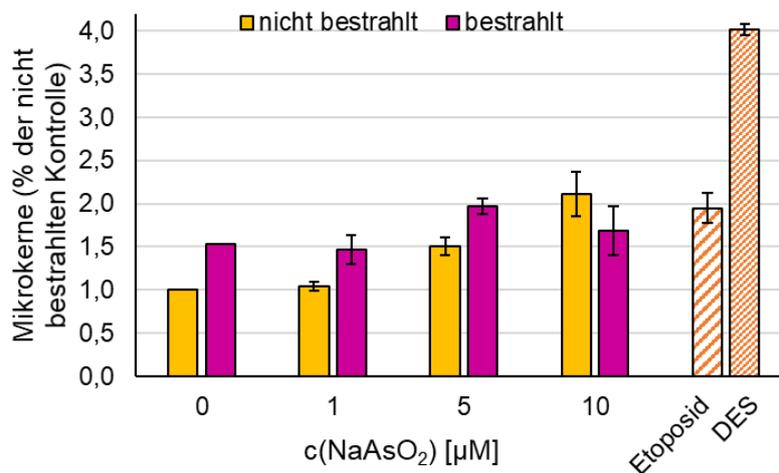
Konzentrationsbereich stellte sich ein G<sub>2</sub>/M-Zellzyklusphasenarrest ein. Wie bereits erläutert, ist das Zusammenspiel der DNA-Reparaturmechanismen, der Zellzykluskontrolle und der Apoptose von großer Wichtigkeit für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität. Aus diesem Grund wurde in der Folge der Einfluss von Arsen auf die Mikrokernbildung und die Entstehung von Genmutationen untersucht.

#### **5.7.1 Einfluss von Arsenit auf die Induktion von Mikrokerneln**

Das Auftreten von Mikrokerneln und hypodiploider Kerne in An- und Abwesenheit von Arsen wurde mittels Mikrokerntest am Durchflusszytometer betrachtet. Hierbei ist eine Unterscheidung zwischen aneugener und klastogener Wirkung möglich (Avlasevich *et al.*, 2006). Anhand der Untersuchung der auftretenden Mikrokerne (Abbildung 44) konnte ein konzentrationsabhängiger Verlauf der Mikrokernelinduktion durch Arsen nachgewiesen werden. Bereits eine Behandlung mit 5 µM Arsenit begünstigte die Bildung. Nach einer Behandlung mit einer Konzentration von 10 µM NaAsO<sub>2</sub> konnten doppelt so viele Mikrokerne detektiert werden wie in der zugehörigen Kontrolle.

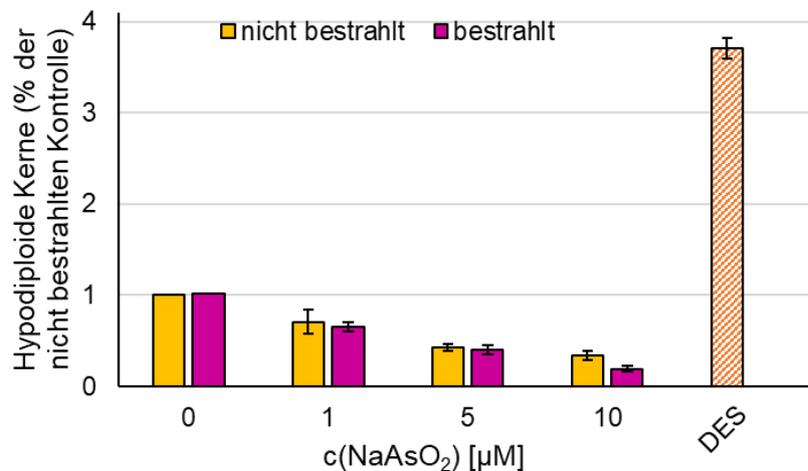
Eine Bestrahlung mit 1 Gy bewirkte ein leicht gesteigertes Auftreten von Mikrokerneln im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle. Eine zusätzliche Inkubation mit 1 µM NaAsO<sub>2</sub> induzierte hingegen keine weiteren Mikronuklei. Die kombinierte 5 µM Behandlung mit Arsen und Bestrahlung verursachte einen Anstieg der Mikrokerne; dabei stieg die Anzahl der Mikrokerne durch die Arseninkubation im gleichen Maße an wie bei der nicht bestrahlten Inkubation. Demnach ergaben sich keine synergistischen Effekte.

Die Ergebnisse bezüglich der Mikrokernelinduktion durch Arsen könnten sowohl durch eine klastogene als auch durch eine aneugene Wirkung resultieren. In beiden Fällen werden Mikrokerne induziert. Durch eine aneugene Wirkung von Arsen wären jedoch ebenfalls hypodiploide Kerne detektierbar. Abbildung 45 verdeutlicht, dass es in Anwesenheit von Arsen, relativ zur zugehörigen Kontrolle, zu einer Reduktion der hypodiploiden Kerne kam. Im Gegensatz dazu war deutlich ersichtlich, dass die Positivkontrolle DES eine starke Induktion der hypodiploiden Kerne verursachte. Ebenso wie die nicht bestrahlten Proben zeigten auch die bestrahlten eine Reduktion der hypodiploiden Kerne.



**Abbildung 44: Einfluss von Arsenit auf das Auftreten von Mikrokernen in HeLa S3-Zellen.** HeLa S3-Zellen wurden für 26 h mit Arsen (1 µM – 10 µM) inkubiert; eine Bestrahlung (1 Gy) erfolgte nach 18 h. Als Positivkontrollen wurden Etoposid und Diethylstilbestrol (DES) mitgeführt. Zur Ausbildung von Mikrokernen müssen Zellen einen vollständigen Zellzyklus durchlaufen. Aus diesem Grund wurden die Zellen mit frischem Medium nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. Diese Analyse wurde unter Anleitung von Rebecca Niemand von Frau Stephanie Habel im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

Im Gegensatz zu den dargestellten Ergebnissen konnte eine aneugene Wirkung von Arsen in humanen Lymphozyten gezeigt werden (Vega *et al.*, 1995; Ramírez *et al.*, 1997). Hierbei wurden jedoch vergleichsweise niedrige Konzentrationen bis maximal  $10^{-2}$  µM Arsen verwendet, wohingegen in der vorliegenden Arbeit Konzentrationen ab 1 µM Arsenit verwendet wurden. Die daraus resultierenden Ergebnisse deuten durch die Reduktion der hypodiploiden Kerne und der Induktion der Mikrokerne auf eine klastogene Wirkung ab einer Konzentration von 5 µM Arsen hin. Dies konnte ebenfalls in A549-Zellen, humanen Lymphozyten sowie in zahlreichen anderen Modellsystemen gezeigt werden (Yager und Wiencke, 1993; Chakraborty und De, 2009; Bartel *et al.*, 2011; zusammengefasst in Basu *et al.*, 2001; Bustaffa *et al.*, 2014). Bezüglich der konträren Studien wurde bereits postuliert, dass Arsen im sehr niedrigen Konzentrationsbereich aneugen wirkt, jedoch im hohen Konzentrationsbereich eine klastogene Wirkung aufweist (zusammengefasst in Gebel, 2001; Rossman, 2003).



**Abbildung 45: Einfluss von Arsenit auf das Vorkommen hypodiploider Kerne in HeLa S3-Zellen.** HeLa S3-Zellen wurden für 26 h mit Arsen (1  $\mu$ M – 10  $\mu$ M) inkubiert. Eine Bestrahlung (1 Gy) erfolgte nach 18 h. Als Positivkontrolle wurde die aneugene Substanz Diethylstilbestrol (DES) mitgeführt. Zur Ausbildung von hypodiploiden Kernen müssen Zellen einen vollständigen Zellzyklus durchlaufen. Aus diesem Grund wurden die Zellen mit frischem Medium nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. Diese Analyse wurde unter Anleitung von Rebecca Niemand von Frau Stephanie Habel im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

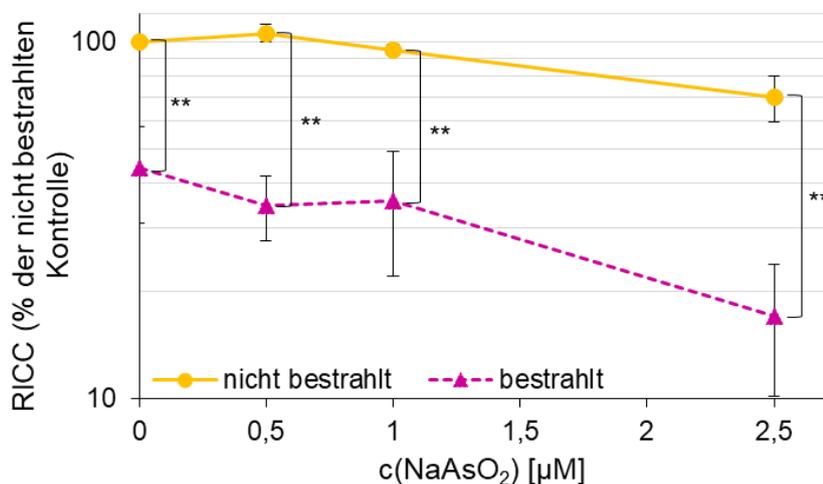
### 5.7.2 Einfluss von Arsenit auf das Auftreten von Genmutationen

Der *in vitro* PIG-A-Genmutationstest basiert auf dem GPI-Status von Säugerzellen und wurde in unserer Arbeitsgruppe entwickelt. Das *PIG-A*-Gen ist an der Synthese des GPI-Ankers beteiligt. Die Detektion des GPI-Status erfolgt über verschiedenen Oberflächenproteine, die an den GPI-Anker binden. Das daraus resultierende Fluoreszenzsignal ermöglicht eine sensitive und reproduzierbare Quantifizierung vereinzelt vorkommender GPI-negativer Zellen (Krüger *et al.*, 2015). Als Zellmodell werden TK6-Zellen eingesetzt, die sich vielseitig für die Verwendung in gentoxischen Untersuchungen bewährt haben. Das *PIG-A*-Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert, daher reicht eine genotypische Mutation aus, um eine phänotypische Veränderung zu erzielen (zusammengefasst in Kirkland *et al.*, 2007). Für den PIG-A-Genmutationstest muss zuvor ein geeigneter Konzentrationsbereich festgelegt werden; die höchste Behandlungsdosis sollte dabei einen RICC von 10 % bis 20 % nicht unterschreiten.

### 5.7.2.1 Einfluss von Arsenit auf den „Relative increase in cell counts“

Über den RICC lässt sich die relative Zunahme der Zellzahl ermitteln. Hierbei handelt es sich um ein sehr empfindliches Testsystem, das die Teilungsfähigkeit der Zellen miterfasst. Die Berücksichtigung der Teilungsfähigkeit ist unerlässlich, da diese essentiell für die Entstehung von Mutationen ist, welche mittels PIG-A-Genmutationstest untersucht werden sollen. Nachdem sich die in HeLa S3-Zellen verwendeten Konzentrationen als zu hoch erwiesen haben (Anhang, Abbildung 57), wurde daher ein niedrigerer Konzentrationsbereich gewählt (Abbildung 46).

Bei einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  NaAsO<sub>2</sub> ergab sich ein leicht proliferierender Effekt von circa 5 % im Vergleich zur Kontrolle. Bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Arsenit konnte hingegen eine Abnahme des RICC um 5 % im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden. Eine Konzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  NaAsO<sub>2</sub> ergab eine weitere Reduktion des RICC um 25 % auf 70 %. Die Ergebnisse bestätigen die Studie von Hornhardt *et al.* (2006). Hierbei wurde der Parameter der Zellzahl untersucht; bei 2  $\mu\text{M}$  NaAsO<sub>2</sub> reduzierte sich die Zellzahl um 20 % im Vergleich zur Kontrolle.

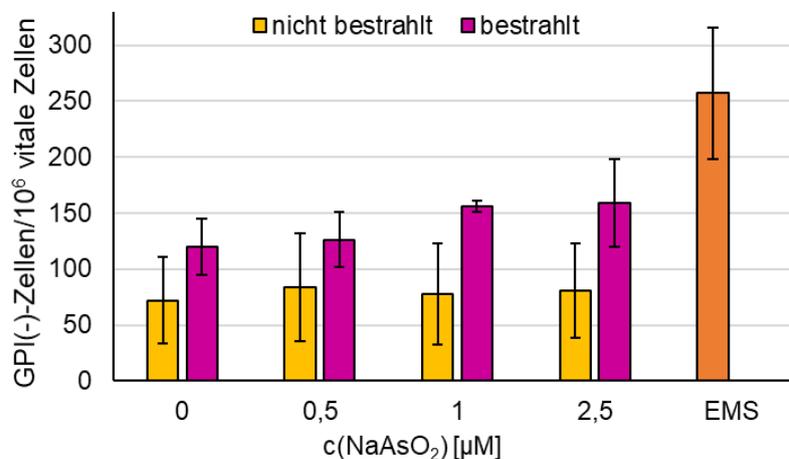


**Abbildung 46: Relative increase in cell counts (RICC) der TK6-Zellen nach Inkubation mit Arsenit.** TK6-Zellen wurden für 26 h mit Arsenkonzentrationen von 0,5  $\mu\text{M}$  bis 2,5  $\mu\text{M}$  behandelt. Eine Bestrahlung mit 1 Gy erfolgte nach 18 h. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der nicht bestrahlten Probe nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (\*\*  $p \leq 0,01$ ). Diese Analyse wurde unter Anleitung von Rebecca Niemand von Frau Stephanie Habel im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

Eine Bestrahlung führte zu einem deutlichen Abfall des RICC. Im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle ergab sich ein Verlust um etwa 50 %. Dieser Verlust blieb auch bei zunehmender Arsenkonzentration in etwa gleich, wobei sich der Unterschied durchweg als signifikant darstellte. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Behandlung mit 2,5  $\mu\text{M}$  NaAsO<sub>2</sub> mit zusätzlicher Bestrahlung als maximal verwendbare Konzentration für den FIG-A-Genmutationstest eignet.

### 5.7.2.2 Untersuchung des Einflusses von Arsenit auf das Auftreten von Genmutationen mittels FIG-A-Genmutationstest

Wie bereits beschrieben, wurde das Auftreten von Genmutationen am Durchflusszytometer mittels des *in vitro* FIG-A-Genmutationstests untersucht. Die Ergebnisse werden in Abbildung 47 dargestellt. Durch die Inkubation mit Arsen im Konzentrationsbereich von 0,5  $\mu\text{M}$  bis 2,5  $\mu\text{M}$  NaAsO<sub>2</sub> kam es zu keiner erhöhten Inzidenz von Genmutationen. Demnach wurden durchweg in etwa die gleiche Anzahl von durchschnittlich 75 GPI-defiziente TK6-Zellen detektiert. In der Literatur wurde ebenfalls beschrieben, dass Arsen keine mutagene Wirkung aufweist (zusammengefasst in Basu *et al.*, 2001).



**Abbildung 47: Einfluss von Arsenit auf das Vorkommen von GPI-defizienten TK6-Zellen.** TK6-Zellen wurden für 26 h mit Arsen (0,5  $\mu\text{M}$  – 2,5  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Eine Bestrahlung mit 1 Gy erfolgte noch 18 h. Als Positivkontrolle wurde Ethylmethansulfonat (EMS) mitgeführt. Zur Ausbildung möglicher Genmutationen wurden die Zellen für 10 Tage subkultiviert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. Diese Analyse wurde unter Anleitung von Rebecca Niemand von Frau Stephanie Habel im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

Eine Bestrahlung mit 1 Gy führte zum vermehrten Auftreten von GPI-defizienten Zellen; es konnten 120 GPI-defiziente Zellen/ $10^6$  vitaler Zellen detektiert werden. Eine erhöhte Mutationsrate aufgrund von  $\gamma$ -Strahlung konnte bereits in TK6-Zellen nachgewiesen werden (Yatagai *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2010).

Bei Betrachtung der bestrahlten Proben in Kombination mit Arsenbehandlung ließ sich im Konzentrationsverlauf eine Steigerung von 120 auf 160 GPI-defiziente TK6-Zellen erkennen. Arsen wies demnach in Kombination mit Röntgenstrahlung einen synergistischen Effekt auf, wodurch ein erhöhtes Auftreten von Mutationen im *PIG-A*-Lokus resultierte. Dieser Effekt war aufgrund der Schwankungen jedoch nicht signifikant. Ähnliche synergistische Effekte auf die Mutationsrate konnten in TK6-Zellen unter Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (UV C) und gleichzeitiger Arsenbehandlung festgestellt werden (Danaee *et al.*, 2004).

## 6. Zusammenfassende Diskussion

DNA-Reparaturprozesse sind von besonderer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität. Die DNA-Doppelstrangbruchreparatur spielt dabei eine bedeutende Rolle, da DNA-Doppelstrangbrüche eine der gravierendsten Schädigungen der DNA darstellen (zusammengefasst in Hoeijmakers, 2001; Clancy, 2008). Die Proteine der DNA-Reparaturmechanismen besitzen häufig Zink-bindenden Strukturen; die Zinkionen werden darin durch Thiolgruppen und Stickstoff komplexiert. Diese Zink-bindende Strukturen sind potentielle Angriffspunkte für chemische Substanzen. Vor allem Metalle weisen eine hohe Thiolaaffinität auf, wodurch diese mit den Zink-bindenden Proteinen wechselwirken können und in der Folge kanzerogen wirken können (zusammengefasst in Hartwig, 2001; Beyersmann und Hartwig, 2008; Hartwig, 2013).

Arsen ist ein Halbmetall und eine ubiquitär vorkommende Kontaminante, weshalb die Exposition gegenüber Arsen kontinuierlich stattfindet. Anorganisches Arsen reichert sich aufgrund seiner Löslichkeit bevorzugt im Wasser an, wodurch vor allem Trinkwasser sowie Reis- und Reisprodukte stark mit Arsen belastet sind (Richtlinie 98/83/EG; EFSA, 2009). Arsen wurde von der IARC und der MAK-Kommission als Humankarzinogen der Gruppe 1 eingestuft. Infolge einer Arsenintoxikation kann es zu Hautveränderungen bis hin zur Entstehung von Haut-, Lungen- oder Blasen tumoren kommen. Weiterhin wird vermutet, dass Arsen ebenfalls Leber-, Nieren- sowie Prostata tumoren induzieren kann (DFG, 2002; 2014; WHO, 2010; IARC, 2012). Als relevante Wirkmechanismen wurden die Induktion von oxidativem Stress und die Inhibierung von DNA-Reparaturprozessen postuliert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Arsen antioxidative Enzyme hemmt sowie Zink-bindende Proteine der SSBR, der BER, der NER und der MMR beeinflusst (Hartwig *et al.*, 2003; Walter *et al.*, 2007; Nollen *et al.*, 2009; Ebert *et al.*, 2011; Tong *et al.*, 2015; zusammengefasst in Emadi und Gore, 2010). In Bezug auf potentielle Einflüsse auf die DNA-Doppelstrangbruchreparatur ist jedoch nur wenig bekannt. Zhang *et al.* (2014) konnten eine Interaktion von NaAsO<sub>2</sub> mit den RING-Finger Proteinen RNF20 und RNF40 sowie einen inhibitorischen Effekt auf die Anlagerung der Reparaturproteine Rad51 und BRCA1, die eine bedeutende Rolle in der HR spielen, zeigen. Weiterhin wurde gezeigt, dass Arsen konzentrationsabhängig die DNA-Doppelstrangbruchreparatur in Ovarialzellen des chinesischen Hamsters hemmt, jedoch ohne weitere mechanistische Untersuchungen durchzuführen (Takahashi *et al.*, 2000).

