

Einfluss von Arsen auf die Ringfingerstruktur in BRCA1 sowie auf dessen funktionelle Rolle in der DNA-Schadensantwort

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

M.Sc. Tizia Marie Matthäus

1. Referentin: Prof. Dr. Andrea Hartwig
 2. Referent: Prof. Dr. Mirko Bunzel
- Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2021

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 08.06.2021

Tizia Marie Matthäus

Für meine Liebsten

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	4
2.1	DIE DNA-SCHADENSANTWORT	4
2.2	DAS DNA-REPARATURPROTEIN BRCA1.....	7
2.2.1	STRUKTURELLER AUFBAU VON BRCA1.....	7
2.2.2	BRCA1 IN DER DNA-SCHADENSANTWORT.....	9
2.2.2.1	BRCA1 IN DER DNA-DOPPELSTRANGBRUCHREPARATUR	10
2.2.2.2	BRCA1 IN DER REGULATION DER ZELLZYKLUSPROGRESSION	17
2.2.2.3	BRCA1 IN DER TRANSKRIPTIONELLEN REGULATION	21
2.3	ARSEN	24
2.3.1	VORKOMMEN, VERWENDUNG UND EXPOSITION.....	24
2.3.2	TOXIKOKINETIK UND METABOLISMUS	25
2.3.3	TOXIZITÄT	26
2.3.3.1	INDUKTION VON OXIDATIVEM STRESS	29
2.3.3.2	TRANSKRIPTIONELLE UND EPIGENETISCHE VERÄNDERUNGEN.....	30
2.3.3.3	INHIBIERUNG DER DNA-REPARATUR.....	30
3	FRAGESTELLUNG	33
4	MATERIAL UND METHODEN	35
4.1	ZELLKULTUREXPERIMENTE IN HUMANEN ZELLINIEN.....	35
4.1.1	ZELLKULTUR.....	35
4.1.1.1	ZELLINIEN	35
4.1.1.2	KULTIVIERUNGSBEDINGUNGEN DER ZELLEN	36
4.1.1.3	KRYOKONSERVIERUNG UND INKULTURNAHME DER ZELLEN.....	36
4.1.1.4	BEHANDLUNGEN DER ZELLEN	37
4.1.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR ZYTOTOXIZITÄT.....	37
4.1.2.1	LEBENDZELLZAHL.....	37
4.1.2.2	ATP-GEHALT	38
4.1.3	ZELLULÄRE AUFNAHME MITTELS GRAPHITROHR-ATOMABSORPTIONSSPEKTROMETRIE	38
4.1.4	GENEXPRESSIONSANALYSEN MITTELS <i>HIGH-THROUGHPUT RT-QPCR</i>	40
4.1.4.1	RNA-ISOLIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG	40
4.1.4.2	cDNA-SYNTHESE.....	41
4.1.4.3	PRÄAMPLIFIKATION	41
4.1.4.4	PRIMER- UND PROBENVORBEREITUNG	42

4.1.4.5	96x96 <i>DYNAMIC ARRAY IFC</i> QPCR ANALYSE	43
4.1.4.6	DATENANALYSE UND DARSTELLUNG	44
4.1.5	ZELLZYKLUSPHASENVERTEILUNG UND ZELLTODMECHANISMEN MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE	45
4.1.5.1	ZELLZYKLUSPHASENVERTEILUNG	46
4.1.5.2	ZELLTODMECHANISMEN	47
4.1.6	NACHWEIS VON DNA-REPARATURPROTEINEN MITTELS IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG	48
4.2	ZELLKULTUREXPERIMENTE IN BAKTERIELLEN TESTSYSTEMEN	50
4.2.1	BAKTERIENKULTUR	50
4.2.2	HETEROLOGE PROTEINEXPRESSION	50
4.2.2.1	AMPLIFIKATION UND LAGERUNG DES PLASMIDVEKTORS	51
4.2.2.2	ISOLIERUNG DER PLASMID-DNA	52
4.2.2.3	SEQUENZIERUNG DER PLASMID-DNA	52
4.2.2.4	MUTAGENESE	53
4.2.2.5	TRANSFORMATION DURCH HITZESCHOCK	54
4.2.2.6	PROTEINEXPRESSION UND ZELLERNTTE	54
4.2.2.7	ZELLYSE MITTELS ULTRASCHALL	55
4.2.2.8	PROTEINAUFREINIGUNG MITTELS AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE	55
4.2.3	SODIUMDODECYLSULFAT-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	56
4.2.4	COOMASSIE-FÄRBUNG	57
4.2.5	WESTERN BLOT UND IMMUNODETEKTION	57
4.2.6	GELFILTRATION	58
4.3	SPEKTROSKOPISCHE METHODEN	58
4.3.1	SYNCHROTRON-CIRCULARDICHROISMUS-SPEKTROSKOPIE	59
4.3.1.1	UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTURVERÄNDERUNG	61
4.3.1.2	QUANTITATIVE AUSWERTUNG DER SEKUNDÄRSTRUKTUR	63
4.3.1.3	PROTEINSTABILITÄT MITTELS THERMISCHER DENATURIERUNG	64
4.3.2	UV/VIS-SPEKTROSKOPIE	64
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	66
5.1	AUSWIRKUNGEN EINER BRCA1-DEFIZIENZ AUF DIE DNA-SCHADENSANTWORT UNTER NaAsO₂-EINFLUSS	66
5.1.1	ZYTOTOXIZITÄT VON NaAsO ₂	66
5.1.2	ZELLULÄRE AUFNAHME VON NaAsO ₂	69
5.1.3	EINFLUSS VON NaAsO ₂ AUF DAS GENEXPRESSIONSPROFIL	70
5.1.4	EINFLUSS VON NaAsO ₂ AUF DIE ZELLZYKLUSPHASENVERTEILUNG	84
5.1.5	EINFLUSS VON NaAsO ₂ AUF DIE DNA-DOPPELSTRANGBRUCHREPARATUR	94

5.1.5.1	SCHADENSERKENNUNG	95
5.1.5.2	HOMOLOGE REKOMBINATION.....	97
5.1.5.3	NICHT-HOMOLOGES END-JOINING	106
5.1.6	EINFLUSS VON NaAsO ₂ AUF DIE ZELLTODMECHANISMEN	108
5.2	REKOMBINANTE EXPRESSION EINES BRCA1-KONSTRUKTES	112
5.3	STRUKTURUNTERSUCHUNGEN MITTELS CIRCULARDICHROISMUS-SPEKTROSKOPIE.....	115
5.3.1	REKOMBINANTES PEPTID.....	116
5.3.2	SYNTHETISCHES PEPTID.....	121
5.3.2.1	EINFLUSS VON CoCl ₂	121
5.3.2.2	EINFLUSS VON ZnCl ₂	122
5.3.2.3	EINFLUSS VON NaAsO ₂	124
5.3.2.4	VERGLEICH DER ZnCl ₂ - UND NaAsO ₂ -EINFLÜSSE.....	127
5.3.2.5	KONKURRIERENDE UNTERSUCHUNGEN VON ZnCl ₂ UND NaAsO ₂	129
5.3.3	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	132
5.3.3.1	VERGLEICH DER EINGESETZTEN BRCA1-KONSTRUKTE	132
5.3.3.2	EINFLUSS DER VERSCHIEDENEN METALLVERBINDUNGEN	133
5.4	METALLBINDUNGSUNTERSUCHUNGEN MITTELS UV/VIS-SPEKTROSKOPIE.....	136
5.4.1	SYNTHETISCHES PEPTID.....	137
5.4.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	140
6	ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION	144
7	LITERATURVERZEICHNIS	163
8	ANHANG	174
8.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	174
8.2	VERWENDETE MATERIALIEN.....	178
8.2.1	CHEMIKALIEN.....	178
8.2.2	LÖSUNGEN UND PUFFER.....	180
8.2.3	VERBRAUCHSMATERIALIEN	185
8.2.4	KITS	186
8.2.5	INSTRUMENTE	186
8.2.6	SOFTWARE.....	187
8.3	UNTERSUCHTE GENE	188
8.4	ERGÄNZENDE DATEN.....	191
8.4.1	EINFLUSS VON NaAsO ₂ AUF DAS GENEXPRESSIONSPROFIL	191

8.4.2	EINFLUSS VON NaAsO ₂ AUF DAS GENEXPRESSIONSPROFIL NORMIERT AUF UWB1.289.....	193
8.4.3	UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTIONALITÄT VON p53.....	195
8.4.3.1	IMMUNFLUORIMETRISCHER NACHWEIS VON PHOSPHO-p53	195
8.4.3.2	IMMUNFLUORIMETRISCHER NACHWEIS VON p21.....	196
8.4.4	EINFLUSS AUF DIE EXPRESSION DES GENES <i>POLQ</i>	197
8.4.5	STRUKTURUNTERSUCHUNGEN MITTELS CIRCULARDICHROISMUS-SPEKTROSKOPIE.....	198
8.4.6	METALLBINDUNGSUNTERSUCHUNGEN MITTELS UV/VIS-SPEKTROSKOPIE.....	199
8.5	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	200
8.6	TABELLENVERZEICHNIS	203
9	PUBLIKATIONSLISTE	205
10	DANKSAGUNG	206

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die DNA ist Trägerin der gesamten Erbinformation eines Organismus und unterliegt permanenten Angriffen durch exogene und endogene Faktoren. Da das Überleben eines Organismus von der exakten Weitergabe der genetischen Information an ihre Folgegenerationen abhängt, besitzt die Zelle ein komplexes Netzwerk unterschiedlichster Mechanismen, die dem Schutz der genomischen Stabilität dienen. Ein Kernprotein dieser, in der Gesamtheit als DNA-Schadensantwort (DDR) bezeichneten, Signaltransduktionskaskade stellt das multifunktionale BRCA1 (*breast cancer type 1 susceptibility protein*) dar. So wurde bereits gezeigt, dass BRCA1 nach Exposition gegenüber ionisierender Strahlung (IR) mit verschiedensten Signalproteinen interagiert und so Einfluss auf die Schadensreaktion nehmen kann. Aufgrund der vielschichtigen Beteiligung von BRCA1 an den Mechanismen der DDR besteht weiterhin Forschungsbedarf. Das Ringfingerprotein BRCA1 rückt zudem aufgrund seiner Zink-komplexierenden Domänen in den Fokus der Wissenschaft. Die in diesen Strukturen enthaltenen Thiolgruppen dienen als potentiell Angriffsziel für redoxaktive sowie thiolaffine Metallverbindungen. Die Bindung an diese sensitiven Gruppen sowie dessen Oxidation können in einer Konformationsänderung und somit einem Funktionsverlust des Proteins resultieren. Ein solcher exogener Faktor stellt das ubiquitär vorkommende dreiwertige, anorganische Arsen dar. Weltweit sind mehrere Millionen Menschen einer erhöhten Arsen-Exposition durch das Trinkwasser oder durch Nahrungsmittel ausgesetzt. Die vermehrte Aufnahme korreliert dabei mit einem statistisch erhöhten Risiko für bestimmte Krebserkrankungen, wobei die ursächlichen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind.

Die vorliegende Arbeit sollte dazu dienen, den Einfluss von BRCA1 im komplexen Netzwerk der DDR einzuordnen und gleichzeitig eine mögliche Beeinflussung der RING-Domäne des Proteins und den assoziierten Signalwegen der DDR durch das toxische Halbmetall Arsen zu identifizieren.

Die Rolle von BRCA1 in der DDR wurde im Rahmen dieser Arbeit unter Zuhilfenahme einer natürlich mutierten und somit BRCA1-defizienten Zelllinie (UWB1.289) sowie einem stabil transfizierten BRCA1-profizienten Pendant (UWB1.289 + BRCA1) analysiert. Die vergleichenden Untersuchungen wurden unter basalen Bedingungen sowie unter Einfluss verschiedener Schadensfaktoren durchgeführt. Während die Doppelstrangbruch (DSB)-induzierende Bestrahlung mit 1 Gy weder auf transkriptioneller noch auf funktioneller Ebene Einflüsse auf die analysierten Signalwege ausübte, führten die isolierten NaAsO₂- sowie die Co-Expositionen der aufgeführten Behandlungen zu deutlichen Effekten. Dabei lösten die beiden zuletzt genannten Behandlungen in allen Experimenten vergleichbare Veränderungen der Antwortmechanismen aus, weshalb die auftretenden Effekte allein dem toxischen Arsenit zugesprochen wurden. Genexpressionsanalysen deuteten auf eine intrazelluläre Akkumulation des Metalloids sowie ein

erhöhtes oxidatives Stresslevel durch Arsenit hin. Weiterhin implizierten die transkriptionellen Veränderungen nach Arsenit-Behandlung eine DNA-Schädigung sowie eine Aktivierung der DDR durch die Einleitung eines Zellzyklusarrestes und die Induktion der Apoptose. Auch der Signalweg der DNA-Reparatur wurde durch Arsenit auf transkriptioneller Ebene moduliert, wobei die beobachtete reprimierte Genexpression mit einer zellulären Seneszenz oder epigenetischen Modifikationen begründet sein könnte. Die Metalloid-vermittelte Transkriptionsregulation der untersuchten Gene verlief dabei unabhängig vom BRCA1-Status, mit Ausnahme des *BRCA1*-Gens selbst. Demgegenüber zeigten die funktionellen Analysen verschiedene Antwortmechanismen nach Arsenit-Schädigung für die beiden Zelllinien und somit eine deutliche BRCA1-Abhängigkeit. So konnte beispielsweise der auf Genebene postulierte Zellzyklusarrest lediglich im Falle der BRCA1-profizienten Zellen bestätigt werden. Während die Metalloid-Exposition in den UWB1.289-Zellen zu keinerlei Veränderung der Zellzyklusphasenverteilung führte, zeigten die UWB1.289 + BRCA1-Zellen einen andauernden G₂/M-Arrest bereits in gering zytotoxischen Konzentrationen (5 µM). Eine ausgeprägte Dosis-Wirkungs-Beziehung präsentierte sich auch bei den funktionellen Analysen der Arsenit-vermittelten Zelltodmechanismen. Hierbei übte BRCA1 eine sensibilisierende Wirkung auf die Arsenit-vermittelte Induktion des Zelltods aus. In der vorliegenden Arbeit konnte somit erstmalig die direkte Beteiligung von BRCA1 an der Zellzyklusregulation sowie der Induktion des Zelltods nach Arsenit-Schädigung nachgewiesen werden. Weiterhin wurde die mögliche Beeinträchtigung der DNA-Reparatur auf Ebene spezifischer DNA-Reparaturproteine überprüft. Hierbei stellte sich heraus, dass Arsenit selbst keine DSB induziert. Gleichzeitig wurde jedoch postuliert, dass das Metalloid den Reparaturvorgang IR-generierter DSB mittels Homologer Rekombination (HR) bereits in nicht-zytotoxischen Konzentrationen (1 µM) inhibiert. Dabei zeigte sich eine gestörte Abdissoziation der HR-spezifischen DNA-Reparaturproteine BRCA1, Rad51 sowie Rad54. Das Fehlen von BRCA1 als multifunktionales Rekrutierungsprotein führte zu einem Versagen der HR, was durch eine ausbleibende Anlagerung der genannten Proteine deutlich wurde. Daraus konnte geschlossen werden, dass sowohl das Metalloid als auch eine BRCA1-Defizienz zu einer Verlagerung der fehlerfreien HR zum fehlerbehafteten Nicht-Homologen *End-Joining* (NHEJ) nach IR-induzierter Schädigung führen.

Ein denkbarer Mechanismus der beeinflussten Dissoziationsfähigkeit von BRCA1 könnte mit der bereits beschriebenen potentiellen Arsenit-Assoziation an die RING-Domäne des Proteins begründet sein. Die nachfolgend durchgeführten subzellulären Untersuchungen verdeutlichten jedoch eine erhöhte Bindungsaffinität des natürlichen Cofaktors Zink im Vergleich zu Arsenit. So war auch ein Überschuss an As(III) nicht in der Lage, Zn(II) unter reduzierenden Bedingungen aus seiner bevorzugten Koordinationsumgebung im BRCA1-Ringfinger herauszulösen und eine Strukturveränderung zu verursachen.

Ein direkter Einfluss von Arsenit auf die biologische Funktion des gesamten, nativen BRCA1-Proteins in zellulären Systemen konnte aus den hier beschriebenen Analysen nicht abgeleitet werden. Auch eine indirekte Substitution des natürlichen Cofaktors durch den möglichen Arsenit-induzierten oxidativen Stress einer Zelle scheint unwahrscheinlich, da die persistierenden Foci eine gewisse Stabilität von BRCA1 sowie einen fehlenden Export aus dem Nukleus implizieren. Beide Faktoren benötigen die Ausbildung des BRCA1/BARD1-Heterodimers, welche nur bei einem intakten Ringfinger auftritt. Die beobachtete Arsenit-vermittelte Beeinflussung von BRCA1 ist demnach nicht auf eine Substitution von Zink und eine damit einhergehende Konformationsänderung des Proteins zurückzuführen. Denkbar wäre eine Beeinträchtigung Thiol-reicher Regionen außerhalb der RING-Domäne, die in gestörten Protein-Interaktionen resultieren können.

Zusammenfassend führte die Arsenit-vermittelte Schädigung zu einer Aktivierung der DDR. Das Fehlen eines funktionsfähigen BRCA1-Proteins verursachte eine nachteilige Wirkung auf die dabei eintretenden Antwortmechanismen. In BRCA1-profizienten Zellen übte Arsenit ebenfalls adverse Effekte auf die Signalwege der DDR aus, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen durch indirekte Wirkprofile begründet schienen. Hinsichtlich des programmierten Zelltodes konnte BRCA1 protektive Eigenschaften aufzeigen, indem es nach irreparabler Schädigung die Apoptose einleitete und so die Weitergabe von Fehlinformationen verhindert. In beiden Fällen implizieren die Ergebnisse eine nachteilige Wirkung von Arsenit, wobei ein intaktes BRCA1-Protein maßgeblich zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität beitrug.

2 EINLEITUNG

Die DNA (Desoxyribonukleinsäure) ist Trägerin der gesamten Erbinformation eines Organismus, weshalb der Erhalt der genomischen Stabilität und Integrität von größter Wichtigkeit ist. Allerdings unterliegt die Erbsubstanz permanenten Angriffen durch exogene und endogene Faktoren, welche die molekulare Struktur der DNA verändern und auf diese Weise ihre Stabilität gefährden können. Umwelteinflüsse, wie ionisierende Strahlung (*ionizing radiation*, IR), ultraviolette (UV) Strahlung oder eine Vielzahl genotoxischer Substanzen, gehören dabei zu den exogenen Einflussfaktoren. Läsionen der DNA können jedoch auch von endogenen Faktoren verursacht werden und die genomische Stabilität gefährden. Hierzu zählen beispielsweise reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), die als Nebenprodukt physiologischer Prozesse, wie der Zellatmung, entstehen. Zu den häufigsten Läsionen zählen Einzel- (*single strand breaks*, SSB) sowie Doppelstrangbrüche (*double strand breaks*, DSB), aber auch Basenfehlpaarungen und chemische Addukte (HOUTGRAAF *et al.*, 2006; ZHOU UND ELLEDGE, 2000).

2.1 DIE DNA-SCHADENSANTWORT

Das Überleben eines Organismus hängt von der exakten Weitergabe der genetischen Information einer Zelle an ihre Folgegenerationen ab. Eine solch originalgetreue Übermittlung erfordert nicht nur extreme Genauigkeit bei der Replikation der DNA sowie Präzision in der Chromosomenverteilung, sondern auch die Fähigkeit, spontane DNA-Schäden zu überleben und gleichzeitig die Anzahl der vererbaren Mutationen zu minimieren (ZHOU UND ELLEDGE, 2000).

Um die Genauigkeit der Genomreplikation sowie -transkription zu gewährleisten, besitzt die Zelle komplexe Mechanismen, die die Chromosomenstruktur überwachen und die Reparatur sowie den Ablauf des Zellzyklus koordinieren. Dabei wird beim Erkennen eines Schadens der Zellzyklusarrest eingeleitet, wodurch der Teilungsprozess unterbrochen und Zeit für die Reparatur bereitgestellt wird (ZHOU UND ELLEDGE, 2000). Mit Hilfe dieses Schrittes wird vermieden, dass falsche Informationen an die Tochterzellen weitergegeben werden. Solche Fehlinformationen in der DNA können zu Mutationen führen, deren Anhäufung wiederum ein unkontrolliertes Zellwachstum (Onkogenese) oder den Verlust überlebenswichtiger Funktionen verursachen können (HOUTGRAAF *et al.*, 2006).

Mit dem Ziel, die Fehlerweitergabe zu minimieren, hält die Zelle ein komplexes Netzwerk unterschiedlichster Mechanismen bereit, die in ihrer Gesamtheit dem Schutz der genomischen Stabilität dienen. Die Mechanismen der DNA-Schadensantwort (*DNA damage response*, DDR) sind mannigfaltig und umfassen neben der Koordination des Zellzyklus sowie der Rekrutierung spezifischer DNA-Reparaturproteine auch die Steuerung der Ablesehäufigkeit bestimmter Gene.

Hierbei wird unter anderem Einfluss auf die Chromatinstruktur genommen, was dazu führt, dass die DNA stärker oder schwächer kondensiert und so die Transkriptionsrate der entsprechenden Gensequenzen variiert werden kann. Auch die Induktion des Zelltods durch die Apoptose (programmierter Zelltod) oder der zellulären Seneszenz (dauerhafte Blockade des Zellzyklus) sind Teil dieses komplexen Netzwerkes (ZHOU UND ELLEDGE, 2000; HOUTGRAAF *et al.*, 2006).

Die DDR ist eine Signaltransduktionskaskade und in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Innerhalb dieser Signalwege wird abhängig von ihren Aufgaben zwischen Sensoren, Transducern und Effektoren unterschieden. Zunächst wird ein DNA-Schaden von Sensorproteinen erkannt, das Signal über Transducer verstärkt und anschließend an Effektorproteine weitergeleitet. Die Effektoren führen dann die übermittelten Signale aus, indem sie eine Kaskade verschiedener Schadensantwortmechanismen aktivieren. Neben den Schadenssensoren, Signaltransducern und Effektorproteinen sind eine Reihe weiterer Mediatorproteine an der DDR beteiligt. Sie sind meist zellzyklusspezifisch und assoziieren mit den genannten Proteinen der Signalkaskade in bestimmten Phasen des Zellzyklus (HOUTGRAAF *et al.*, 2006; ZHOU UND ELLEDGE, 2000).

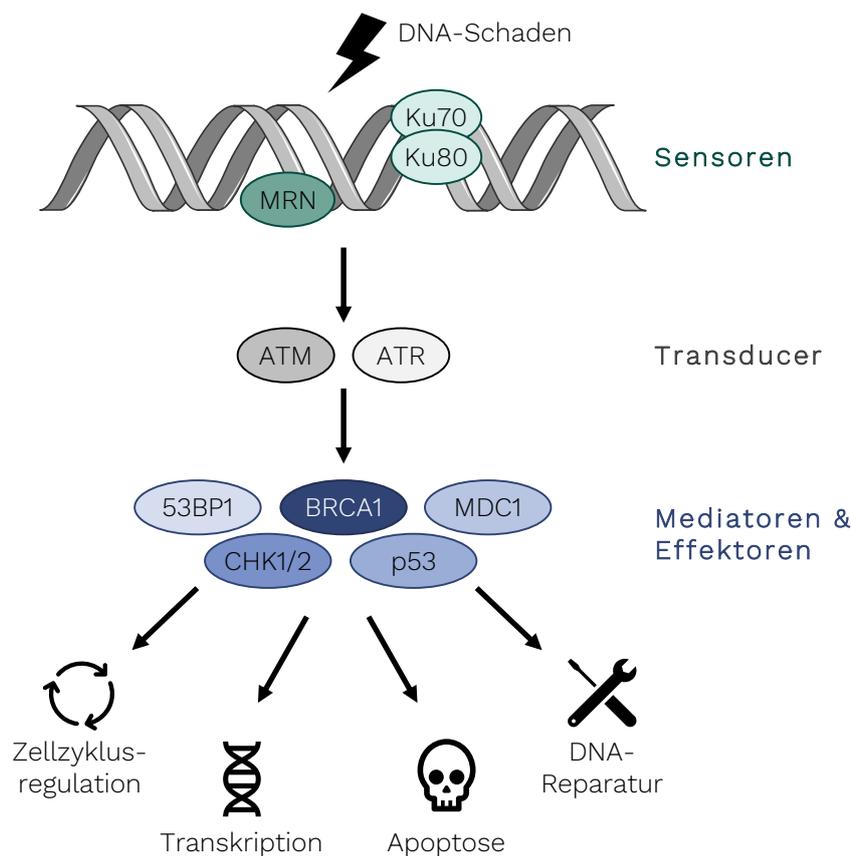


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Signalweiterleitung in der DNA-Schadensantwort (DDR). Zunächst wird der DNA-Schaden über Sensorproteine erkannt, wobei je nach Art der Läsion verschiedene Sensoren rekrutiert werden. In einer Kaskade wird das Signal anschließend über Transducer an Effektor- und Mediatorproteine weitergeleitet. Diese setzen die verschiedenen Mechanismen der DDR in Gang und aktivieren einen Zellzyklusarrest, die Apoptose, die Transkription oder die DNA-Reparatur (modifiziert nach ZHOU UND ELLEDGE, 2000; HOUTGRAAF *et al.*, 2006).