Die vorliegende Arbeit sollte einen weiterführenden Beitrag zur genaueren mechanistischen Betrachtung des Einflusses von Arsen auf die DNA-Schadensreparatur leisten. Hierzu wurden zunächst die DNA-Doppelstrangbruchreparatur in der humanen Zelllinie HeLa S3 im Allgemeinen sowie die beiden Reparaturwege NHEJ und HR im Speziellen betrachtet. Ergänzend wurden der Einfluss von Arsen auf den Zellzyklus und die Induktion der Apoptose untersucht. Mittels Genexpressionsanalyse wurden die zuvor erhaltenen Ergebnisse bekräftigt und zusätzlich der Einfluss von Arsen auf weitere zelluläre Signalwege betrachtet. Abschließend wurde die genomische Stabilität in HeLa S3- und TK6-Zellen mit und ohne zusätzliche Bestrahlung untersucht.

Die Zytotoxizitätsanalysen dienten zur Findung eines geeigneten Konzentrationsbereichs von Arsen; dieser erstreckte sich für die Untersuchungen der DNA-Doppelstrangbruchreparatur von 1  $\mu\text{M}$  bis maximal 10  $\mu\text{M}$  Arsenit. Darüber hinaus zeigte sich eine leichte Zunahme der Zellzahl um 10 % bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$ . Aus diesem Grund wurde für die Zellzyklusanalysen sowie den Viabilitätsmessungen Konzentrationen bis 30  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  eingesetzt.

Der direkte Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen erfolgte mittels PFGE; ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  Arsen lag eine Inhibierung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur nach bereits 4 h Reparaturzeit vor. Vor allem nach 8 h konnte ein vermehrtes Auftreten kleiner DNA-Fragmente im Agarosegel beobachtet werden. Nach einer Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  zeigte sich 20 % mehr DNA im Gel als in der bestrahlten Kontrolle. Das erhaltene Ergebnis bestätigte die Beobachtungen von Takahashi *et al.* (2000). Diese verzeichneten einen signifikanten Rückgang der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in chinesischen Hamsterzellen infolge einer Arseninkubation. Die PFGE lässt keine Unterscheidung der beiden Hauptreparaturwege für DNA-Doppelstrangbrüche zu; aus diesem Grund wurde für die spezifische mechanistische Untersuchung die indirekte Nachweismethode der Immunfluoreszenzfärbung verwendet. Durch diese Analyse-methode konnte nachgewiesen werden, dass Arsen selbst keine DNA-Doppelstrangbrüche induziert. Zur Untersuchung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur wurden daher Schäden durch Röntgenstrahlung induziert. Die Schadenserkenung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur wurde durch Arsen nicht beeinträchtigt; weder die Assoziation, noch die Dissoziation von phosphoryliertem ATM,  $\gamma\text{H2AX}$  und 53BP1 wurden beeinflusst. Lediglich nach einer Reparaturzeit von 8 h konnte eine leichte Erhöhung der Foci-Anzahl von  $\gamma\text{H2AX}$  und 53BP1 festgestellt werden. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Schadenserkenung

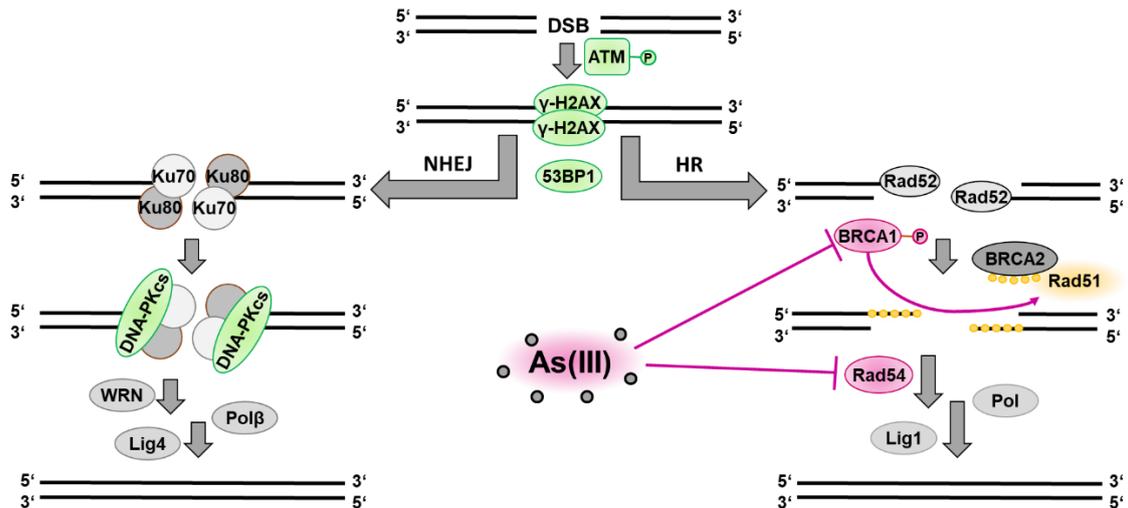
sowie die Weiterleitung des Schadensignals in Anwesenheit von Arsen korrekt stattfinden. Ferner lässt sich durch den leichten Effekt auf spätere Reparaturzeitpunkte vermuten, dass die NHEJ nicht durch Arsen beeinflusst wird, die HR jedoch schon. Diese Schlussfolgerung ergab sich, da in der untersuchten G<sub>2</sub>-Phase die anfängliche Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche durch die NHEJ gewährleistet wird, die spätere Reparatur hingegen durch die HR (Beucher *et al.*, 2009).

Zur Untersuchung des spezifischen Einflusses auf die NHEJ und die HR wurden Markerproteine der beiden Reparaturwege ausgewählt; DNA-PKcs für das NHEJ sowie Rad51 für die HR. Bezüglich der Reparaturkinetik von DNA-PKcs zeigte sich ein normaler Verlauf der Reparatur trotz Arseninkubation. Nach 8 h Reparaturzeit ließen sich sowohl in der nicht mit Arsen behandelten Kontrolle, als auch in den mit 5 µM Arsen behandelten Zellen etwa 20 DNA-PKcs-Foci detektieren. Hieraus ließ sich schließen, dass der Reparaturmechanismus des NHEJ nicht durch Arsen beeinträchtigt wird, da es sich bei DNA PKcs um ein für das NHEJ essentielles und spezifische Protein handelt (zusammengefasst in Dobbs *et al.*, 2010). Kritisch betrachtet werden muss jedoch, dass es sich bei DNA-PKcs um ein früh anlagerndes Reparaturprotein handelt, wodurch keine Aussagen über die anschließenden Reparaturfaktoren getroffen werden konnten. Aufgrund der Beobachtungen mittels 53BP1- sowie γH2AX-Färbung und Vergleich mit den Kontrollzellen ließ sich jedoch bekräftigen, dass das erhaltene Ergebnis der DNA-PKcs-Foci auf keinen Einfluss von Arsen auf das NHEJ zurückzuführen ist.

Bezüglich der Reparaturkinetik von Rad51 zeigte sich nach Arsenbehandlung und gleichzeitiger Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch Röntgenstrahlung ein eindeutiger Effekt. Während die nicht behandelte Kontrolle einen Rückgang von 32 Foci auf 16 Foci verzeichnete, zeigten die Rad51-Foci infolge einer Arsenbehandlung eine Persistenz. Der erhaltene Einfluss auf Rad51 zeigte demnach einen eindeutigen nachteiligen Effekt auf die HR an, da Rad51 spezifisch sowie essentiell für die Funktionalität der HR ist (zusammengefasst in Sak *et al.*, 2005; Heyer *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu den erhaltenen Ergebnisse bewirkte in einer Studie mit HeLa-Zellen eine Inkubation mit 5 µM NaAsO<sub>2</sub> keine Foci-Assoziation von Rad51 (Zhang *et al.*, 2014). Hierbei wurde eine Reparaturzeit von 10 min betrachtet, wohingegen in der vorliegenden Arbeit eine Reparaturzeit von 2 h bis 8 h betrachtet wurde. Die Gesamtheit der Ergebnisse deutet demnach auf eine verlangsamte Anlagerung von Rad51 an den DNA-Doppelstrangbruch hin. Weiterhin zeigten Zhang *et al.* (2014), dass BRCA1 durch Arsen beeinflusst wurde. Dies bekräftigt die

Annahme der verlangsamten Anlagerung von Rad51, da BRCA1 sowie PALB2 und BRCA2 für die Anlagerung von Rad51 zuständig sind (Sy *et al.*, 2009). Eine verminderte Aktivität von BRCA1 führt demnach zu einer verlangsamten Anlagerung von Rad51 (Parvin *et al.*, 2011; Towler *et al.*, 2013). Folglich wurde in der vorliegenden Arbeit die Rekrutierung von BRCA1 an den DNA-Schaden betrachtet. Hierbei zeigte sich analog zu Zhang *et al.* (2014) ein negativer Einfluss auf die Formation der BRCA1-Foci. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass der Einfluss auf BRCA1 konzentrationsabhängig verläuft. Nach einer Reparaturzeit von 2 h konnten etwa 25 Foci in der nicht behandelten Kontrolle, 13 Foci in der 1  $\mu$ M sowie 1 Focus in der 5  $\mu$ M Arsenbehandlung in der G<sub>2</sub>-Phase detektiert werden. Der Einfluss auf BRCA1 erklärt die verlangsamte Anlagerung von Rad51, jedoch nicht die Persistenz der Rad51-Foci. Aus diesem Grund wurde anschließend Rad54 untersucht, welches für den Abbau von Rad51 zuständig ist (zusammengefasst in Mazin *et al.*, 2010). Die daraus resultierenden Ergebnisse zeigten einen signifikanten Einfluss auf die Assoziation von Rad54 an den DNA-Doppelstrangbruch. 8 h nach Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen ließen sich in der nicht behandelten Kontrolle 16 Foci nachweisen, wohingegen nach 1  $\mu$ M Inkubation nur etwa 11 Foci und nach 5  $\mu$ M Inkubation mit Arsenit nur 5 Foci detektierbar waren. Der Effekt auf Rad54 unterstützt damit das Ergebnis der persistierenden Rad51-Foci.

Das Genexpressionsprofil der DNA-Schadensantwort sowie DNA-Reparatur ergab nach Behandlung mit Arsen ebenfalls eindeutige Effekte. Die Gene *DDIT3* und *GADD45A* zeigten einen konzentrations- und zeitabhängigen Anstieg der Transkriptmenge, was darauf schließen ließ, dass es zu einem vermehrten Auftreten von DNA-Schäden kam (zusammengefasst in Fornace Jr *et al.*, 1989; Bento *et al.*, 2009; Shan *et al.*, 2012). Zudem zeigten nahezu alle Gene der DNA-Reparatur eine Repression der relativen Genexpression nach Arsenbehandlung. Hierbei konnten bereits vorliegende Ergebnisse zum Einfluss von Arsen auf die SSBR, die BER, die NER und die MMR bestätigt werden (Hartwig *et al.*, 1997; 2003; Schwerdtle *et al.*, 2003a; Ebert *et al.*, 2011; Treas *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2017). Ferner unterstützte die Genexpressionsanalyse den festgestellten nachteiligen Effekt von Arsen auf die DNA-Doppelstrangbruchreparatur.



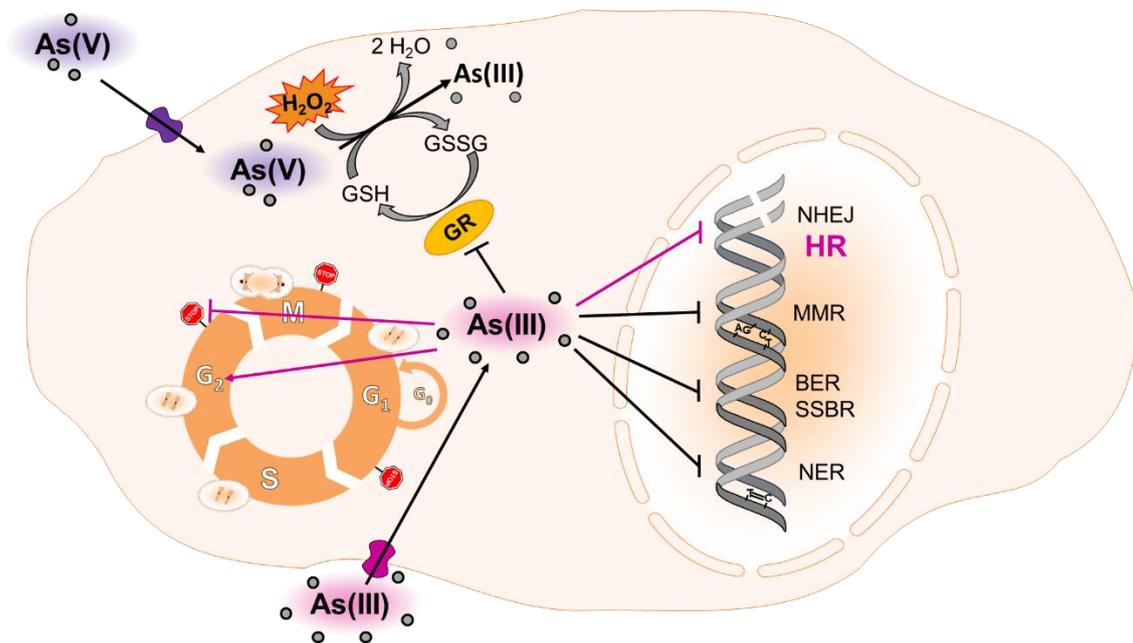
**Abbildung 48: Zusammenfassender Einfluss von Arsen auf die DNA-Doppelstrangbruchreparatur.** Arsen nimmt keinen Einfluss auf die Schadenserkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB). Weder phospho-ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) noch  $\gamma$ H2AX oder 53BP1 (*p53 binding protein 1*) zeigten einen verlangsamten Abbau der Foci. Ferner wird auch das nicht-homologe *end-joining* (NHEJ) nicht durch Arsen beeinträchtigt; dies wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung von DNA-PKcs (DNA-abhängige Proteinkinase, katalytische Untereinheit) nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wird die homologe Rekombination (HR) stark durch Arsen beeinträchtigt. Die Anlagerung von BRCA1 (*breast cancer 1*) und Rad54 wurden konzentrationsabhängig inhibiert. Hieraus resultierte eine verlangsamte Anlagerung von Rad51 (Zhang *et al.*, 2014) und eine Persistenz der Foci.

Die Gesamtheit der Daten bezüglich der DNA-Doppelstrangbruchreparatur konnten demnach fortführend zur vorhandenen Datenlage nachweisen, dass im Spezifischen die HR durch Arsen beeinträchtigt wird (Abbildung 48). Morales *et al.* (2016) wiesen dies mittels transfizierten U2OS-Zellen nach; die HR wurde in Anwesenheit von Arsen (1  $\mu$ M – 5  $\mu$ M) inhibiert, wohingegen die NHEJ bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M nur leicht beeinflusst wurde. Erste mechanistische Untersuchungen erfolgten durch Zhang *et al.* (2014) in HeLa-Zellen. Bereits 5  $\mu$ M NaAsO<sub>2</sub> verhinderten die Rekrutierung von BRCA1 und Rad51 an den induzierten DNA-Doppelstrangbruch. Untersucht wurde dabei ein Reparaturzeitpunkt von 10 min. Kombiniert mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich schließen, dass Arsen BRCA1 über den gesamten Reparaturverlauf der HR inhibiert. Dies führt wiederum zur verlangsamten Anlagerung von Rad51 (Zhang *et al.*, 2014) und damit zum indirekten Einfluss von Arsen auf Rad51. Ferner wird die Anlagerung von Rad54 konzentrationsabhängig durch Arsen beeinträchtigt. In der Folge kann Rad51 nicht mehr abgebaut werden (Mason *et al.*, 2015; zusammengefasst in Mazin *et al.*, 2010). Der aus dem Zusammenhang der Datenlage resultierende Wirkmechanismus von Arsen bezüglich

der DNA-Doppelstrangbruchreparatur verdeutlicht erneut, dass Zink-bindende Strukturen Zielstrukturen von Arsen darstellen (Sun *et al.*, 2014; zusammengefasst in Hartwig, 2001). Sowohl BRCA1, als auch Rad54 verfügen über solche Zink-bindenden Strukturen, wodurch eine Interaktion mit Arsen aufgrund der Thiolaffinität ermöglicht wurde (Catrouillet *et al.*, 2015; zusammengefasst in Borden und Freemont, 1996; Emadi und Gore, 2010; Mazin *et al.*, 2010).

Nicht nur die DNA-Reparatur alleine, sondern das Zusammenspiel der DNA-Reparaturmechanismen, der oxidativen Stressantwort sowie der Zellzykluskontrolle und der Apoptose sind von Bedeutung für den Erhalt der genomischen Stabilität. Die oxidative Stressantwort wurde in der vorliegenden Arbeit mittels Genexpressionsanalysen untersucht, da hierzu bereits zahlreiche mechanistische Studien vorliegen. Es ist bereits bekannt, dass Arsen in vielerlei Hinsicht mit GSH sowie Proteinen dessen Redoxzyklus interagiert und dadurch oxidativen Stress induziert (zusammengefasst in Thomas, 2008; Romero *et al.* 2014). Diesbezüglich zeigte unter anderem *G6PD* eine Repression der relativen Genexpression. Ein weiterer Mechanismus, der im Zusammenhang mit der Induktion von oxidativem Stress durch Arsen diskutiert wird, ist die Generierung von ROS infolge einer Induktion der NOX (Chou *et al.* 2004, Lemarie *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2015). Die Induktion von oxidativem Stress wurde vorrangig durch die 16-fache, beziehungsweise 64-fache Induktion von *HMOX1* durch Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$ , beziehungsweise 5  $\mu\text{M}$  Arsenit verdeutlicht.

Mittels durchflusszytometrischer Untersuchung konnte eine Induktion eines G<sub>2</sub>/M-Zellzyklusphasenarrests durch Arsen bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  nachgewiesen werden. Die Genexpressionsdaten sowie vorliegende Literaturdaten stützen dieses Ergebnis (McCollum *et al.*, 2005; Yih *et al.*, 2005). Hierbei wurde ebenfalls ein G<sub>2</sub>/M-Arrest als empfindlichster Parameter bestimmt. Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit ein Aussetzen des Zellzyklusstopp bei höheren Arsenkonzentrationen (ab 20  $\mu\text{M}$ ) festgestellt werden. Dieser Effekt konnte ebenfalls in CGL2-Zellen beobachtet werden (Yih *et al.*, 2005). Durch eine zusätzliche Bestrahlung mit 1 Gy trat die Inaktivierung des Zellzyklusstopp ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  NaAsO<sub>2</sub> ein, da durch die Bestrahlung alleine ebenfalls ein G<sub>2</sub>/M-Arrest induziert wurde.



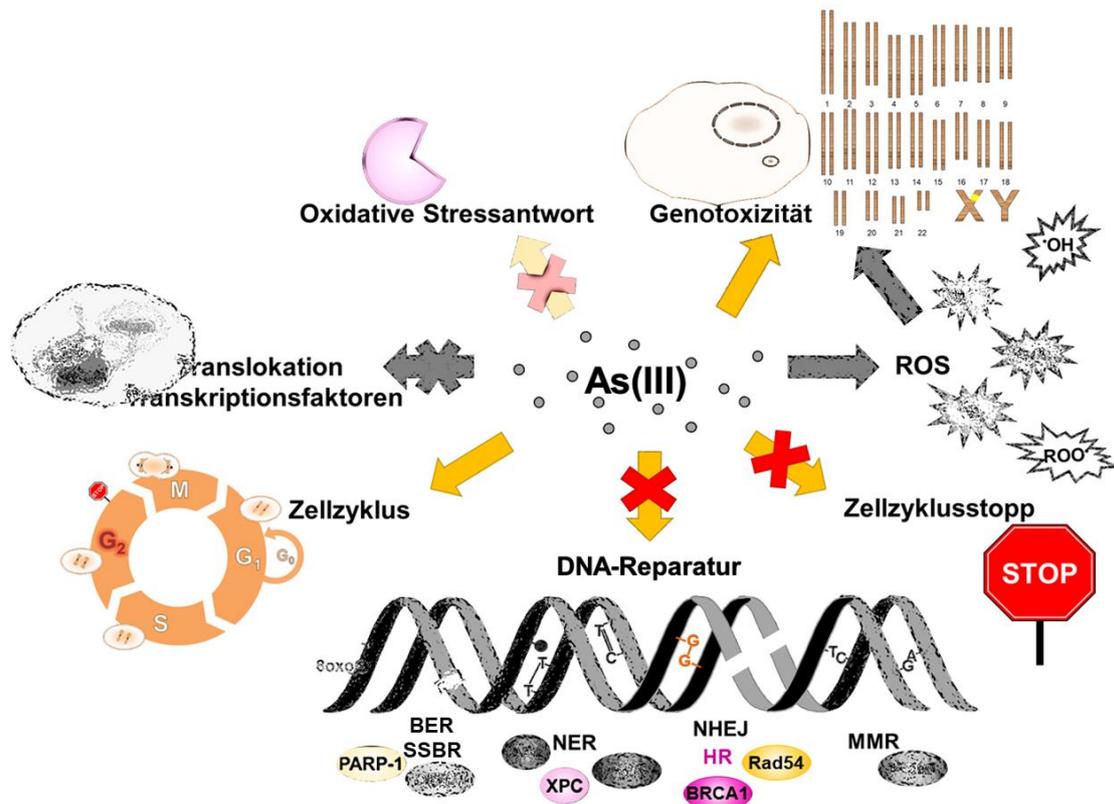
**Abbildung 49: Zusammenfassender zellulärer Wirkmechanismus von Arsen.** Für Arsen konnte bereits eine Inhibierung der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER), der Basen-Exzisionsreparatur (BER), der DNA-Einzelstrangbruchreparatur (SSBR) und der Mismatch-Reparatur (MMR) nachgewiesen werden (Hartwig *et al.*, 1997; 2003; Schwerdtle *et al.*, 2003a; Ebert *et al.*, 2011; Treas *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2017). Bezüglich der DNA-Doppelstrangbruchreparatur lag jedoch nur eine mechanistische Untersuchung, die homologe Rekombination (HR) betreffend, vor. Dabei wurde gezeigt, dass die Anlagerung von BRCA1 (*breast cancer 1*) und Rad51 nach 10 Minuten durch die Anwesenheit von Arsen inhibiert wurde (Zhang *et al.*, 2014). Die vorliegende Arbeit konnte zudem nachweisen, dass BRCA1 und Rad54 direkt sowie Rad51 indirekt durch Arsen beeinträchtigt werden. BRCA1 zeigte einen konzentrationsabhängigen Verlust der Assoziation an den DNA-Doppelstrangbruch. Rad51 zeigte hingegen in der Studie von Zhang *et al.* (2014) eine verlangsamte Anlagerung und in der vorliegenden Arbeit eine fehlende Dissoziation vom DNA-Doppelstrangbruch aufgrund der direkten Inhibierung von Rad54 durch Arsen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das nicht-homologe *end-joining* (NHEJ) nicht durch Arsen beeinflusst wird. Mittels Genexpressionsanalysen konnte ebenfalls der negative Einfluss auf die verschiedenen DNA-Reparaturwege gezeigt werden. Darüber hinaus konnte die Induktion von oxidativem Stress, der bereits ausführlich in der Literatur beschrieben wird, bestätigt werden (Chou *et al.*, 2004; Lemarie *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2015; zusammengefasst in Thomas, 2008; Romero *et al.*, 2014). Mittels durchflusszytometrischer Untersuchung konnte zudem gezeigt werden, dass niedrige Arsenkonzentrationen eine G<sub>2</sub>/M-Arrest induzieren, wohingegen höhere Konzentrationen eine Inhibierung des Zellzyklusstopps bewirken.

Ferner wurde mittels durchflusszytometrischer Untersuchung die Viabilität von HeLa S3-Zellen nach Behandlung mit Arsen betrachtet. Es ergab sich ein eindeutiger, konzentrationsabhängiger Effekt auf die Viabilität. Bereits eine Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  Arsenit zeigte eine signifikante Steigerung der apoptotischen Zellen. Dieser Einfluss von Arsen auf die Apoptose wurde bereits in HeLa-Zellen untersucht. Hierbei konnte bei längerer Inkubationszeit eine um 50 % erhöhte Induktion der Apoptose nachgewiesen werden (Han *et al.*, 2008). Anhand der Induktion der pro-apoptischen Gene *PM-AIP1* und *TNFRSF10B* konnte dies auch in den Genexpressionsanalysen nachgewiesen werden.

Folglich ergab sich ein nachteiliger Effekt des Arsens auf die genomische Stabilität. Zwar wirkte die Induktion der Apoptose als Folge einer Arsenbehandlung entgegen einer Instabilität, dennoch wurden sowohl die DNA-Reparaturprozesse als auch die Zellzykluskontrolle durch Arsen beeinflusst. Die Induktion von oxidativem Stress trägt zusätzlich zur Instabilität des Genoms bei. Abbildung 49 veranschaulicht die erhaltenen zellulären Wirkmechanismen von Arsen. Um den tatsächlichen Einfluss von Arsen auf die Stabilität des Genoms abschließend zu klären, wurde der Einfluss von Arsen mit und ohne zusätzliche Röntgenbestrahlung auf die Induktion von Mikrokernen, hypodiploiden Kernen sowie Genmutationen untersucht. Bezüglich der Induktion von Mikrokernen sowie hypodiploider Kerne wies Arsen einen klastogenen, jedoch keinen aneugenen Effekt im untersuchten Konzentrationsbereich (1  $\mu\text{M}$  – 5  $\mu\text{M}$ ) auf. Dies bestätigte vorliegende Literaturdaten (Yager und Wiencke, 1993; Chakraborty und De, 2009; zusammengefasst in Basu *et al.*, 2001). Es wurde postuliert, dass Arsen im sehr niedrigen Konzentrationsbereich (Spurenbereich) aneugene Effekte und im höheren Konzentrationsbereich klastogene Effekte aufweist. Eine zusätzliche Bestrahlung induzierte keine weiterführenden klastogenen oder aneugenen Effekte. Bezüglich der Induktion von Genmutationen wurde der GPI-Status von TK6-Zellen betrachtet. Durch ausschließliche Behandlung mit Arsen ließ sich kein Effekt auf das Auftreten GPI-defizienter TK6-Zellen detektieren. Dementgegen konnte bei einer kombinierten Behandlung von Arsen und Bestrahlung eine konzentrationsabhängige Zunahme der GPI-defizienten Zellen festgestellt werden. Synergistische Effekte von Arsen konnten bereits in Kombination mit UV C-Bestrahlung gezeigt werden (Danaee *et al.*, 2004).

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit einen Beitrag zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Arsen leisten. Insgesamt wurde ein nachteiliger Einfluss auf die genomische Stabilität nachgewiesen; es kam zur Inhibierung der fehlerfreien DNA-Doppelstrangbruchreparatur und zum Aussetzen des Zellzyklusstopps durch Arsen.

Ferner kam es zur Induktion von Mutationen infolge einer kombinierten Behandlung von Arsen und Röntgenstrahlung. Die neuen sowie die bereits bekannten Erkenntnisse bezüglich der Wirkungsweise von Arsen werden in Abbildung 50 zusammengefasst.



**Abbildung 50: Zusammenfassung des toxischen Wirkprofils von dreiwertigen anorganischem Arsen.** Die Toxizität von Arsen beruht auf einer Vielzahl von Mechanismen. Bisherige Erkenntnisse (grau) zeigten, dass Arsen die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) induziert sowie die Translokation von Transkriptionsfaktoren inhibiert (Flora *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2004; zusammengefasst in Emadi und Gore; 2010). Die vorliegende Arbeit konnte bestätigen (farbig, transparent), dass es zudem zu einer Inhibition der oxidativen Stressantwort kommt und Arsen eine klastogene Wirkung aufweist. Zusätzlich konnte durch die vorliegende Arbeit gezeigt werden (farbig), dass Arsen einen G<sub>2</sub>/M-Arrest induziert und es in hohen Konzentrationen zu einer Aufhebung des Zellzyklusstopps kommt. Dieses Aussetzten kann durch zusätzliche Röntgenbestrahlung bei geringeren Konzentrationen eintreten. Weiterhin konnten BRCA1 und Rad54 als empfindliche Zielmoleküle von Arsen identifiziert werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- Agarwal, S., Van Cappellen, W.A., Guénoilé, A., Eppink, B., Linsen, S.E.V., Meijering, E., Houtsmuller, A., Kanaar, R., Essers, J., 2011. ATP-dependent and independent functions of Rad54 in genome maintenance. *The Journal of Cell Biology* 192 (5), 735-750.
- Amundson, S.A., Xia, F., Wolfson, K., Liber, H.L., 1993. Different cytotoxic and mutagenic responses induced by x-rays in two human lymphoblastoid cell lines derived from a single donor. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 286 (2), 233-241.
- Ando, T., Kawabe, T., Ohara, H., Ducommun, B., Itoh, M., Okamoto, T., 2001. Involvement of the interaction between p21 and proliferating cell nuclear antigen for the maintenance of G2/M arrest after DNA damage. *Journal of Biological Chemistry* 276 (46), 42971-42977.
- ATSDR, 2007. Toxicological profile for arsenic.
- Avlasevich, S.L., Bryce, S.M., Cairns, S.E., Dertinger, S.D., 2006. In vitro micronucleus scoring by flow cytometry: Differential staining of micronuclei versus apoptotic and necrotic chromatin enhances assay reliability. *Environmental and molecular mutagenesis* 47 (1), 56-66.
- Azam, S.M.G.G., Afrin, S., Naz, S., 2017. Arsenic in cereals, their relation with human health risk, and possible mitigation strategies. *Food Reviews International* 33 (6), 620-643.
- Bartel, M., Ebert, F., Leffers, L., Karst, U., Schwerdtle, T., 2011. Toxicological characterization of the inorganic and organic arsenic metabolite thio- in cultured human lung cells. *Journal of Toxicology* 2011, 9.
- Basu, A., Mahata, J., Gupta, S., Giri, A.K., 2001. Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: A review. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 488 (2), 171-194.
- Baumann, P., Benson, F.E., West, S.C., 1996. Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell* 87 (4), 757-766.
- Baumann, P., West, S.C., 1998. Role of the human Rad51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends in biochemical sciences* 23 (7), 247-251.
- Bento, C., Andersson, M.K., Åman, P., 2009. Ddit3/chop and the sarcoma fusion oncoprotein fus-ddit3/tls-chop bind cyclin-dependent kinase 2. *BMC Cell Biology* 10.
- Beucher, A., Birraux, J., Tchouandong, L., Barton, O., Shibata, A., Conrad, S., Goodarzi, A.A., Krempler, A., Jeggo, P.A., Löbrich, M., 2009. ATM and artemis promote homologous recombination of radiation- induced DNA double- strand breaks in G2. *The EMBO journal* 28 (21), 3413-3427.
- Beyersmann, D., Hartwig, A., 2008. Carcinogenic metal compounds: Recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Archives of Toxicology* 82 (8), 493.
- BfR, 2014a. Arsen in Reis und Reisprodukten. 1-58.

- BfR, 2014b. EU-Höchstgehalte für anorganisches Arsen in Reis und Reisprodukten durch Verzehrsempfehlungen zum Schutz von Säuglingen, Kleinkindern und Kindern ergänzen., 1-9.
- Borden, K.L., Freemont, P.S., 1996. The ring finger domain: A recent example of a sequence—structure family. *Current opinion in structural biology* 6 (3), 395-401.
- Brem, R., Hall, J., 2005. Xrcc1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. *Nucleic Acids Research* 33 (8), 2512-2520.
- Bustaffa, E., Stoccoro, A., Bianchi, F., Migliore, L., 2014. Genotoxic and epigenetic mechanisms in arsenic carcinogenicity. *Archives of Toxicology* 88 (5), 1043-1067.
- Calatayud, M., Barrios, J.A., Vélez, D., Devesa, V., 2012. In vitro study of transporters involved in intestinal absorption of inorganic arsenic. *Chemical Research in Toxicology* 25 (2), 446-453.
- Caldecott, K.W., 2008. Single-strand break repair and genetic disease. *Nature Reviews Genetics* 9 (8), 619-631.
- Calviño, E., Estañ, M.C., Simón, G.P., Sancho, P., Boyano-Adánez, M.D.C., De Blas, E., Bréard, J., Aller, P., 2011. Increased apoptotic efficacy of lonidamine plus arsenic trioxide combination in human leukemia cells. Reactive oxygen species generation and defensive protein kinase (mek/erk, akt/mTOR) modulation. *Biochemical Pharmacology* 82 (11), 1619-1629.
- Catrouillet, C., Davranche, M., Dia, A., Bouhnik-Le Coz, M., Pédrot, M., Marsac, R., Gruau, G., 2015. Thiol groups controls on arsenite binding by organic matter: New experimental and modeling evidence. *Journal of Colloid and Interface Science* 460.
- Chakraborty, T., De, M., 2009. Clastogenic effects of inorganic arsenic salts on human chromosomes in vitro. *Drug and Chemical Toxicology* 32 (2), 169-173.
- Chan, D.W., Chen, B.P.-C., Prithivirajasingh, S., Kurimasa, A., Story, M.D., Qin, J., Chen, D.J., 2002. Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes & Development* 16 (18), 2333-2338.
- Chen, H., Jia, R., Zhou, M., Xu, A., Hu, Y., Cheng, W., Shao, C., 2010. The role of nucleophosmin/b23 in radiation-induced chromosomal instability in human lymphoblastoid cells of different p53 genotypes. *International journal of radiation biology* 86 (12), 1031-1043.
- Chou, W.-C., Jie, C., Kenedy, A.A., Jones, R.J., Trush, M.A., Dang, C.V., 2004. Role of NADPH oxidase in arsenic-induced reactive oxygen species formation and cytotoxicity in myeloid leukemia cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (13), 4578-4583.
- Christmann, M., Tomicic, M.T., Roos, W.P., Kaina, B., 2003. Mechanisms of human DNA repair: An update. *Toxicology* 193 (1-2), 3-34.
- Clancy, S., 2008. DNA damage & repair: Mechanisms for maintaining DNA integrity. *Nature Education* 1 (1), 103.
- D'Andrea, A.D., Grompe, M., 2003. The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer* 3 (1), 23-34.

- Danaee, H., Nelson, H.H., Liber, H., Little, J.B., Kelsey, K.T., 2004. Low dose exposure to sodium arsenite synergistically interacts with UV radiation to induce mutations and alter DNA repair in human cells. *Mutagenesis* 19 (2), 143-148.
- Darzynkiewicz, Z., Bedner, E., 2000. Analysis of apoptotic cells by flow and laser scanning cytometry. In: John, C.R. ed. *Methods in enzymology*. Academic Press, 18-39.
- David, S.S., O'shea, V.L., Kundu, S., 2007. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 447 (7147), 941-950.
- De Jager, M., Dronkert, M.L., Modesti, M., Beerens, C.E., Kanaar, R., Van Gent, D.C., 2001. DNA-binding and strand-annealing activities of human mre11: Implications for its roles in DNA double-strand break repair pathways. *Nucleic Acids Research* 29 (6), 1317-1325.
- Deakne, J.S., Huang, F., Negri, J., Tolliday, N., Cocklin, S., Mazin, A.V., 2013. Analysis of the activities of Rad54, a swi2/snf2 protein, using a specific small-molecule inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 288 (44), 31567-31580.
- Deans, A.J., West, S.C., 2011. DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nature Reviews Cancer* 11 (7), 467-480.
- Deckbar, D., Birraux, J., Krempler, A., Tchouandong, L., Beucher, A., Walker, S., Stiff, T., Jeggo, P., Löbrich, M., 2007. Chromosome breakage after G2 checkpoint release. *The Journal of cell biology* 176 (6), 749-755.
- DFG, 2002. Arsen und anorganische Arsenverbindungen (mit Ausnahme von Arsenwasserstoff). The MAK-collection for occupational health and safety. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- DFG, 2014. Arsen und Anorganische Arsenverbindungen (mit Ausnahme von Arsenwasserstoff). The MAK-collection for occupational health and safety. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Dobbs, T.A., Tainer, J.A., Lees-Miller, S.P., 2010. A structural model for regulation of NHEJ by DNA-PKcs autophosphorylation. *DNA repair* 9 (12), 1307-1314.
- Drobna, Z., Styblo, M., Thomas, D.J., 2009. An overview of arsenic metabolism and toxicity. *Current protocols in toxicology / editorial board, Mahin D. Maines (editor-in-chief) ... [et al.]* 42 (431), 4.31.1-4.31.6.
- Dynan, W.S., Yoo, S., 1998. Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. *Nucleic Acids Research* 26 (7), 1551-1559.
- Ebert, F., Weiss, A., Bültmeyer, M., Hamann, I., Hartwig, A., Schwerdtle, T., 2011. Arsenicals affect base excision repair by several mechanisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 715 (1-2), 32-41.
- Efferth, T., Kaina, B., 2004. Microarray-based prediction of cytotoxicity of tumor cells to arsenic trioxide. *Cancer Genomics-Proteomics* 1 (5-6), 363-370.
- EFSA, 2009. Scientific opinion on arsenic in food. *EFSA Journal* 7 (10), 1351.
- EFSA, 2015. Overview of data collection reports. *Chemicals in food 2015*, 16-20.
- El-Ghor, A.A., Noshay, M.M., Eid, J.I., 2011. Lead acetate and arsenic trioxide induce instability of microsatellites at three different fragile sites (6q21, 9q32-9q33 and 15p14) within the genome of the rat. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 726 (2), 195-199.