Abhängig vom jeweiligen Schaden werden unterschiedliche Sensorproteine rekrutiert. Mögliche Sensoren stellen beispielsweise die PARP1 (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1), der MRN-Komplex, bestehend aus den drei Proteinen MRE11 (*meiotic recombination protein 1*), Rad50 und NBS1 (*nijmegen breakage syndrome 1*), sowie der Ku-Komplex (Ku70/Ku80) dar. Bekannte Transducerproteine sind ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) und ATR (*ataxia-telangiectasia and RAD3-related*), die durch Phosphorylierung und somit Aktivierung verschiedener Effektor- sowie Mediatorproteine wie p53, BRCA1 (*breast cancer type 1 susceptibility protein*), 53BP1 (*tumor protein P53 binding protein 1*), MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint 1*) und CHK1/CHK2 (*checkpoint kinase 1/2*) die Signalweiterleitung kontrollieren. Je nach Kontext können bestimmte Moleküle, wie beispielsweise BRCA1, mehrere Funktionen in dem Netzwerk der Signaltransduktion haben (HOUTGRAAF *et al.*, 2006; ZHOU UND ELLEDGE, 2000).

Nur durch eine effiziente DNA-Schadensreparaturmaschinerie kann die Weitergabe von Mutationen an die nachfolgende Generation verhindert werden. Die Vielfalt an DNA-Läsionen erfordert ein hohes Maß an spezialisierten DNA-Reparaturmechanismen (HOUTGRAAF *et al.*, 2006). Kleinere Basenmodifikationen, die durch Oxidation, Alkylierung oder Desaminierung entstehen, können durch die Basen-Exzisionsreparatur (*base excision repair*, BER) entfernt werden. SSB, die beispielsweise durch oxidative Schäden der DNA oder abasische Stellen entstehen, werden mit Hilfe der DNA-Einzelstrangbruchreparatur (*single strand break repair*, SSB) behoben. Die Nukleotid-Exzisionsreparatur (*nucleotide excision repair*, NER) erkennt Helix-verzerrende Läsionen und kann sperrige DNA-Addukte (*bulky lesions*) oder Intrastrang-*Crosslinks* beseitigen. Mit Hilfe der Mismatch-Reparatur (*mismatch repair*, MMR) werden Basenfehlpaarungen, die bei einer fehlerhaften Replikation auftreten können, repariert. Die zwei Hauptwege zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen stellen die Homologe Rekombination (*homologous recombination*, HR) sowie das Nicht-Homologe *End-Joining* (*non-homologous end joining*, NHEJ) dar (CHATTERJEE UND WALKER, 2017; HOEIJMAKERS, 2001). Als *back-up* Mechanismen für die DSB stehen außerdem das *Single strand annealing* (SSA) sowie das *Microhomology-mediated end-joining* (MMEJ) zur Verfügung (WANG, 2012).

Die Effektivität der vorhandenen Reparaturmechanismen ist, wie bereits erwähnt, für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität von entscheidender Bedeutung. Dabei spielen Ringfinger-enthaltende DNA-Reparaturproteine, wie beispielsweise BRCA1, eine wichtige Rolle. Mit Thiolgruppen-tragenden Seitenketten komplexieren sie Zinkionen und erlangen so eine stabile Struktur. Ringfingerstrukturen bieten mit ihren Cystein- und Histidinseitenketten gleichzeitig jedoch potentielle Angriffspunkte für toxische Metallverbindungen. Die Bindung von Metallen an kritische Thiolgruppen kann in einer Konformationsänderung und damit einhergehend in einem Aktivitätsverlust der Proteine resultieren. Auch die Freisetzung von Zink aus den Zink-bindenden Strukturen durch redoxaktive Metalle kann die Struktur und somit die Funktion der entsprechenden Proteine verändern (HARTWIG, 2001).

2.2 DAS DNA-REPARATURPROTEIN BRCA1

In den 90er Jahren wurde *BRCA1* als eines der Gene identifiziert, das für Krebserkrankungen im Bereich der Brust und der Eierstöcke verursachend ist. Inzwischen gilt dessen Genprodukt BRCA1 als anerkannter Tumorsuppressor für Brust-, Eierstock-, Bauchspeicheldrüsen- und Prostatakrebs und spielt gleichzeitig eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität (TAKAOKA UND MIKI, 2018).

Liegt eine Mutation im *BRCA1*-Gen vor, haben Frauen ein 70-80 %iges Lebenszeitrisiko an Brustkrebs und ein 50 %iges Lebenszeitrisiko an Eierstockkrebs zu erkranken. Insgesamt wurden mehr als 1600 Mutationen in *BRCA1* identifiziert, darunter Deletionen, Insertionen und viele Einzelnukleotid-Polymorphismen in den kodierenden und nicht-kodierenden Sequenzen (GORODETSKA *et al.*, 2019; CLARK *et al.*, 2012).

Das *BRCA1* Gen ist auf dem Chromosom 17 (17q21) lokalisiert und enthält 24 Exons. Es codiert für das gleichnamige Genprodukt BRCA1, bei dem es sich um ein vorwiegend im Nukleus lokalisiertes Protein aus 1863 Aminosäuren (AS) handelt. Das entsprechende Protein faltet sich zu einer komplexen dreidimensionalen Struktur mit unterschiedlichen funktionellen Domänen (TAKAOKA UND MIKI, 2018).

2.2.1 STRUKTURELLER AUFBAU VON BRCA1

Das Genprodukt BRCA1 besteht aus mehreren Untereinheiten (Abbildung 2 - oben), die für seine vielfältigen Funktionen essentiell sind. Im N-terminalen Bereich trägt das Protein eine Cysteinreiche Fingerdomäne RING (*really interesting new gene*), die eine Zink-bindende Domäne darstellt. Die konservierte Primärsequenz besteht aus etwa 50 AS und zeigt ein charakteristisches Muster, welches sich aus sieben paarweise geordneten Cysteinen (Cys) und einem Histidin (His) zusammensetzt. Die genannten AS sind in der Lage, zwei Zn^{2+} -Ionen koordinativ zu binden, wobei jedes Ion tetraedrisch mit vier AS-Resten interagiert. Dabei bildet das Cysteinpaar I (Cys1, Cys2) mit dem Cysteinpaar III (Cys4, Cys5) die Bindungsstelle I, während das Cystein-Histidinpaar II (Cys3, His1) mit dem Cysteinpaar IV (Cys6, Cys7) eine weitere Metallbindung (Bindungsstelle II) ermöglicht (Abbildung 2 – rechts unten). Die AS-Reste 8-22 sowie 81-96 formen eine antiparallele α -Helix, die die zentrale RING-Domäne (AS 23 - 76) flankieren. Zudem ist das RING-Motiv durch ein kurzes antiparalleles dreisträngiges β -Faltblatt (AS 35 - 37, 42 - 44, 74 - 76), zwei großen Zn^{2+} -Bindungsschleifen sowie einer zentralen α -Helix (AS 46 - 53) charakterisiert. Proteolyse-Studien haben jedoch gezeigt, dass das etwa 50 AS-umfassende RING-Motiv integraler Bestandteil einer größeren, etwa 100 AS-umfassenden Domäne ist (BRZOVIC *et al.*, 2001). Grundsätzlich bildet BRCA1 ein Heterodimer mit dem Ringfingerprotein BARD1 (*BRCA1-associated RING domain protein 1*) aus und fungiert so als E3-Ubiquitin-Ligase (Abbildung 2 – links unten). Mutationen in der RING-Domäne von BRCA1, die

es von BARD1 abkoppeln und so die E3-Ubiquitin-Ligaseaktivität außer Kraft setzen, sind häufig mit einer Krebsprädisposition verbunden (TAKAOKA UND MIKI, 2018).

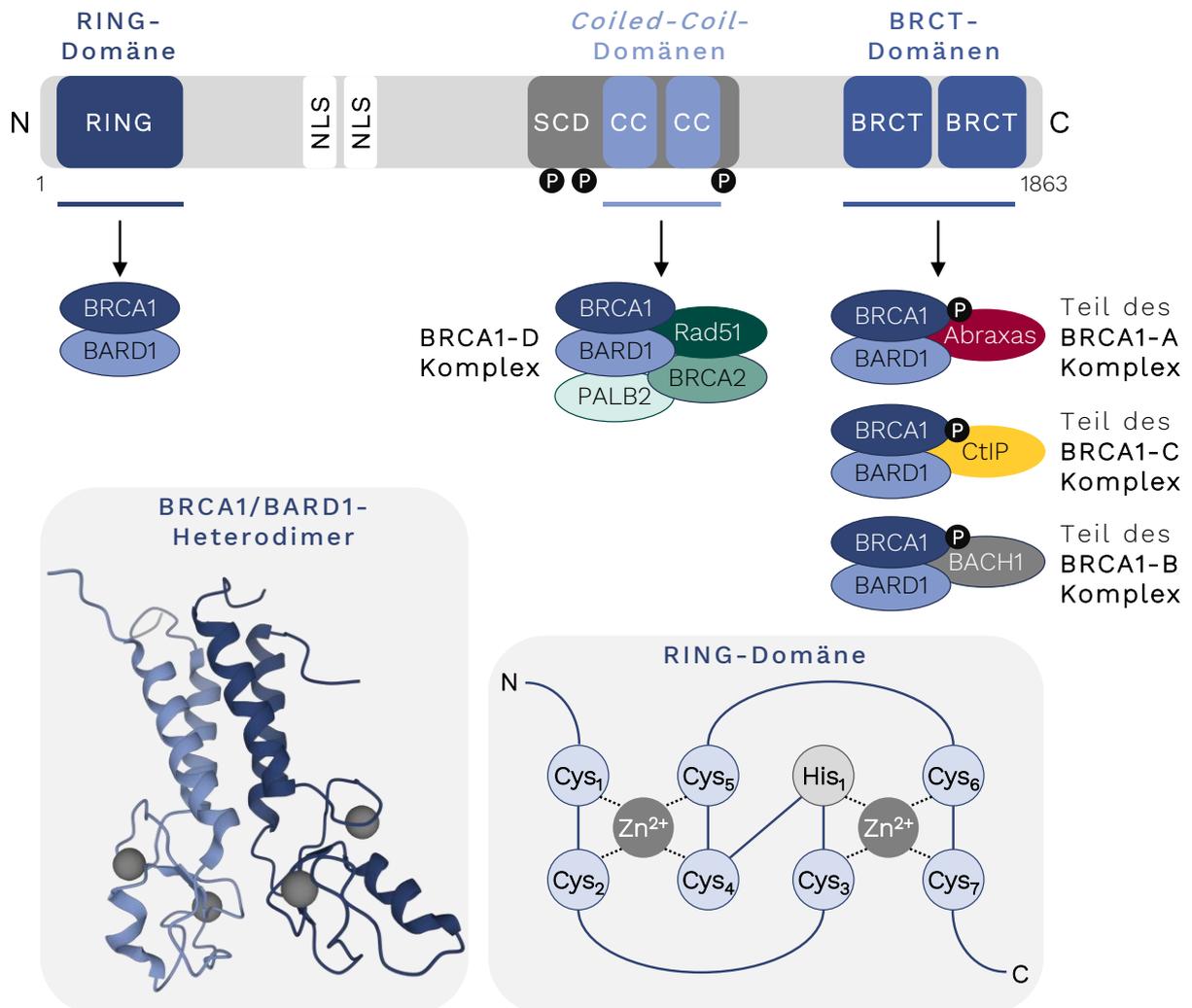


Abbildung 2: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen von BRCA1 sowie die 3D-Darstellung des BRCA1/BARD1-Heterodimers.

Oben: Am N-terminalen Ende von BRCA1 (*breast cancer type 1 susceptibility protein*) befindet sich eine RING (*really interesting new gene*)-Domäne, die mit BARD1 (*BRCA1-associated RING domain protein 1*) ein Heterodimer ausbildet. Der zentrale Bereich besteht aus zwei nukleären Lokalisationssignalen (NLS), zwei *Coiled-Coil*-Domänen (CC) sowie einer Serin-Cluster-Domäne (SCD). Letztere dient häufig als Substrat für Phosphorylierungen, während die CC-Domänen für Protein-Interaktionen wichtig sind. Das C-terminale Ende enthält zwei BRCT (*BRCA1 C-terminal*)-Domänen, die als Erkennungssequenzen für verschiedene Phosphopeptide dienen. Durch Wechselwirkung mit den verschiedenen Proteinen bilden sich unterschiedliche BRCA1-Komplexe aus. **Links unten:** Das Heterodimer aus BRCA1 (dunkelblau) und BARD1 (hellblau) interagiert über die in den Proteinen enthaltenen RING-Domänen und weist insgesamt vier Zinkbindungsstellen auf (PDB: 1JM7). **Rechts unten:** Die RING-Domäne von BRCA1 zeigt ein charakteristisches Muster bestehend aus sieben Cysteinen (Cys) (hellblau) und einem Histidin (His) (grau), welche paarweise angeordnet sind. So bilden Cys1Cys2 mit Cys4Cys5 und Cys3His1 mit Cys6Cys7 jeweils eine Zinkbindungsstelle (modifiziert nach BRZOVIC *et al.*, 2001; PIETRASIK *et al.*, 2020).

Am C-terminalen Ende des Proteins befinden sich zwei Phosphopeptid-bindende BRCT (*BRCA1 C-terminal*) -Domänen, die die Interaktion mit wichtigen Partnerproteinen der DNA-Schadensantwort vermitteln. Hierzu zählen insbesondere Proteine, die von ATM oder ATR, in Folge einer DNA-Läsion, phosphoryliert wurden. Die BRCT-Domänen von BRCA1 erkennen die Sequenz Phospho-SXXF, wobei S für Serin, F für Phenylalanin und X für beliebige AS steht. Beispiele für solche Bindungspartner sind BACH1 (*BRCA1-associated C-terminal helicase*), CtIP (*C-terminal binding protein 1*) und Abraxas (*BRCA1 a complex subunit*). Zusätzlich können die BRCT-Domänen jedoch auch die DNA-Bindung sowie die Interaktion mit Nicht-Phosphoproteinen vermitteln (TAKAOKA UND MIKI, 2018; CLARK *et al.*, 2012). Auch innerhalb dieser Region wurden krebsprädisponierende Mutationen gefunden, die die phosphospezifische Interaktion mit anderen Proteinen beeinflussen können (SAVAGE UND HARKIN, 2015).

Der zentrale Bereich von BRCA1 wird durch die Exons 11 - 13 kodiert, wobei Mutationen in dieser Region häufig bei Brustkrebspatientinnen nachgewiesen wurden. Er besteht aus zwei nukleären Lokalisationssignalen (*nuclear localization signal*, NLS) sowie zwei *Coiled-Coil*-Domänen, die beispielsweise für die Interaktion mit BRCA2 durch PALB2 (*partner and localizier of BRCA2*) verantwortlich sind (GORODETSKA *et al.*, 2019). Des Weiteren weist das zentrale Element eine Serin-Cluster-Domäne (SCD) auf, deren AS-Reste häufig als Substrat für Phosphorylierungen von ATM/ATR-Kinasen dienen. Zusätzlich können in diesem Bereich wichtige Bindungsproteine wie Rad50, Rad51, Myc und RB (Retinoblastom Protein) anknüpfen. Die große Anzahl der in dieser Region auftretenden Mutationen, viele mit dem Verlust großer Sequenzabschnitte, legt die fundamentale Rolle zur tumorsuppressiven Wirkung von BRCA1 nahe (CLARK *et al.*, 2012).

2.2.2 BRCA1 IN DER DNA-SCHADENSANTWORT

BRCA1 dient durch seine fundamentalen Rollen in der DNA-Schadenssignalisierung, der DNA-Reparatur, der Zellzykluskontrolle, der Transkriptionsregulation, der Proteinubiquitinierung, der Chromatinremodellierung sowie der Apoptose zur Aufrechterhaltung der genomischen Integrität. Aufgrund seiner Fähigkeit, mit einer Vielzahl an Proteinen zu interagieren, fungiert BRCA1 als eine Art Gerüst für die Bildung von Proteinkomplexen mit unterschiedlichsten zellulären Funktionen. Es wird davon ausgegangen, dass all diese Proteine zur Funktion von BRCA1 als Tumorsuppressor beitragen (SAVAGE UND HARKIN, 2015).

Abhängig von den entsprechenden Bindungspartnern von BRCA1 werden unterschiedliche Komplexe ausgebildet. Dabei interagieren die BRCT-Domänen von BRCA1 mit phosphoryliertem Abraxas, BACH1 oder CtIP, wobei die drei Komplexe BRCA1-A, -B und -C aufgebaut werden. Die gewählte Abkürzung stellt dabei den Anfangsbuchstaben des Schlüsselproteins dar, das mit BRCA1 interagiert. Neben den genannten Komplexen ist zusätzlich auch der BRCA1-D-Komplex bekannt, der mit BRCA2 über PALB2 interagiert. BRCA1 bildet demnach mehrere Schlüsselproteinkomplexe, die in Reaktion auf DNA-Schäden unterschiedlich und kooperativ fungieren.

Das BRCA1/BARD1-Heterodimer befindet sich in allen Komplexen als Kernkomponente (SAVAGE UND HARKIN, 2015; OHTA *et al.*, 2011). Abbildung 3 zeigt den strukturellen Aufbau sowie die Interaktionen der entsprechenden Bindungspartner dieser vier BRCA1-Komplexe.

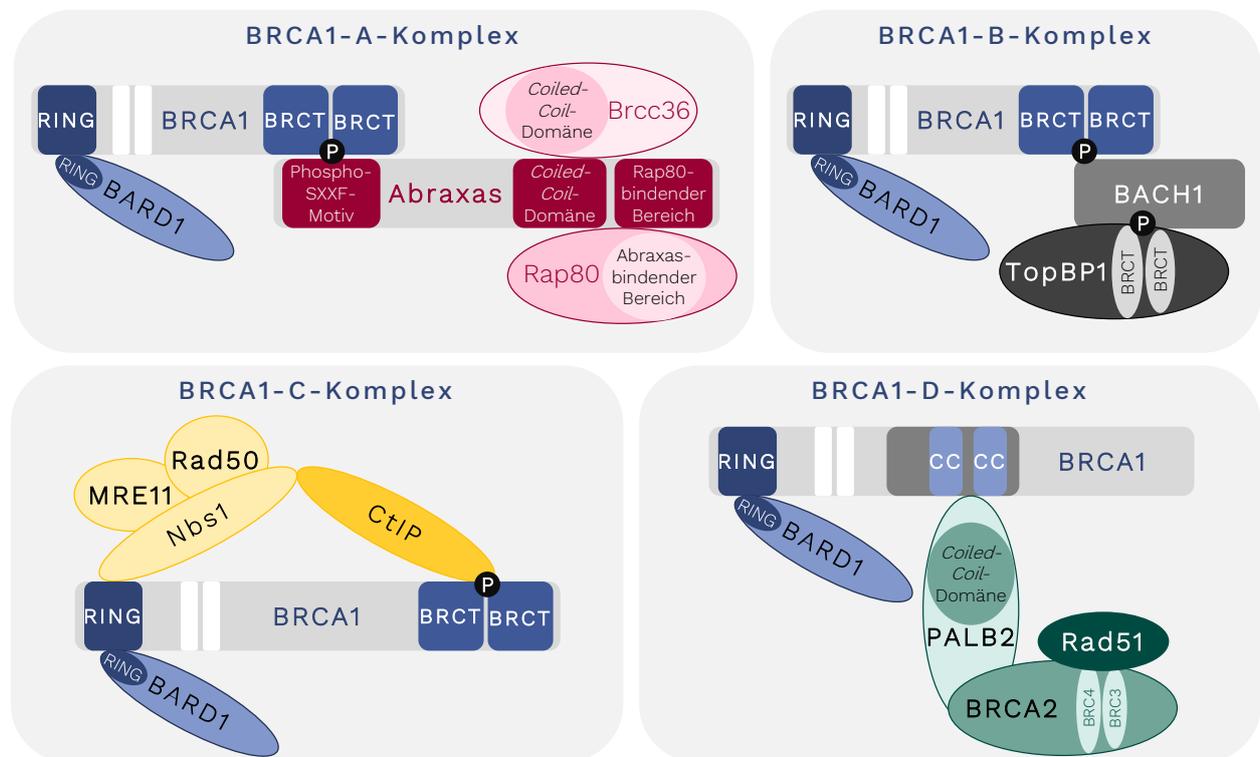


Abbildung 3: Struktureller Aufbau der unterschiedlichen BRCA1-Komplexe.

Abhängig von den entsprechenden Bindungspartnern von BRCA1 können unterschiedliche BRCA1-Komplexe ausgebildet werden. Das BRCA1/BARD1-Heterodimer befindet sich dabei in allen Komplexen als Kernkomponente. Der BRCA1-A-Komplex setzt sich aus den Proteinen BRCA1, Rap80, Abraxas und Brcc36 zusammen. Sowohl Rap80 als auch Brcc3 interagieren direkt mit Abraxas, das in seinem phosphorylierten Zustand wiederum direkt an die BRCT-Domänen von BRCA1 bindet. Der BRCA1-B-Komplex besteht aus BRCA1, BACH1 und TopBP1. Auch phosphoryliertes BACH1 kann direkt an die BRCT-Domänen von BRCA1 binden und geht gleichzeitig eine direkte Interaktion mit TopBP1 ein. Der BRCA1-C-Komplex setzt sich aus den Proteinen BRCA1, CtIP sowie dem MRN-Komplex (MRE11, Rad50, Nbs1) zusammen. Das phosphorylierte CtIP bindet an die C-terminalen BRCT-Domänen von BRCA1 und interagiert direkt mit dem Nbs1 des MRN-Komplexes. Dieser steht zusätzlich mit dem N-terminalen Ende von BRCA1 in direkter Verbindung. Der BRCA1-D-Komplex besteht aus BRCA1, PALB2, BRCA2 und Rad51. Während PALB2 direkt an BRCA1 bindet, assoziiert BRCA2 indirekt über PALB2 mit BRCA1. Rad51 wiederum kann an BRCA2 binden und wird so stabilisiert (modifiziert nach CHEN *et al.*, 2008; SY *et al.*, 2009; WANG, 2012; WANG UND ELLEDGE, 2007).

Im Folgenden soll ein gesonderter Fokus auf zelluläre Mechanismen gelegt werden, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

2.2.2.1 BRCA1 IN DER DNA-DOPPELSTRANGBRUCHREPARATUR

Wie bereits beschrieben, können viele verschiedene Arten von DNA-Läsionen als Folge von unterschiedlichen endogenen und exogenen Noxen entstehen. Die schwerwiegendsten DNA-Schäden stellen dabei DSB dar, da sie in hohem Maße genotoxische Effekte verursachen. Da bei

diesen Läsionen beide Stränge der DNA-Doppelhelix geschädigt sind, geht die Sequenzinformation verloren. Durch eine fehlerhafte Vereinigung von geschädigten DNA-Enden kommt es zum Verlust von genetischer Information. Darüber hinaus sind bei einem DSB die DNA-Enden in der Lage zu dissoziieren, wodurch eine Reparatur zusätzlich erschwert wird. Werden DSB nicht fehlerfrei repariert, können genetische Mutationen und eine mögliche Kanzerogenese die Folge sein (SAVAGE UND HARKIN, 2015; WU *et al.*, 2010).

DSB können als Nebenprodukt bei der DNA-Replikation oder während der Exposition gegenüber ionisierender Strahlung und anderen genotoxischen Verbindungen, wie beispielsweise Schwermetallen, entstehen. Besonders anfällig ist das Genom bei DNA-Schäden während der Replikation, da Läsionen in einem Einzelstrang zu einem DSB umgewandelt werden können und so zum Zusammenbruch der Replikationsgabel führen (ROY *et al.*, 2011). Viele DNA-schädigende Substanzen verursachen neben replikationsspezifischen DNA-Läsionen auch eine Blockierung der Replikationsgabel. Die Wiederherstellung von blockierten Replikationsgabeln wird primär durch den Mechanismus der HR ermöglicht. Dieser Reparaturweg wird insbesondere dann aktiviert, wenn einzelsträngige DNA akkumuliert und diese mit dem *Coating*-Protein RPA (*replication protein A*) überzogen ist (SAVAGE UND HARKIN, 2015).

Die Reparatureffizienz von DSB ist weiterhin abhängig von der vorherrschenden Zellzyklusphase. Da die HR die homologe Sequenz des Schwesterchromatids als Vorlage für den Einbau von Nukleotiden in den DSB benötigt, ist dieser Mechanismus nur während der späten S- sowie G₂-Phase des Zellzyklus verfügbar. In diesen Phasen hat bereits eine Replikation der DNA erfolgreich stattgefunden (siehe Abschnitt 2.2.2.2). Im Gegensatz zur HR wird beim NHEJ keine Matrize verwendet, weshalb dieser Reparaturweg unabhängig von der Zellzyklusphase stattfindet und der vorherrschende Mechanismus in G₀/G₁-Zellen darstellt (SAVAGE UND HARKIN, 2015).

Während das fehleranfällige NHEJ zu Fehlverknüpfungen, Deletionen sowie Translokationen des Chromosoms führen kann, ist die HR aufgrund der homologen Vorlage nahezu fehlerfrei. Die HR scheint demnach der Hauptmechanismus zum Schutz der genomischen Integrität in proliferierenden Zellen zu sein (ROY *et al.*, 2011).