- Emadi, A., Gore, S.D., 2010. Arsenic trioxide - an old drug rediscovered. *Blood Reviews* 24 (4-5), 191-199.
- EU Nr. 2015/1006, Verordnung (EU) 2015/1006 der Kommission vom 25. Juni 2015 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 hinsichtlich der Höchstgehalte für anorganisches Arsen in Lebensmitteln.
- Evans, C.D., Ladow, K., Schumann, B.L., Savage Jr, R.E., Caruso, J., Vonderheide, A., Succop, P., Talaska, G., 2004. Effect of arsenic on benzo[a]pyrene DNA adduct levels in mouse skin and lung. *Carcinogenesis* 25 (4), 493-497.
- Fischer, B.M., Neumann, D., Piberger, A.L., Risnes, S.F., 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. *Archives of toxicology* 90 (11), 2745-2761.
- Fornace Jr, A.J., Nebert, D.W., Hollander, M.C., Luethy, J.D., Papathanasiou, M., Fargnoli, J., Holbrook, N.J., 1989. Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents. *Molecular and Cellular Biology* 9 (10), 4196-4203.
- Gebel, T.W., 2001. Genotoxicity of arsenical compounds. *International journal of hygiene and environmental health* 203 (3), 249-262.
- Goodhead, D.T., 1994. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: Clustered damage in DNA. *International journal of radiation biology* 65 (1), 7-17.
- Guillamet, E., Creus, A., Ponti, J., Sabbioni, E., Fortaner, S., Marcos, R., 2004. In vitro DNA damage by arsenic compounds in a human lymphoblastoid cell line (TK6) assessed by the alkaline comet assay. *Mutagenesis* 19 (2), 129-135.
- Hall, E.J., 2009. Radiation biology for pediatric radiologists. *Pediatric Radiology* 39 (SUPPL. 1), S57-S64.
- Han, Y.H., Kim, S.Z., Kim, S.H., Park, W.H., 2008. Suppression of arsenic trioxide-induced apoptosis in HeLa cells by n-acetylcysteine. *Mol Cells* 26 (1), 18-25.
- Harper, J.W., Elledge, S.J., 2007. The DNA damage response: Ten years after. *Molecular cell* 28 (5), 739-745.
- Hartwig, A., 2001. Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: Differential effects on structure and function. *Antioxidants and Redox Signaling* 3 (4), 625-634.
- Hartwig, A., 2013. Metal interaction with redox regulation: An integrating concept in metal carcinogenesis? *Free Radical Biology and Medicine* 55, 63-72.
- Hartwig, A., Groblinghoff, U., Beyersmann, D., Natarajan, A., Filon, R., Mullenders, L., 1997. Interaction of arsenic (iii) with nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *Carcinogenesis* 18 (2), 399-405.
- Hartwig, A., Pelzer, A., Asmuss, M., Bürkle, A., 2003. Very low concentrations of arsenite suppress poly(ADP- ribosyl)ation in mammalian cells. *International journal of cancer* 104 (1), 1-6.
- Herschleb, J., Ananiev, G., Schwartz, D.C., 2007. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat. Protocols* 2 (3), 677-684.
- Heyer, W.-D., Ehmsen, K.T., Liu, J., 2010. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annual review of genetics* 44, 113-139.

- Hoeijmakers, J.H., 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *nature* 411 (6835), 366.
- Holcomb, N., Goswami, M., Han, S.G., Scott, T., D'orazio, J., Orren, D.K., Gairola, C.G., Mellon, I., 2017. Inorganic arsenic inhibits the nucleotide excision repair pathway and reduces the expression of xpc. *DNA Repair* 52 (Supplement C), 70-80.
- Hopfner, K.P., Craig, L., Moncalian, G., Zinkel, R.A., Usui, T., Owen, B.a.L., Karcher, A., Henderson, B., Bodmer, J.L., McMurray, C.T., Carney, J.P., Petrini, J.H.J., Tainer, J.A., 2002. The Rad50 zinc-hook is a structure joining mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* 418 (6897), 562-566.
- Hornhardt, S., Gomolka, M., Walsh, L., Jung, T., 2006. Comparative investigations of sodium arsenite, arsenic trioxide and cadmium sulphate in combination with gamma-radiation on apoptosis, micronuclei induction and DNA damage in a human lymphoblastoid cell line. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 600 (1-2), 165-176.
- IARC, 2009. Arsenic, metals, fibres and dusts. A review of human carcinogens. World Health Organization (WHO), Lyon, France.
- IARC, 2012. Arsenic and arsenic compounds. 1-54.
- Islam, M.S., Khan, A., Aftab, H., Kusumoto, Y., 2015. Arsenic induced cytotoxicity study against human epithelial carcinoma (hela) cell.
- Iyama, T., Wilson, D.M., 2013. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair* 12 (8), 620-636.
- Jackson, S.P., 2002. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23 (5), 687-696.
- Jenuwein, T., Allis, C.D., 2001. Translating the histone code. *Science* 293 (5532), 1074-1080.
- Jiang, Q., Greenberg, R.A., 2015. Deciphering the BRCA1 tumor suppressor network. *Journal of Biological Chemistry* 290 (29), 17724-17732.
- Jiang, X., Chen, C., Zhao, W., Zhang, Z., 2013. Sodium arsenite and arsenic trioxide differently affect the oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in A549 cells: An implication for the paradoxical mechanism. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36 (3), 891-902.
- Kaminaga, K., Noguchi, M., Narita, A., Sakamoto, Y., Kanari, Y., Yokoya, A., 2015. Visualisation of cell cycle modifications by x-ray irradiation of single HeLa cells using fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicators. *Radiation Protection Dosimetry* 166 (1-4), 91-94.
- Kapuscinski, J., 1995. DAPI: A DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochemistry* 70 (5), 220-233.
- Kirkland, D., Pfuhrer, S., Tweats, D., Aardema, M., Corvi, R., Darroudi, F., Elhajouji, A., Glatt, H., Hastwell, P., Hayashi, M., 2007. How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ecvam workshop. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 628 (1), 31-55.
- Kitchin, K.T., Ahmad, S., 2003. Oxidative stress as a possible mode of action for arsenic carcinogenesis. *Toxicology Letters* 137 (1), 3-13.

- Kitchin, K.T., Wallace, K., 2008. The role of protein binding of trivalent arsenicals in arsenic carcinogenesis and toxicity. *Journal of Inorganic Biochemistry* 102 (3), 532-539.
- Komatsu, K., 2016. Nbs1 and multiple regulations of DNA damage response. *Journal of Radiation Research* 57, i11-i17.
- Krüger, C.T., 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. *Archives of Toxicology* 89 (12), 2429-2443.
- Kuo, L.J., Yang, L.-X., 2008.  $\Gamma$ -h2ax-a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In vivo* 22 (3), 305-309.
- Kurz, E.U., Lees-Miller, S.P., 2004. DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair* 3 (8-9), 889-900.
- Landry, J.J.M., Pyl, P.T., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, M.M., Stütz, A.M., Jauch, A., Aiyar, R.S., Pau, G., Delhomme, N., Gagneur, J., Korbel, J.O., Huber, W., Steinmetz, L.M., 2013. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3: Genes | Genomes | Genetics* 3 (8), 1213-1224.
- Lees-Miller, S., Meek, K., 2003. Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie* 85 (11), 1161-1173.
- Lemarie, A., Bourdonnay, E., Morzadec, C., Fardel, O., Vernhet, L., 2008. Inorganic arsenic activates reduced nadph oxidase in human primary macrophages through a rho kinase/p38 kinase pathway. *The Journal of Immunology* 180 (9), 6010-6017.
- Li, J.H., Rossman, T.G., 1989. Mechanism of comutagenesis of sodium arsenite with n-methyl-n-nitrosourea. *Biological Trace Element Research* 21 (1), 373-381.
- Lieber, M.R., 2010. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual review of biochemistry* 79, 181-211.
- Lipkowitz, S., Weissman, A.M., 2011. Rings of good and evil: Ring finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumour suppression and oncogenesis. *Nature reviews. Cancer* 11 (9), 629-643.
- Liu, D., Keijzers, G., Rasmussen, L.J., 2017. DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 773 (Supplement C), 174-187.
- Liu, N., 2002. XRCC2 is required for the formation of Rad51 foci induced by ionizing radiation and DNA cross-linking agent mitomycin c. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2 (2), 106-113.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>ΔΔCt method. *methods* 25 (4), 402-408.
- Löbrich, M., Shibata, A., Beucher, A., Fisher, A., Ensminger, M., Goodarzi, A.A., Barton, O., Jeggo, P.A., 2010.  $\gamma$ H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: Strengths, limitations and optimization. *Cell cycle* 9 (4), 662-669.
- Mandal, B.K., Suzuki, K.T., 2002. Arsenic round the world: A review. *Talanta* 58 (1), 201-235.
- Mandal, P., 2017. Molecular insight of arsenic-induced carcinogenesis and its prevention. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 390 (5), 443-455.

- Mark, W.-Y., Liao, J.C.C., Lu, Y., Ayed, A., Laister, R., Szymczyna, B., Chakrabartty, A., Arrowsmith, C.H., 2005. Characterization of segments from the central region of BRCA1: An intrinsically disordered scaffold for multiple protein–protein and protein–DNA interactions? *Journal of Molecular Biology* 345 (2), 275-287.
- Martin, O.A., Bonner, W.M., 2006.  $\gamma$ -H2AX in cancer cells: A potential biomarker for cancer diagnostics, prediction and recurrence. *Cell Cycle* 5 (24), 2909-2913.
- Mason, J.M., Dusad, K., Wright, W.D., Grubb, J., Budke, B., Heyer, W.D., Connell, P.P., Weichselbaum, R.R., Bishop, D.K., 2015. Rad54 family translocases counter genotoxic effects of Rad51 in human tumor cells. *Nucleic Acids Research* 43 (6), 3180-3196.
- Mazin, A.V., Bornarth, C.J., Solinger, J.A., Heyer, W.-D., Kowalczykowski, S.C., 2000. Rad54 protein is targeted to pairing loci by the Rad51 nucleoprotein filament. *Molecular Cell* 6 (3), 583-592.
- Mazin, A.V., Mazina, O.M., Bugreev, D.V., Rossi, M.J., 2010. Rad54, the motor of homologous recombination. *DNA repair* 9 (3), 286-302.
- McCollum, G., Keng, P.C., States, J.C., McCabe Jr, M.J., 2005. Arsenite delays progression through each cell cycle phase and induces apoptosis following G2/M arrest in U937 myeloid leukemia cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 313 (2), 877-887.
- McKinnon, P.J., 2004. ATM and ataxia telangiectasia. Second in molecular medicine review series. *EMBO Reports* 5 (8), 772-776.
- Mei, N., Lee, J., Sun, X., Xing, J.Z., Hanson, J., Le, X.C., Weinfeld, M., 2003. . *FASEB Journal* 17 (15), 2310-2312.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., L., Q., Cochran, C., Bennett, L. M., Ding, W., Bell, R., Rosenthal, J., Hussey, C., T., T., McClure, M., Frye, C., Hattier, T., Phelps, R., Haugen-Strano, A., Katcher, H., Yakumo, K., Gholami, Z., Shaffer, D., Stone, S., Bayer, S., Wray, C., Bogden, R., Dayananth, P., Ward, J., Tonin, P., Narod, S., Bristow, P. K., Norris, F. H., H., L., Morrison, P., Rostek, P., Lai, M., Barrett, J. C., Lewis, C., N., S., Cannon-Albright, L., Goldgar, D., Wiseman, R., Kamb, A., & Skolnick, M.H., 1994. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266, 7.
- Mladenov, E.V., Kalev, P.S., Anachkova, B.B., 2009. Nuclear matrix binding site in the Rad51 recombinase. *Journal of cellular physiology* 219 (1), 202-208.
- Modesti, M., Ristic, D., Van Der Heijden, T., Dekker, C., Van Mameren, J., Peterman, E.J.G., Wuite, G.J.L., Kanaar, R., Wyman, C., 2007. Fluorescent human Rad51 reveals multiple nucleation sites and filament segments tightly associated along a single DNA molecule. *Structure* 15 (5), 599-609.
- Morales, M.E., Derbes, R.S., Ade, C.M., Ortego, J.C., Stark, J., Deininger, P.L., Roy-Engel, A.M., 2016. Heavy metal exposure influences double strand break DNA repair outcomes. *PLoS ONE* 11 (3).
- Moynahan, M.E., Chiu, J.W., Koller, B.H., Jasin, M., 1999. Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Molecular Cell* 4 (4), 511-518.

- Moynahan, M.E., Cui, T.Y., Jasin, M., 2001. Homology-directed DNA repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a BRCA1 mutation. *Cancer Research* 61 (12), 4842-4850.
- Munoz, L.E., Maueröder, C., Chaurio, R., Berens, C., Herrmann, M., Janko, C., 2013. Colourful death: Six-parameter classification of cell death by flow cytometry—dead cells tell tales. *Autoimmunity* 46 (5), 336-341.
- Ngu, T.T., Stillman, M.J., 2006. Arsenic binding to human metallothionein. *Journal of the American Chemical Society* 128 (38), 12473-12483.
- Niewolik, D., Pannicke, U., Lu, H., Ma, Y., Wang, L.C.V., Kulesza, P., Zandi, E., Lieber, M.R., Schwarz, K., 2006. DNA-PKcs dependence of artemis endonucleolytic activity, differences between hairpins and 5' or 3' overhangs. *Journal of Biological Chemistry* 281 (45), 33900-33909.
- Nollen, M., Ebert, F., Moser, J., Mullenders, L.H.F., Hartwig, A., Schwerdtle, T., 2009. Impact of arsenic on nucleotide excision repair: XPC function, protein level, and gene expression. *Molecular Nutrition and Food Research* 53 (5), 572-582.
- O'Donovan, P.J., Livingston, D.M., 2010. BRCA1 and BRCA2: Breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis* 31 (6), 961-967.
- Ogawa, Y., Kobayashi, T., Nishioka, A., Kariya, S., Hamasato, S., Seguchi, H., Yoshida, S., 2003. Radiation-induced reactive oxygen species formation prior to oxidative DNA damage in human peripheral t cells. *International journal of molecular medicine* 11 (2), 149-152.
- Ohnishi, T., Mori, E., Takahashi, A., 2009. DNA double-strand breaks: Their production, recognition, and repair in eukaryotes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 669 (1), 8-12.
- Ohta, T., Sato, K., Wu, W., 2011. The BRCA1 ubiquitin ligase and homologous recombination repair. *FEBS Letters* 585 (18), 2836-2844.
- Pance, A., 2013. Tailoring the models of transcription. *International Journal of Molecular Sciences* 14 (4), 7583-7597.
- Parvin, J., Chiba, N., Ransburgh, D., 2011. Identifying the effects of brca1 mutations on homologous recombination using cells that express endogenous wild-type BRCA1. *Journal of visualized experiments : JoVE* (48).
- Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., Bonner, W.M., 2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology* 10 (15), 886-895.
- Peremartí, J., Ramos, F., Marcos, R., Hernández, A., 2014. Arsenic exposure disrupts the normal function of the fa/brca repair pathway. *Toxicological Sciences* 142 (1), 93-104.
- PflSchAnwV, 1992. Verordnung über Anwendungsverbote für Pflanzenschutzmittel (Pflanzenschutz-Anwendungsverordnung).
- Prakash, R., Zhang, Y., Feng, W., Jasin, M., 2015. Homologous recombination and human health: The roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7 (4), a016600.

- Puck, T., Fisher, H., 1956. Genetics of somatic mammalian cells. I. Demonstration of the existence of mutants with different growth requirements in a human cancer cell strain (HeLa). *J. Exp. Med* 1, 427.
- Raderschall, E., Golub, E.I., Haaf, T., 1999. Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (5), 1921-1926.
- Ramírez, P., Eastmond, D.A., Laclette, J.P., Ostrosky-Wegman, P., 1997. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 386 (3), 291-298.
- Redon, C.E., Nakamura, A.J., Martin, O.A., Parekh, P.R., Weyemi, U.S., Bonner, W.M., 2011. Recent developments in the use of  $\gamma$ -H2AX as a quantitative DNA double-strand break biomarker. *Aging* 3 (2), 168-174.
- Redon, C.E., Nakamura, A.J., Zhang, Y.-W., Ji, J., Bonner, W.M., Kinders, R.J., Parchment, R.E., Doroshow, J.H., Pommier, Y., 2010. Histone  $\gamma$ H2AX and poly(ADP-ribose) as clinical pharmacodynamic biomarkers. *Clinical Cancer Research* 16 (18), 4532-4542.
- Richtlinie 98/83/EG, Richtlinie 98/83/EG des Rates vom 3. November 1998 über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* 330, 32-54.
- Riedel, E., Janiak, C., 2015. *Anorganische Chemie* Walter de Gruyter GmbH & Co KG.
- Rivera-Calzada, A., Maman, J.P., Spagnolo, L., Pearl, L.H., Llorca, O., 2005. Three-dimensional structure and regulation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-pkcs). *Structure* 13 (2), 243-255.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., Bonner, W.M., 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *The Journal of cell biology* 146 (5), 905-916.
- Romero, A., Ramos, E., Los Ríos, C., Egea, J., Pino, J., Reiter, R.J., 2014. A review of metal-catalyzed molecular damage: Protection by melatonin. *Journal of pineal research* 56 (4), 343-370.
- Rosen, E.M., 2013. BRCA1 in the DNA damage response and at telomeres. *Frontiers in genetics* 4 (85), 1-14.
- Rossman, T.G., 2003. Mechanism of arsenic carcinogenesis: An integrated approach. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 533 (1-2), 37-65.
- Rossman, T.G., Uddin, A.N., Burns, F.J., Bosland, M.C., 2001. Arsenite is a cocarcinogen with solar ultraviolet radiation for mouse skin: An animal model for arsenic carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 176 (1), 64-71.
- Sak, A., Stueben, G., Groneberg, M., Böcker, W., Stuschke, M., 2005. Targeting of Rad51-dependent homologous recombination: Implications for the radiation sensitivity of human lung cancer cell lines. *British Journal of Cancer* 92 (6), 1089-1097.
- San Filippo, J., Sung, P., Klein, H., 2008. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annual Review of Biochemistry*. pp. 229-257.

- Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., Jackson, S.P., 2007. Human ctip promotes DNA end resection. *Nature* 450 (7169), 509.
- Sattar, A., Xie, S., Hafeez, M.A., Wang, X., Hussain, H.I., Iqbal, Z., Pan, Y., Iqbal, M., Shabbir, M.A., Yuan, Z., 2016. Metabolism and toxicity of arsenicals in mammals. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 48, 214-224.
- Schulte-Uentrop, L., El-Awady, R.A., Schliecker, L., Willers, H., Dahm-Daphi, J., 2008. Distinct roles of XRCC4 and Ku80 in non-homologous end-joining of endonuclease-and ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks. *Nucleic acids research* 36 (8), 2561-2569.
- Schultz, L.B., Chehab, N.H., Malikzay, A., Halazonetis, T.D., 2000. p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *The Journal of Cell Biology* 151 (7), 1381-1390.
- 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 XPAzf 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.
- Shan, Z., Li, G., Zhan, Q., Li, D., 2012. Gadd45a inhibits cell migration and invasion by altering the global RNA expression. *Cancer Biology and Therapy* 13 (11), 1112-1122.
- Shen, S., Wang, C., Weinfeld, M., Le, X.C., 2013. Inhibition of nucleotide excision repair by arsenic. *Chinese Science Bulletin* 58 (2), 214-221.
- Shiloh, Y., 2001. ATM and ATR: Networking cellular responses to DNA damage. *Current opinion in genetics & development* 11 (1), 71-77.
- Shrivastav, M., De Haro, L.P., Nickoloff, J.A., 2008. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell research* 18 (1), 134.
- Signes-Pastor, A.J., Carey, M., Meharg, A.A., 2016. Inorganic arsenic in rice-based products for infants and young children. *Food chemistry* 191, 128-134.
- Suchánková, J., Kozubek, S., Legartová, S., Sehnalová, P., Küntziger, T., Bártová, E., 2015. Distinct kinetics of DNA repair protein accumulation at DNA lesions and cell cycle-dependent formation of  $\gamma$ H2AX- and Nbs1-positive repair foci. *Biology of the Cell* 107 (12), 440-454.
- Sun, X., Zhou, X., Du, L., Liu, W., Liu, Y., Hudson, L.G., Liu, K.J., 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. *Toxicology and applied pharmacology* 274 (2), 313-318.
- Sy, S.M.H., Huen, M.S.Y., Chen, J., 2009. Palb2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (17), 7155-7160.
- Symington, L.S., 2002. Role of Rad52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (4), 630-670.

- Takahashi, S., Takeda, E., Kubota, Y., Okayasu, R., 2000. Inhibition of repair of radiation-induced DNA double-strand breaks by nickel and arsenite. *Radiation research* 154 (6), 686-691.
- Tessema, M., Lehmann, U., Kreipe, H., 2004. Cell cycle and no end. *Virchows Archiv* 444 (4), 313-323.
- Thoma, N.H., Czyzewski, B.K., Alexeev, A.A., Mazin, A.V., Kowalczykowski, S.C., Pavletich, N.P., 2005. Structure of the swi2/snf2 chromatin-remodeling domain of eukaryotic Rad54. *Nat Struct Mol Biol* 12 (4), 350-356.
- Thomas, D.J., 2008. Unraveling arsenic—glutathione connections. *Toxicological Sciences* 107 (2), 309-311.
- Ting, H.-C., Yen, C.-C., Chen, W.-K., Chang, W.-H., Chou, M.-C., Lu, F.-J., 2010. Humic acid enhances the cytotoxic effects of arsenic trioxide on human cervical cancer cells. *Environmental toxicology and pharmacology* 29 (2), 117-125.
- Tong, D., Ortega, J., Kim, C., Huang, J., Gu, L., Li, G.-M., 2015. Arsenic inhibits DNA mismatch repair by promoting egfr expression and PCNA phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 290 (23), 14536-14541.
- Towler, W.I., Zhang, J., Ransburgh, D.J.R., Toland, A.E., Ishioka, C., Chiba, N., Parvin, J.D., 2013. Analysis of BRCA1 variants in double-strand break repair by homologous recombination and single-strand annealing. *Human Mutation* 34 (3), 439-445.
- Treas, J., Tyagi, T., Singh, K.P., 2013. Chronic exposure to arsenic, estrogen, and their combination causes increased growth and transformation in human prostate epithelial cells potentially by hypermethylation-mediated silencing of MLH1. *Prostate* 73 (15), 1660-1672.
- Trenz, K., Schütz, P., Speit, G., 2005. Radiosensitivity of lymphoblastoid cell lines with a heterozygous BRCA1 mutation is not detected by the comet assay and pulsed field gel electrophoresis. *Mutagenesis* 20 (2), 131-137.
- Uematsu, N., Weterings, E., Yano, K.-I., Morotomi-Yano, K., Jakob, B., Taucher-Scholz, G., Mari, P.-O., Van Gent, D.C., Chen, B.P., Chen, D.J., 2007. Autophosphorylation of DNA-PKcs regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *The Journal of cell biology* 177 (2), 219-229.
- Ulukaya, E., Acilan, C., Yilmaz, Y., 2011. Apoptosis: Why and how does it occur in biology? *Cell Biochemistry and Function* 29 (6), 468-480.
- van Hoffen, A., Balajee, A.S., Van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H.F., 2003. Nucleotide excision repair and its interplay with transcription. *Toxicology* 193 (1), 79-90.
- Vega, L., Gonsebatt, M.E., Ostrosky-Wegman, P., 1995. Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes in vitro: An individual susceptibility effect detected. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 334 (3), 365-373.
- Vogt, B.L., Rossman, T.G., 2001. Effects of arsenite on p53, p21 and cyclin D expression in normal human fibroblasts — a possible mechanism for arsenite's comutagenicity. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 478 (1-2), 159-168.
- Walter, I., Schwerdtle, T., Thuy, C., Parsons, J.L., Dianov, G.L., Hartwig, A., 2007. Impact of arsenite and its methylated metabolites on PARP-1 activity, PARP-1 gene

- expression and poly(ADP-ribosylation) in cultured human cells. *DNA Repair* 6 (1), 61-70.
- Wang, Y., Zhang, Y., Yang, L., Cai, B., Li, J., Zhou, Y., Yin, L., Yang, L., Yang, B., Lu, Y., 2011. Arsenic trioxide induces the apoptosis of human breast cancer Mcf-7 cells through activation of caspase-3 and inhibition of hERG channels. *Experimental and therapeutic medicine* 2 (3), 481-486.
- Ward, J.F., 1990. The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: A review. *International Journal of Radiation Biology* 57 (6), 1141-1150.
- Watanabe, T., Hirano, S., 2013. Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. *Archives of Toxicology* 87 (6), 969-979.
- WHO, 1993. Guidelines for drinking-water quality. 2nd edition, Vol. 1 - Recommendations, 36.
- WHO, 2010. Exposure to arsenic: A major public health concern. Geneva: Public Health and Environment, 1-5.
- WHO, 2011. Arsenic in drinking-water. 1-24.
- Wu, C.-L., Huang, L.-Y., Chang, C.L., 2017. Linking arsenite- and cadmium-generated oxidative stress to microsatellite instability in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine* 112 (Supplement C), 12-23.
- Yager, J.W., Wiencke, J.K., 1993. Enhancement of chromosomal damage by arsenic: Implications for mechanism. *Environmental health perspectives* 101 (Suppl 3), 79.
- 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. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 20 (3), 156-164.
- Yatagai, F., Morimoto, S., Goto, S., Kato, T., Honma, M., Hanaoka, F., 2002. Mutation induction in human cells after low dose x ray exposure. *Radiation protection dosimetry* 99 (1-4), 241-243.
- Yih, L.-H., Hsueh, S.-W., Luu, W.-S., Chiu, T.H., Lee, T.-C., 2005. Arsenite induces prominent mitotic arrest via inhibition of G2 checkpoint activation in Cgl-2 cells. *Carcinogenesis* 26 (1), 53-63.
- Yih, L.-H., Lee, T.-C., 2000. Arsenite induces p53 accumulation through an ATM-dependent pathway in human fibroblasts. *Cancer Research* 60 (22), 6346-6352.
- Yuan, S.S.F., Lee, S.Y., Chen, G., Song, M., Tomlinson, G.E., Lee, E.Y.H.P., 1999. BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Research* 59 (15), 3547-3551.
- Zhang, F., Paramasivam, M., Cai, Q., Dai, X., Wang, P., Lin, K., Song, J., Seidman, M.M., Wang, Y., 2014. Arsenite binds to the ring finger domains of RNF20-RNF40 histone E3 ubiquitin ligase and inhibits DNA double-strand break repair. *Journal of the American Chemical Society* 136 (37), 12884-12887.
- Zhang, Z., Pratheeshkumar, P., Budhraj, A., Son, Y.-O., Kim, D., Shi, X., 2015. Role of reactive oxygen species in arsenic-induced transformation of human lung bronchial epithelial (beas-2b) cells. *Biochemical and biophysical research communications* 456 (2), 643-648.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

8-oxoG	8-Oxoguanin
53BP1	p53 <i>binding protein 1</i>
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ABCB1	<i>ATP-binding cassette, sub-family B, member 1</i>
ABCC1	<i>ATP-binding cassette, sub-family C, member 1</i>
ACTB	<i>aktin B</i>
ADH	<i>alcohol dehydrogenase</i>
ALARA	<i>as low as reasonably achievable</i>
ALDH1A1	<i>aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1</i>
Annexin V-FITC	Annexin V als Fluorescein-Isothiocyanat-Konjugat
ANOVA	einfaktorielle Varianzanalyse
APAF1	<i>apoptotic peptidase activating factor 1</i>
APC	Allophoerythrin
APE1	<i>apurinic / apyrimidinic endonuclease 1</i>
APEX1	<i>APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1</i>
ATM	<i>ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ataxia-telangiectasia and Rad3 related</i>
AXIN2	<i>axis inhibition protein 2</i>
B2M	<i>beta-2-microglobulin</i>
BARD1	<i>BRCA1-associated RING Domain-1</i>
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
BBC3	<i>BCL2 binding component 3</i>
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BCL2L1	<i>BCL2-like 1</i>
BER	Basen-Exzisionsreparatur
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BMD	Benchmark Dosis
BRCA1	<i>breast cancer 1</i>
BRCA2	<i>breast cancer 2</i>
BRCT	<i>BRCA1 carboxy terminus</i>

BS	Binding Solution
BSA	Rinderserumalbumin
BTRC	<i>beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase</i>
CAT	Katalase
CCND1	<i>cyclin D</i>
CDK4	<i>Cyclin-dependent Kinase 4</i>
CDKN1A1	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A1</i>
CDKN1B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>
CDKN2B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2B</i>
CENP-F	Zentromerprotein F
CFA	Koloniebildungsfähigkeit
CHK	Checkpoint-Kinasen
CtIP	<i>C-terminal binding protein interaction protein</i>
CYP1A1	<i>cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDB1	<i>damage-specific DNA binding protein 1</i>
DDB2	<i>damage-specific DNA binding protein 2</i>
DDIT3	<i>DNA-damage-inducible transcript 3</i>
DES	Diethylstilbestrol
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMA(V)	Dimethylarsinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNA-PKcs	DNA-PK, katalytische Untereinheit
E2F1	<i>E2F transcription factor 1</i>
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EMA	Ethidiummonoazid
EMS	Ethylmethansulfonat
EPHX1	<i>epoxide hydrolase 1</i>
ERCC	<i>excision repair cross-complementing rodent repair deficiency</i>
FEN1	<i>flap endonuclease 1</i>

FKS	fetales Kälberserum
FTH1	<i>ferritin, heavy polypeptide 1</i>
fwd	<i>forward</i>
G6PD	<i>glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>
GADD45A	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha</i>
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GCLC	<i>glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GG-NER	globalen Genomreparatur
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPX	Glutathion-Peroxidase
GPX1	<i>glutathione peroxidase 1</i>
GPX2	<i>glutathione peroxidase 2</i>
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Dimer
GSR	<i>glutathione reductase</i>
GSTP1	<i>glutathione S-transferase pi 1</i>
GUSB	<i>glucuronidase, beta</i>
HMOX1	<i>heme oxygenase (decycling) 1</i>
HPRT1	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
HR	Homologe Rekombination
HSP1A1	<i>heat shock protein 1A1</i>
IARC	Internationale Agentur für Krebsforschung
IFC	<i>Integrated fluidic circuit</i>
I $\kappa$ B $\alpha$	<i>inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells alpha</i>
IKK	I $\kappa$ B Kinase
IL8	<i>interleukin 8</i>
IR	Bestrahlung
IRIF	<i>irradiation induced foci</i>
JUN	<i>jun proto-oncogene</i>
KEAP1	<i>kelch-like ECH-associated protein 1</i>
LBP	Lysepuffer
LIG	<i>ligase 1</i>

MAK-Kommission	Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheits-schädlicher Arbeitsstoffe
MAP3K5	<i>mitogen-activated protein kinase 5</i>
MDB	<i>membrane desalting buffer</i>
MDM2	<i>mouse double minute 2 homolog</i>
MGMT	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
MLH	<i>mutL homolog</i>
MMR	Mismatch-Reparatur
M-Phase	Mitose-Phase
Mre11	<i>meiotic recombination 11</i>
MRN-Komplex	Mre11/Nbs1/Rad50-Komplex
MSH	<i>mutS homolog</i>
MSI	<b>Mikrosatelliteninstabilität</b>
MT1X	<i>metallothionein 1X</i>
MT2A	<i>metallothionein 2A</i>
MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NAT1	<i>N-acetyltransferase 1</i>
Nbs1	Nibrin
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
NFE2L2	<i>nuclear factor, erythroid 2-like 2</i>
NF-κB	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
NFKB1	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i>
NFKB1A	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
NFKB2	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2</i>
NF-αB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NHEJ	nicht-homologes <i>end-joining</i>
NOX	NADPH-Oxidase
NQO1	<i>NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1</i>
NRC	<i>No reaction control</i>
NTC	<i>No template control</i>
OGG	Oxoguanin Glykosylase
OGG1	<i>8-oxoguanine DNA glycosylase</i>

PALB2	<i>partner and localizer of BRCA2</i>
PARP-1	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
PI	Propidiumiodid
PI3K	<i>phosphatidyl 3-kinase-related kinases</i>
PIK	Phosphoinositid-Kinase
PLK3	<i>polo-like kinase 3</i>
PMAIP1	<i>phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
PNKP	<i>polynucleotide kinase 3'-phosphatase</i>
POLB	<i>polymerase, beta</i>
POLD1	<i>polymerase, delta 1</i>
PPM1D	<i>protein phosphatase, Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup> dependent, 1D</i>
PRDX1	<i>peroxiredoxin 1</i>
PS	Phosphatidylserin
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RAD50	<i>RAD50 homolog</i>
RAD51	<i>RAD51 recombinase</i>
ref	<i>referse</i>
RICC	relative Zellzahl-Zunahme
RING	<i>really interesting new gene</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPA	Replikationsprotein A
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RRM2B	<i>ribonucleotide reductase M2 B</i>
RT	<i>reverse transcriptase</i>
-RT	RNA-Kontrolle
SEPP1	<i>selenoprotein P, plasma, 1</i>
SF2	super family 2
SIRT2	<i>sirtuin 2</i>

SLC30A1	<i>solute carrier family 30. member 1</i>
SOD	Superoxiddismutase
SOD1	<i>superoxide dismutase 1</i>
SOD2	<i>superoxide dismutase 2</i>
S-Phase	Synthese-Phase
SSBR	DNA-Einzelstrangbruchreparatur
STA	Preamplifikation
STS	Staurosporin
SULT1A1	<i>sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1</i>
TC-NER	Transkriptions-gekoppelte Reparatur
TFIIH	<b><i>transcription factor IIH</i></b>
TFRC	<i>transferrin receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFRSF10B	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b</i>
TP53	<i>tumor protein p53</i>
TXN	<i>thioredoxin</i>
TXNRD1	<i>thioredoxin reductase 1</i>
UGT1	<i>UDP glucuronosyltransferase 1 family</i>
UV C	ultraviolettes Licht
VEGFA	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
WB1	Waschpuffer 1
WB2	Wachpuffer 2
WHO	<i>World Health Organisation</i>
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>
XPA	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group A</i>
XPC	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group C</i>
XPD (ERCC2)	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group D</i>
XPF (ERCC4)	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group F</i>
XRCC1	<i>X ray repair cross complementing 1</i>
XRCC4	<i>X-ray repair cross-complementing protein 4</i>
XRCC5	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5</i>
ZKF	Zellkulturflasche
$\gamma$ H2AX	phosphoryliertes Histon H2AX

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Durchschnittliche Aufnahme von Arsen aus Lebensmitteln.....	7
Abbildung 2: Darstellung der oxidativen Stressantwort und Induktion von oxidativem Stress durch Arsen.....	9
Abbildung 3: Bekanntes toxikologisches Wirkprofil von dreiwertigen anorganischem Arsen.....	10
Abbildung 4: Mögliche Schädigungen der DNA und deren Reparaturwege.....	12
Abbildung 5: Mechanismus der Schadenserkenkung von DNA-Doppelstrangbrüchen.....	14
Abbildung 6: Mechanismus des nicht-homologen <i>end-joining</i> (NHEJ).....	16
Abbildung 7: Mechanismus der homologen Rekombination (HR).....	18
Abbildung 8: Mechanismus der direkten DNA-Einzelstrangbruchreparatur (SSBR) und der Einfluss von Arsen auf diesen Reparaturmechanismus.....	20
Abbildung 9: Mechanismus der Basen-Exzisionsreparatur (BER) und der Einfluss von Arsen auf diesen Reparaturmechanismus.....	22
Abbildung 10: Mechanismus der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) und der Einfluss von Arsen auf diesen Reparaturmechanismus.....	23
Abbildung 11: Mechanismus der Mismatch-Reparatur (MMR) und der Einfluss von Arsen auf diesen Reparaturmechanismus.....	25
Abbildung 12: Überblick der DNA-Doppelstrangbruchreparatur und der Einfluss von Arsen auf die zugehörigen Reparaturmechanismen.....	26
Abbildung 13: Exemplarische Darstellung eines Histogramms der Zellzyklusphasenverteilung.....	37
Abbildung 14: Exemplarische Darstellung eines Histogramms der Viabilitätsuntersuchung.....	38
Abbildung 15: Exemplarische Darstellung eines Histogramms des Mikrokerntests.....	44
Abbildung 16: Exemplarische Darstellung eines Histogramms des PIG-A-Genmutationstests.....	48
Abbildung 17: Zelluläre Aufnahme von Arsenit in HeLa S3-Zellen.....	49
Abbildung 18: Einfluss von Arsenit auf die Zellzahl (a) und Koloniebildungsfähigkeit (b) von HeLa S3-Zellen.....	50
Abbildung 19: Exemplarisches Agarosegel einer Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE).....	52
Abbildung 20: Quantitative Auswertung der Pulsfeldgelelektrophorese über den DNA-Gehalt im Gel.....	54