2.2.2.1.1 BRCA1 IN DER DNA-SCHADENSERKENNUNG

Tritt ein DSB auf, findet zunächst die Erkennung und zelluläre Signalisierung durch den aus MRE11, Rad50 und NBS1-bestehenden MRN-Komplex statt (OHTA *et al.*, 2011). Dieser Schadenssensorkomplex fördert die Rekrutierung von ATM und ATR, wodurch das Histon H2AX phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung bewirkt dabei, dass die vorliegende DNA-Läsion über mehrere tausend Basenpaare hinweg markiert vorliegt. Die Erkennung und Bindung phosphorylierter Histone (γ -H2AX) an die DNA-Läsion durch MDC1 löst gleichzeitig die Rekrutierung des BRCA1-A-Komplexes (Abraxas, Rap80, Brcc36, BRCA1) aus. MDC1 wird

anschließend selbst phosphoryliert und bildet so eine Bindungsstelle für RNF8 (Ringfingerprotein 8), wodurch der Ablauf der RNF8-Kaskade ermöglicht wird. Die Rekrutierung des BRCA1-A-Komplexes ist demnach stark von der katalytischen Aktivität der beiden E3-Ubiquitin-Ligasen RNF8 und Ubc13 (*Ubiquitin-conjugating enzyme E2 13*) abhängig. Beide Proteine sind im Falle eines DNA-Schadens für Prozesse der Ubiquitinierung verantwortlich, bei denen insbesondere Chromatin-assoziierte Histone strukturell verändert werden. Über die Bindung von Rap80 an die Ubiquitinketten erfolgt die Rekrutierung des BRCA1-A-Komplexes, was eine Reparatur mittels HR ermöglicht (SAVAGE UND HARKIN, 2015; WU *et al.*, 2010; WANG, 2012).

Neben diesem γ -H2AX-abhängigen Mechanismus wurde ebenso ein γ -H2AX-unabhängiger Weg zur Rekrutierung von BRCA1 beschrieben. So ist die γ -H2AX-unabhängige Rekrutierung von BRCA1 durch die Bindung von PAR (Poly(ADP)-Ribose) -Einheiten in der Umgebung des DSB durch BARD1 vermittelt. PAR wird innerhalb kurzer Zeit als Antwort auf einen DNA-Schaden gebildet, weshalb dieser Weg schneller als der γ -H2AX-abhängige Mechanismus ablaufen kann. γ -H2AX scheint jedoch für die BRCA1-Retention am DSB erforderlich zu sein, weshalb eher von einer Stabilisierungs- als von einer Rekrutierungsfunktion ausgegangen wird. Es wird vermutet, dass BRCA1 zu verschiedenen Zeiten und an unterschiedlichen Regionen der DSB-Enden und des flankierenden Chromatins mannigfache Rollen spielt (LI UND YU, 2013; SAVAGE UND HARKIN, 2015).

2.2.2.1.2 BRCA1 IN DER HOMOLOGEN REKOMBINATION

Der Reparaturmechanismus der HR lässt sich in drei Phasen untergliedern, dem pre-synaptischen, synaptischen sowie post-synaptischen Stadium. Im ersten Stadium findet die Endresektion statt, bei der aus den doppelsträngigen Bruchenden einzelsträngige 3'-Überhänge generiert werden. Im Anschluss wird die Rekombinase Rad51 an die einzelsträngige DNA (ssDNA) gebunden und ein Rad51-Nukleoproteinfilament ausgebildet. Das entstandene Filament fördert in der zweiten Phase die Invasion des Schwesterstrangs und erzeugt einen Heteroduplex, eine sogenannte *Holliday Junction*. Im letzten Stadium erfolgt die DNA-Synthese unter Verwendung des Schwesterchromatids als Vorlage. Die Struktur wird aufgelöst, die Enden ligiert und *Crossover-* oder *Non-Crossover-*Produkte gebildet (SAVAGE UND HARKIN, 2015; WU *et al.*, 2010). Inwiefern die in Abschnitt 2.2.2 genannten BRCA1-Komplexe an den unterschiedlichen Phasen der HR beteiligt sind und welche Funktionen dabei noch umstritten sind, wird im Folgenden genauer betrachtet (Abbildung 4).

Neben der frühzeitigen Erkennung eines DNA-Schadens ist der MRN-Komplex auch für den initialen Schritt der DSB-Reparatur mittels HR verantwortlich. Der genannte Sensor-Komplex rekrutiert die Proteine BRCA1 sowie CtIP, wodurch der BRCA1-C-Komplex ausgebildet wird. Der MRN-Komplex koordiniert somit die Endresektion, das pre-synaptische Stadium der HR. In dieser Phase werden die Bruchenden einer enzymatischen Prozessierung unterzogen, bei der einzelsträngige 3'-Überhänge generiert werden. Trotz der Komplexbildung zwischen BRCA1, CtIP

und MRN ist die Rolle von BRCA1 im Rahmen der Endresektion umstritten. So konnte auch eine BRCA1-unabhängige CtIP-vermittelte Resektion der DNA-Enden nachgewiesen werden, wobei sowohl die Geschwindigkeit der Reaktion als auch die Länge der generierten Überhänge beeinflusst waren. Demnach scheint BRCA1 zwar nicht essentiell für die CtIP-vermittelte Resektion zu sein, dennoch erleichtert die Interaktion von BRCA1 und CtIP innerhalb des BRCA1-C-Komplexes die Effizienz dieses Prozesses (SAVAGE UND HARKIN, 2015; PRAKASH *et al.*, 2015).

Eine weitere wichtige Funktion des BRCA1-C-Komplexes ist die Verdrängung des NHEJ-fördernden Proteins 53BP1 von den DNA-Enden, um so die Endresektion zu erleichtern. 53BP1 ist ein Signalprotein, das durch Rekrutierung anderer NHEJ-assoziiierter Proteine sowie durch Hemmung der Endresektion die Reparatur mittels NHEJ begünstigt. Der BRCA1-C-Komplex ist dabei in der Lage, die Rekrutierung dieser Proteine zu blockieren sowie 53BP1 zu verdrängen, wodurch die Reparatur mittels HR in S/G₂-Zellen gefördert wird (SAVAGE UND HARKIN, 2015; PRAKASH *et al.*, 2015).

Weiterhin wurde die Beteiligung des BRCA1-B-Komplexes (BACH1, TopBP1, BRCA1) an der HR beschrieben, wobei dessen Rollen bislang noch nicht vollständig verstanden sind. Es wird angenommen, dass die im Komplex enthaltene DNA-Helikase BACH1 die Endresektion fördert, indem sie die Entwindung der DNA und somit den Zugang der Schadensstelle ermöglicht. Gleichzeitig konnte eine antagonistische Wirkung des BRCA1-A-Komplexes in Bezug auf die Endresektion festgestellt werden. Dabei soll das im Komplex enthaltene Rap80 die Resektion durch Bindung an Ubiquitin-Ketten am DSB hemmen. BRCA1 scheint demnach die Endresektion zu initiieren bzw. zu fördern, kann aber gleichzeitig auch vor übermäßiger Resektion der DNA-Enden schützen (SAVAGE UND HARKIN, 2015; PRAKASH *et al.*, 2015; WANG, 2012).

Die durch die Endresektion generierten 3'-Überhänge werden anschließend durch die Bindung von RPA vor der Ausbildung sekundärer Strukturen sowie dem nukleolytischen Abbau geschützt. Dabei wird vermutet, dass der BRCA1-B-Komplex zur RPA-Beladung der einzelsträngigen Überhänge beiträgt (SAVAGE UND HARKIN, 2015).

In der synaptischen Phase der HR interagiert Rad54 mit Rad51 und unterstützt so die Invasion des gebildeten Filaments in das Schwesterchromatid. Rad54 ist dabei für die Stabilisierung der um die ssDNA helikal gewundenen Rad51-Moleküle sowie die Chromatinremodellierung verantwortlich, wodurch die Suche der homologen Sequenz begünstigt wird. Sobald die Homologie gefunden wurde, fördert Rad51 den Austausch der DNA-Stränge, was zur Bildung einer sogenannten D (*Displacement*)-Loop führt. Neben der Stabilisierung des Rad51-Filaments ist Rad54 jedoch auch für dessen Dissoziation von Bedeutung. Während die Verdrängung von Rad51 unter ATP (Adenosintriphosphat)-Verbrauch stattfindet, ist die Stabilisierung des Nukleoproteinfilaments ATPase-unabhängig (MAZIN *et al.*, 2010; GORODETSKA *et al.*, 2019).

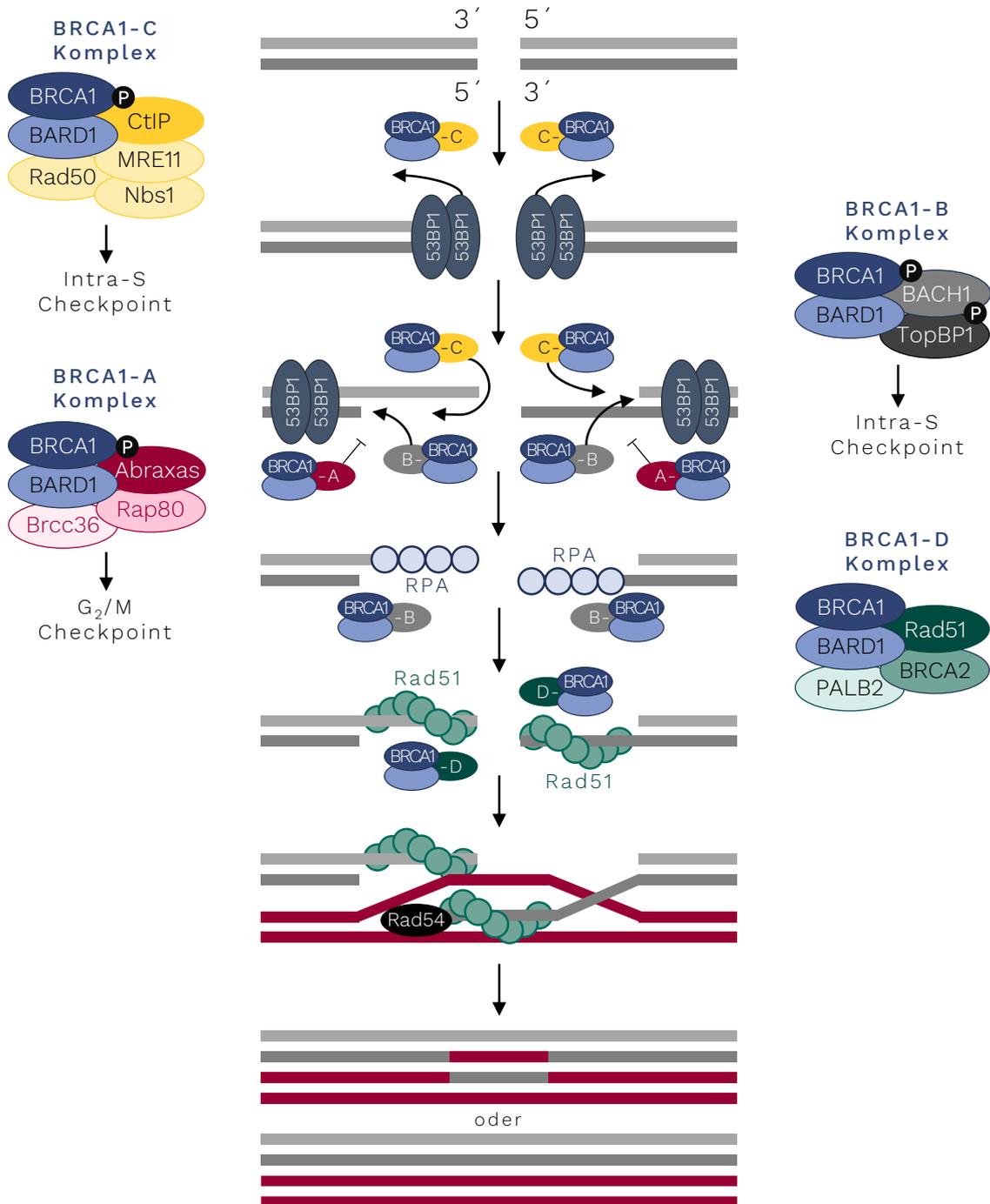


Abbildung 4: BRCA1 im Mechanismus der Homologen Rekombination (HR).

Im initialen Schritt der HR verdrängt der BRCA1-C-Komplex das NHEJ-fördernde Protein 53BP1 von den Doppelstrangbrüchenden und leitet so die Endresektion ein. Während der BRCA1-B-Komplex die Resektion fördert, verhindert der BRCA1-A-Komplex die übermäßige Resektion. Die generierten 3'-Überhänge werden anschließend durch RPA geschützt, wobei die Beladung vermutlich mit Hilfe des BRCA1-B-Komplexes stattfindet. Schließlich ermöglicht der BRCA1-D-Komplex den Austausch von RPA mit Rad51, wodurch sich das Nukleoproteinfilament ausbildet. Rad54 unterstützt dann die Invasion in das Schwesterchromatid und die Ausbildung der *Holliday-Junction*. Abschließend folgt die DNA-Synthese, unter Verwendung der homologen Vorlage, sowie die Ligation, wobei zwei intakte DNA-Helices entstehen. Sowohl der BRCA1-C-, als auch der BRCA1-B-Komplex sind für Aktivierung des Intra-S-Checkpoints nach DNA-Schädigung verantwortlich. Der G₂/M-Checkpoint wird wiederum unterstützend durch den BRCA1-A-Komplex reguliert (modifiziert nach SAVAGE UND HARKIN, 2015).

Im post-synaptischen Stadium wird der fehlende Abschnitt des beschädigten Strangs durch DNA-Polymerasen, unter Verwendung der intakten DNA als Vorlage, wiederhergestellt und mittels DNA-Ligasen verknüpft. Rad54 kann die hierbei gebildete *Holliday-Junction*, aufgrund seiner ATPase-Aktivität, vor sich hertreiben, wodurch die Basenpaare auf dem homologen Strang nacheinander ausgetauscht werden (*Branch Migration*). Im Anschluss kommt es zum sogenannten *Second-End-Capture*, bei dem das zweite Bruchende durch die D-Loop eingefangen wird. In Folge kann nun auch der zweite Strang durch Synthese verlängert werden. Abschließend entsteht bei der Auflösung der Struktur entweder ein *Crossing-Over*- oder ein *Non-Crossing-Over*-Produkt. Das *Crossing-Over*-Produkt zeigt hierbei einen Austausch der DNA-Sequenzen zwischen den Chromatiden, wobei *Non-Crossing-Over*-Produkte entsprechend keine Abschnitte tauschen (GORODETSKA *et al.*, 2019; MAZIN *et al.*, 2010).

Wie bereits beschrieben, werden vielfältigste Funktionen für BRCA1 diskutiert, die je nach Zeitpunkt und Region unterschiedlich ausfallen. Dabei wird beispielsweise vermutet, dass die Rekrutierung des BRCA1-A-Komplexes zeitlich nach der Rekrutierung von BRCA1 in anderen DSB-bindenden Komplexen erfolgt. Dies könnte erklären, wie der BRCA1-C-, und B-Komplex die DNA-Endresektion initiiert bzw. fördert, während der BRCA1-A-Komplex diesen Prozess hemmt (SAVAGE UND HARKIN, 2015).

2.2.2.1.3 BRCA1 IM NICHT-HOMOLOGEN END-JOINING

Der Reparaturmechanismus des NHEJ lässt sich grob in drei Phasen einteilen. Dabei wird der DSB zunächst erkannt, anschließend prozessiert und im Folgenden ligiert. Beim NHEJ werden die beiden Enden des DSB ohne homologe Vorlage und somit unabhängig von der Zellzyklusphase miteinander verknüpft. Durch diesen weitaus simpleren Mechanismus ist das NHEJ häufig fehlerbehaftet, weshalb es stark zur genomischen Instabilität beitragen kann (SAVAGE UND HARKIN, 2015; GORODETSKA *et al.*, 2019).

Im ersten Schritt des NHEJ erkennt das Heterodimer aus Ku70/Ku80 den DSB und bindet zum Schutz vor unspezifischer Prozessierung an dessen Enden. Diese Bindung vermittelt im Anschluss die Rekrutierung der katalytischen Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK_{cs}), wodurch sich an der DNA-Läsion die aktive DNA-PK ausbildet. Die Generierung dieses Holoenzym stabilisiert und schützt die DNA-Enden bis zur Ligation. Die häufig vorliegenden 3' - oder 5' -Überhänge müssen vor der Verknüpfung prozessiert werden. Hierfür binden der MRN-Komplex sowie die Endonuklease Artemis, die die Prozessierung der DNA-Enden katalysieren. Abschließend aktiviert die DNA-PK den XRCC4 (*X-ray repair cross complementing 4*) /DNA-Ligase IV-Komplex, wodurch die Ligation der DNA-Enden stattfinden kann. Falls notwendig, findet vor der Ligation die Synthese des fehlenden DNA-Abschnitts mit Hilfe von DNA-Polymerasen statt (DAVIS UND CHEN, 2013; GORODETSKA *et al.*, 2019; SAVAGE UND HARKIN, 2015).

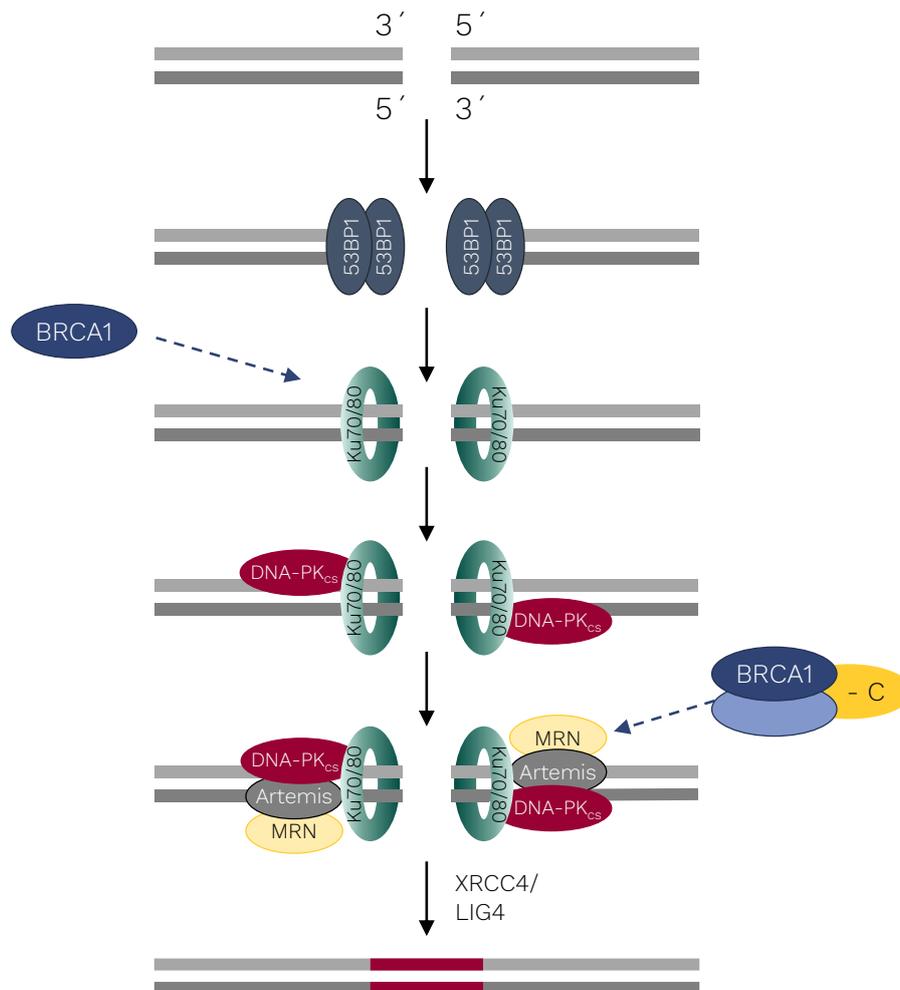


Abbildung 5: BRCA1 im Mechanismus des Nicht-Homologen *End-Joinings* (NHEJ).

Beim Auftreten eines Doppelstrangbruchs (DSB) lagert sich zunächst 53BP1 an die Läsion an, wodurch die Reparatur mittels NHEJ gefördert wird. Im Anschluss bindet das Heterodimer Ku70/Ku80 an den DSB, wobei hier eine mögliche indirekte Interaktion mit BRCA1 besteht. Nachfolgend wird die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK_{cs}) gebunden. Zur Prozessierung werden zusätzlich der MRN-Komplex sowie die Endonuklease Artemis rekrutiert, wobei auch hier eine Beteiligung von BRCA1 durch die Interaktion mit dem MRN-Komplex möglich ist. Abschließend wird die DNA-Ligation durch den XRCC4 (*X-ray repair cross complementing 4*)/LIG4 (Ligase IV) -Komplex katalysiert (modifiziert nach DAVIS UND CHEN, 2013; SAVAGE UND HARKIN, 2015).

Die Rolle von BRCA1 im Mechanismus des NHEJ ist bislang noch umstritten. Es wurde bereits beschrieben, dass BRCA1 indirekt mit Ku80 interagiert und so schnell an DSB binden kann. Eine Beteiligung an der Reparatur mittels NHEJ wird außerdem von der bereits beschriebenen Interaktion von BRCA1 mit dem MRN-Komplex, welcher sowohl bei der HR als auch beim NHEJ eine essentielle Rolle spielt, bekräftigt. Gleichzeitig zeigten gegensätzliche Ergebnisse jedoch eine beeinträchtigte HR sowie eine erhöhte NHEJ-Häufigkeit in BRCA1-defizienten embryonalen murinen Stammzellen. Infolgedessen bleibt die genaue Beteiligung von BRCA1 am Mechanismus des NHEJ Gegenstand aktueller Forschung (WU *et al.*, 2010; SAVAGE UND HARKIN, 2015), wobei die hier vorliegende Arbeit einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung leisten soll.

2.2.2.2 BRCA1 IN DER REGULATION DER ZELLYKLUSPROGRESSION

Ein wichtiger und komplexer Vorgang der DNA-Schadensantwort stellt der Zellzyklus einer Zelle dar. Er bezeichnet die geordnete Abfolge von Ereignissen, die in verschiedenen Phasen auftreten und zur korrekten Vervielfältigung und Übertragung der genomischen Information auf die Tochterzellen führen. Der Zellzyklus besteht aus vier zeitlich aufeinanderfolgenden Phasen, die sogenannte G_1 (*Gap*)-Phase, S (Synthese)-Phase, G_2 -Phase und M (Mitose)-Phase. Die Periode zwischen den Mitosen, der Zellteilung, wird als Interphase bezeichnet. So entspricht die G_1 -Phase dem Zeitraum zwischen der mitotischen Teilung und dem Beginn der DNA-Synthese. In dieser Phase befindet sich die Zelle im Wachstum und der gleichzeitigen Synthese von Proteinen und Nukleotiden, die für die darauffolgende DNA-Synthese notwendig sind. Die G_1 -Phase stellt einen wichtigen regulatorischen Kontrollpunkt dar, bei dem entschieden wird, ob die Zelle weiter den Zellzyklus durchläuft und sich teilt oder ob sie den Zellzyklus verlässt und in die sogenannte Ruhephase G_0 -Phase übergeht. In dieser Phase verweilt die Zelle solange, bis sie ein Signal zur Weiterführung erhält. In der an die G_1 -Phase anschließende S-Phase findet die DNA-Replikation statt. Hierbei wird eine exakte Kopie des Genoms erstellt, sodass am Ende dieser Phase zwei identische Schwesterchromatide vorliegen. Ist die Replikation abgeschlossen, tritt die Zelle in die G_2 -Phase ein. In diesem Stadium findet erneut ein Wachstum der Zellen sowie die Synthese Mitose-benötigter Proteine statt. Während der eigentlichen Zellteilung, der M-Phase, werden die Chromosomen so organisiert, dass zwei genetisch identische Tochterzellen entstehen können. Anschließend erfolgt ein weiterer Durchlauf des kompletten Zyklus (HOUTGRAAF *et al.*, 2006; HUSTEDT UND DUROCHER, 2016). In Abbildung 6 ist der Ablauf des Zellzyklus sowie dessen Regulation schematisch dargestellt.

Bei einer auftretenden DNA-Schädigung können verschiedene *Checkpoints* im Zyklus einer Zelle aktiviert werden. Diese Kontrollpunkte verhindern das Fortschreiten der Zelle in die nächste Zellzyklusphase, wodurch ein sogenannter Zellzyklusarrest eingeleitet wird. Der Zelle wird so Zeit zur Reparatur der Läsion gegeben, was wiederum die Weitergabe des Schadens an die Tochterzellen verhindert. Die Aktivierung der *Checkpoints* nach DNA-Schädigung ist demnach entscheidend für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität. Diese Kontrollpunkte befinden sich zu Beginn der G_1 -Phase (G_0/G_1 -*Checkpoint*), vor der Replikation (G_1/S -*Checkpoint*), während der Replikation (*Intra-S-Checkpoint*), nach der Replikation bzw. vor der Mitose (G_2/M -*Checkpoint*) sowie innerhalb der Mitose (*M-Checkpoint*) (WU *et al.*, 2010; HOUTGRAAF *et al.*, 2006; FUNK, 2001). Die treibende Kraft für die Zellzyklusprogression ist die periodische Aktivierung und Inaktivierung von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK). Diese assoziieren mit spezifischen Cyclinen, wodurch sich aktive Kinase-Holoenzyme bilden. Die CDK-Aktivität ist in der G_1 -Phase generell niedrig und steigt progressiv an, wobei sie beim Eintritt in die Mitose ihr Maximum erreicht. Welche Phase im Zellzyklus von welchem CDK-Cyclin-Komplex gesteuert wird, hängt vom jeweiligen Zeitpunkt ab (HUSTEDT UND DUROCHER, 2016; FUNK, 2001).

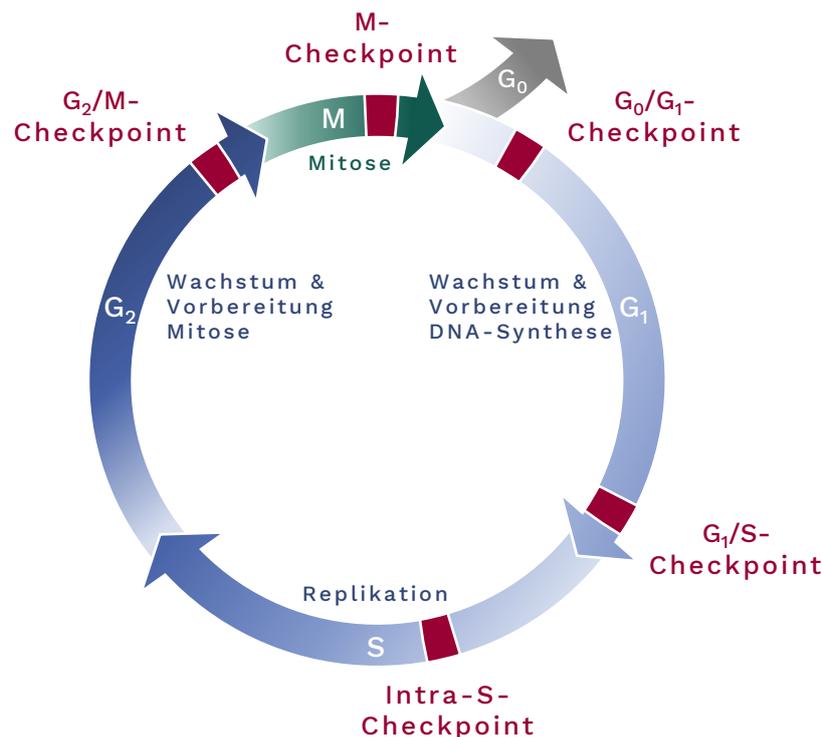


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Zellzyklus sowie dessen Regulation.

Der Zellzyklus besteht aus vier aufeinander folgenden Phasen. In der G₁ (*Gap*)-Phase befindet sich die Zelle im Wachstum und der gleichzeitigen Vorbereitung auf die nachfolgende DNA-Synthese. In der anschließenden S (Synthese) -Phase erfolgt die DNA-Replikation, bei der eine exakte Kopie des Genoms erstellt wird. Nachfolgend geht die Zelle in die G₂-Phase, in der sie sich wieder im Wachstum und der Vorbereitung auf die Mitose befindetet. Schließlich teilt sich die Zelle in der M (Mitose)-Phase in zwei genetisch identische Tochterzellen. Die G₀-Phase befindet sich außerhalb des Zellzyklus, hier findet keine Zellteilung statt. Tritt ein DNA-Schaden auf, können verschiedene *Checkpoints* im Zyklus aktiviert werden, wodurch ein Zellzyklusarrest eintritt und die Zelle Zeit zur Reparatur erhält (modifiziert nach HOUTGRAAF *et al.*, 2006).

Tritt ein IR-induzierter oder Replikations-assoziiertes DNA-Schaden auf, kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung von ATM und ATR, beispielsweise durch den MRN-Komplex. ATM/ATR phosphorylieren und stimulieren wiederum die Kinasen CHK1/CHK2 sowie p53. Der Tumorsuppressor p53 induziert anschließend die Transkription des CDK-Inhibitors p21, welcher wiederum die Aktivität von CDK4 und CDK6 hemmt und so einen G₁-Arrest auslöst. Eine verstärkte Expression von p21 als Reaktion auf aktiviertes p53 verursacht zudem einen G₂/M-Arrest. Hierbei bindet p21 an den CDK1-CyclinB-Komplex, wodurch dessen Aktivierung und somit die Zellzyklusprogression verhindert wird. Neben p53 können auch die aktivierten Kinasen CHK1/CHK2 das Signal weiterleiten, indem sie die drei Isoformen A/B/C der CDC25 (*cell division cycle 25*) -Phosphatase phosphorylieren. Durch diese Modifikation wird die Inaktivierung sowie die Ubiquitin-vermittelte Degradation der Phosphatase eingeleitet. Als Folge dieser Signalkaskade werden die Komplexe CDK2-CyclinE sowie CDK1-CyclinB gehemmt, was zur Einleitung des G₁/S-Arrests bzw. G₂/M-Arrests führt (MAIER *et al.*, 2016; HOUTGRAAF *et al.*, 2006).

Bei dieser unabdingbaren Zellzyklusregulation spielt neben den genannten Proteinen insbesondere auch BRCA1 eine essentielle Rolle. Die in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Komplexe werden dabei abhängig vom Zellzyklus gebildet. Beim Vorliegen einer DNA-Läsion erfolgen intrazelluläre Phosphorylierungsschritte, bei denen BRCA1 je nach Art des Schadens durch spezifische Proteine wie beispielsweise ATM (IR-Strahlung, Ser1387), ATR (UV-Strahlung, Ser1457) sowie CHK2 (IR-Strahlung, Ser988) phosphoryliert wird (YOSHIDA UND MIKI, 2004). Inwieweit die Art der Phosphorylierung die Funktion von BRCA1 in der Zellzyklusregulation beeinflusst, wird nachfolgend genauer erläutert und in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

Wie bereits erwähnt spielt p53, durch Aktivierung der p21-Transkription, eine entscheidende Rolle beim *G₁/S-Checkpoint*. BRCA1 fungiert hierbei vermutlich als Gerüstprotein, das die Signalisierung und Phosphorylierung von p53 durch ATM, als Reaktion auf IR-induzierte DNA-Läsionen, erleichtert. BRCA1 wird hierbei selbst durch ATM phosphoryliert. Die Phosphorylierung von p53 wiederum führt zur p53-vermittelten transkriptionellen Induktion von p21, wodurch der *G₁*-Arrest eingeleitet wird (WU *et al.*, 2010; SAVAGE UND HARKIN, 2015; ROY *et al.*, 2011).

Zusätzlich zu dem p21-vermittelten Mechanismus ist der BRCA1-induzierte *G₁/S*-Arrest insbesondere von der Anwesenheit des RB Proteins abhängig. Nach derzeitigem Kenntnisstand kann dieser über eine Reihe von unterschiedlichen Wegen erfolgen, an denen hauptsächlich ATM, ATR, BARD1, RB, p53, p21 und deren nachgeschaltete Effektoren beteiligt sind (CLARK *et al.*, 2012; GORODETSKA *et al.*, 2019; DENG, 2006).

Auch bei der Aktivierung des *Intra-S-Phasen-Checkpoints* scheint BRCA1 eine entscheidende Rolle zu spielen. Das Protein ist durch Regulation der CHK1-Kinaseaktivität während der S-Phasenprogression an dieser Signaltransduktion beteiligt. Zudem ist die IR-induzierte ATM-vermittelte Phosphorylierung an Ser1387 von BRCA1 für den *S-Phasen-Checkpoint* erforderlich. Phospho-BRCA1 könnte demnach funktionelle Partner für die Regulierung dieser Signalkaskade rekrutieren. Darüber hinaus kann BRCA1 auch die ATM-Aktivierung nach DNA-Schädigung während der S-Phase kontrollieren. BRCA1 scheint hierbei mit dem MRN-Komplex (BRCA1-C-Komplex) zu interagieren, welcher ein Sensor für DSB darstellt und ATM direkt aktiviert (WU *et al.*, 2010; DENG, 2006).

Da DNA-Läsionen während der DNA-Synthese häufig zu blockierten Replikationsgabeln führen, ist die Zelle in der Lage, die Replikation innerhalb der S-Phase zu hemmen und so die Reparatur des vorliegenden Schadens zu ermöglichen. Der BRCA1-B-Komplex erkennt diese blockierten Replikationsgabeln und trägt so zur Inhibierung der DNA-Synthese sowie zur Aktivierung des *Intra-S-Checkpoints* bei (TAKAOKA UND MIKI, 2018).

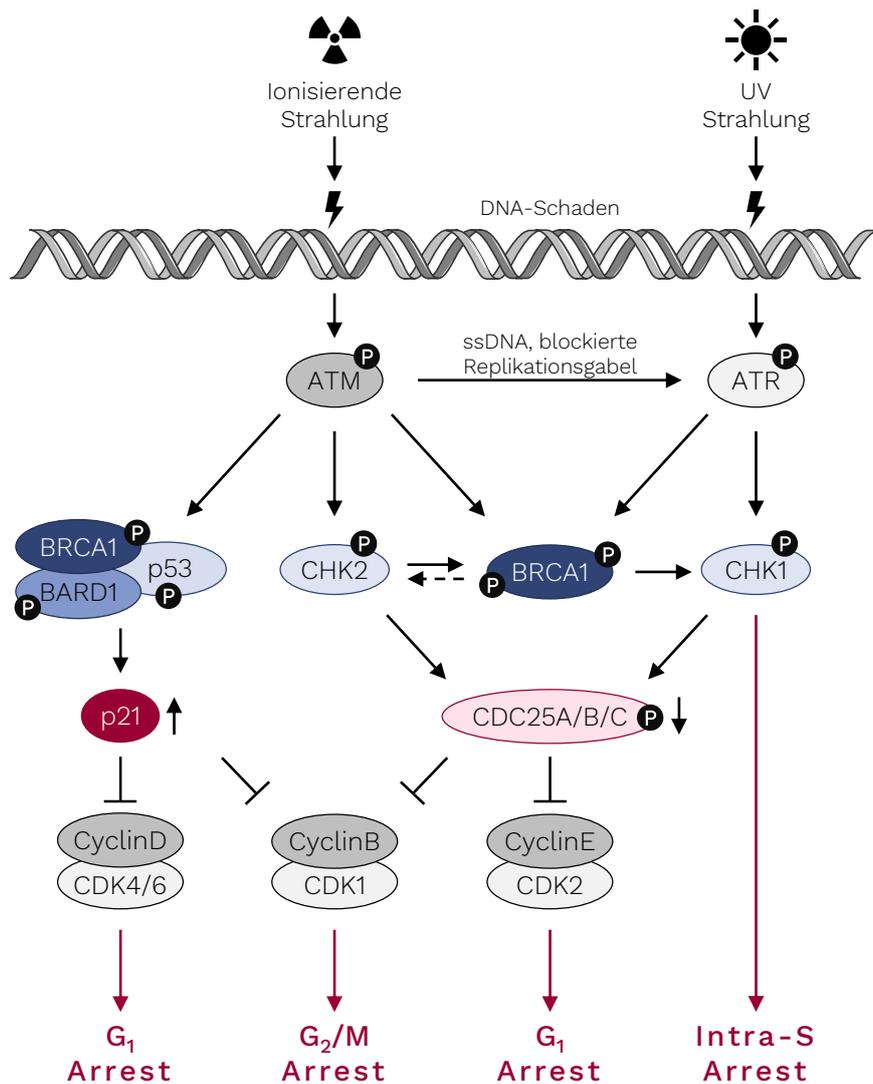


Abbildung 7: Modell zur Veranschaulichung der BRCA1-Funktionen in der Regulation des Zellzyklus.

Nach der Schadenserkenkung werden ATM und ATR abhängig von der Läsion durch Phosphorylierung aktiviert. ATM phosphoryliert seinerseits p53, wobei das BRCA1/BARD1-Heterodimer als Gerüstproteinkomplex dient. In Folge wird die Transkription des CDK-Inhibitors p21 induziert, was zu einem G₁- bzw. G₂/M-Arrest führt. Weitere Zielproteine von ATM und ATR stellen CHK1/CHK2 sowie BRCA1 dar. So kann phosphoryliertes BRCA1 durch Regulation der CHK1-Kinaseaktivität den Intra-S-Checkpoint kontrollieren. Dabei werden durch Aktivierung von CHK1/CHK2 die drei Isoformen von CDC25 phosphoryliert und anschließend abgebaut. Folglich werden CDK1/2 gehemmt und der G₁- sowie G₂/M-Arrest eingeleitet. Des Weiteren kann BRCA1 durch Regulation der CHK1-Kinaseaktivität auch den G₂/M-Checkpoints regulieren. Zusätzlich scheint auch CHK2 an der BRCA1-vermittelten Regulation des G₂/M-Checkpoints beteiligt zu sein (modifiziert nach DENG, 2006; MAIER *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2010).

Analog zum Intra-S-Checkpoint reguliert BRCA1 auch während des G₂/M-Checkpoints die CHK1-Kinaseaktivität. Anders als beim S-Phasen-Kontrollpunkt phosphoryliert ATM hier jedoch das Ser1423 von BRCA1, das für die Aktivierung des G₂/M-Checkpoints erforderlich ist. BRCA1 scheint demnach unterschiedliche funktionelle Partner für die Aktivierung des G₂/M-Checkpoints sowie des S-Phasen-Checkpoints zu haben (WU *et al.*, 2010). So ist beispielweise der BRCA1-A-Komplex, durch Regulation der CHK1-Kinaseaktivität, an dieser Signaltransduktion beteiligt. Das

im Komplex enthaltene Rap80 vermittelt dabei die Rekrutierung von BRCA1 an den DSB sowie die Bindung an dessen Umgebung. Durch die Bindung an Chromatin wird die Phosphorylierung von CHK1 gefördert. Wie bereits beschrieben, führt diese Modifizierung in einer Signalkaskade zur Initiierung des G₂/M-Arrests. Auch CtIP, das im BRCA1-C-Komplex gebunden ist, ist für die schadensinduzierte Phosphorylierung von CHK1 und somit zur Aktivierung des G₂/M-*Checkpoints* erforderlich (TAKAOKA UND MIKI, 2018). Neben ATM und CHK1 scheint auch CHK2 an der BRCA1-vermittelten Regulation des G₂/M-Kontrollpunkts beteiligt zu sein (DENG, 2006).

Außerdem interagiert BRCA1 mit dem Mediator des MDC1-Proteins. MDC1 wirkt zusammen mit γ H2AX, um DNA-Reparaturproteine wie 53BP1, BRCA1 und MRN an die Stellen der DNA-Brüche zu rekrutieren und einen Zellzyklusarrest in der S- und G₂/M-Phase des Zellzyklus zu induzieren (GORODETSKA *et al.*, 2019).

Während die oben dargestellten Studien die prominente Beteiligung von BRCA1 an der Zellzykluskontrolle vorzugsweise nach IR-induzierten DSB in Betracht ziehen, so sollen in der vorliegenden Arbeit weiterführende Untersuchungen der Zellphasenverteilung nach Arsenit-Schädigung Berücksichtigung finden.

2.2.2.3 BRCA1 IN DER TRANSKRIPTIONELLEN REGULATION

Die Genexpression beschreibt im Allgemeinen die Umsetzung der in der DNA enthaltenen Information in funktionelle Moleküle. Die Regulation kann prinzipiell auf allen Ebenen von der Transkription bis zum Abbau der Genprodukte erfolgen, wobei ein grundlegender Bestandteil dabei die Regulation der Gentranskription ist. Sie ist ein kritischer biologischer Prozess, der es dem Organismus ermöglicht, auf eine Vielzahl von intra- und extrazellulären Signalen zu reagieren, die Zellidentität während der Entwicklung zu definieren, sie während der gesamten Lebensdauer aufrechtzuerhalten sowie die zelluläre Aktivität zu koordinieren. Die primären Regulatoren der Genexpression sind dabei die Transkriptionsfaktoren (TF). TF sind Proteine, die an spezifische DNA-Sequenzen binden und so die Transkription regulieren. Ihre Entwicklung wird von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst, dazu gehören beispielsweise epigenetische Mechanismen, genregulatorische Elemente und molekulare Cofaktoren (CASAMASSIMI UND CICCODICOLA, 2019; MITSIS *et al.*, 2020).

BRCA1 kann neben den bisher genannten Mechanismen der DDR auch die transkriptionelle Regulation über unterschiedliche Wege beeinflussen (Abbildung 8). So kann das Protein durch seine Struktur sowie durch Interaktion mit der Kerntranskriptionsmaschinerie in der Transkriptionsregulation fungieren. Des Weiteren ist BRCA1 in der Lage auf epigenetischer Ebene durch Chromatinmodifikationen sowie durch die Assoziation mit sequenzspezifischen TF die Genexpression zu regulieren (MULLAN *et al.*, 2006). Obwohl BRCA1 dazu befähigt ist direkt an die DNA zu binden, ist das Protein selbst kein sequenzspezifischer TF, sondern ein Co-Regulator

sowie Co-Repressor diverser TF. BRCA1 wird dabei über die Interaktion mit sequenzspezifischen TF innerhalb der gebildeten Komplexe an Promotoren rekrutiert (GORODETSKA *et al.*, 2019; SAVAGE UND HARKIN, 2015).

Erste Hinweise für die Funktion von BRCA1 in der Transkriptionsregulation lieferte die Struktur des Proteins. Bei der Identifizierung des Gens und dessen Genprodukt im Jahre 1994 zeigte das Protein eine hohe Anzahl an sauren, negativ geladenen Aminosäureresten, insbesondere im C-terminalen Bereich. In nachfolgenden Untersuchungen konnte die Transaktivierungsaktivität von BRCA1 und somit dessen physiologische Rolle in der Transkriptionsregulation festgestellt werden (SAVAGE UND HARKIN, 2015; MULLAN *et al.*, 2006).

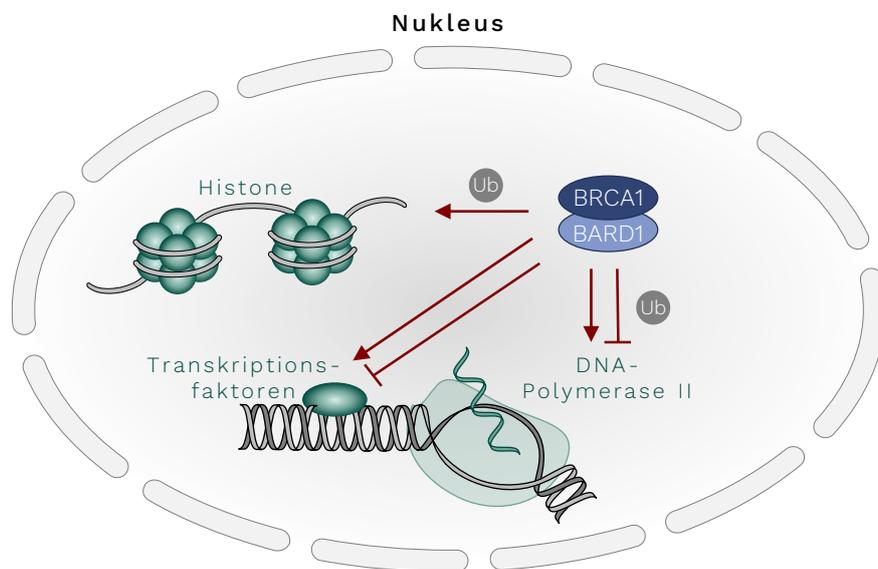


Abbildung 8: Funktionelle Rolle von BRCA1 in der transkriptionellen Regulation.

Das Heterodimer aus BRCA1 und BARD1 ist in der Lage, mit der Kernkomponente der Transkriptionsmaschinerie, der RNA-Polymerase II, zu interagieren. Dabei kann es entweder die mRNA-Transkription stimulieren oder die Polymerase bei auftretender DNA-Schädigung entfernen. Des Weiteren ist das Heterodimer dazu befähigt, Proteine zu modulieren, die an der Chromatinremodellierung beteiligt sind. Durch Ubiquitinierung (Ub) von Histonen wird hier die Zugänglichkeit der DNA verändert. Darüber hinaus kann BRCA1 sowohl als Co-Aktivator wie auch als Co-Repressor verschiedener Transkriptionsfaktoren wirken.

Seit einigen Jahren häufen sich die Hinweise auf die funktionelle Rolle von BRCA1 in der Transkriptionsregulation. So ist BRCA1 dazu befähigt, mit dem RNA-Polymerase II Holoenzymkomplex durch die RNA-Helikase A zu interagieren. BRCA1 scheint demnach eine Kernkomponente der Transkriptionsmaschinerie zu sein. Dabei kann die Interaktion entweder direkt über die C-terminale Domäne von BRCA1 oder indirekt über den im Heterodimer enthaltenen Bindungspartner BARD1 stattfinden. Der zentrale Bereich des Proteins wiederum bindet an eine große Anzahl von TF, die möglicherweise Signale an die RNA-Polymerase II vermitteln. Gleichmaßen stellt die RNA-Polymerase II jedoch auch ein Ziel für die BRCA1/BARD1 Ubiquitin-Ligaseaktivität nach DNA-Schädigung dar. So könnte das Enzym durch Ubiquitinierung abgebaut werden, wodurch der Zugang für die Reparaturmaschinerie ermöglicht

wird. BRCA1 kann demnach seine Assoziation mit der RNA-Polymerase II nutzen, um die mRNA-Transkription zu stimulieren und gleichzeitig bei auftretender DNA-Schädigung die Polymerase von der aktiven Transkription der Gene zu entfernen (YOSHIDA UND MIKI, 2004; MULLAN *et al.*, 2006).

Neben der Fähigkeit, die basale Transkriptionsmaschinerie zu regulieren, kann BRCA1 zudem Proteine modulieren, die an der Chromatinremodellierung beteiligt sind. Dabei ubiquitiniert das BRCA1/BARD1-Heterodimer beispielsweise Histone wie H2A und H2AX, wodurch die Zugänglichkeit der genomischen DNA für Transkriptions- und Reparaturmechanismen verändert wird (TAKAOKA UND MIKI, 2018).

Ein weiterer Weg, über den BRCA1 die Transkription beeinflusst, stellt die Regulation der für die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren benötigten Signalwege dar. Ein Beispiel hierfür ist die bereits beschriebene Phosphorylierung von BRCA1 als Reaktion auf DNA-Schäden durch ATM/ATR, die für die ATM-vermittelte p53-Signalisierung und -Aktivierung erforderlich ist. BRCA1 reguliert demnach die p53-abhängige Transkription von p21. Darüber hinaus scheint das Protein auch die p53-Zielgene, die als Reaktion auf DNA-Schäden transaktiviert werden, zu modulieren. Dabei induziert das BRCA1-stabilisierte p53 spezifisch die Transkription von DNA-Reparatur- und Zellzyklusarrest-assoziierten Zielgenen, nicht aber die der p53-regulierten pro-apoptotischen Gene (SAVAGE UND HARKIN, 2015; MULLAN *et al.*, 2006).

Die Rolle von BRCA1 als Co-Aktivatoren von TF wurde beispielsweise durch die Bildung eines Komplexes mit der p65-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*), beschrieben. Dieser Komplex ist in der Lage, an Promotoren unterschiedlicher Zielgene zu binden. Durch die Transaktivierung dieser anti-apoptotischen Gene wird die Apoptose gehemmt und eine zelluläre Resistenz gegen DNA-Schäden induziert (SAVAGE UND HARKIN, 2015).

Neben der als Co-Aktivatoren beschriebenen Funktion, ist BRCA1 jedoch auch in der Lage als Co-Repressor durch Hemmung der Transkription zu dienen. So kann das Protein beispielsweise den Signalweg der Östrogenantwort auf mehreren Ebenen beeinflussen. Östrogene fördern im Allgemeinen die Proliferation sowie die Expression einer Reihe von proliferativen Genen, die mit der Entwicklung von Krebs assoziiert sind. Ein wichtiger TF stellt dabei der Östrogenrezeptor ER- α (*estrogen receptor- α*) dar. BRCA1 ist hierbei befähigt, die ER- α stimulierte Transkription durch direkte Bindung an den TF zu hemmen, wobei dessen Signalweiterleitung beeinträchtigt wird. Gleichzeitig kann der Co-Repressor beispielsweise auch die Expression einer Reihe von endogenen ER- α -regulierten Genen unterdrücken (SAVAGE UND HARKIN, 2015).

Es wird vermutet, dass BRCA1 als Reaktion auf eine DNA-Schädigung als eine Art „Schalter“ fungiert und ein Signal an Promotor-bindende Proteine weiterleitet. BRCA1 scheint dabei an eine große Anzahl von Promotoren im gesamten Genom gebunden zu sein, obwohl es die Transkription der meisten dieser Gene in einer gesunden Zelle nicht reguliert. Erst als Reaktion

auf verschiedene Stressfaktoren wird die Expression vieler dieser Gene in einer BRCA1-abhängigen Weise reguliert. Möglich wäre, dass die Aktivität sowie die Proteinzusammensetzung der BRCA1-Promotor-gebundenen Komplexe über Phosphorylierungsereignisse oder andere DNA-Schadens-induzierte Modifikationen von BRCA1-bindenden Proteinen reguliert wird. Diese Regulation könnte die Feinabstimmung der BRCA1-regulierten Transkription als Antwort auf verschiedene Arten von genotoxischem Stress ermöglichen (SAVAGE UND HARKIN, 2015).

2.3 ARSEN

Wie bereits beschrieben, zählen auch toxische Metallverbindungen, wie beispielsweise Arsenit, zu den exogenen Faktoren, die die DNA schädigen können. Dabei stellen insbesondere Zink-bindende Strukturen, wie das DNA-Reparaturprotein BRCA1, potentielle Angriffspunkte für Metallionen dar. Nachfolgend werden die allgemeinen und toxikologischen Grundlagen von Arsen sowie der Einfluss des Halbmetalls auf die DNA-Reparatur genauer erläutert.

2.3.1 VORKOMMEN, VERWENDUNG UND EXPOSITION

Das Element Arsen (As) ist ein Halbmetall der 5. Hauptgruppe des Periodensystems. Es besitzt die Ordnungszahl 33 und weist eine Valenzelektronenkonfiguration von s^2p^3 auf. Die bedeutendsten Oxidationsstufen sind -3, +3 und +5. Elementares Arsen kommt in der Natur nur selten vor, ist jedoch in zahlreichen sulfidischen und oxidischen Mineralien in der Erdkruste zu finden (HOLLEMAN *et al.*, 2007).