Abbildung 21: Einfluss von Arsenit auf die Reparatur induzierter DNA-Doppelstrangbrüche in der G <sub>2</sub> -Phase mittels Immunfluoreszenzfärbung von phospho-ATM.....	55
Abbildung 22: Exemplarische Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung von $\gamma$ H2AX in HeLa S3-Zellen.....	56
Abbildung 23: Einfluss von Arsenit auf die Reparatur induzierter DNA-Doppelstrangbrüche in der G <sub>2</sub> -Phase mittels Immunfluoreszenzfärbung von $\gamma$ H2AX.....	57
Abbildung 24: Einfluss von Arsenit auf die Reparatur induzierter DNA-Doppelstrangbrüche in der G <sub>2</sub> -Phase mittels Immunfluoreszenzfärbung von 53BP1.....	59
Abbildung 25: Proteinstruktur der katalytischen Untereinheit der DNA-Proteinkinase (DNA-PKcs).....	60
Abbildung 26: Exemplarische Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung von DNA-PKcs in HeLa S3-Zellen.....	61
Abbildung 27: Einfluss von Arsenit auf die Reparatur induzierter DNA-Doppelstrangbrüche in der G <sub>2</sub> -Phase mittels Immunfluoreszenzfärbung von DNA-PKcs.....	62
Abbildung 28: Proteinstruktur von Rad51.....	63
Abbildung 29: Exemplarische Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung von Rad51 in HeLa S3-Zellen.....	64
Abbildung 30: Einfluss von Arsenit auf die Reparatur induzierter DNA-Doppelstrangbrüche in der G <sub>2</sub> -Phase mittels Immunfluoreszenzfärbung von Rad51.....	65
Abbildung 31: Proteinstruktur von <i>breast cancer 1</i> (BRCA1).....	67
Abbildung 32: Einfluss von Arsenit auf die Reparatur induzierter DNA-Doppelstrangbrüche in der G <sub>2</sub> -Phase mittels Immunfluoreszenzfärbung von BRCA1.....	69
Abbildung 33: Proteinstruktur von Rad54.....	70
Abbildung 34: Einfluss von Arsenit auf die Reparatur induzierter DNA-Doppelstrangbrüche in der G <sub>2</sub> -Phase mittels Immunfluoreszenzfärbung von Rad54.....	71
Abbildung 35: Einfluss von Arsenit auf die Zellzyklusphasenverteilung der HeLa S3-Zellen.....	73
Abbildung 36: Einfluss von Arsenit in Kombination mit Bestrahlung auf die Zellzyklusphasenverteilung der HeLa S3-Zellen.....	75
Abbildung 37: Einfluss von Arsenit auf die Viabilität der HeLa S3-Zellen.....	75
Abbildung 38: <i>Heat Map</i> der relativen Genexpression in HeLa S3-Zellen in Anwesenheit von Arsenit.....	78
Abbildung 39: Einfluss von Arsenit auf die relative Expression der mit der DNA-Schadensantwort assoziierten Gene <i>DDIT3</i> und <i>GADD45A</i> .....	81

Abbildung 40: Einfluss von Arsenit auf die relative Expression von Genen, die mit der DNA-Reparatur assoziiert sind.....	83
Abbildung 41: Einfluss von Arsenit auf die relative Expression der mit der Proliferation und der Zellzykluskontrolle assoziierten Gene.....	85
Abbildung 42: Einfluss von Arsenit auf die relative Expression von Genen, die mit der Apoptose assoziiert sind.....	85
Abbildung 43: Einfluss von Arsenit auf die relative Expression der durch oxidativen Stress induzierbaren Gene.....	87
Abbildung 44: Einfluss von Arsenit auf das Auftreten von Mikrokernen in HeLa S3-Zellen.....	89
Abbildung 45: Einfluss von Arsenit auf das Vorkommen hypodiploider Kerne in HeLa S3-Zellen.....	90
Abbildung 46: <i>Relative increase in cell counts</i> (RICC) der TK6 Zellen nach Inkubation mit Arsenit.....	91
Abbildung 47: Einfluss von Arsenit auf das Vorkommen von GPI-defizienten TK6-Zellen.....	92
Abbildung 48: Zusammenfassender Einfluss von Arsen auf die DNA-Doppelstrangbruchreparatur.....	98
Abbildung 49: Zusammenfassender zellulärer Wirkmechanismus von Arsen.....	100
Abbildung 50: Zusammenfassung des toxikologischen Wirkprofils von dreiwertigen anorganischem Arsen.....	102
Abbildung 51: Zellzahl der HeLa S3-Zellen in Anwesenheit von Arsenit nach Bestrahlung mit 80 Gy.....	140
Abbildung 52: Untersuchung der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch Arsenit.....	141
Abbildung 53: Einfluss von Arsenit in Kombination mit Bestrahlung auf die Viabilität von HeLa S3-Zellen.....	142
Abbildung 54: Einfluss von Arsenit und Bestrahlung auf die relative Expression von Genen, die mit der DNA-Reparatur assoziiert sind.....	143
Abbildung 55: Einfluss von Arsenit und Bestrahlung auf die relative Expression der mit der Proliferation und der Zellzykluskontrolle assoziierten Gene.....	145
Abbildung 56: Einfluss von Arsenit und Bestrahlung auf die relative Expression der durch oxidativen Stress induzierbaren Gene.....	145
Abbildung 57: <i>Relative increase in cell counts</i> (RICC) der TK6-Zellen nach Inkubation mit bis zu 10 $\mu$ M Arsenit.....	146

### **8.3 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Temperaturprogramm der Arsenbestimmung mittels Grafitrohr-AAS.....	32
Tabelle 2: Verdünnung der verwendeten Antikörper.....	36
Tabelle 3: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze von Arsen.....	140

#### 8.4 Verwendete Chemikalien und Kits

20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco)
2x Assay loading reagent	Fluidigm (San Francisco)
2x TaqMan® PreAmp Master Mix, 10000 mg/L	Applied Biosystems (Darmstadt)
5x Exonuklease Reaktionspuffer	New England Bio Labs (Frankfurt)
7-Aminoactinomycin D	Biologend (London)
AAS-Magnesium-Matrixmodifier, 10000 mg/L	Perkin Elmer (Rodgau)
AAS-Palladium-Matrixmodifier	Perkin Elmer (Rodgau)
Actinomycin D	Roth (Karlsruhe)
Albumin Fraktion V	Roth (Karlsruhe)
Annexin V FITC-konjugiert	Biologend (London)
Arsen-Standard (ROTI®Star 100 mg/L)	Roth (Karlsruhe)
Borsäure (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	Roth (Karlsruhe)
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Roth (Karlsruhe)
CasyTon®	OLS (Bremen)
CHEF Mammalian Genomic DNA Plug Kit	BioRad (München)
DAPI (CyStain® DNA/Protein)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Desoxycholsäure Natriumsalz (DOC)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Diethylstilbenzol (DES)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth (Karlsruhe)
DMEM	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DNA Away	Roth (Karlsruhe)
DNA Suspensions Puffer	TEKnova (Kristiansand)
Ethanol (Rotipuran)	Roth (Karlsruhe)
Ethanol, vergällt (96 %)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiummonoazid (EMA)	Invitrogen (Darmstadt)
Ethylmethansulfonat (EMS)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Etylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Exonuklease I (20 U/μL)	New England Bio Labs (Frankfurt)
FACS Flow	BD (Heidelberg)

Fetales Kälberserum	Invitrogen (Darmstadt)
Formaldehyd (37 %)	Roth (Karlsruhe)
Gel-Red®	VWR (Darmstadt)
Giemsa® Stammlösung	Roth (Karlsruhe)
i/qScript cDNA Synthese Kit	BioRad (München)
Igepal	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Immersionsöl	Zeiss (Jena)
Isopropanol (2-Propanol)	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid (KCl)	Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrgenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth (Karlsruhe)
Kernextraktionskit (Nuclear Extract KIT)	ActiveMotif (La Hupe)
Natriumarsenit (NaAsO <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumazid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung (10 %)	AppliChem (Darmstadt)
NucleoSpin® RNA Plus Kit	Macherey-Nagel (Düren)
PCR Certified Water	TEKnova (Kristiansand)
Penicillin/Streptomycin (P: 5.000 U/mL, S: 5mg/L)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Primer Eurofins	Eurofins (Ebersberg)
Primer Fluidigm	Fluidigm (San Francisco)
Propidiumiodid (1 mg/mL)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Protease Inhibitor Cocktail (cOmpete)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Pulsed Field Certified™ Agarose	BioRad (München)
RNase	Roche Diagnostics (Mannheim)
RNase Away	VWR (Darmstadt)
RPMI-1640	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Saccharose	Roth (Karlsruhe)
Salpetersäure Supra-Qualität (HNO <sub>3</sub> )	Roth (Karlsruhe)
SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low ROX	BioRad (München)
Staurosporin (1mM)	Sigma-Aldrich (Steinheim)F
SYBR Green Supermix	VWR (Darmstadt)
TE-Puffer	TEKnova (Kristiansand)
Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat	Roth (Karlsruhe)

TRIS Ultra Qualität	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100 10 % Lösung	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Trypsin, 10-fach	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Vectashield Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories (Burlingame)
Wasserstoffperoxid Suprapur® (30 %)	Merk Millipore (Darmstadt)
Zitronensäure	Roth (Karlsruhe)

## 8.5 Antikörper, Puffer und Lösungen

### 8.5.1 Antikörper

Anti-53BP1	Milipore (Schwalbach)
Anti-BRCA1	Abcam (Cambridge)
Anti-DNA-PKcs Phospho (Thr2609)	Biolegend (London)
Anti-mouse Alexa Fluor® 488-konjugiert	Invitrogen (Darmstadt)
Anti-phosphoATM	Santa Cruz Biotechnology (Texas)
Anti-Rabbit Cy3-konjugiert	Jackson (Suffolk)
Anti-Rad51	Abcam (Cambridge)
Anti-Rad54	Abcam (Cambridge)
Anti-γH2AX	Millipore (Schwalbach)
Goat-anti-mouse IgG, polyclonal	Biolegend (London)
Mouse-anti-human CD19-APC (HIB19)	Biolegend (London)
Mouse-anti-human CD55	Biolegend (London)
Mouse-anti-human CD55-PE (JS11)	Biolegend (London)
Mouse-anti-human CD59	Biolegend (London)
Mouse-anti-human CD59-PE (p282)	Biolegend (London)
SYTOX Green®	Invitrogen (Darmstadt)

### 8.5.2 Lösungen und Puffer

#### 8.5.2.1 Zellkultur

Alle Lösungen für Zellkulturversuche oder zur Kultivierung wurden sterilfiltriert oder autoklaviert.

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> in bidestilliertem Wasser
PBS-EDTA (pH 7,4)	0,005 M EDTA in PBS



#### 8.5.2.5 Mikrokerntest

Puffer	2 % FKS in PBS
Färbelösung	8,5 µg/L EMA in Puffer
Lyselösung 1:	584 mg/L NaCl 1,14 g/L Tri-Natrium-Dihydrat 300 µL/L Igepal in bidestilliertem Wasser
Lyselösung A	0,4 µM SYTOX Green® 0,5 mg/mL RNase in Lyselösung 1
Lyselösung 2	85,6 g/L Saccharose 15 g/L Zitronensäure in bidestilliertem Wasser
Lyselösung B	0,4 µM SYTOX Green® in Färbelösung 2

#### 8.5.2.6 PIG-A-Genmutationstest

Färbepuffer	1 % BSA 0,1 % Natriumazid in PBS
7-AAD-Puffer	0,7 µg/mL 7-AAD in Färbepuffer
Fixierpuffer	1 % Formaldehyd 2,5 µg/mL Actinomycin D in PBS

## 8.6 Verbrauchsmaterialien

24-Loch-Platte, transparent	TPP (Transadingen)
Autosampler-Gefäße, 1 mL	Perkin Elmer (Rotgau)
Autosampler-Gefäße, 2 mL	Perkin Elmer (Rotgau)
Deckgläschen (Ø 12 mm)	Roth (Karlsruhe)
Dynamic Array IFC	Fluidigm (San Francisco)
Falcon Tubes 3,5 mL	BD (Heidelberg)
Glaspipetten (1, 2, 5, 10 und 20 mL)	Roth (Karlsruhe)
Graphitrohr für AAS	Perkin Elmer (Rotgau)
Handschuhe Conform Latex	VWR (Darmstadt)
Kanüle (0,4 x 20 mm)	Terumo (Eschborn)
Kryoröhrchen mit Gewinde, 1,8 mL	Sarstedt (Nürnbrecht)
Mikroplatten-Verschlussfolie	VWR (Darmstadt)
Mikroreaktionsgefäße, 1,5 mL	Sarstedt (Nürnbrecht)
Mikroreaktionsgefäße, 2,0 mL	Sarstedt (Nürnbrecht)
Multiply ProGefäße, 0,5 mL	Sarstedt (Nürnbrecht)
Nano Eppendorf (Multiply-11 Strip 0,2 ml Kette)	Sarstedt (Nürnbrecht)
Nano Eppendorf Deckelkette für 0,2 ml Kette	Sarstedt (Nürnbrecht)
Objektträger (76 x 26 mm)	Roth (Karlsruhe)
Parafilm	Bremis (Oshkosh)
Pasteur-Pipetten Glas, 145 mm	Brand (Wertheim)
Pipettenaufsatz distritips® 12,5 mL	Gilson (Limburg an der Lahn)
Pipettenspitzen LTS 20 µL	Mettler Toledo (Gießen)
Pipettenspitzen, 0,1-10 µL	Brand (Weinheim)
Pipettenspitzen, 100-1000 µl	Brand (Wertheim)
Pipettenspitzen, 1-200 µL	Sarstedt (Nürnbrecht)
Pipettenspitzen, 500-5000 µL	Eppendorf (Hamburg)
Plastik-Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Sarstedt (Nürnbrecht)
Plastik-Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Sarstedt (Nürnbrecht)
Sterilfilter (500 mL), 0,2 µM, PES (Ø 75 mm)	VWR (Darmstadt)
Sterilfilter, 0,2 µM (Ø 25 mm)	VWR (Darmstadt)
Sterilindikatorband Autoklav	Roth (Karlsruhe)
Sterilindikatorband Heißluft	Roth (Karlsruhe)
Vernichtungsbeutel	VWR (Darmstadt)

Whatman-Papier, 3 mm	Whatman (Dassel)
Zellkulturflasche ( $\square$ 150 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt (Nürnbrecht)
Zellkulturflasche ( $\square$ 25 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt (Nürnbrecht)
Zellkulturflasche ( $\square$ 75 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt (Nürnbrecht)
Zellkulturschalen, ( $\varnothing$ 100 mm)	Sarstedt (Nürnbrecht)
Zellkulturschalen, ( $\varnothing$ 150 mm)	Sarstedt (Nürnbrecht)
Zellkulturschalen, ( $\varnothing$ 35 mm)	Sarstedt (Nürnbrecht)
Zellkulturschalen, ( $\varnothing$ 60 mm)	Sarstedt (Nürnbrecht)
Zellschaber	VWR (Darmstadt)
Zellzählcups	Roche Diagnostics (Mannheim)

## 8.7 Verwendete Geräte

Atomabsorptionsspektrometer PINAAcle 900 T	Perkin Elmer (Rotgau)
Autoklav D150	Systec (Linden)
Biofreezer Herafreeze top	Thermo Scientific (Langenselbold)
Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
BioMark PCR Genetic Analysis	Fluidigm (San Francisco)
Brutschrank Heracell 150i	Thermo Scientific (Langenselbold)
Casy® TTC Cell Couter & Analyser System	OLS (Mannheim)
Centrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)
Colony Counter BZG-30	WTW (Weilheim)
Cryo 1 °C Cooler	VWR (Darmstadt)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen)
Eppendorf Pipette 0,1-2,5 µL	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 0,5-10 µL	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 1000-5000 µL	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 100-1000 µL	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 10-100 µL	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 20-200 µL	Eppendorf (Hamburg)
Feinwaage BP 61 S	Sartorius (Göttingen)
Galaxy Mini Centrifuge	VWR (Darmstadt)
Heißluftsterilisator	Memmert (Schwabach)
Heizschüttler MKR 13	HLC-BioTech (Bovenden)
Heizschüttler SH26	Cat (Staufen)
Heizschüttler TS-100	Peqlab (Erlangen)
IFC Controller HX	Fluidigm (San Francisco)
Kühl- und Gefrierschränke	Bosch (Gerlingen)
Laborspülmaschine Professional G7889	Miele (Güterloh)
LSRII Fortessa FACS	BD (Heidelberg)
Luminescent Image Analyzer LAS-3000	Fujifilm (Düsseldorf)
Magnetrührer Variomag® Poly Komet	VWR (Darmstadt)
Megafuge 1.0	Heraeus (Hanau)
MicroCentrifuge	Roth (Karlsruhe)
Mikroskop Axio Imager Z2	Carl Zeiss AG (Feldbach)
Mikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss AG (Feldbach)

Multipipette plus	Eppendorf
Multipipette® Pipette Lite XLS® 0,5-10 µl	Mettler Toledo (Gießen)
NanoQuant Platte	Tecan (Männedorf)
PCR Workstation Pro	Peqlab (Waltham)
PFGE CHEF-DR III	BioRad (München)
pH-Meter 3210	WTW (Weilheim)
Pipetus	Hirschmann
	Laborgeräte(Eberstadt)
Reinstwasseranlage Milli-Q	Merck Millipore (Darmstadt)
Röntgenröhre CellRad	Faxitron (Much)
Sterilwerkbank HERAsafeKS	Thermo Scientific (Langenselbold)
Taumler 3012	GFL (Burgwedel)
Tecan Infinite® M200 Pro	Tecan (Männedorf)
Thermal Cycler C100 (CFX 96 Real Time System)	BioRad (München)
Timer	Roth (Karlsruhe)
Tischzentrifuge Mikroreaktionsgefäße	VWR (Darmstadt)
Vakuum System BVC21NT	Vakuubrand (Wertheim)
Vortex-Genie 2T	Scientific Industries (New York)
Waage VWR 1502	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	Memmert (Schwabach)

## 8.8 Verwendete Software

AA Winlab 322	Perkin Elmer (Rotgau)
AIDA Image Analyzer	Raytest (Straubenhardt)
BD FACSDiva™	BD (Heidelberg)
Fluidigm Real Time PCR Analysis	Fluidigm (San Francisco)
GenEx	MultiD Analyses (Götberg)
IBM SPSS Statistics 24	SPSS Statistics (Chicago)

## 8.9 Sequenzen der verwendeten Primer

Transkript	Gen ID	Sequenz der Primer (5'→3')
<b>Referenzgene</b>		
<i>ACTB</i>	60	fwd: CCAACCGCGAGAAGATGAC ref: TAGCACAGCCTGGATAGCAA
<i>B2M</i>	567	fwd: AAGATGAGTATGCCTGCCGTGT ref: TCTTCAAACCTCCATGATGCTGCT
<i>GAPDH</i>	2597	fwd: ACACCATGGGGAAGGTGAAG ref: GTGACCAGGCGCCCAATA
<i>GUSB</i>	2990	fwd: CATCGATGACATCACCGTCAC ref: ACAGGTTACTGCCCTTGACA
<i>HPRT1</i>	3251	fwd: GCTTTCCTTGGTCAGGCAGTA ref: ACTTCGTGGGGTCCTTTTCAC
<b>Transkriptionsfaktoren</b>		
<i>AXIN2</i>	8313	fwd: TGATAAGGTCCCTGGCAACTCA ref: GCGTGGTCTCTCTGTCTCT
<i>BTRC</i>	8945	fwd: GAGCAGTGGTCAGAGTCAGAT ref: ACACAAGTTCAGCAGCACATAG
<i>JUN</i>	3725	fwd: AAGAACTCGGACCTCCTCAC ref: TGGATTATCAGGCGCTCCA
<i>KEAP1</i>	9817	fwd: AACTTCGCTGAGCAGATTGG ref: CGTAGAACCGTCGCTGTT
<i>MAP3K5</i>	4217	fwd: ATCATTCGGAAGGCGGTACA ref: ACTCTCAGATGCAAGGCTGAA
<i>MDM2</i>	4193	fwd: CCATGATCTACAGGAACTTGGTA ref: GACACCTGTTCTCACTCACA
<i>MT1X</i>	4501	fwd: ACCACGCTTTTCATCTGTCC ref: GAGCAGTTGGGGTCCATTTTC
<i>MT2A</i>	4502	fwd: AACCTGTCCCGACTCTAG ref: GAAGTCGCGTTCTTTACA
<i>NFE2L2</i>	4780	fwd: CAGTCAGCGACGGAAAGAGTA ref: GGGCAACCTGGGAGTAGTT