Arsen kommt ubiquitär vor und wird zudem anthropogen in die Umwelt eingetragen. Verwendung finden das Halbmetall und seine Verbindungen insbesondere in der Landwirtschaft, der Industrie sowie der Medizin. Dabei wurde Arsen bis zum Verbot 1974 in einer Vielzahl von Pestiziden eingesetzt. Heutzutage wird das Metalloid industriell vorwiegend als Bestandteil in Legierungen sowie Halbleitern oder als Konservierungsmittel für Holz verwendet. Medizinisch kommt es beispielsweise in der traditionellen chinesischen Medizin sowie zur Behandlung von Leukämie zum Einsatz (HETTICK *et al.*, 2015; MANDAL UND SUZUKI, 2002).

Aufgrund der hohen Mobilität von Arsen und seinen Verbindungen findet eine weite Verteilung innerhalb der Umwelt statt. So kann das im Boden vorkommende anorganische Arsen durch Erosion in das Grundwasser und damit in Nutzpflanzen gelangen, wodurch es letztendlich auch in der menschlichen Nahrungskette zu finden ist. In der Luft tritt Arsen insbesondere nach Vulkanausbrüchen, Verhüttung von Erzen oder durch Verbrennen von Kohle in Form des partikulären Arsentrioxids (As_2O_3) auf. Aufgrund der hohen Wasserlöslichkeit ist die genannte Verbindung zusätzlich in der Lage, über Niederschläge in das Grund- und Oberflächenwasser zu gelangen (MANDAL UND SUZUKI, 2002; CHOU UND ROSA, 2003).

Die Exposition des Menschen mit Arsen und dessen Verbindungen ist demnach auf das Grundwasser, die Atmosphäre sowie auf die Nahrung zurückzuführen. Während Lebensmittel wie Fisch, Obst und Gemüse überwiegend organische Arsenverbindungen enthalten, akkumulieren in tierischen Lebensmitteln, wie Milch, Milchprodukte und Fleisch sowie Getreiden (insbesondere Reis) vorwiegend die toxikologisch-relevanten anorganischen Verbindungen. Auch im Trinkwasser dominieren die anorganischen Formen Arsenit (AsO_3^{3-}) und Arsenat (AsO_4^{3-}). Neben der Aufnahme von Arsen über Reis und Reisprodukte spielt die Belastung des Trinkwassers weltweit eine bedeutsame Rolle. Insbesondere in gefährdeten Gebieten wie Bangladesch, China, Indien oder Taiwan stellt die Trinkwasserbelastung mit Arsen eines der größten Umweltprobleme dar. In diesen Regionen enthalten die Böden hohe Mengen an Arsen, wodurch das Grund- und Trinkwasser stark belastet sind. Der von der WHO (*World Health Organization*) festgelegte Grenzwert von $10 \mu\text{g As/L}$ wird in diesen Ländern um ein Vielfaches überschritten (MANDAL UND SUZUKI, 2002; CHOU UND ROSA, 2003).

2.3.2 TOXIKOKINETIK UND METABOLISMUS

Die Aufnahme von Arsen und dessen Verbindungen erfolgt hauptsächlich oral oder inhalativ. Während die inhalative Exposition vorwiegend am Arbeitsplatz oder bei Rauchern eine Rolle spielt, ist die Allgemeinbevölkerung oral über das Trinkwasser und die Nahrung exponiert. Die Bioverfügbarkeit des aufgenommenen anorganischen Arsens hängt dabei von der entsprechenden Matrix sowie der Löslichkeit der jeweiligen Verbindung ab. Die Verteilung im menschlichen Körper wird von Faktoren wie der Blutperfusion, dem Gewebesvolumen sowie der Membranbeschaffenheit beeinflusst. Eine verstärkte Akkumulation ist in der Niere, der Milz sowie der Leber zu finden, wobei auch Schwefel-haltige Gewebe wie Haare, Nägel und die Haut als Marker für langfristige Arsenexpositionen dienen (MANDAL UND SUZUKI, 2002; BFR, 2014).

Die zelluläre Aufnahme der unterschiedlichen Arsenverbindungen wird durch ihren Oxidationsstatus bestimmt (Abbildung 9). Arsenit (As(III)) wird dabei über Aquaglyceroporine und Hexosepermeasen in die Zelle aufgenommen, während Arsenat (As(V)) über Phosphotransporter in die Zelle gelangt. As(V) wird im Anschluss rasch zum reaktiveren As(III) reduziert, wobei dieser Prozess in der Leber stattfindet und durch das Enzym Arsenat-Reduktase katalysiert wird. Das dabei entstandene As(III) wird nachfolgend zu Monomethylarsensäure (MMA) und Dimethylarsinsäure (DMA) methyliert. Diese Methylierungen finden über eine Reihe von Oxidations- und Reduktionsreaktionen statt, wobei auch dieser Prozess in den Hepatozyten stattfindet. Der Methylierungsprozess wird von Methyltransferasen vermittelt, die S-Adenosylmethionin (SAM) als Methyl-Donor und Glutathion (GSH) als essentiellen Cofaktor nutzen. Die Ausscheidung findet beim Menschen hauptsächlich renal statt, wobei in Urin die beiden Metabolite DMA (60 %) und MMA (20 %) sowie anorganisches As (20 %) zu finden sind (WATANABE UND HIRANO, 2013; MANDAL UND SUZUKI, 2002).

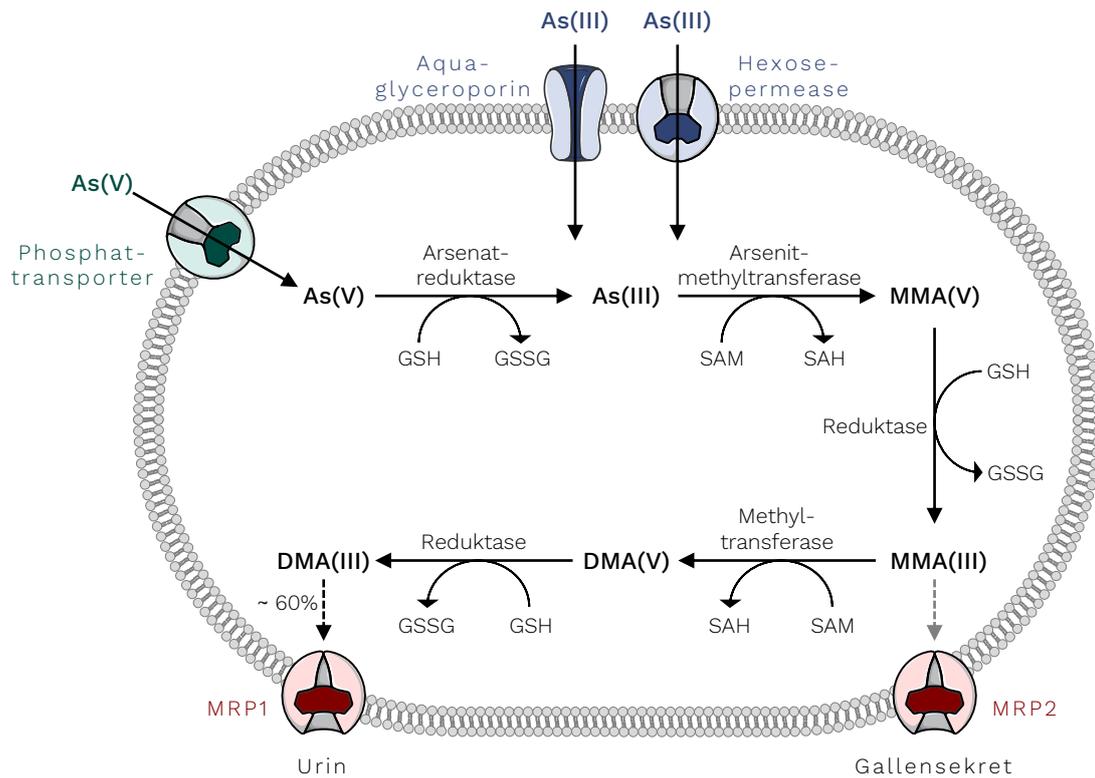


Abbildung 9: Schematische Darstellung des vorgeschlagenen Arsenmetabolismus beim Menschen.

Die zelluläre Aufnahme anorganischer Arsenverbindungen wird durch ihren Oxidationsstatus beeinflusst. Während Arsenat (As(V)) über Phosphattransporter in die Zelle gelangt, wird Arsenit (As(III)) über Aquaglyceropore oder Hexosepermeasen aufgenommen. As(V) wird anschließend rasch zu As(III) reduziert, wobei diese Reaktion von der Arsenat-Reduktase katalysiert wird und Glutathion (GSH) als Cofaktor benötigt. Durch weitere Methylierungs- und Reduktionsreaktionen werden die Metabolite Monomethylarsonsäure (MMA) und Dimethylarsonsäure (DMA) gebildet. Die Methylierungsschritte werden von Methyltransferasen vermittelt, wobei S-Adenosylmethionin (SAM) als Methyl-Donor dient. Der Hauptausscheidungsweg erfolgt über die Niere, wobei der aktive Transporter MRP1 (*multidrug resistance protein 1*) zum Einsatz kommt. GSSG: Glutathiondisulfid, SAH: S-Adenosylhomocystein (modifiziert nach BEYERSMANN UND HARTWIG, 2008; WATANABE UND HIRANO, 2013).

Während anorganische Verbindungen beim Menschen einem effizienten Stoffwechsel unterliegen, können organische Arsenverbindungen wie Arsenobetain und Arsenocholin, die beispielsweise in Meerestieren und Fischen vorkommen, nicht oder nur schwach metabolisiert werden (WATANABE UND HIRANO, 2013).

2.3.3 TOXIZITÄT

Das toxikologische Potential von Arsen ist abhängig von der Art der jeweiligen chemischen Verbindung (organisch oder anorganisch, Oxidationsstatus), deren Löslichkeit sowie der Toxikokinetik. Dreiwertige Arsenverbindungen sind in der Regel toxischer als fünfwertige, was möglicherweise auf die große Bereitschaft mit benachbarten SH-Gruppe zu reagieren und so ggf. Enzyme zu hemmen, zurückzuführen ist. Im Allgemeinen werden organische Verbindungen in Lebensmitteln als weniger toxisch angesehen als ihre anorganischen Vertreter. Die

toxikologischen Risikobewertungen internationaler Organisationen legen daher einen besonderen Fokus auf anorganische Arsenverbindungen in Lebensmitteln (BfR, 2014; EFSA, 2009). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden alle Experimente mit anorganischem Arsen durchgeführt.

Eine Intoxikation mit Arsen kann sowohl akute als auch chronische Effekte im menschlichen Körper auslösen. Die akute Toxizität von anorganischem Arsen geht häufig mit gastrointestinalen, kardiovaskulären, renalen und neurologischen Störungen einher. Bei einer chronischen Arsenexposition wiederum stellt die Haut das sensitivste Organ für nicht-karzinogene Wirkungen dar. Dabei werden insbesondere Hautläsionen wie Hyperkeratosen und Pigmentstörungen beobachtet. Zudem können Schäden an peripheren Blutgefäßen auftreten, was zum Absterben von Geweben (*Blackfoot-Disease*) führt. Weitere toxische Effekte einer chronischen Exposition sind kardiovaskuläre Erkrankungen, neurotische Wirkungen, Entwicklungsstörungen sowie die Kanzerogenität bereits bei niedrigen Konzentrationen (BfR, 2014; HARTWIG *et al.*, 2020).

Die Kanzerogenität, welche von anorganischem Arsen ausgeht, spielt auch bei der Festlegung von Grenzwerten eine entscheidende Rolle. Wie bereits beschrieben, verstoffwechselt der menschliche Organismus anorganisches Arsen in organische Formen. Insbesondere die dabei entstehenden dreiwertigen methylierten Spezies (MMA(III) und DMA(III)) tragen zur Arsen-induzierten Genotoxizität und vermutlich auch zur Kanzerogenität bei (HARTWIG *et al.*, 2020).

So wurden Arsen und seine anorganischen Arsenverbindungen sowohl international durch die IARC (*International Agency for Research on Cancer*) als auch national durch die MAK-Kommission (DFG Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe) in die Kanzerogenitätskategorie I und somit als „kanzerogen für den Menschen“ eingestuft. Dabei konnte in epidemiologischen Studien ein Zusammenhang zwischen der Arsenaufnahme über das Trinkwasser und einem erhöhten Risiko für Haut-, Blasen- und Lungenkrebs beobachtet werden. Auch Krebserkrankungen der Niere, der Leber sowie der Prostata können durch die Aufnahme anorganischen Arsens hervorgerufen werden (IARC, 2012; DFG, 2002).

Die Festlegung eines sicheren Grenzwertes für Arsen in Lebensmitteln ist nach Bewertung durch die EFSA (*European Food Safety Authority*) nicht möglich. Zur Risikobewertung wird stattdessen das BMDL (*Benchmark Dose Lower Confidence Limit*) verwendet. Dabei handelt es sich um einen definierten Dosisbereich, bei dem nur ein leichter, jedoch messbarer Effekt auf die Organe auftritt. Die EFSA schlägt einen BMDL₀₁-Bereich vom 0,3 – 8,0 µg/kg KG/Tag vor, was ein zusätzliches Risiko für die Entwicklung von Lungen-, Haut- und Blasen Tumoren sowie Hautläsionen von 1 % bei täglicher Arsenaufnahme in diesem Bereich bedeutet. Da in Europa die geschätzte durchschnittliche ernährungsbedingte Exposition der Allgemeinbevölkerung gegenüber anorganischem Arsen in diesem Bereich liegt, kann ein mögliches Krebsrisiko für

Verbraucher nicht ausgeschlossen werden und demnach kein TDI (*tolerable daily intake*)-Wert abgeleitet werden (EFSA, 2009; BfR, 2014).

Die genauen Wirkmechanismen des Humankarzinogen sind bislang noch nicht vollständig bekannt. Mögliche Wirkweisen der kanzerogenen Effekte sind die Induktion von oxidativem Stress, eine beeinträchtigte DNA-Reparatur, ein verändertes DNA-Methylierungsmuster, die verstärkte Zellproliferation sowie die Inhibierung von p53 (BEYERSMANN UND HARTWIG, 2008). Abbildung 10 zeigt einen Überblick des toxikologischen Wirkprofils von anorganischem Arsen.

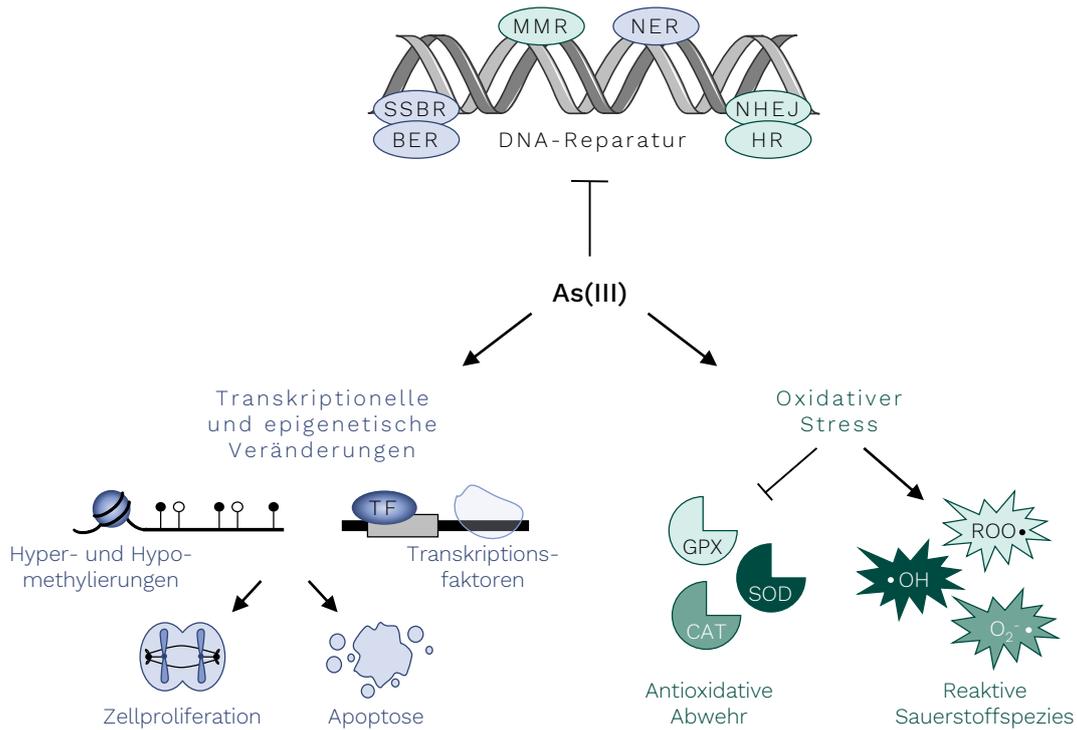


Abbildung 10: Toxikologisches Wirkprofil von dreiwertigen anorganischem Arsen (As(III)).

Das toxikologische Potential von As(III) ist auf eine Vielzahl von Mechanismen zurückzuführen. So besitzt As(III) eine hohe Affinität gegenüber Thiolgruppen, wodurch eine Interaktion mit DNA-Reparaturproteinen sowie mit antioxidativ-wirkenden Enzymen, wie der Glutathion-Peroxidase (GPX), der Superoxiddismutase (SOD) und der Katalase (CAT), ermöglicht wird. Zusätzlich wird durch die verstärkte Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies oxidativer Stress durch As(III) ausgelöst. Das Metalloid ist zudem in der Lage, auf epigenetischer sowie transkriptioneller Ebene zu wirken, indem es zu Hypo- oder Hypermethylierungen führt oder unterschiedliche Transkriptionsfaktoren (TF) beeinflusst. Dabei können Signalwege wie die Zellproliferation oder die Apoptose reguliert werden.

Anorganisches Arsenit selbst zeigt kein mutagenes Potential in bakteriellen Testsystemen und Säugerzellen. Allerdings ist das Metalloid in der Lage die Mutagenität anderer DNA-schädigender Agenzien, wie beispielsweise UV-Strahlung, zu erhöhen und so als Co-Mutagen zu wirken. Demgegenüber konnten jedoch bereits klastogene Effekte wie Chromosomenabberationen, DNA-Basenschäden und DNA-Strangbrüche sowie der Austausch von Schwesterchromatiden in Säugerzellen nachgewiesen werden (BEYERSMANN UND HARTWIG, 2008).

Zwar konnten bislang ähnliche genotoxische Effekte für die anorganischen Verbindungen As(III) und As(V) beobachtet werden, allerdings trat dies erst bei etwa zehnfach höheren As(V)-Konzentrationen auf. In Bezug auf die methylierten Verbindungen erwiesen sich MMA(III) und DMA(III) bei allen Endpunkten bereits in niedrigeren Konzentrationen genotoxisch. Fünfwertige, organische, Verbindungen zeigen entweder keine genotoxischen Wirkungen oder die vorhandenen Effekte waren auf deutlich höhere Gehalte beschränkt (KLIGERMAN *et al.*, 2003; SCHWERDTLE *et al.*, 2003B).

Die zugrundeliegenden Mechanismen für die Co-Mutagenität und Klastogenität scheinen ebenfalls die Induktion von oxidativem Stress, die Inhibierung der DNA-Reparatur und das veränderte DNA-Methylierungsmuster zu sein. Alle resultieren in genomischer Instabilität der Zelle (BEYERSMANN UND HARTWIG, 2008).

2.3.3.1 INDUKTION VON OXIDATIVEM STRESS

Eine Reihe unterschiedlicher Studien liefern Hinweise auf die Arsen-induzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie von reaktiven Stickstoffspezies (RNS) und dem damit einhergehenden oxidativen Stress. Die dabei zugrundeliegenden Mechanismen sind vielfältig und umfassen beispielsweise die Bildung von ROS während des Arsenmetabolismus sowie die Interaktion mit der mitochondrialen Atmungskette (HARTWIG *et al.*, 2020). Es wurde bereits gezeigt, dass ROS und RNS an der oxidativen Schädigung von Lipiden, Proteinen und DNA in Arsen-exponierten Zellen beteiligt sind und dass diese Läsionen zum Zelltod führen können (HARTWIG, 2013).

Darüber hinaus ist auch eine Beeinträchtigung der zellulären Redoxhomöostase durch Arsen bekannt. Arsenverbindungen sind dabei in der Lage, den Gehalt des zellulären Antioxidans GSH zu verringern. GSH wird als Cofaktor für die Reduktion von As(V) zu As(III) sowie als Bindungspartner für As(III) benötigt. Im Zuge dieser Reduktion entsteht ein GSH-Dimer (GSSG), welches anschließend durch die GSH-Reduktase wieder zu GSH umgewandelt wird. Die gebildeten GSH-As(III)-Komplexe, insbesondere jedoch die endogen gebildeten methylierten Verbindungen, sind in hohen Konzentrationen dazu befähigt, die GSH-Reduktase zu hemmen, wodurch die Regeneration von GSH und somit dessen antioxidative Wirkung blockiert wird. Ein weiterer Mechanismus zur Störung der ROS-Detoxifizierung ist die Beeinträchtigung weiterer antioxidativ-wirkender Enzyme wie die Katalase (CAT), die Superoxiddismutase (SOD) sowie die GSH-Peroxidase (GPX) (HARTWIG *et al.*, 2020; CHOUCANE UND SNOW, 2001; HU *et al.*, 2020).

Zudem trägt auch die Induktion von NADPH-Oxidasen (NOX) zur Generierung von ROS durch anorganisches Arsen bei. Dieser Membran-assoziierte Enzymkomplex ist für die Übertragung der Elektronen von NADPH (Nikotinamidadeninucleotidphosphat) auf molekularen Sauerstoff

verantwortlich, wobei abhängig von der Isoform hochreaktive Superoxidationradikale oder Wasserstoffperoxid (H₂O₂) gebildet werden (HU *et al.*, 2020; ELLINSWORTH, 2015).

Weiterhin sind exogen methylierte Arsenverbindungen in der Lage, redoxaktives Eisen aus Ferritin freizusetzen. Durch die gleichzeitige Beeinträchtigung der antioxidativ-wirkenden Enzyme und dem damit verbundenen erhöhten Vorkommen an ROS können zweiwertige Eisenionen über die Fenton-Reaktion oxidiert werden, wodurch Hydroxylradikale gebildet werden (AHMAD *et al.*, 2000).

2.3.3.2 TRANSKRIPTIONELLE UND EPIGENETISCHE VERÄNDERUNGEN

Es ist bekannt, dass Arsen Redox-regulierte Signaltransduktionen verändern kann, woraus sowohl Aktivierungen als auch Inhibierungen verschiedener TF resultieren können. Einer dieser TF ist NF- κ B, der für die Regulation der Zellproliferation sowie der Apoptose verantwortlich ist. Die Aktivierung des TF NF- κ B ist dabei stark von der Expositionsdauer, der Arsenkonzentration sowie vom Zelltyp abhängig. Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der durch ROS-vermittelte Wege nach Arsenexposition beeinflusst wird, ist NRF2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*). So konnte zuvor bereits gezeigt werden, dass anorganisches Arsen über unterschiedliche Mechanismen in der Lage ist, diesen NRF2-KEAP1-Weg zu aktivieren. Neben den bereits genannten Arsen-beeinflussten Redox-regulierten Signalwegen werden auch MAPKs (*mitogen-activates protein kinase*) durch Arsen aktiviert. Diese regulieren beispielsweise die Proliferation, die Genexpression sowie die Apoptose (HU *et al.*, 2020; EMADI UND GORE, 2010).

Ein weiterer Mechanismus in Bezug auf Veränderungen der Genexpression besteht in epigenetischen Veränderungen, die durch As(III) ausgelöst werden. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang insbesondere die Veränderung des Methylierungsmusters durch Arsen, was in der Aktivierung der Expression von Onkogenen und dem *Silencing* von Tumorsuppressorgenen resultieren kann. Dabei wurden sowohl Hypo-, als auch Hypermethylierungen beobachtet, jedoch sind die zugrundeliegenden Mechanismen bislang noch unklar. Die wichtigsten epigenetischen Veränderungen, die nach Exposition gegenüber anorganischem Arsenit auftreten, sind die Hypermethylierung von Promotorregionen, globale Hypomethylierung sowie die Veränderung der globalen Histon H3-Methylierung. Die Mechanismen zur Veränderung spezifischer Methylierungen sind komplex und bedürfen weiteren Forschungsarbeiten zur Klärung dieser veränderten Genexpression (BROCATO UND COSTA, 2013; REICHARD UND PUGA, 2010).

2.3.3.3 INHIBIERUNG DER DNA-REPARATUR

Ein weiterer potentiell genotoxischer Mechanismus von Arsen ist die Interaktion mit den verschiedenen DNA-Reparaturwegen. So können dreiwertige, nicht aber fünfwertige Arsenverbindungen beispielsweise die NER hemmen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Reparatur von UVC- und Benzo[*a*]pyren-Diolepoxid-induzierten DNA-Läsionen durch As(III) und

noch ausgeprägter durch MMA(III) und DMA(III) beeinträchtigt ist. Darüber hinaus ist auch die Beeinträchtigung der BER durch Arsenit und seinen methylierten Metaboliten bekannt. Der empfindlichste Parameter in Bezug auf die Arsen-beeinträchtigte DNA-Reparatur ist jedoch die Poly(ADP-Ribosy)lierung (PARylierung). Schon niedrige nanomolare Konzentrationen der dreiwertigen Verbindungen As(III), MMA(III) sowie DMA(III) sind dabei in der Lage die PARylierung zu hemmen. Zusätzlich konnte eine direkte Beeinträchtigung des isolierten Zinkfingerproteins PARP1 durch dreiwertige Arsenverbindungen beobachtet werden. Die PARP1 stellt das Schlüsselenzym für die PARylierung dar und nimmt damit eine wichtige Funktion in der DNA-Schadenserkennung der SSBR bzw. BER ein (HARTWIG *et al.*, 2003; WEDLER *et al.*, 2021).

Als möglicher Mechanismus gilt dabei die Interaktion der dreiwertigen Metallverbindungen mit Thiolgruppen, wie sie beispielsweise in Zink- und Ringfingern vorkommen. So sind dreiwertige Arsenverbindungen aufgrund der hohen Affinität gegenüber Dithiol- und Trithiolgruppen in der Lage, an diese zu binden, wodurch die Konformation und somit die Funktion der Proteine verändert werden. Dabei konnte bereits gezeigt werden, dass dreiwertiges anorganisches Arsen spezifisch mit Zinkfingermotiven interagiert, die drei oder mehr Cysteine enthalten (ZHOU *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2014). Auch die Oxidation von Cysteinresten durch redoxaktive Metalloide kann die Funktionalität dieser Proteine beeinflussen. Beispiele für Proteine, die solche sensitiven Angriffspunkte in ihrer Struktur aufweisen, sind der Transkriptionsfaktor p53 sowie das zuvor genannte DNA-Reparaturproteine PARP1 (HARTWIG, 2001). So beinhaltet beispielsweise die Struktur des PARP1-Proteins drei solcher Zinkfinger motive. Jüngste Erkenntnisse deuten darauf hin, dass insbesondere der Zinkfinger I unter homöostatischen Bedingungen nicht mit Zink gesättigt vorliegt und ihn so besonders empfindlich gegenüber Arsenit und damit verbundenem oxidativen Stress macht. Die Arbeitsgruppe begründet dies durch die unterschiedlichen Affinitäten der Zink-bindenden Strukturen gegenüber dem Cofaktor (BOSSAK *et al.*, 2015). Auch das in der NER-beteiligte Zinkfingerprotein XPA (*xeroderma pigmentosum group a-complementing protein*) zeigte eine Beeinflussung nach Behandlung mit dreiwertigen Arsenverbindungen. Dabei waren die Verbindungen dazu befähigt Zink aus einem Zinkfinger-enthaltenden Konstrukt, das dem humanen XPA-Protein ähnelt, freizusetzen (SCHWERDTLE *et al.*, 2003A). Der zugrundeliegende Mechanismus scheint auf die Oxidation der Thiolgruppen und somit die Bildung von Disulfidbrücken zurückzuführen zu sein (PIATEK *et al.*, 2008).

Demgegenüber ist nur wenig über die Beeinflussung der Cystein-reichen Ringfinger, welche ebenfalls ein potentielles Angriffsziel darstellen und eine essentielle Rolle im Rahmen der DDR einnehmen, bekannt. Auch das Kernprotein der nahezu fehlerfreien HR, BRCA1, gehört durch seine N-terminale RING-Domäne zu den möglichen *Targets* für Metallverbindungen. Erste Hinweise auf eine Interaktion mit anderen Metalloiden als dem natürlichen Cofaktor machte die Arbeitsgruppe ROEHM UND BERG. Sie konnten zeigen, dass Co(II) in der Lage war mit unterschiedlichen Affinitäten an die beiden unbesetzten Bindungsstellen in der RING-Domäne

von BRCA1 zu binden und so eine Konformationsänderung auszulösen (ROEHM UND BERG, 1997). Indizien für eine Arsenit-vermittelte Beeinflussung des Proteins ergab die Forschungsarbeit der Autorengruppe ZHANG. Hierbei konnte eine unterdrückte Rekrutierung von BRCA1 an Laser-induzierte DSB und somit eine beeinträchtigte DSBR durch Arsenit-Behandlung beobachtet werden (ZHANG *et al.*, 2014) Die dabei zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch unklar und bedürfen, aufgrund der bedeutenden Rolle der HR in der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität einer Zelle, weiteren Forschungsarbeiten.

Neben dem direkten Einfluss von Arsen auf verschiedene DNA-Reparaturproteine kann das Halbmetall im Falle von BRCA1 auch indirekt, im Hinblick auf seine Funktion als E3-Ubiquitin-Ligase, Einfluss nehmen. So konnte bereits eine Beeinträchtigung des RNF20-RNF40 E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes durch As(III) beobachtet werden. Dieser Komplex ist für die Ubiquitinierung des Histons H2B beim Vorliegen eines DSB verantwortlich, wodurch die Chromatinremodellierung eingeleitet und die Reparatur erleichtert wird. Durch Bindung von As(III) an die RING-Domänen der im E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexe enthaltenen Proteine wird der Vorgang der Ubiquitinierung und damit die epigenetische Markierung von Histonen gehemmt. Zusätzlich wird vermutet, dass As(III) auch Ubiquitinierungsprozesse anderer Ringfinger-E3-Ubiquitin-Ligasen, die für die DNA-Schadensantwort wichtig sind, stören kann (ZHANG *et al.*, 2014). Eine solche E3-Ubiquitin-Ligase stellt das Heterodimer aus BRCA1 und BARD1 dar, weshalb weiterführende Arbeiten eine mögliche Arsenit-vermittelte Beeinflussung dieser fokussieren sollten.

3 FRAGESTELLUNG

Die DNA ist Trägerin der gesamten Erbinformation eines Organismus. Das Überleben hängt von der exakten Weitergabe der genetischen Information einer Zelle an ihre Folgegenerationen ab. Die Erbsubstanz unterliegt dabei permanenten Angriffen sowohl durch exogene als auch endogene Faktoren, welche die molekulare Integrität der DNA verändern und so die genomische Stabilität gefährden können. Ein komplexes Netzwerk aus Proteinen der DNA-Schadensantwort (DDR) ist dazu befähigt, eine Vielzahl an Läsionen zu reparieren oder durch den programmierten Zelltod die Weitergabe an die Tochterzellen zu verhindern (ZHOU UND ELLEDGE, 2000).

Zahlreiche DDR-assoziierte Proteine besitzen dabei Zink-bindende Domänen. Ein wichtiger Vertreter hierfür ist BRCA1, welches eine fundamentale Rolle in der Signaltransduktionskaskade der DDR spielt (SAVAGE UND HARKIN, 2015). Die Bedeutung von BRCA1 wird besonders durch Studien mit *BRCA1*-mutierten Zellen deutlich, welche mit einem Funktionsverlust des Proteins einhergehen. Eine *loss-of-function* Mutation erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Tumorbildung, insbesondere für Brust- und Eierstockkrebs (CLARK *et al.*, 2012). Aufgrund der vielschichtigen Beteiligung von BRCA1 an den Mechanismen der DDR, besteht noch immer Forschungsbedarf. Ein Ziel der hier vorliegenden Arbeit befasst sich deshalb damit, detaillierten Aufschluss über die Einflussnahme von BRCA1 in den verschiedenen Signalwegen der DDR zu geben.

Des Weiteren gilt BRCA1 aufgrund der Zink-bindenden Domäne als potentiell Angriffsziel für toxische Metallverbindungen. Redoxaktive sowie thiolaffine Metalle und Halbmetalle sind bekanntermaßen in der Lage, an kritische Thiolgruppen in Zinkfingerproteinen zu binden oder diese zu oxidieren. Dementgegen ist die Datenlage über eine Interaktion mit Ringfingerproteinen wie BRCA1 jedoch unzureichend. Insbesondere ubiquitär vorkommende, dreiwertige Arsenverbindungen weisen eine große Bereitschaft auf an benachbarte Dithiol- und Trithiolgruppen zu assoziieren. Eine solche Interaktion geht häufig mit einer Konformationsänderung und somit einem Funktionsverlust der Proteine einher, was wiederum die assoziierten Signalwege der DDR und so die genomische Integrität negativ beeinflusst. Demnach widmet sich ein weiterer Aspekt der hier vorliegenden Arbeit einer möglichen Beeinträchtigung BRCA1-vermittelter DDR-Mechanismen durch die anorganische Arsenverbindung NaAsO_2 . Um ursächliche Erkenntnis über die potentiell veränderten Signalwege der DDR zu gewinnen, befasst sich das abschließende Ziel dieser Arbeit mit dem strukturellen Einfluss des genannten Metalloids auf die RING-Domäne von BRCA1.

Zur Identifizierung der Beteiligung von BRCA1 auf die genannten Fragestellungen, wird eine Zelllinie verwendet, die eine natürliche Mutation im *BRCA1*-Gen aufweist (UWB1.289). Vergleichende Untersuchungen erfolgen mit einem stabil transfizierten BRCA1-profizienten Pendant (UWB1.289 + BRCA1). Die Bestimmung eines geeigneten Konzentrationsbereiches der

NaAsO₂-Behandlung wird mit Hilfe von Zytotoxizitätsuntersuchungen durchgeführt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird ein gesonderter Fokus auf die DNA-Doppelstrangbruchreparatur (DSBR) gelegt. Hierzu gilt es für alle durchgeführten Experimente, neben der NaAsO₂-Inkubation, auch eine Exposition mit DSB-induzierender Röntgenstrahlung zu berücksichtigen. Um eine vergleichbare Arsenaufnahme in beiden Zelllinien zu gewährleisten, werden spektrometrische Analysen der intrazellulären Arsengehalte mittels GF-AAS durchgeführt. Mit Hilfe der Hochdurchsatz RT-qPCR sollen neben dem transkriptionellen Einfluss einer BRCA1-Defizienz auch substanzspezifische Veränderungen der Genexpression analysiert werden. Für ein tiefergehendes Verständnis der durch die Genexpressionsanalysen erhaltenen Ergebnisse und um die Veränderungen auf Transkriptionsebene zu verifizieren, werden Analysen auf funktioneller Ebene angeschlossen. Die Zellzyklusregulation nach Schädigung der DNA stellt dabei einen wichtigen Kontrollmechanismus der DDR dar. Um eine potentielle Beteiligung von BRCA1 an der Zellzyklusprogression nach DNA-Schädigung zu identifizieren, werden sowohl dosis- als auch zeitabhängige Analysen mittels Durchflusszytometrie angeschlossen. Weiterhin werden die Assoziation und Dissoziation von BRCA1 sowie weiteren DNA-Reparaturproteinen der DSBR mittels IF-Färbung vergleichend untersucht. Abschließend sollen verschiedene Zelltodmechanismen unter Berücksichtigung des BRCA1-Statuses identifiziert werden.

Um eine potentielle Beeinflussung der BRCA1-vermittelten Signalwege innerhalb des komplexen Netzwerkes der DDR mit einer möglichen Konformationsänderung in Verbindung zu bringen, werden ergänzende subzelluläre Struktur- sowie Bindungsanalysen mittels SRCD- und UV/Vis-Spektroskopie durchgeführt. Dafür soll zunächst die stabile Strukturdomäne der ersten 110 AS von BRCA1 mittels bakterieller Proteinexpression rekombinant hergestellt werden. In nachgeschalteten Analysen wird ein integraler Teil dieser Domäne, der isolierte Ringfinger (AS 22 – 77), in Form eines synthetischen Peptides untersucht.

Zusammenfassend sollen die Analysen dazu beitragen, den Einfluss von BRCA1 in der DDR einzuordnen und gleichzeitig eine mögliche Beeinflussung des Proteins durch das toxische Halbmetall Arsen zu identifizieren. Mit Hilfe dieser Ergebnisse kann abschließend eine Aussage über die Auswirkungen einer BRCA1-Defizienz sowie einer zusätzlichen Arsen-Exposition auf die genomische Stabilität einer Zelle abgeleitet und so ein wichtiger Beitrag im Verständnis des kanzerogenen Wirkmechanismus von Arsen geleistet werden.

4 MATERIAL UND METHODEN

Im folgenden Abschnitt werden die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Materialien und Methoden beschrieben. Eine Auflistung der eingesetzten Lösungen sowie Puffer, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte befindet sich in Anhang 8.2.

4.1 ZELLKULTUREXPERIMENTE IN HUMANEN ZELLINIEN

Zu Beginn werden die methodischen Grundlagen der Zellkulturexperimente dargestellt, die in humanen Zelllinien durchgeführt wurden.

4.1.1 ZELLKULTUR

Vor Verwendung in der Zellkultur wurden die Lösungen und Puffer sterilfiltriert und die eingesetzten Verbrauchsmaterialien hitzeautoklaviert oder mit Heißluft sterilisiert. Zum Schutz vor Kontaminationen wurden alle Arbeiten mit lebenden Zellen in einer Reinraumwerkbank mit vertikaler Strömung (*Laminar Flow*) gemäß DIN EN 12469 durchgeführt (Thermo Electron LED GmbH; Safety Cabinet Type KS 18).

4.1.1.1 ZELLINIEN

Bei der Durchführung der folgenden Experimente wurden die Zelllinien UWB1.289 (ATCC® CRL-2945™) und UWB1.289 + BRCA1 (ATCC® CRL-2946™) verwendet. Beide Zelllinien sind adhärente Zellen, die als *Monolayer* wachsen.

Die humanen UWB1.289-Zellen stammen aus einem papillär-serösen Ovarialkarzinom einer Frau. Die Patientin entwickelte im Alter von 42 Jahren Brustkrebs, erkrankte mit 54 Jahren an Eierstockkrebs und verstarb im Alter von 56 Jahren. Die UWB1.289-Zelllinie weist eine *BRCA1*-Mutation 2594delC innerhalb des Exons 11 auf, die eine Keimbahnmutation darstellt. Die 2594delC-Mutation führt zu einem Stopp beim Codon 845 von *BRCA1*, wodurch das vollständige Ablesen des Gens verhindert wird. Die Zellen sind demnach mit einer Deletion des Wildtyp-*BRCA1*-Allels behaftet. Die Zellen zeigen einen komplexen, fast tetraploiden Karyotyp, in welchem zwei Kopien des Chromosoms 17 mit dem mutierten *BRCA1*-Allel vorliegen. Mit Ausnahme von Chromosom 22 zeigen alle Chromosomen der UWB1.289-Zellen strukturelle Anomalien auf. Darüber hinaus weisen die Zellen eine somatische *Frameshift*-Mutation (625delAG) innerhalb des Exons 6 von *p53* auf und sind Estrogen- und Proestrogenrezeptor negativ. Die UWB1.289-Zelllinie ist sensitiv gegenüber IR (DELLORusso *et al.*, 2007; ATCC, 2019A).

Zur Entwicklung einer *BRCA1*-profizienten Zelllinie wurde ein pcDNA3-Plasmid, das die cDNA des Wildtyps von *BRCA1* trägt, stabil in die UWB1.289-Zellen transfiziert. Die dabei entstandenen

und in dieser Arbeit verwendeten UWB1.289+BRCA1-Zellen sind in der Lage, das funktionsfähige Protein BRCA1 zu exprimieren, wodurch die DNA-Schadensantwort teilweise wiederhergestellt werden konnte. Aufgrund der gentechnischen Veränderung der Zellen dient das Antibiotikum Geneticin (G-418) als Selektionsreagenz. Beide Zelllinien wurden kommerziell erworben (DELLORUSSO *et al.*, 2007; ATCC, 2019B).

4.1.1.2 KULTIVIERUNGSBEDINGUNGEN DER ZELLEN

Als Nährmedium wurde für die beiden Zelllinien ein Gemisch aus 50 % *Roswell Park Memorial Institut* (RPMI)-1640 und 50 % *Mammary Epithelial Growth Medium* (MEGM) verwendet. Dem Zellkulturmedium wurden 3 % fetales Kälberserum (FKS) und 100 U/mL Penicillin sowie 100 µg/mL Streptomycin zugesetzt. Für die Kultivierung der UWB1.289+BRCA1-Zellen wurden jeweils 200 µg/mL G-418 als Selektionsreagenz zugegeben. Die Kultivierungsbedingungen im Brutschrank betragen 37 °C bei einer 5 %igen CO₂-Konzentration und 100 % Luftfeuchtigkeit.

Beide Zelllinien wurden alle sieben Tage zur Vermeidung einer Konfluenz subkultiviert. Zudem wurde alle vier Tage das Nährmedium zur Vorbeugung eines zellulären Nährstoffmangels erneuert. Zur Subkultivierung der Zelllinien wurden die verwendeten Lösungen zunächst auf 37 °C temperiert. Nach dem sorgfältigen Entfernen des Mediums wurden die Zellen zunächst mit phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Anschließend wurde mit einer 0,25 %igen Trypsinlösung für 30 sec behandelt und die Zellen für 4 min im Brutschrank inkubiert, sodass sich der Zellrasen durch das darauffolgende Resuspendieren mit frische, Nährmedium vollständig vom Boden des Zellkulturgefäßes ablöste und vereinzelt werden konnte. Nach Zellzahlbestimmung mittels CASY® *Cell Counter* konnten die Zellen in definierter Zellzahl für Zellkulturexperimente oder zur Subkultivierung verwendet werden.

4.1.1.3 KRYOKONSERVIERUNG UND INKULTURNAHME DER ZELLEN

Zur längerfristigen Lagerung der UWB1.289- und UWB1.289+BRCA1-Zelllinie wurden die Zellen bei möglichst niedriger Passagezahl kryokonserviert. Dafür wurde das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und die Zellen, wie oben beschrieben, trypsiniert. Aliquote von je 10⁶ Zellen wurden in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen gegeben und 3 min bei 1300 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 mL Einfrierlösung (FKS / 10 % DMSO) suspendiert und anschließend in ein Kryoröhrchen überführt. Mit Hilfe eines *Cryo 1 °C Coolers* konnte die Zellsuspension schrittweise auf -80 °C heruntergekühlt werden. Nach etwa 24 h wurde das Kryoröhrchen bis auf weiteres in Flüssigstickstoff (-196 °C) gelagert.

Für die Inkulturnahme der UWB1.289- und UWB1.289+BRCA1-Zellen wurde das tiefgefrorene Kryoröhrchen zunächst bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und unmittelbar in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen mit 9 mL vorgelegtem Medium überführt. Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 1.300 rpm wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen

und in eine sterile Zellkulturschale ausgestreut. Je nach Konfluenz erfolgte nach 4 - 6 Tagen die Subkultivierung der Zellen. Nach mindestens dreimaligem Passagieren wurden die Zellen für die Experimente eingesetzt.

4.1.1.4 BEHANDLUNGEN DER ZELLEN

Die Behandlungen der UWB1.289- und UWB1.289+BRCA1-Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase, 48 h nach Subkultivierung, durchgeführt. Vor jeder Behandlung wurden die Integrität und Konfluenz der Zellen lichtmikroskopisch überprüft. Zusätzlich zu den behandelten Proben wurde bei jedem Versuch eine nicht behandelte Kontrolle mitgeführt.

4.1.1.4.1 INKUBATION MIT NATRIUMARSENIT

Die Inkubationen der Zellen wurden mit Arsen in Form von Natriumarsenit (NaAsO_2) durchgeführt, wobei zunächst Stammlösungen (1 mM, 10 mM) mit ddH_2O angesetzt und anschließend sterilfiltriert wurden. Für die Behandlungen wurde das jeweilige Volumen der Stammlösungen berechnet und direkt in das Nährmedium pipettiert. Dabei nahmen die Endkonzentrationen, abhängig vom durchgeführten Experiment, Werte zwischen 1 μM und 10 μM an. Die Inkubationsdauer mit NaAsO_2 belief sich auf 26 h. Im Falle einer zusätzlichen Bestrahlung (siehe Kapitel 4.1.1.4.2) wurde eine Vorinkubationszeit von 18 h sowie eine Nachinkubationszeit zwischen 2 h und 24 h gewählt. Die Inkubationen erfolgten im Brutschrank bei den unter Kapitel 4.1.1.2 beschriebenen Bedingungen.

4.1.1.4.2 IONISIERENDE STRAHLUNG

Die in den Experimenten eingesetzte ionisierende Strahlung (IR) diente der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und wurde technisch erzeugt. Hierfür fand das Röntgengerät *Cell-Rad* der Firma Faxitron Anwendung. Die Proben wurden bei 130 kV und 4,5 mA mit einer Dosis von 1 Gy bestrahlt und im Anschluss abhängig von der gewählten Nachinkubationszeit weiter kultiviert.

4.1.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR ZYTOTOXIZITÄT

Um die Zytotoxizität von NaAsO_2 , IR sowie der Kombinationsbehandlung zu beurteilen, wurden Versuche zur Zellzahlbestimmung durchgeführt. Als weiterer Parameter zur Analyse der Zellviabilität wurde der ATP-Gehalt gemessen und zur Beurteilung herangezogen.

Die Analysen zur Zytotoxizität wurden in Zusammenarbeit mit Frau Hatice Yasemin Seren sowie Frau Sandra Stößer im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeiten durchgeführt.

4.1.2.1 LEBENDZELLZAHL

Die akut zytotoxische Wirkung der drei unterschiedlichen Behandlungsvarianten wurde mittels der Lebendzellzahl bestimmt. Dafür wurden zunächst je Zellkulturschale (\varnothing 60 mm)

0,3 x 10⁶ UWB1.289-Zellen bzw. 0,25 x 10⁶ UWB1.289+BRCA1-Zellen ausgestreut und unter den zuvor beschriebenen Wachstumsbedingungen für 48 h kultiviert. Im Anschluss wurde mit der Testsubstanz für 26 h inkubiert oder für 18 h vorinkubiert, bestrahlt und 8 h nachinkubiert (siehe Abschnitt 4.1.1.4.1 und 4.1.1.4.2). Jede Behandlung wurde in Doppelbestimmung durchgeführt sowie eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Im Anschluss an die entsprechende Behandlung wurden die Zellen, wie unter 4.1.1.2 beschrieben, abgelöst, in frischem Medium aufgenommen und die Zellzahl mittels CASY® *Cell Counter* bestimmt.

4.1.2.2 ATP-GEHALT

Eine weitere Methode zur Bestimmung der akut zytotoxischen Wirkung der unterschiedlichen Behandlungen stellt der sogenannte ATP-Assay dar. Mit Hilfe dieses Assays kann der zelluläre ATP-Gehalt ermittelt werden, welcher in direkter Korrelation mit der Zellviabilität steht.

Der Assay wurde in weißwandigen 96-Well Platten mit transparentem Boden angesetzt. Zu Beginn wurden pro Kavität 1 x 10⁴ UWB1.289- bzw. 0,75 x 10⁴ UWB1.289+BRCA1-Zellen ausgestreut und 48 h kultiviert. Die darauffolgenden Behandlungen erfolgten wie unter Abschnitt 4.1.1.4.1 und 4.1.1.4.2 beschrieben. Die gewählten Arsenitkonzentrationen betragen 1 µM, 5 µM und 10 µM, wobei für die zusätzlich bestrahlten Proben eine Nachinkubationszeit von 8 h gewählt wurde. Nach Ablauf der entsprechenden Behandlungszeit wurde das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Multikanalpipette 100 µL frisches Kulturmedium je Kavität hinzugegeben. Zusätzlich wurde reines Zellkulturmedium als Blindwert mitgeführt. Im Anschluss wurden 100 µL temperiertes *CellTiter-Glo*®-Reagenz in jede Kavität gegeben und eine Äquilibrationszeit von 30 min bei RT im Dunkeln eingehalten. Das zugesetzte Reagenz lysierte die Zellen, wodurch das intrazelluläre ATP freigesetzt werden konnte. Zur Gewährleistung einer guten Durchmischung wurde die Platte vor jeder Messung 2 min orbital geschüttelt und nach einer 10-minütigen Ruhephase die Photonenemission bei 562 nm bestimmt. Die Messung der Biolumineszenz fand im Mikotiterplattenlesegerät *Tecan Infinite*® 200 Pro in Dreifachbestimmung statt. Der gemessene Wert wurde durch die mittlere Hintergrundlumineszenz des Mediums korrigiert.

4.1.3 ZELLULÄRE AUFNAHME MITTELS

GRAPHITROHR-ATOMABSORPTIONSSPEKTROMETRIE

Zur Quantifizierung des intrazellulären Arsengehaltes in UWB1.289 und UWB1.289+BRCA1-Zellen wurde die Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie (GF-AAS) angewandt. Zu Beginn wurden 1 x 10⁶ UWB1.289 bzw. 0,8 x 10⁶ UWB1.289+BRCA1-Zellen in Ø 10 cm Zellkulturschalen ausgestreut und für 48 h kultiviert. Die Inkubation mit NaAsO₂ erfolgte, wie in Abschnitt 4.1.1.4.1 beschrieben, für 18 h. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen trypsiniert und in kalter Abbruchlösung (PBS/10 % FKS) aufgenommen und vereinzelt. Die nachfolgenden Schritte

wurden auf Eis durchgeführt. Die erhaltene Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend durch 5-minütige Zentrifugation (1250 rpm, 4 °C) pelletiert. Im Anschluss wurde das Pellet zweimal mit PBS gewaschen, dazwischen unter den genannten Bedingungen erneut zentrifugiert und anschließend in kaltem PBS aufgenommen. Zuletzt erfolgte die Ermittlung der Zellzahl sowie des mittleren Zellvolumens mit Hilfe des CASY® *Cell Counters*, bevor die Zellen mittels Zentrifugation erneut pelletiert wurden.

Zur Messung des zellulären Arsengehaltes mittels GF-AAS wurden die aufgearbeiteten Zellpellets einem sauren Aufschluss unterzogen. Dafür wurden 500 µL einer 1:1 Mischung aus 30 %igem H₂O₂ und 69 %iger HNO₃ zu den Proben gegeben und in einem Heizschüttler bis zur Trockene eingedampft. Dabei wurde bei 65 °C mit dem Erhitzen begonnen und anschließend die Temperatur stündlich um 10 °C bis zu einer Temperatur von 95 °C erhöht. Der verbleibende Rückstand wurde in 1 mL 0,2%iger HNO₃ aufgenommen und nach gründlichem Vortexen mittels GF-AAS analysiert. Zusätzlich zu den Proben wurde ein Aufschluss-Blindwert mitgeführt, um mögliche Kontaminationen der Aufschlusslösung auszuschließen bzw. zu berücksichtigen.