Anhang

<i>NFKB1</i>	4790	fwd: AGAGTGCTGGAGTTCAGGATAAC ref: TGAAGGTGGATGATTGCTAAGTGT
<i>NFKB1A</i>	4792	fwd: ACTTTCGAGGAAATACCC ref: GATAGAGGCTAAGTGTAGAC
<i>NFKB2</i>	4791	fwd: CCTGACTTTGAGGGACTGTATC ref: GGCTAGATGCAAGGCTGTT
<i>SLC30A1</i>	7779	fwd: AGAAGTGGTGATACAGTGGAAGT ref: GGGTCAGGGAAACATGGATTC
<i>VEGFA</i>	7422	fwd: TACATCTTCAAGCCATCC ref: CTGTAGGAAGCTCATCTC

**DNA-Schadensantwort**

<i>APEX1</i>	328	fwd: ACTGTGCCTTCAAGAGACCAAATG ref: TCCTCATCGCCTATGCCGTAA
<i>ATM</i>	472	fwd: TACCAAGCAGCATGGAGGAA ref: GATTCATGGTAACTGGTTCCTTCTAC
<i>ATR</i>	545	fwd: CATTCCAAAGCGCCACTGAA ref: CGCTGCTCAATGTCAAGAACA
<i>BRCA1</i>	672	fwd: GCTTGACACAGGTTTGGAGTATGC ref: GAGAGTTGGACACTGAGACTGGTT
<i>BRCA2</i>	675	fwd: ATGCAGCAGACCCAGCTTA ref: TCCATGGCCTTCCTAATTTCCA
<i>DDB1</i>	1642	fwd: GGAGTCAATCACCTATCACAATGG ref: GGTATGTCAAGCACTCAGCAAT
<i>DDB2</i>	1643	fwd: TCAAAGGGATTGGAGCTGGAG ref: GTGACCACCATTCGGCTACTA
<i>DDIT3</i>	1649	fwd: TTAAGTCTAAGGCACTGAG ref: GGTGTGGTGATGTATGAA
<i>ERCC1</i>	2067	fwd: GCCGACTGCACATTGATCC ref: TCCGCTGGTTTCTGCTCATA
<i>ERCC2</i>	2068	fwd: TACCCCGAGCAGTTCTCCTA ref: CTGAGGGCATCTCCAGGAC
<i>ERCC5</i>	2073	fwd: TTGATGGGGATGCTCCACTA ref: TGGAGTCACTGGACGCTAA

---

<i>ERRC4</i>	2072	fwd: CTTCTGGAATCTCTGAGAGCAA ref: GAGGTGCTGGAGTCAAGAAA
<i>GADD45A</i>	1647	fwd: GCTCCTGCTCTTGGAGAC ref: CAGGATCCTTCCATTGAGATGAA
<i>LIG1</i>	3978	fwd: TGGGAAGTACCCGGACATCA ref: GCTTCGGTGTCCAGGATGAA
<i>LIG3</i>	3980	fwd: TCCAGGACTTCCTTCGGAAA ref: CAGCAGCAGCTTCACTGTTA
<i>MGMT</i>	4255	fwd: TGTGAAATTCGGAGAAGTGA ref: GAGGATGGGGACAGGATT
<i>MLH1</i>	4292	fwd: CTTACCCAGACTTTGCTACC ref: GGCATAGACCTTATCACTACTTCC
<i>MSH2</i>	4436	fwd: CCAGCAGCAAAGAAGTGCTA ref: TGTTCACCTTGGACAGGAAC
<i>OGG1</i>	4968	fwd: GTGTACTAGCGGATCAAGTATGGA ref: CAGTCGCACACCTTGAATT
<i>PARP1</i>	142	fwd: TTCTGGAGGACGACAAGGAA ref: GTTGCTACCGATCACCGTAC
<i>PCNA</i>	5111	fwd: TCTGAGGGCTTCGACACCTA ref: CATTGCCGGCGCATTTTAGTA
<i>POLB</i>	5423	fwd: AAGAAATTGCCTGGAGTAGGAACA ref: CAGATGGACCAATGCCACTAACT
<i>POLD1</i>	5424	fwd: AGCTGGTGGAGTCTAAGTACAC ref: GACGGAGTCAGTGTACCATA
<i>RAD50</i>	10111	fwd: TCCCTCCTGGAACCAAAGGAA ref: AGACGAATCTGGGCTCTCACA
<i>RAD51</i>	5888	fwd: GGAAGACCCAGATCTGTCA ref: ATGTACATGGCCTTTCCTTCAC
<i>RRM2B</i>	50484	fwd: CCTTGCGATGGATAGCAGATAGA ref: AGTCCTGGCATAAGACCTCTC
<i>XPA</i>	7507	fwd: ACATCATTCACAATGGGGTGATA ref: ACCCCAAACTTCAAGAGACC
<i>XPC</i>	7508	fwd: TAAAGGGGTCCATGAGGACACA ref: CTGGCTGGCTGCAGATGTIA

---

<i>XRCC5</i>	7520	fwd: TGATTTGCTGGAGGACATTGAAAG ref: AATCGGCTGCTGAGGTCA
--------------	------	--

---

**Apoptose**


---

<i>APAF1</i>	317	fwd: ACCGTCTCCGCATTCTGA ref: TCTGTAACACTCTTGTCTCTGGTT
<i>BAX</i>	581	fwd: GGGTTGTCGCCCTTTCTAC ref: TCTTGGATCCAGCCCAACA
<i>BBC3</i>	27113	fwd: ACGACCTCAACGCACAGTA ref: ATGCTACATGGTGCAGAGAAAG
<i>BCL2</i>	596	fwd: TGACAGAGGATCATGCTGTACTTA ref: TCCAATTCCTTTCGGATCTTATTTCA
<i>BCL2L1</i>	598	fwd: CCTCTCCCGACCTGTGATAC ref: GGCTCAACCAGTCCATTGTC
<i>PMAP1</i>	5366	fwd: CAGTTGGAGGCTGAGGTTT ref: TCCTGAGTTGAGTAGCACACT
<i>TNFRSF10B</i>	8795	fwd: GCACCACGACCAGAAACAC ref: ACAATCACCGACCTTGACCAT
<i>XIAP</i>	331	fwd: AGGAGTGTCTGGTAAGAACTACTG ref: GCATACTGTCTTCTGAGCATTCA

---

**Zellzykluskontrolle**


---

<i>CCND1</i>	595	fwd: AGAGGCGGAGGAGAACAAA ref: AGGGCGGATTGGAAATGAAC
<i>CDKN1A1</i>	1026	fwd: GCAGACCAGCATGACAGATTTT ref: ACAAAGTGAAGTAAAGGCAGAAGA
<i>CDKN1B</i>	1027	fwd: AGGAAGCGACCTGCAACC ref: TTGGGGAACCGTCTGAAACA
<i>CDKN2B</i>	1030	fwd: TTACGGCCAACGGTGGATTA ref: GGCATGCCCTTGTCTCC
<i>E2F1</i>	1869	fwd: AGCTCATTGCCAAGAAGTCCAA ref: TCCITGGGTCAACCCCTCAA
<i>EGFR</i>	1956	fwd: GAACCCCGAGGGCAAATACA ref: CACGAGCCGTGATCTGTCA
<i>IL8</i>	3576	fwd: TTCAGAGACAGCAGAGCACAC ref: AAGTTCTTTAGCACTCCTTGGCA

Anhang

<i>MYC</i>	4609	fwd: GCCGCATCCACGAAACTTTG ref: GAGGCTGCTGGTTTTCCACTAC
<i>PLK3</i>	1263	fwd: ACTGTCCAGGTGAACTTC ref: GAAGCGAGGTAAGTACAAG
<i>PPM1D</i>	8493	fwd: AGCCAGAACTTCCCAAGGAAA ref: ACTACACGATTACCCCCAGAC
<i>SIRT2</i>	22933	fwd: TCAAGCCAACCATCTGTCACTA ref: CTCCACCAAGTCCTCCTGTT
<i>TP53</i>	7157	fwd: CGAGATGTTCCGAGAGCTGAAT ref: TTTATGGCGGGAGGTAGACTGA

**Fremdstoffmetabolismus**

<i>ABCB1</i>	5243	fwd: AACACCACTGGAGCATTGAC ref: ACAGCAAGCCTGGAACCTA
<i>ABCC1</i>	4363	fwd: CCTGTTCTCGGAAACCATCC ref: AAGGTGATCCTCGACAGGAA
<i>ADH</i>	125	fwd: GGTGGACATCAACAAGGACAA ref: CAACATAACAGGGAAGCCATCAT
<i>ALDH1A1</i>	216	fwd: CTGATGCCGACTTGGACAATG ref: ATACTTCTTAGCCCGCTCAACA
<i>CYP1A1</i>	1543	fwd: AAACCAGTGGCAGATCAACC ref: AGGGGTGAGAAACCGTTCA
<i>EPHX1</i>	2052	fwd: CCACGACTTACACCAGAGGAT ref: AATCTCCACCTGCTTCTTCCA
<i>GSTP1</i>	2950	fwd: CACCCTGTACCAGTCCAATACC ref: TCCTGCTGGTCCCTTCCCATA
<i>NAT1</i>	9	fwd: AGGAAGAAGCAGCAATCTGTCT ref: TCGGATCTGGTGTGGAAGAATGT
<i>NQO1</i>	1728	fwd: TTTATGGCGGGAGGTAGACTGA ref: AAAGTTCGCAGGGTCCCTTCA
<i>SULT1A1</i>	6817	fwd: AAGTTCATGGTTCGGAGAAGTGT ref: ACGGTGGTGTAGTTGGTCATAG
<i>UGT1</i>	54658	fwd: TCCCAGGAATTTGAAGCCTACAT ref: TCGTGTGTGTTGCAAGATTTCG

Oxidative Stressantwort		
<i>CAT</i>	847	fwd: AGAAGTGCGGAGATTCAACAC ref: CCTCATTCAGCACGTTTACACA
<i>FTH1</i>	2495	fwd: TTACCTGTCCATGTCTTAC ref: CATCACAGTCTGGTTTCT
<i>G6PD</i>	2539	fwd: GCCGTCACCAAGAACATTC ref: CTCCCGAAGGGCTTCTCC
<i>GCLC</i>	2729	fwd: TGGATGCCATGGGATTTGGAA ref: CTCAGATATACTGCAGGCTTGGAA
<i>GPX1</i>	2876	fwd: CACCCTCTCTTCGCCTTCC ref: GAGCTTGGGGTTCGGTCATAA
<i>GPX2</i>	2877	fwd: GCTTTCATTGCCAAGTCTTCTAT ref: TCATTCTGACAGTTCCTGATGT
<i>GSR</i>	2936	fwd: TTGCGTGAATGTTGGATGTGTA ref: ATGGGACTTGGTGAGATTGTTT
<i>HMOX1</i>	3162	fwd: CAGTCAGGCAGAGGGTGATA ref: GCTCCTGCAACTCCTCAAA
<i>HSP1A1</i>	3303	fwd: TCCTGTGTTTGCAATGTTGAA ref: CTGCATGTAGAAACCGGAAAA
<i>PRDX1</i>	5052	fwd: GCCTTCAGTTCACTGACAA ref: TTCGGCTGAATCTGAAGTCTTG
<i>SEPP1</i>	6414	fwd: AAAGTCTCTCTCACGACTCTC ref: AGGTGCTGATGTCCATGATTGT
<i>SOD1</i>	6647	fwd: TGATCTCACTCTCAGGAGACCAT ref: ACCACAAGCCAAACGACTTC
<i>SOD2</i>	6648	fwd: AGGATCCACTGCAAGGAACA ref: GTGCTCCCACACATCAATCC
<i>TFRC</i>	7037	fwd: CACCATCAAGCTGCTGAATGA ref: GCCTTACTATAACGCCACATAACC
<i>TXN</i>	7295	fwd: TTACAGCCGCTCGTCAGA ref: CCCACCTTTTGTCCCTTCTT
<i>TXNRD1</i>	7296	fwd: GCATCCCTGGTGACAAAGAA ref: CCAACAACCAGGGTCTTACC

## 8.10 Ergänzende Daten

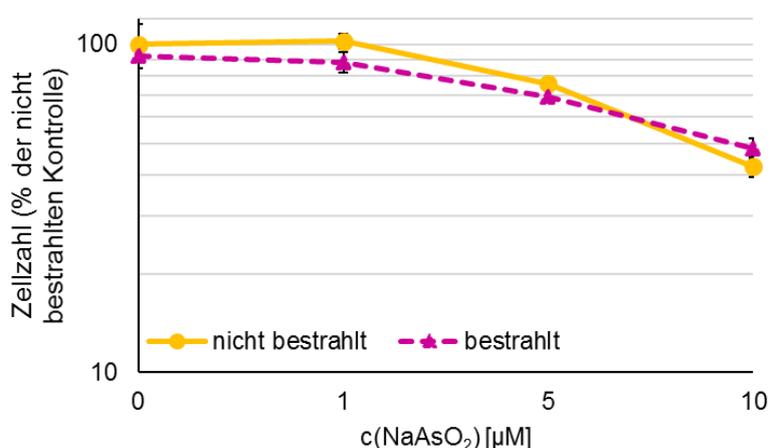
### 8.10.1 Ergänzende Daten zur zellulären Aufnahme von Arsenit in HeLa S3-Zellen

Die Nachweis-, Bestimmungs- und Erfassungsgrenze wurde nach der Leerwertmethode der DIN 32645 ermittelt und berechnet. Hierfür wurden zehn Leerwerte hergestellt und deren Arsengehalt je dreimal bestimmt. Die daraus ermittelten Grenzwerte werden in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze von Arsen.

	Schnellschätzung	Berechnung nach DIN 32645
Nachweisgrenze As [ $\mu\text{g/L}$ ]	0,372	0,161
Erfassungsgrenze As [ $\mu\text{g/L}$ ]	0,744	0,282
Bestimmungsgrenze As [ $\mu\text{g/L}$ ]	1,240	0,585

Die Grenzwerte wurden in Zusammenarbeit mit Frau Olga Wentland im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit „Untersuchung der zellulären Aufnahme von Arsen“ durchgeführt.



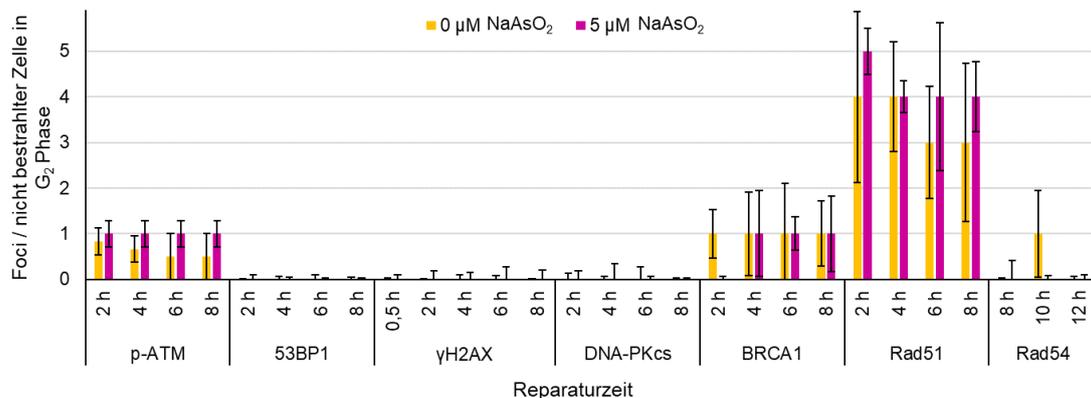
**Abbildung 51: Zellzahl der HeLa S3-Zellen in Anwesenheit von Arsenit nach Bestrahlung mit 80 Gy.** HeLa S3-Zellen wurden für 26 h mit Arsenkonzentrationen von  $1 \mu\text{M}$  bis  $10 \mu\text{M}$  inkubiert. Eine Bestrahlung mit 80 Gy, analog zur Pulsfeld-Gelelektrophorese, erfolgte nach 18 h. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Frau Vivien Haberland durchgeführt.

### 8.10.2 Ergänzende Daten der Pulsfeld-Gelelektrophorese

Bei der PFGE handelt es sich um eine direkte Nachweismethode, für die jedoch Strahlendosen von 80 Gy zur Induktion der DNA-Doppelstrangbrüche benötigt wurden. Abbildung 51 bestätigt, dass innerhalb des untersuchten Zeitraums die hohe Strahlendosis zu keinem signifikanten Unterschied innerhalb der Zellzahl führte.

### 8.10.3 Ergänzende Daten der Immunfluoreszenzfärbung

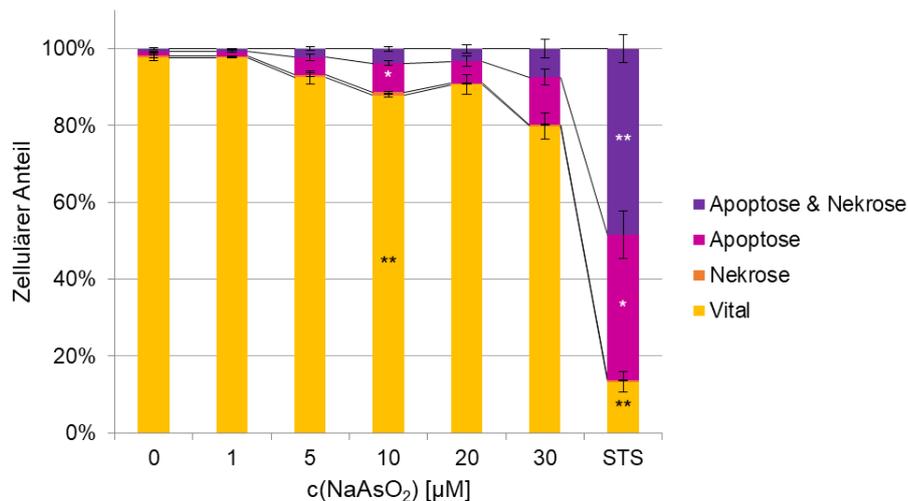
Mittels Immunfluoreszenzfärbung konnte gezeigt werden, dass Arsen alleine im untersuchten Konzentrationsbereich ( $1 \mu\text{M} - 5 \mu\text{M}$ ) keine DNA-Doppelstrangbrüche induziert (Abbildung 52). Innerhalb der untersuchten Proteine zeigte sich kontinuierlich die gleiche Foci-Anzahl in der nicht bestrahlten Kontrolle sowie der  $5 \mu\text{M}$  Behandlung.



**Abbildung 52: Untersuchung der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch Arsenit.** HeLa S3-Zellen wurden für 20 h, 22 h, 24 h und 26 h mit Arsen ( $5 \mu\text{M}$ ) inkubiert. Dabei entspricht der 20 h-Punkt einer Reparaturzeit von 2 h, der 22 h-Punkt einer Reparaturzeit von 4 h, der 24 h-Punkt einer Reparaturzeit von 6 h und der 26 h-Punkt einer Reparaturzeit von 8 h. Vergleichend zu den weiteren Immunfluoreszenzversuchen wurde die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch Arsen mittels immunologischer Fluoreszenzfärbung phospho-ATM, 53BP1,  $\gamma\text{H2AX}$ , DNA-PKcs, BRCA1, Rad51 und Rad54 in der G<sub>2</sub>-Phase durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. Die Versuche zu phospho-ATM wurden unter Anleitung von Rebecca Niemand durch Stephanie Ziemann im Rahmen ihrer Masterarbeit und die Versuche zu  $\gamma\text{H2AX}$  wurden unter Anleitung von Rebecca Niemand durch Vivien Haberland durchgeführt.