Nach erfolgreichem Aufschluss der Zellen konnte die zelluläre Gesamtaufnahme mittels GF-AAS analysiert werden. Dazu wurden 20 µL Probelösung mit 5 µL Palladium/Magnesium-*Modifier* (1 g/L Pd(NO₃)₂ und 0,6 g/L Mg(NO₃)₂ in 0,2 % iger HNO₃) mittels Autosampler pipettiert und mit einem spezifischen Temperaturprogramm analysiert (siehe Tabelle 1). Durch Verwendung eines *Matrix-Modifiers* wurde eine verlustfreie Pyrolyse der Matrix ermöglicht, da der Analyt so in höherflüchtige Formen überführt werden konnte.

Tabelle 1: Temperaturprogramm der GF-AAS zur Arsenbestimmung.

	Temperatur [°C]	Aufheizzeit [s]	Haltezeit [s]	Argonstrom [mL/min]
Trocknung 1	110	1	30	250
Trocknung 2	130	15	30	250
Pyrolyse	1200	10	20	250
Atomisierung	2000	0	5	0
Ausheizen	2450	1	3	250

Zu Beginn jeder Messung wurde eine Kalibrierung mit einem Arsenstandard im Bereich von 0-10 µg/L in 0,2 %iger HNO₃ analysiert. Zusätzlich wurden externe Standards sowie Blindwert zur Überprüfung der Methode gemessen. Durch die Bestimmung der Zellzahlen sowie der mittleren Zellvolumina konnte die intrazelluläre Konzentration an Arsen berechnet werden. Als Emissionsquelle wurde eine elementspezifische elektrodenlosen Entladungslampe (EDL) bei der Wellenlänge von 193,7 nm verwendet.

4.1.4 GENEXPRESSIONSANALYSEN MITTELS *HIGH-THROUGHPUT RT-QPCR*

Um die Wirkung der unterschiedlichen Behandlungen auf das Genexpressionsmuster zu untersuchen, wurde eine im Arbeitskreis bereits etablierte *HT RT-qPCR* (*high-throughput reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*) durchgeführt. Bei der angewandten Methode ließen sich Aussagen über Expression und Aktivität von insgesamt 95 Genen in 96 Proben treffen (FISCHER *et al.*, 2016). Die dabei ausgewählten Gene spielen bei der Zellzyklusregulation und -proliferation, der oxidativen Stressantwort, den Signalwegen der Apoptose sowie der DNA-Schadensantwort und -Reparatur eine entscheidende Rolle. Eine vollständige Auflistung der untersuchten Gene befindet sich in Anhang 8.2.6.

Für die Versuche wurden zunächst je 4×10^5 Zellen in Zellkulturschalen (\varnothing 60 mm) ausgestreut und für 48 h kultiviert. Im Anschluss erfolgte die entsprechende Behandlung, wobei Arsenitkonzentrationen von 1 μ M, 5 μ M und 10 μ M gewählt wurden und eine Nachinkubationszeit von 8 h eingehalten wurde (siehe Abschnitt 4.1.1.4.1 und 4.1.1.4.2). Nach Ablauf der entsprechenden Behandlungszeit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen trypsiniert und in 3 mL 10 % FKS in PBS aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und durch Zentrifugation pelletiert (3 min, 1.300 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 1 mL PBS resuspendiert und zur erneuten Zentrifugation, unter denselben Bedingungen, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

4.1.4.1 RNA-ISOLIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG

Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe des *NucleoSpin® RNA Plus* Kits von Macherey-Nagel, wobei alle nachfolgenden Arbeitsschritte höchst sterile Arbeitsbedingungen erforderten. Dafür wurden alle Arbeitsflächen entweder mit Ethanol oder speziellen Reinigungslösungen (*DNA Away*, *RNase Away*) desinfiziert und Verbrauchsmaterialien zuvor autoklaviert. Die folgende Aufarbeitung wurde auf Eis durchgeführt.

Das Zellpellet wurde zunächst in 350 μ L Lysepuffer (LBP) resuspendiert, gevortext und anschließend auf eine *gDNA Removal* Säule überführt, um die genomische DNA (gDNA) zu entfernen. Nach Zentrifugation (30 s, 11.000 g) befand sich die RNA im Eluat, wohingegen die gDNA auf der Säule verblieb und verworfen wurde. Dem Eluat wurden 100 μ L *Bindung Solution* (BS) zugesetzt und moderat durch Resuspendieren gemischt. Das gesamte Lysat wurde anschließend auf eine weitere Säule gegeben und erneut zentrifugiert (20 s, 11.000 g). Dabei erfolgte die Bindung der RNA an die Säule und die Abtrennung von störenden Bestandteilen. Anschließend folgten zwei Waschschriffe, wobei zunächst 200 μ L Waschpuffer 1 (WB1) zugegeben und erneut zentrifugiert (20 s, 11.000 g) wurde. Der Durchgang wurde verworfen und

die Säule in ein neues Auffanggefäß gegeben. Im Anschluss folgte der zweite Waschschrift mit 600 µL Waschpuffer 2 (WB2) unter denselben Zentrifugationsbedingungen. Es wurden nochmals 250 µL WB2 zugegeben und erneut zentrifugiert (2 min, 11000 g). Der Durchgang wurde wiederholt verworfen und die Säule in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die auf der Säule vorhandene RNA mit 30 µL RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation (1 min, 11.000 g) eluiert. Zur Steigerung der RNA-Ausbeute wurde das RNA-haltige Eluat erneut auf die Säule gegeben und wieder zentrifugiert. Die extrahierte RNA wurde maximal zwei Wochen bei -80 °C gelagert.

Vor der cDNA (*complementary DNA*) -Synthese erfolgte die Quantifizierung des RNA-Gehaltes durch Messung der Absorption an einem Spektralphotometer (*Tecan Ininifite@200 Pro*) bei 260 nm. Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm gemessen und der Absorptionsquotient von 260/280 nm berechnet, wodurch die Reinheit der RNA bestimmt werden konnte. Jede Probe musste einen Quotienten von $\geq 2,0$ aufweisen, um eine ausreichende Reinheit zu gewährleisten. Zur Messung der entsprechenden Absorption wurden 2 µL Probenmaterial auf eine NanoQuant-Platte™ pipettiert und mittels Photometer in Doppelbestimmung gemessen.

4.1.4.2 cDNA-SYNTHESE

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte mittels *qScript cDNA Synthese* Kit. Dafür wurden je Reaktionsansatz 1 µg RNA mit je 5 µL des Mastermixes (1 µL *iScript Reverse Transcriptase* + 4 µL *Reaction Mix* (5x)) versetzt und mit nukleasefreiem Wasser auf 20 µL ergänzt, gevortext und anschließend zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Umschreibung im *Thermocycler* nach folgendem Temperaturprogramm:

Tabelle 2: Temperaturprogramm der cDNA-Synthese.

5 min	25 °C
30 min	42 °C
5 min	85 °C
Endtemperatur	4 °C

Das Umschreiben der RNA in cDNA erfolgte in Doppelbestimmung. Die erhaltene cDNA wurde bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

4.1.4.3 PRÄAMPLIFIKATION

Die Präamplifikation (*specific target amplification*, STA) dient der Vervielfältigung der jeweiligen Zielgene (*templates*). Die Probenvorbereitung sowie die folgenden Arbeitsschritte wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden zunächst die Primer in einem PCR-Cap *gepooled* und mit DNA-Suspensionspuffer auf eine Endkonzentration von 500 nM (*Pooled Primer Mix*) verdünnt. Die angesetzte Stammlösung des *Pooled Primer Mix* war bei -20 °C lagerungsfähig. Ein 5 µL Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 3: Reaktionsansatz der Präamplifikation.

<i>2x TaqMan PreAmp Master Mix</i>	2,50 µL
<i>Pooled Primer Mix</i>	0,50 µL
PCR zertifiziertes Wasser	0,75 µL
cDNA-Probe	1,25 µL

Zusätzlich zu den Proben wurden eine Wasserkontrolle ohne *template* (NTC-STA) und eine nicht umgeschriebene RNA-Kontrolle (NoRT) mitgeführt. Anschließend wurden die Proben gründlich durchmischt und zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die STA im *Thermocycler* entsprechend folgendem Temperaturprogramm:

Tabelle 4: Temperaturprogramm der Präamplifikation.

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

Im Anschluss an die Präamplifikation wurde ein Exonuklease I Verdau durchgeführt, wodurch ungebundene Primer sowie überschüssige Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) entfernt wurden und ein *Carry-Over*-Effekt minimiert wurde. Hierfür wurden 0,4 µL Exonuklease I (Exo I, 20 units/µL), 0,2 µL 10x Exonuklease I Reaktionspuffer und 1,4 µL PCR zertifiziertes Wasser zugegeben, um eine Arbeitskonzentration von 4 *units*/µL zu erhalten. Anschließend wurden 2 µL dieses Reaktionsgemisches zu den jeweiligen STA-Proben gegeben. Nach gründlicher Durchmischung und Zentrifugation erfolgte der Verdau nach folgendem Temperaturprogramm:

Tabelle 5: Temperaturprogramm des Exonuklease I Verdau.

Verdau	40 min	37 °C
Inaktivierung	15 min	80 °C
Endtemperatur		4 °C

Die STA und Exonuklease I behandelten Proben wurden im Anschluss mit TE-Puffer 5-fach verdünnt und bei -20 °C für maximal zwei Tage aufbewahrt.

4.1.4.4 PRIMER- UND PROBENVORBEREITUNG

Im nächsten Arbeitsschritt wurden die *forward* und *reverse* Primerpaare (100 µM) auf eine Arbeitskonzentration von 5 µM verdünnt, indem 2,5 µL jedes Primerpaares, 25 µL *2x Assay Loading Reagent* und 22,5 µL DNA Suspensionspuffer zugegeben wurden. Zusätzlich wurde eine *No Reaction Control* (NRC) mitgeführt, bei der das Primerpaar durch PCR zertifiziertes Wasser ersetzt wurde. Die Reaktionsgemische der Primerpaare wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Probenvorbereitung wurden je 2,25 μL der STA und Exonuklease I behandelten Proben mit 2,5 μL 2x *SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low ROX* und 0,25 μL 20x *DNA Sample Loading Reagent* versetzt, gemischt und anschließend zentrifugiert. Zudem wurde eine nicht präamplifizierte Wasserkontrolle ohne *template* (NTC) mitgeführt.

4.1.4.5 96x96 DYNAMIC ARRAY IFC QPCR ANALYSE

Die Vorbereitung und Beladung des 96 x 96 *dynamic array IFC (integrated fluidic circuit)* von Fluidigm erfolgte nach Herstellerangaben. Vor der eigentlichen Beladung des Chips wurde zunächst ein *Priming* durchgeführt. Dazu wurden die Akkumulatoren des *dynamic array* zunächst mit 150 μL *Control Line Fluid* mit Hilfe einer Spritze befüllt und anschließend die Schutzfolie am Boden des Chips entfernt. Der Chip wurde in den *IFC Controller HX* geladen und das *Prime* (136x) Programm gestartet, wodurch das Fluid in die Mikrokanäle des Chips geleitet wurde. Im Anschluss erfolgte die Beladung des Chips durch Pipettieren der einzelnen Proben- und Primer-Reaktionsgemische (Abbildung 11).

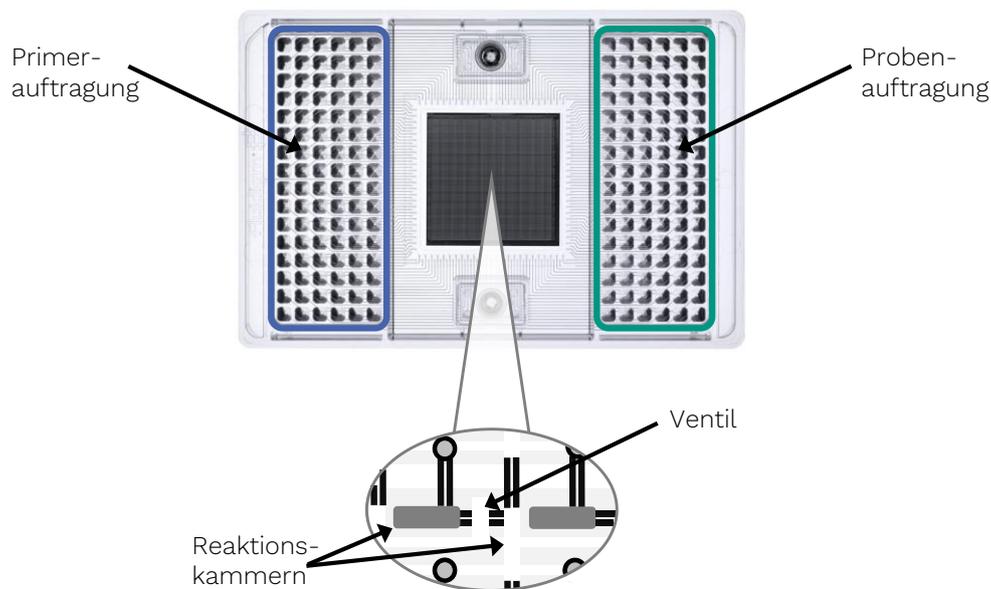


Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines Fluidigm 96 x 96 *Dynamic arrays IFC (integrated fluidic circuit)*. In die Kavitäten rechts werden 96 zu analysierende Proben und links 95 Primer-Paare sowie eine *no reaction control* (NRC) pipettiert. In jeder der 9216 Reaktionskammern wird jeweils eine Probe mit einem Primer-Paar kombiniert. Die Reaktionskammern sind mit ventilsteuerten Kanälen verbunden.

Dieser Arbeitsschritt musste innerhalb von 2 h durchgeführt werden, um einen Druckabfall im Chip zu vermeiden. Dazu wurden je 5 μL der Proben- und Primer-Reaktionsgemische möglichst luftblasenfrei in die entsprechenden Kavitäten pipettiert (Abbildung 11). Das Durchmischen der Proben und Primer in den 9216 Reaktionskammern erfolgte erneut im *IFC Controller HX* mittels *Load Mix* (136x) Programm. Nach der Beladung des Chips wurden anhaftende Staubpartikel auf dessen Oberfläche mit Klebestreifen entfernt. Der Chip wurde anschließend in das BioMark™

System überführt. Die qPCR sowie die Schmelzkurvenanalyse wurden entsprechend folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

Tabelle 6: Temperaturprogramm der qPCR und der Schmelzkurvenanalyse.

thermale Durchmischung	2400 s		70 °C
thermale Durchmischung	30 s		60 °C
<i>Hot Start</i>	60 s		95 °C
Denaturierung	5 s	(30x)	96 °C
Annealing und Elongation	20 s	(30x)	60 °C
Schmelzkurvenanalyse	3 s		60 °C
Temperaturerhöhung	1 °C / 3 s		95 °C

4.1.4.6 DATENANALYSE UND DARSTELLUNG

Die Auswertung und Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Software *Fluidigm Real-Time PCR Analysis*. Dabei wurde zunächst die gleichmäßige Beladung aller PCR-Reaktionskammern durch den passiven Referenzfarbstoff ROX überprüft. Die C_q -Werte (*cycle of quantification*) der jeweiligen Zielamplifikate wurden in allen Reaktionskammern mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff *EvaGreen®* ermittelt. Dabei ist das erhaltene Fluoreszenzsignal proportional zur Amplifikatmenge. Für eine Präzisierung der C_q -Werte wurde die in der Software enthaltene Schwellenwert-Methode (*auto detectors*) zur Korrektur der Basislinien eingesetzt.

Mit Hilfe einer *Heat Map* wurden die Daten zunächst übersichtlich dargestellt. Die Visualisierung als *Heat Map* ermöglichte einen generellen Überblick sowie eine Überprüfung von eventuellen Beladungsproblemen. Die Gene wurden hierbei als Spalten und die Proben als Reihen angezeigt, die C_q -Werte wurden anhand einer Farbskalierung dargestellt. Kleine C_q -Werte wurden in hellen Farben wie gelb oder rot abgebildet, während hohe C_q -Werte in dunklen Farben wie violett und blau sichtbar gemacht wurden. Zusätzlich konnten auch die Negativkontrollen NoRT, NTC, NTC-STA und NRC einer optischen Überprüfung unterzogen werden.

Zudem wurden die resultierenden Schmelzkurven angezeigt, wodurch die Spezifität der PCR-Reaktionen überprüft werden konnte. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Daten der *Heat Map* exportiert und mittels der *GenEx* Software bearbeitet. Dabei wurden über die integrierten Programm-Tools *geNorm* und *NormFinder* die geeigneten Referenzgene selektiert. Mit Hilfe dieser Tools wurden sowohl die optimale Anzahl als auch die am besten geeigneten Referenzgene identifiziert. Für die Normalisierung standen die fünf Referenzgene *ACTB*, *BSM*, *GAPDH*, *GUSB* und *HPRT1* zur Verfügung.

Als Maß für die Quantifizierung wurde der C_q -Wert herangezogen. Er entspricht der Anzahl an PCR Zyklen, die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau (*threshold*), das sich signifikant vom Hintergrund unterscheidet, zu erreichen. Die Expressionsunterschiede wurden

anschließend auf der Grundlage dieser C_q -Werte mit Hilfe der sogenannten $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Methode berechnet (LIVAK UND SCHMITTGEN, 2001). Dabei wurde zunächst der C_q -Wert des Referenzgens vom C_q -Wert des zu untersuchenden Gens innerhalb einer Probe subtrahiert (Gleichung 1). Im Anschluss wurde die Differenz aus dem ΔC_q -Wert der Kontrolle und dem ΔC_q -Wert der Behandlung gebildet (Gleichung 2). Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle (Ratio), normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, ergab sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta C_q}$ (Gleichung 3).

$$\Delta C_q = C_q \text{ Zielgen} - C_q \text{ Referenzgen} \quad (\text{Gleichung 1})$$

$$\Delta\Delta C_q = \Delta C_q \text{ Behandlung} - \Delta C_q \text{ Kontrolle} \quad (\text{Gleichung 2})$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_q} \quad (\text{Gleichung 3})$$

Der Mittelwert der in Doppelbestimmung durchgeführten Umschreibung jeder Probe wurde berechnet und mit dem Wert der zugehörigen Kontrolle, deren relative Genexpression auf eins normiert wurde, ins Verhältnis gesetzt. Die Vereinigung der drei unabhängigen Versuche sowie die graphische Darstellung erfolgten mit dem MS-Office-Programm Excel.

4.1.5 ZELLYKLUSPHASENVERTEILUNG UND ZELLTODMECHANISMEN MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die Bestimmung der Zellzyklusphasenverteilung sowie der Zelltodmechanismen erfolgten in einem Ansatz. Beide Untersuchungen wurden mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzfärbung durchgeführt. Die Zellzyklusphasenverteilung wurde dabei mit Hilfe des DNA-interkalierenden Farbstoffs DAPI gemessen, während für die Untersuchungen der Zelltodmechanismen die Fluoreszenzfarbstoffe Annexin V als Fluorescein-Isothiocyant-Konjugat (Annexin V-FITC) sowie Propidiumiodid (PI) eingesetzt wurden.

Für die Versuche wurden zunächst $3,5 \times 10^5$ UWB1.289- sowie UWB1.289+BRCA1-Zellen in Zellkulturschalen (\varnothing 60 mm) ausgestreut und für 48 kultiviert. Die Zellen wurden, wie unter Kapitel 4.1.1.4.1 und 4.1.1.4.2 beschrieben, entsprechend mit $1 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$ NaAsO_2 behandelt, bestrahlt und eine Nachinkubationszeit von 8 h eingehalten. Neben den üblichen Behandlungen wurden zudem Zeitreihen von 24 h bis 96 h der Arsenitbehandlung, der Bestrahlung sowie der Kombinationsbehandlung aufgenommen. Zusätzlich zur unbehandelten Negativkontrolle wurden zwei Positivkontrollen mitgeführt. Dabei wurde zur Kontrolle der Apoptose 24 h mit jeweils 500 nM Staurosporin (STS) inkubiert, während die Überprüfung der Nekrose sowie späten Apoptose mittels Cadmiumchlorid (CdCl_2) für 3 h durchgeführt wurde.

Nach Abbruch der entsprechenden Behandlungszeit wurde das Medium abgenommen und in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt, sodass neben den lebenden Zellen auch tote miterfasst werden können. Die an der Zellkulturschale anhaftenden Zellen wurden zunächst mit

PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert, wobei sowohl die Waschlösung als auch die Trypsinlösung ebenfalls in das Röhrchen überführt wurden. Im Anschluss wurden die Zellen in frischem Kulturmedium vereinzelt und die Zellsuspension erneut überführt. Nachfolgend wurden die Zellen bei 1300 rpm und 4 °C für 4 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das erhaltene Zellpellet in 2 mL PBS resuspendiert. Je 1 mL dieser Zellsuspension wurde in ein Durchflusszytometerröhrchen überführt, sodass je ein Ansatz für die Untersuchung der Zellzyklusphasenverteilung sowie der Bestimmung der Zelltodmechanismen zur Verfügung stand.

4.1.5.1 ZELLYKLUSPHASENVERTEILUNG

Zur Untersuchung der Zellzyklusphasenverteilung wurden die Zellen zunächst tropfenweise mit 3 mL 96 %igem Ethanol (-20 °C) Vortex-gemischt und über Nacht bei -20 °C fixiert. Anschließend wurden die Proben bei 4.000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen, mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Proben mit 650 µL DAPI-Lösung versetzt und für 30 min unter Lichtausschluss auf Eis inkubiert.

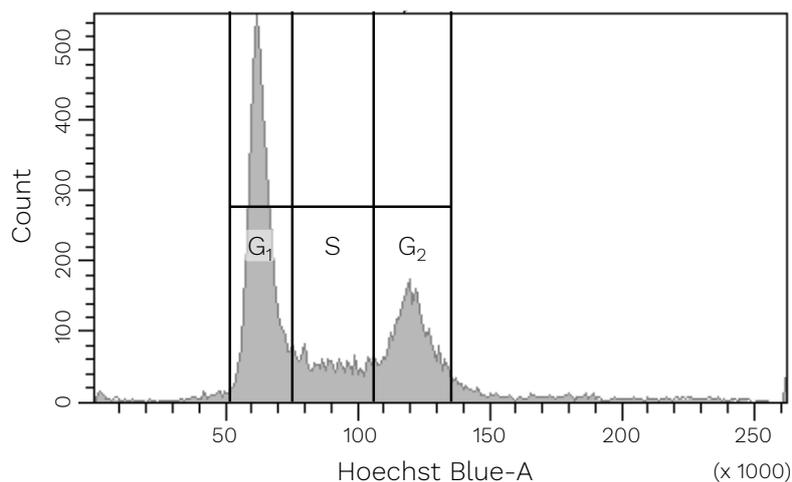


Abbildung 12: Exemplarisches Histogramm einer *Gating*-Strategie zur Ermittlung der Zellzyklusphasenverteilung nach Messung am BD LSRFortessa.

Hierbei wird die Fluoreszenzintensität (Emissionswellenlänge des DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) -Signals gleich der des Farbstoffes Hoechst Blue A) gegen die gemessene Zellzahl (*count*) aufgetragen. Die DNA wird durch Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI angefärbt. Anhand der unterschiedlichen Intensität des DAPI-Signals erfolgt die Einteilung der G_1 -, S- und G_2 -Phase.

Die Messung des DAPI-Signals erfolgte anschließend mit Hilfe des Durchflusszytometers BD LSRII Fortessa. Hierfür wurden 30.000 Events gemessen, wobei eine maximale Fließgeschwindigkeit der Zellen von 700 Events/sec eingehalten wurde. Der DNA-interkalierende Farbstoff DAPI wurde mit Hilfe eines violetten Lasers bei einer Exzitation von 405 nm und einem Bandpassfilter von 450/50 nm gemessen. Die Anzahl der Zellen (*counts*) wurde in einem Histogramm über das DAPI-Signal aufgetragen. Zur Setzung der entsprechenden *Gates* für die einzelnen Zellzyklusphasen wurde sich an der G_1 -Phase orientiert. Da sich der doppelte DNA-

Gehalt in der G₂/M-Phase im Vergleich zur G₁-Phase befindet, wurde das Gate für die G₂/M-Phase auf das doppelte Signal der G₁-Phase gesetzt. Eine beispielhafte *Gating*-Strategie für die Ermittlung der Zellzyklusphasenverteilung ist in Abbildung 12 dargestellt.

4.1.5.2 ZELLTODMECHANISMEN

Zur Bestimmung der Zelltodmechanismen wurde die in Kapitel 4.1.5 erhaltene Zellsuspension für 4 min bei 1.300 rpm und 4 °C zentrifugiert und anschließend der Überstand abgenommen. Es wurde ein Mastermix für alle Proben aus je 200 µL Ringerlösung, 0,25 µL PI (62,5 ng/mL) und 1 µL Annexin V-FITC (450 ng/mL) angesetzt. Mittels Annexin V, gekoppelt mit dem Fluorochrom FITC, lassen sich apoptotische Zellen am Durchflusszytometer erfassen. Der Farbstoff PI hilft zusätzlich bei der Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen. Apoptotische Zellen weisen demnach ein Annexin V-FITC-Signal, nekrotische sowie spät-apoptotische Zellen ein Annexin V-FITC- und PI-Signal und vitale Zellen kein Fluoreszenzsignal auf (Abbildung 13).