#### 8.10.4 Ergänzende Daten zum Einfluss von Arsenit auf die Viabilität von HeLa S3-Zellen

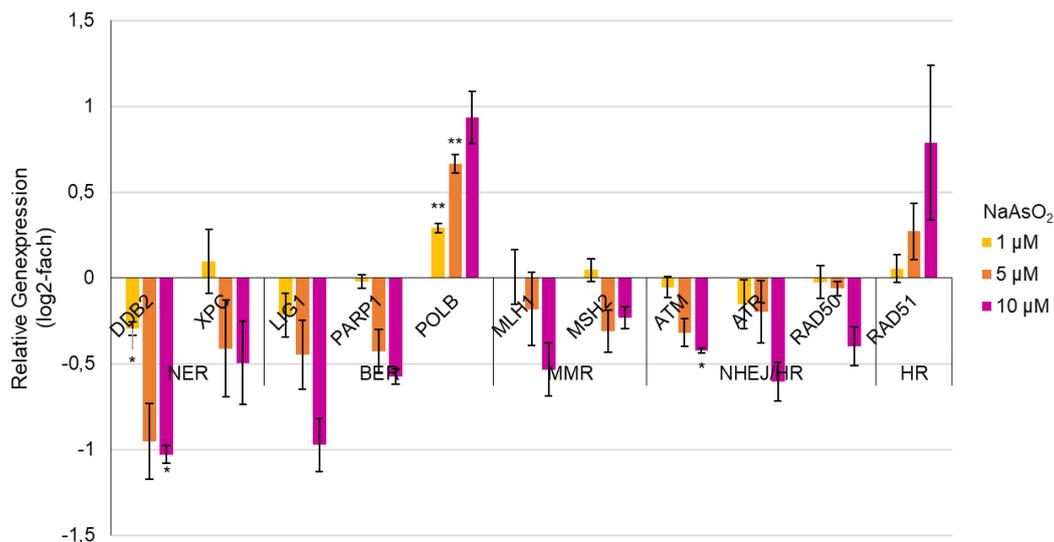
Die Untersuchungen der bestrahlten Zellen (Kapitel 5.5) zeigte ein ähnliches Ergebnis wie die nicht bestrahlten Zellen (Abbildung 53). Die Apoptose wurde konzentrationsabhängig durch Arsen induziert, es zeigte sich jedoch kein additiver Effekt durch die kombinierte Behandlung mit Röntgenstrahlung und Arsen.



**Abbildung 53: Einfluss von Arsenit in Kombination mit Bestrahlung auf die Viabilität von HeLa S3-Zellen.** HeLa S3-Zellen wurden für 26 h mit Arsen (1 µM – 30 µM) inkubiert. Die Bestrahlung (1 Gy) erfolgte nach 18 h. Als Positivkontrolle wurde Staurosporin (STS) mitgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen ± Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ ).

#### 8.10.5 Ergänzende Daten zum Einfluss von Arsenit auf das Genexpressionsmuster von HeLa S3-Zellen

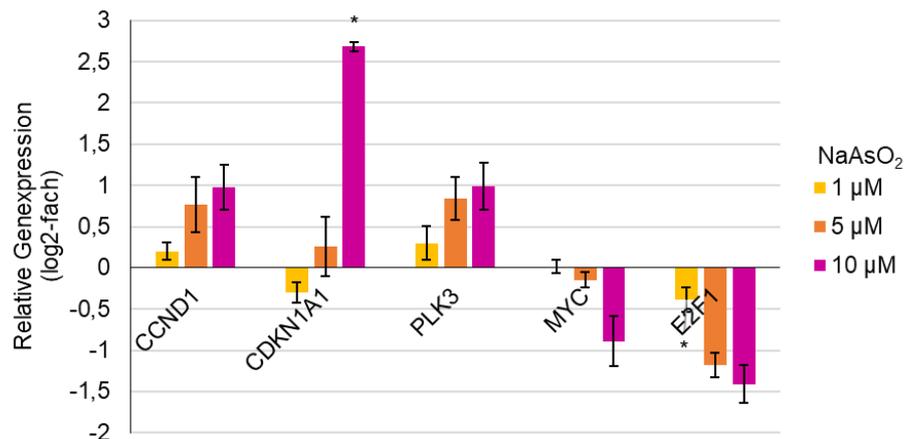
Die bestrahlten Proben ergaben meist ein sehr ähnliches Genexpressionsprofil im Vergleich zu den nicht bestrahlten Proben (Kapitel 5.6). Abbildung 54 stellt das Expressionsprofil der Gene der DNA-Reparatur von HeLa S3-Zellen dar, die mit Arsen inkubiert und zusätzlich bestrahlt wurden. Es zeigte sich insgesamt ein nachteiliger Effekt auf die untersuchten Gene. Die Ausnahme bildeten dabei *POLB* und *RAD51*. Im Vergleich zu den nicht bestrahlten Proben wiesen sie nur geringfügige Abweichungen auf.



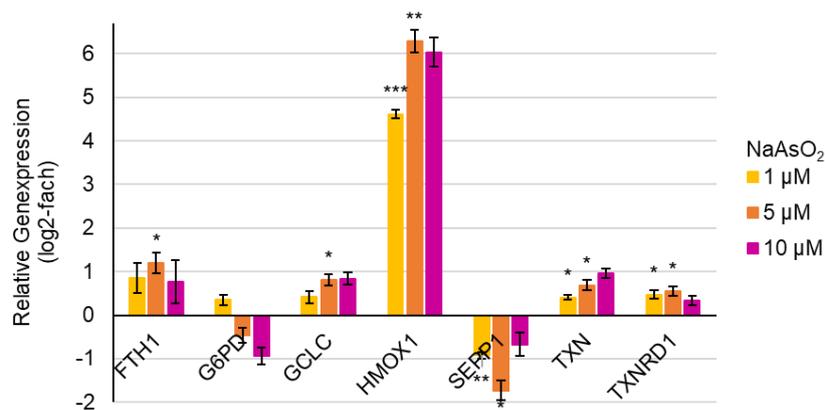
**Abbildung 54: Einfluss von Arsenit und Bestrahlung auf die relative Expression von Genen, die mit der DNA-Reparatur assoziiert sind.** HeLa S3-Zellen wurden für 26 h mit Arsen (1 µM – 10 µM) inkubiert. Eine Bestrahlung (1 Gy) erfolgte nach 18 h. Untersucht wurden Gene aller DNA-Reparatur-mechanismen: *DDB2* und *XPC* der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER), *LIG1*, *PARP1* und *POLB* der Basen-Exzisionsreparatur (BER), *MLH1* und *MSH2* der Mismatch-Reparatur (MMR) sowie *ATM*, *ATR*, *RAD50* und *Rad51* des nicht-homologen *end-joinings* (NHEJ) und der homologen Rekombination (HR). Dargestellt sind die Mittelwerte (log<sub>2</sub>-fach) aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen ± Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der relativen Genexpression der Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ ).

Abbildung 55 zeigt den Einfluss einer kombinierten Bestrahlung mit Arseninkubation auf Gene des Zellzyklus sowie der Zellzykluskontrolle. Es ergab sich kein eindeutiges Ergebnis. Insgesamt betrachtet, deuten die erhaltenen Daten auf einen G<sub>2</sub>/M-Arrest hin. Ein Aussetzen des Zellzyklusarrest, was mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen gezeigt werden konnte (Kapitel 5.4), war jedoch nicht erkennbar.

Die Induktion von oxidativem Stress infolge einer kombinierten Behandlung mit Arsen und Bestrahlung zeigte keinen zusätzlichen Effekt im Vergleich zur alleinigen Arsenbehandlung (Abbildung 56). Das erhaltene Genexpressionsmuster zeigt jedoch eindeutig, dass oxidativer Stress induziert wurde.



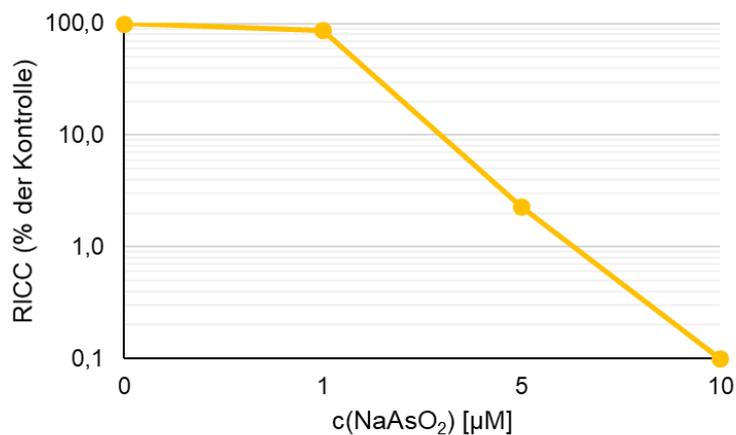
**Abbildung 55: Einfluss von Arsenit und Bestrahlung auf die relative Expression der mit der Proliferation und der Zellzykluskontrolle assoziierten Gene.** HeLa S3-Zellen wurden für 26 h mit Arsen (1  $\mu\text{M}$  – 10  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Die Bestrahlung (1 Gy) erfolgte nach 18 h. Untersucht wurden *CCND1*, *CDKN1A1*, *PLK3*, *MYC* und *E2F1*. Dargestellt sind die Mittelwerte (log<sub>2</sub>-fach) aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der relativen Genexpression der Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (\*  $p \leq 0,05$ ).



**Abbildung 56: Einfluss von Arsenit und Bestrahlung auf die relative Expression der durch oxidativen Stress induzierbaren Gene.** HeLa S3-Zellen wurden für 26 h mit Arsen (1  $\mu\text{M}$  – 10  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Die Bestrahlung mit 1 Gy erfolgte nach 18 h. Zur Untersuchung der oxidativen Stressantwort wurden folgende Gene herangezogen: *FTH1*, *G6PD*, *GCLC*, *HMOX1*, *SEPP1*, *TXN* und *TXNRD1*. Dargestellt sind die Mittelwerte (log<sub>2</sub>-fach) aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen  $\pm$  Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der relativen Genexpression der Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

### 8.10.2 Ergänzende Daten zum Einfluss von Arsenit auf den „*Relative increase in cell counts*“

Innerhalb der Zytotoxizitätsuntersuchung mittels RICC in TK6-Zellen wurden zunächst die gleichen Konzentrationen wie innerhalb der Zytotoxizitätsuntersuchungen der HeLa S3-Zellen getestet (Kapitel 5.2). Diese erwiesen sich jedoch als zu zytotoxisch (Abbildung 57). Für den PIG-A-Genmutationstest sollte die höchste Behandlungsdosis einen RICC von 10 % bis 20 % betragen, aus diesem Grund mussten nachfolgend geringere Arsenkonzentrationen für die Untersuchungen gewählt werden.



**Abbildung 57: *Relative increase in cell counts* (RICC) der TK6-Zellen nach Inkubation mit bis zu 10 µM Arsenit.** TK6-Zellen wurden für 26 h mit Arsenkonzentrationen von 1 µM bis 10 µM behandelt. Dargestellt ist der Mittelwert eines in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchs. Diese Analyse wurde unter Anleitung von Rebecca Niemand von Frau Stephanie Habel im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

## 9 Publikationsliste

### Publikationen

- B.M. Strauch, R.K. Niemand, N.L. Winkelbeiner, A. Hartwig (2017) *“Comparison between micro- and nanosized copper oxide and water soluble copper chloride: interrelationship between intracellular copper concentrations, oxidative stress and DNA damage response in human lung cells”* Particle and Fibre Toxicology 14:28, 1-17.

### Publikationen in Vorbereitung

- R.K. Niemand, V.M.M. Haberland, A. Hartwig (2018) *„Arsenic impairs the homologous repair of radiation-induced double-strand breaks in HeLa S3 cells”*
- M. Hufnagel, R.K. Niemand, B.M. Strauch, A. Hartwig (2018) *„Essentielle Spurenelemente, toxische Metallverbindungen: Funktionen, Wirkungsmechanismen und Konsequenzen für die Risikobewertung“*

### Vorträge auf Fachtagungen

- GUM Meeting der Gesellschaft für Umwelt- und Mutationsforschung e.V., München (2016)  
Gesellschaft für Umwelt- und Mutationsforschung (GUM)  
*„Arsenite specifically inhibits homologous recombination in response to ionizing radiation”*  
R.K. Schilling, V.M.M. Haberland, A. Hartwig
- 5. Workshop „Nachwuchsförderung“ der Gesellschaft für Umwelt – Mutationsforschung e.V., Würzburg (2017)  
Gesellschaft für Umwelt- und Mutationsforschung (GUM)  
*„Arsenite impairs the cell cycle control and specifically inhibits HR during DNA double strand break repair”*  
R.K. Niemand, V.M.M. Haberland, A. Hartwig

### Poster auf Fachtagungen

- 29. GUM Meeting der Gesellschaft für Umwelt- und Mutationsforschung e.V., München (2016)  
Gesellschaft für Umwelt- und Mutationsforschung (GUM)  
*„Arsenite specifically inhibits homologous recombination in response to ionizing radiation”*  
R.K. Schilling, V.M.M. Haberland, A. Hartwig
- 14<sup>th</sup> Biennial Meeting of the German Society for DNA repair, Essen (2016)  
Deutsche Gesellschaft für DNA-Reparaturforschung (DGDR)  
*„Impact of arsenite on the DNA double-strand break repair: Specific inhibition of HR”*  
R.K. Schilling, A. Hartwig
- ToxNet-BW Symposium 2016, Konstanz (2016)  
BWTOX.NET – Toxikologie-Netzwerk Baden-Württemberg  
*„Changes in the gene expression profile of human cervical cancer cells through arsenite”*  
R.K. Schilling, A. Hartwig
- Symposium “DNA damage response, genetic instability and cancer”, Mainz (2016)  
*„Impact of arsenite on important factors of the DNA double-strand break repair”*  
R.K. Schilling, V.M.M. Haberland, A. Hartwig
- 44. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Karlsruhe (2015)  
Lebensmittelchemische Gesellschaft, Fachgruppe der GDCh  
*„Einsatz von Genexpressionsprofilen zur Aufklärung der Wirkmechanismen von toxischen Substanzen und chemischen Kanzerogenen“*  
R.K. Schilling, B.M. Fischer, A. Hartwig
- 44. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Karlsruhe (2015)  
Lebensmittelchemische Gesellschaft, Fachgruppe der GDCh  
*„Einfluss von Arsen(III)-oxid auf Reparaturfaktoren der homologen Rekombination“*  
R.K. Schilling, A. Hartwig

### **Preise und Auszeichnungen**

- Posterpreis des 44. Deutschen Lebensmittelchemikertags, Karlsruhe, 2015  
Lebensmittelchemische Gesellschaft, Fachgruppe der GDCh  
*„Einfluss von Arsen(III)-oxid auf Reparaturfaktoren der homologen Rekombination“*  
R.K. Schilling, A. Hartwig
- Auszeichnung für herausragendes studentisches Engagement, Karlsruhe, 2013  
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

## 10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Andrea Hartwig, die mich überhaupt erst ermutigte eine Promotion anzustreben. Sie eröffnete mir die Möglichkeit mich sowohl persönlich als auch wissenschaftlich weiterzuentwickeln. Dank ihr war es mir möglich meinen eigenen wissenschaftlichen Ideen nachzugehen und trotzdem die notwendige Anleitung zu erhalten. Liebe Andrea, herzlichen Dank für die vergangenen Jahre!

Ebenso möchte ich mich bei meinem Koreferenten Herrn Prof. Dr. Mirko Bunzel bedanken, der sich die Zeit und Mühe gemacht hat, meine Arbeit zu begutachten.

Natürlich möchte ich mich auch beim gesamten AK Hartwig bedanken. An erster Stelle geht ein großes Dankeschön an Beate und Betty. Ihr habt mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden und seid auch nicht davor zurückgeschreckt, viel Zeit in die Korrektur meiner Arbeit zu stecken. Lieber Matze, ich möchte mich bei dir für eine unglaublich schöne aber auch anstrengende Zeit bedanken. Danke, dass du in Momenten der Schwäche für mich da warst und versucht hast die Last von meinen Schultern zu nehmen! Ohne dich hätte ich diese Promotion niemals so gut gemeistert. Natürlich geht auch ein besonderes Dankeschön an Sarah, Vivien und Wera, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mit denen ich wundervolle Stunden verbracht habe! Auch bei Sonya, Doro, Elena, Barbara, Paul und Nadin möchte ich mich für eine wunderbare Arbeitsatmosphäre bedanken. Nicht zu vergessen möchte ich mich auch bei den ehemaligen AKlern Sarah, Chris, Liza, Elisa und Daniel für die herzliche Aufnahme in den AK sowie bei den neuen AKlern Tizia und Sabine bedanken. Ich bin wirklich froh ein Teil dieses Arbeitskreises gewesen zu sein!

Ein weiteres Dankschön geht an AK Bunzel. Zunächst möchte ich an dieser Stelle Beate für ihr offenes Ohr, einen unvergesslichen Urlaub und ihre Freundschaft danken! Es ist wirklich schön, jemanden wie dich in meinem Leben zu wissen! Liebe Judith, lieber Jan, euch danke ich für zahlreiche schöne Stunden, die ich gerne während, aber auch nach der Arbeit mit euch verbracht habe! Außerdem möchte ich mich bei Daniel, den beiden Andis, Rachel, Martin, Felix, Susanne und Lea für ihre Herzlichkeit bedanken, die jeder einzelne von euch in den Arbeitsalltag mitbringt.

Meinem Papa danke ich für seine stetige Unterstützung und seinen durchgehenden Glauben an mich! Ich bin froh, dass ich dich stolz machen konnte! Außerdem danke ich meiner Mama, meinen Schwiegereltern Marliese und Ernst, Michael, Carmen und meinen Geschwistern. Auch meine Freunde gehören für mich zur Familie. Daher danke ich allen voran meiner besten Freundin Alessa, die wirklich zu jeder Tages- und Nachtzeit für mich da ist! Zudem danke ich Carolin, Josi, Pia, Judith, Kim, Marian, Dominik, Philipp, Markus, Claude, Raphi und Nils für den wundervollsten Freundeskreis der Welt! Es ist wirklich etwas Besonderes so einen Zusammenhalt zu haben. Zudem möchte ich mich bei Johanna und Mirjam bedanken. Wir drei nehmen zusammen jede Hürde!

Das Beste kommt zum Schluss – und wer sollte das sein, wenn nicht du, mein lieber Schatz Dominik (alias Nemo oder Mausi)! Du begleitest mich jetzt seit über 10 Jahren und ich bin wirklich froh dich an meiner Seite zu haben. Ohne deine Unterstützung und deine Liebe wäre ich bei Weitem weder so gut durch das Studium noch durch die Promotion, geschweige denn durchs Leben gekommen. Ich liebe dich und möchte dich nie wieder hergeben!