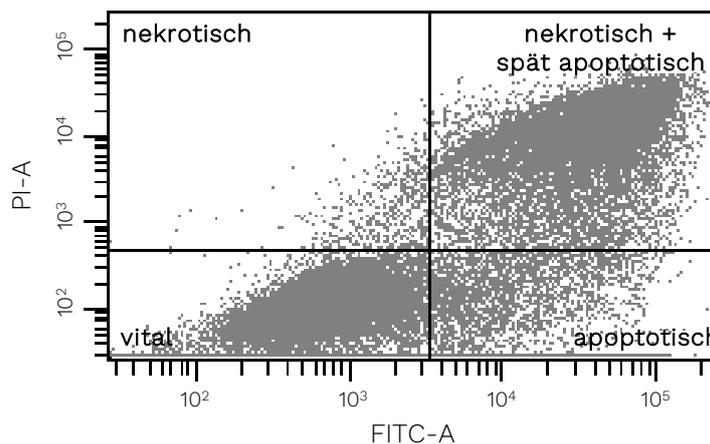


Abbildung 13: Exemplarisches Histogramm einer *Gating*-Strategie zur Ermittlung der Zelltodmechanismen nach Messung am BD LSRFortessa.

Hierbei wird die Fläche des FITC (Fluoresceinisothiocyanat) -Signals gegen die Fläche des PI (Propidiumiodid) -Signals aufgetragen. Vitale Zellen sind dabei PI und FITC negativ, da die Farbstoffe die intakte Zellmembran nicht passieren können (links unten). Apoptotische Zellen wiederum sind FITC positiv und PI negativ. Die Translokation des Phosphatidylserins an die Zelloberfläche apoptotischer Zellen führt zum positiven FITC Signal, gleichzeitig kann PI die Zellmembran jedoch nicht passieren (rechts unten). Zellen, die sich in der Nekrose und späten Apoptose befinden, sind FITC und PI positiv (rechts oben). Nekrotische Zellen wiederum sind FITC negativ, jedoch PI positiv (links oben).

Jede Probe wurde mit 200 µL Mastermix versetzt und anschließend für 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die Messungen zur Untersuchung der Zelltodmechanismen erfolgten ebenfalls am Durchflusszytometers BD LRSII Fortessa. Hierfür wurden 30.000 Events bei einer maximalen Fließgeschwindigkeit von 800 Events/sec gemessen. Um eine Überlagerung der Absorptionsspektren von FITC und PI zu vermeiden, wurde zunächst eine Kompensation durchgeführt. Das Signal von FITC wurde mit Hilfe des blauen Lasers mit einer Exzitation von 488 nm und einem Bandpassfilter von 530/30 nm aufgenommen. Für das PI-Signal wurde ebenfalls der blaue

Laser, aber ein Bandpassfilter von 695/40 nm eingesetzt. Zur Unterscheidung zwischen den Populationen vital, apoptotisch, nekrotisch sowie spät-apoptotisch und nekrotisch wurde das FITC-Signal gegen das PI-Signal aufgetragen und nach Abbildung 13 die *Gates* gesetzt.

4.1.6 NACHWEIS VON DNA-REPARATURPROTEINEN MITTELS IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG

Zur indirekten Untersuchung von DNA-DSB in UWB1.289- und UWB1.289 + BRCA1-Zellen wurde die Immunfluoreszenz (IF) -Färbung eingesetzt. Dabei kann die Rekrutierung spezifischer DNA-Reparaturproteine an den Schaden sowie deren Dissoziation verfolgt werden.

Die Analysen zum Nachweis dieser DNA-Reparaturproteine wurden in Zusammenarbeit mit Frau Hatice Yasemin Seren im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt.

Zu Beginn wurden pro Zellkulturschale (Ø 35 mm) 8×10^4 Zellen auf zwei Deckgläschen (Ø 12 mm) ausgestreut, kultiviert und, wie in Abschnitt 4.1.1.4.1 und 4.1.1.4.2 beschrieben, mit Arsenitkonzentrationen von $1 \mu\text{M}$ und $5 \mu\text{M}$ behandelt und teilweise mit 1 Gy bestrahlt. Als Nachinkubationszeiten wurden 2 h, 4 h, 8 h und 24 h gewählt.

Nach Ablauf der spezifischen Nachinkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von 3,7 %igem Formaldehyd in PBS auf den Deckgläschen fixiert. Nach 10-minütiger Fixierung bei RT wurde das Formaldehyd abgenommen und die Zellen dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurde im Anschluss 0,2 %iges Triton X-100 in PBS zugegeben und für 5 Minuten im Kühlschrank belassen. Nach Ablauf der Zeit wurden die fixierten und permeabilisierten Zellen erneut dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend folgte die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ mit Hilfe von 2 %igem BSA (Bovines Serumalbumin) in PBS.

Für die nachfolgende IF-Färbung wurden spezifische Antikörper für ausgewählte Proteine der DNA-Doppelstrangbruchreparatur sowie für das Zentromerprotein F (CENP-F), das zur Markierung der Zellzyklusphase eingesetzt werden kann, verwendet. Die Primärantikörper wurden zunächst in 2 %igem BSA in PBS verdünnt, wobei die entsprechenden Antikörper, deren Verdünnungen sowie Angaben zum Hersteller Tabelle 7 zu entnehmen sind. Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte bei Raumtemperatur für 1 h in einer feuchten Kammer. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Deckgläschen dreimal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen und anschließend die Inkubation mit den Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern ebenfalls bei Raumtemperatur für 1 h in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die gewählten Sekundärantikörper, deren Verdünnungen sowie die Herstellerangaben sind ebenfalls Tabelle 7 zu entnehmen. Im Anschluss wurde erneut dreimal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen und die Deckgläschen auf einem Objektträger (7,6 x 2,6 cm) mit *Vectashield Mounting Medium with 4',6-*

Diamidin-2-phenylindol (DAPI) fixiert und luftdicht versiegelt. DAPI ist dabei ein DNA-interkalierender Farbstoff, der den Zellkern markiert und ihn mikroskopisch sichtbar macht.

Tabelle 7: Übersicht der Primär- und Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz-Färbung.

Antikörper	Wirt	Art des Antikörpers	Verdünnung	Hersteller/Label
Anti-53BP1	<i>mouse</i>	primär	1:5000	Merck Millipore MAB3802
Anti-53BP1	<i>mouse</i>	primär	1:100	Santa Cruz sc-515841 (E-10)
Anti-BRCA1	<i>mouse</i>	primär	1:5000	Abcam ab16780
Anti-CENP-F	<i>mouse</i>	primär	1:250	Santa Cruz sc-135865 (11)
Anti-CENP-F	<i>mouse</i>	primär	1:1000	Invitrogen MA1-23185
Anti-CENP-F	<i>rabbit</i>	primär	1:1000	Abcam ab5
Anti-DNA-PKcs Phospho (Thr2609)	<i>mouse</i>	primär	1:1000	Biolegend 612902
Anti-p21	<i>rabbit</i>	primär	1:400	Cell Signaling 2947
Anti-phospho-p53 (Ser15)	<i>rabbit</i>	primär	1:1000	Cell Signaling 9284
Anti-Rad51	<i>rabbit</i>	primär	1:5000	Abcam ab63801
Anti-Rad54	<i>mouse</i>	primär	1:1000	Santa Cruz sc-374598 (F-11)
Anti-mouse Alexa Fluor™ 488-conjugated	<i>goat</i>	sekundär	1:500	Invitrogen A-11001
Anti-rabbit Cy™3-conjugated	<i>goat</i>	sekundär	1:500	Jackson 111-165-003

Die fixierten Deckgläschen wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Objektiv 63x) ausgewertet, wobei je Deckgläschen 40 Zellen der G₂-Phase zur Foci-Bestimmung herangezogen wurden. Die ermittelte Anzahl der Foci des nicht bestrahlten und unbehandelten Versuchsansatzes wurde von der Anzahl der auftretenden Foci des bestrahlten Versuchsansatzes subtrahiert.

4.2 ZELLKULTUREXPERIMENTE IN BAKTERIELLEN TESTSYSTEMEN

Neben den humanen Zellkulturexperimenten wurden auch Zellkulturexperimente in bakteriellen Testsystemen durchgeführt. Die Anzucht der Bakterien sowie die sterilen mikro- und molekularbiologischen Arbeiten wurden stets unter einer Reinraumwerkbank oder an der Flamme durchgeführt. Dabei wurden die verwendeten Medien, Puffer und Stammlösungen zuvor hitzeautoklaviert oder sterilfiltriert. Zudem wurden die eingesetzten Verbrauchsmaterialien sowie Glasgefäße heißluftsterilisiert.

4.2.1 BAKTERIENKULTUR

Die verwendeten *Escherichia coli* (*E.coli*)- Stämme wurden bei 37 °C in LB (*lysogeny broth*) - Medium kultiviert. Sowohl der Klonierungs- wie auch der Expressionsstamm besaßen eine Ampicillin-Resistenzgen, weshalb dem Medium in jedem Arbeitsschritt das Antibiotikum in einer Endkonzentration von 100 µg/mL zugesetzt wurde.

Die Zelldichte der Bakterienkultur wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm mittels Photometer bestimmt. Hierfür wurden jeweils 100 µL Bakterienlösung der entsprechenden Probe entnommen und mit 900 µL LB-Medium gemischt, wodurch ein Sättigungseffekt bei den Absorptionsmessungen durch die zeitlich ansteigende Zelldichte vermieden werden konnte. Im Anschluss an die photometrische Messung wurden die Proben für 2 min bei 12.000 rpm zentrifugiert und die gewonnenen Zellpellets anschließend mittels SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) analysiert.

4.2.2 HETEROLOGE PROTEINEXPRESSION

Für die heterologe Proteinexpression wurde ein Plasmid mit den Nukleotidsequenzen der ersten 304 Aminosäuren (AS 1 – 304) von BRCA1 verwendet. Das Plasmid war eine Gabe von Rachel Klevit und wurde von der Firma *Addgene* vermarktet (Addgene plasmid #12645; <http://n2t.net/addgene:12645>; RRID: Addgene_12645). Bei dem Vektor des Plasmids handelte es sich um einen pET151D topo Vektor mit einem T7-Promotor-System. Neben den genannten Nukleotidsequenzen von BRCA1 war zudem ein N-terminaler Hexa-Histidin-*Tag* (*His-Tag*) sowie eine TEV-Proteaseschnittstelle in der Sequenz vorhanden. Der *His-Tag* wurde dabei zur späteren Proteinaufreinigung benötigt, während die TEV-Proteaseschnittstelle die Entfernung des *His-Tags* für nachfolgende Untersuchungen ermöglichte. Analog zu einem klassischen Expressionsvektor waren zudem ein bakterieller Replikationsursprung (ORI) sowie ein Selektionsmarker mit einem Ampicillin-Resistenzgen enthalten (BRZOVIC *et al.*, 2006).

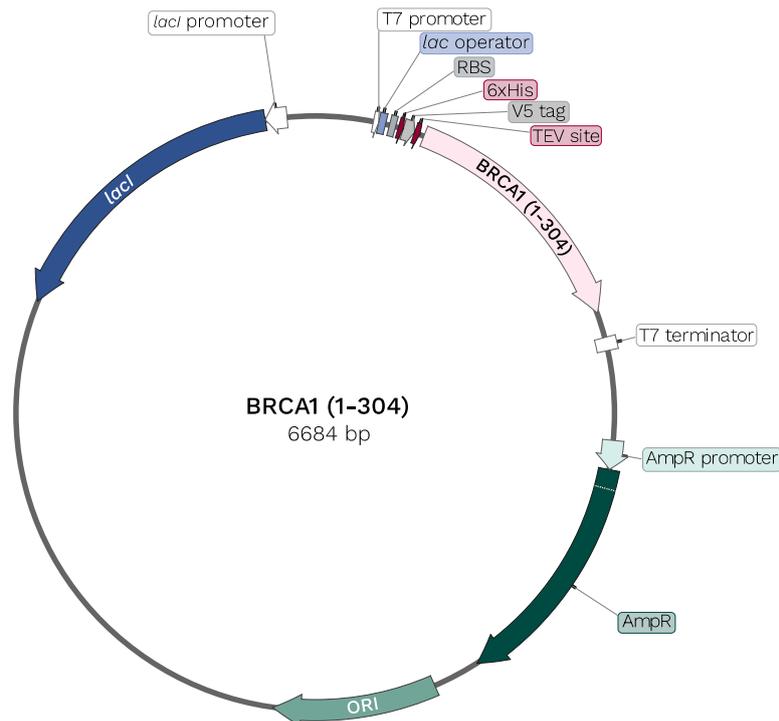


Abbildung 14: Aufbau des eingesetzten Plasmidvektors BRCA1 (1-304) (Addgene #12645).

Der pET-Plasmidvektor enthält unmittelbar vor der für das Zielgen (BRCA1) codierenden Sequenz zusätzlich Sequenzen für einen Hexa-Histidin-*Tag* (6 x His) sowie für eine TEV-Proteaseschnittstelle (TEV *site*). Zudem weist der Vektor Nukleotidsequenzen für das T7-Promotor-System (*LacI*-Repressor (*lacI*), *lacI*-Promotor, T7 Promotor, *lac*-Operator) auf. Des Weiteren besitzt das Plasmid den bakteriellen Replikationsursprung (ORI) sowie einen Selektionsmarker mit einem Ampicillin-Resistenzgen (AmpR) (Abbildung mit Hilfe der Software *SnapGene Viewer* erstellt).

4.2.2.1 AMPLIFIKATION UND LAGERUNG DES PLASMIDVEKTORS

Der Plasmidvektor wurde in Form transformierter Bakterien im *stab culture* Format erworben. Zur Isolierung und Verifizierung des Plasmids sowie zur Herstellung eines Glycerol-Stocks für die Stammhaltung wurde zunächst eine Kultur der *E.coli* DH5 α Bakterienzellen angezüchtet. Dazu wurden 5 mL LB-Medium mit Hilfe des *stabs* beimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln kultiviert. Anschließend wurde für die Langzeitlagerung ein Glycerol-Stock angesetzt. Hierzu wurden 500 μ L Glycerol in einem 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt, 500 μ L Bakterienlösung zugegeben, homogen vermischt und nachfolgend bei -80 °C gelagert.

Mit Hilfe des angesetzten Glycerol-Stocks konnten die Bakterienzellen jederzeit ausplattiert werden. Dazu wurde der Stock langsam auf Eis aufgetaut, eine Plastiköse in die Lösung getaucht und anschließend auf einer Agarplatte mit Ampicillin (100 μ g/mL) vorsichtig ausgestrichen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Bakterienmenge beim Ausstrich verdünnt wurde. Die Kultivierung fand über Nacht bei 30 °C statt, wobei die Agarplatte im Anschluss im Kühlschrank für mehrere Tage gelagert werden konnte.

4.2.2.2 ISOLIERUNG DER PLASMID-DNA

Zur Transformation in einen Expressionsstamm musste das Plasmid zunächst aus dem Klonierungsstamm DH5 α isoliert werden. Die Isolierung und Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mittels *E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit I* von Omega nach Herstellerangaben. Dazu wurden zunächst 5 mL LB-Medium mit einer einzelnen Kolonie der zuvor angesetzten Agarplatte beimpft und über Nacht bei 37 °C und 225 rpm kultiviert. Im Anschluss wurde die Bakterienlösung 1 min bei 4000 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dem Zellpellet wurden nachfolgend 250 μ L der Lösung I/RNase A zugegeben, resuspendiert und in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden 250 μ L Lösung II hinzugegeben und das Gefäß solange invertiert bis sich ein klares Lysat ausgebildet. Anschließend wurden 350 μ L Lösung III zugegeben und erneut vorsichtig invertiert bis ein flockiges, weißes Präzipitat sichtbar war. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 20.000 g wurde der klare Überstand auf eine *HiBind*® DNA-Mini Säule gegeben. Im Anschluss wurde erneut bei 20.000 g für 1 min zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Es wurden 500 μ L HBC-Puffer auf die Säule gegeben und wiederholt bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Auch nach der Zugabe von 700 μ L DNA-Waschpuffer wurde erneut zentrifugiert und der Waschschrift wiederholt. Dabei wurde nach jeder Zentrifugation das Filtrat verworfen. Zum Trocknen der Säule wurde diese nachfolgend für 2 min bei 20.000 g zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und die gebundene Plasmid-DNA mit 50 μ L sterilem bidestilliertem Wasser (ddH₂O) eluiert. Hierfür wurde zunächst 1 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, bevor erneut zentrifugiert wurde.

Eine Qualitätskontrolle sowie eine Quantifizierung der Plasmid-DNA erfolgte photometrisch mittels NanoDrop. Dazu wurde die DNA-Konzentration durch Messung der Absorption bei 260 nm ermittelt. Zur Überprüfung der DNA auf Verunreinigungen mit Proteinen, Zuckern, Salzen und Phenole, wurden zudem die Absorptionen bei 280 nm und 230 nm bestimmt. Sofern die Reinheit der Plasmid-DNA ein Verhältnis von 1,8 – 2,0 bei 260/280 nm und \geq 2,0 bei 260/230 nm aufzeigte, genügte sie den Anforderungen für Folgeexperimente. Die aufgereinigte Plasmid-DNA erfüllte diese Kriterien und wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 C gelagert.

4.2.2.3 SEQUENZIERUNG DER PLASMID-DNA

Zur Bestimmung und Überprüfung der Basensequenz der Plasmid-DNA wurde eine DNA-Sequenzierung des isolierten Plasmids, nach der Methode von SANGER *et al.*, 1977, durchgeführt. Als Sequenzierprimer wurden ein T7 *promotor, forward primer* mit der Sequenz TAATACGACTCACTATAGGG sowie ein T7 *terminator, reverse primer* mit der Sequenz GCTAGTTATTGCTCAGCGG verwendet. Dabei wurde zwei Ansätze mit je 5 μ L Plasmid und 5 μ L T7 *terminator primer* bzw. 5 μ L T7 *promotor primer* hergestellt. Die Sequenzierung erfolgte durch die GATC-Biotech AG (Konstanz).

4.2.2.4 MUTAGENESE

Mit Hilfe des *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* wurde eine Modifikation des Plasmidvektors vorgenommen. Dieses Kit ermöglicht eine ortsspezifische Mutagenese im Plasmid, um Punktmutationen zu setzen, AS zu ersetzen oder mehrere benachbarte AS zu entfernen. Die Grundlage dieses Verfahrens beruht auf der Verwendung eines *supercoiled* doppelsträngigen DNA-Vektors, der das spezielle *Insert* trägt, sowie zwei synthetischen Oligonukleotid-Primern, die die gewünschte Mutation enthalten. Die eingesetzten Primer sind dabei jeweils komplementär zu den entgegengesetzten Strängen des Vektors und werden während der Temperaturzyklen durch die PfuUltra *high fidelity* (HF) DNA-Polymerase verlängert. Die Verlängerung des Primers erzeugt ein mutiertes Plasmid, das gestaffelte Einzelstrangbrüche („*Nicks*“) enthält. Im Anschluss an die Temperaturzyklen wird das Produkt mit Dpn I behandelt. Die Dpn I-Endonuklease ist dabei spezifisch für methylierte und hemimethylierte DNA und wird zum Verdau des parentalen DNA-Templates und zur Selektion der mutationshaltigen synthetisierten DNA verwendet. Abschließend wird der modifizierte Vektor in *XL1-Blue* superkompetente Zellen transformiert (AGILENT TECHNOLOGIES, 2015).

Vor Beginn der Mutagenese mussten zunächst die entsprechenden Primer designt werden. Dies wurde von Frau Stefanie Vollmer, Mitarbeiterin des Instituts für Organische Chemie (IOC) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Anne S. Ulrich, durchgeführt. Ziel der Mutagenese war die Verkürzung der finalen BRCA1 AS-Sequenz, was durch den Einbau eines Stop-Codons (TAA) nach AS 110 (FAKK) bewerkstelligt wurde. Die hierfür designten Primer enthielten folgende Sequenzen: FAKKStop+: CAG CTA TAA TTT TGC AAA AAA GTA AGA AAA TAA CTC TCC TGA ACA TC sowie FAKKStop-: GAT GTT CAG GAG AGT TAT TTT CTT ACT TTT TTG CAA AAT TAT AGC TG.

Zur Synthese des Mutantenstrangs wurde ein Ansatz aus 25 μL hergestellt. Dafür wurden 0,5 μL des zuvor isolierten BRCA1-Plasmids, 10,25 μL ddH₂O, 2,5 μL *reaction buffer*, 2 μL Dimethylsulfoxid (DMSO), 0,5 μL dNTPs (Nukleosidtriphosphate), 4,34 μL FAKKStop+ -Primer (1 pmol/ μL), 4,31 μL FAKKStop- -Primer (1 pmol/ μL) mit 0,5 μL PfuUltra HF DNA-Polymerase gemischt. Anschließend wurde die Lösung Vortex-gemischt, zentrifugiert und die PCR unter dem in Tabelle 8 dargestellten Temperaturprogramm durchgeführt.

Tabelle 8: Temperaturprogramm der PCR zur Mutagenese.

Initiale Denaturierung	30 s		95 °C
Denaturierung	30 s	(18x)	95 °C
Annealing	60 s	(18x)	55 °C
Elongation	6:40 min	(18x)	68 °C
Abkühlen	∞		4 °C

Im Anschluss an die Mutagenesereaktion wurde der Dpn I-Verdau des Amplifikationsproduktes vorbereitet. Dazu wurden 0,7 μL Dpn I zur Amplifikationsreaktion hinzu pipettiert, die Lösung auf dem Orbitalschüttler gemischt, zentrifugiert und anschließend 1 h bei 37 °C im Wasserbad zum Abverdau der parentalen DNA inkubiert. Nachfolgend wurde das modifizierte Plasmid nach Herstellerangaben in superkompetente *XL1 blue*-Zellen mittels Hitzeschock transformiert, auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausgestrichen und auf eine erfolgreiche Mutagenese überprüft (AGILENT TECHNOLOGIES, 2015). Die zuletzt genannten Arbeitsschritte wurden ebenfalls von Frau Stefanie Vollmer durchgeführt.

Nach einer erfolgreichen Testexpression wurde das modifizierte BRCA1-Plasmid, analog zu Abschnitt 4.2.2.2, isoliert. Das entsprechende Plasmid mit der verkürzten Sequenz wurde für die Transformation in einen Expressionsstamm mit anschließender Proteinexpression verwendet.

4.2.2.5 TRANSFORMATION DURCH HITZESCHOCK

Bevor die Überexpression der im Plasmidvektor klonierten Gene stattfinden kann, muss die isolierte Plasmid-DNA zunächst in einen Expressionsstamm transformiert werden. Dabei handelt es sich um einen genetisch veränderten Bakterienstamm, der im Chromosom eine Kopie des Gens der T7 RNA-Polymerase trägt. Diese Polymerase des Phagen T7 ist hoch selektiv für seinen eigenen Promotor und kommt natürlicherweise nicht in *E.coli* vor (STUDIER UND MOFFATT, 1986).

Der isolierte Plasmidvektor wurde hierfür mit Hilfe einer Hitzetransformation in *E.coli* BL21 (DE3) eingebracht. Dazu wurden die zuvor bei -80 °C gelagerten Bakterienzellen sowie das bei -20 °C gelagerte isolierte Plasmid zunächst langsam auf Eis aufgetaut. Im Anschluss wurden 1 μL Plasmid (~80 ng) zu 5 μL Bakterienlösung gegeben und kurz zentrifugiert. Das Gemisch wurde 5 min auf Eis gestellt, dann für genau 30 sec bei 42 °C im Wasserbad erwärmt und zuletzt erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde mit 200 μL LB-Medium resuspendiert und auf einer Agarplatte mit Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht bis zur sichtbaren Koloniebildung. Die Agarplatte konnte für mehrere Tage im Kühlschrank gelagert und zur Anzucht neuer Bakterienkulturen verwendet werden. Zusätzlich wurde analog zum Abschnitt 4.2.2.1 ein Glycerol-Stock der transformierten *E.coli* BL21 (DE3) zur Stammhaltung angesetzt.

4.2.2.6 PROTEINEXPRESSION UND ZELLERNTTE

Vor der Proteinexpression im großen Maßstab wurde zunächst eine Vorkultur angesetzt. Dafür wurden 25 mL LB-Medium in einem 100 mL Erlenmeyerkolben mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37 °C und 225 rpm im Inkubationsschüttler. Anschließend konnte die Hauptkultur (8 x 500 mL jeweils in 2 L Erlenmeyerkolben) mit Hilfe der Vorkultur auf eine Zelldichte von $\text{OD}_{600} = 0,1$ angeimpft werden.

Die Kultivierung wurde erneut bei 37 °C und 225 rpm im Inkubationsschüttler durchgeführt. Im Anschluss erfolgte eine stündliche Messung der optischen Dichte. Bei einem OD₆₀₀-Wert von 0,5 wurde die Expression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG initiiert. Die Expressionsdauer betrug etwa 20 h und wurde durch Zentrifugation bei 6.000 rpm für 20 min und 4 °C beendet.

4.2.2.7 ZELLYSE MITTELS ULTRASCHALL

Im Anschluss an die Zellernte wurden die *E.coli*-Zellen lysiert, wobei alle nachfolgenden Schritte auf Eis durchgeführt wurden. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschallbehandlung, welche auch als Sonifikation bezeichnet wird. Hierfür wurde das bei der Zellernte erhaltene Zellpellet zunächst in 10-30 mL Imidazol-haltigem *Binding Buffer* resuspendiert. Vor der eigentlichen Lyse wurden pro 10 mL Aufschlussvolumen zusätzlich jeweils 100 µL der Proteaseinhibitoren Benzamidin (478,8 mM), Pefabloc (20 mM) und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (100 mM) zugegeben. Außerdem wurden ungefähr 0,6 µL Benzonase pro 10 mL Aufschlussvolumen sowie eine Spatelspitze Lysozym hinzugefügt. Der Aufschluss wurde auf einem Vortex® vermischt und anschließend für etwa 15 min auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurde die Aufschluslösung im 3-minütigen Intervall bei einer Leistung von 67 % unter intensiver Eiskühlung sonifiziert. Durch die dabei auftretenden Kavitations- und Scherkräfte wurden die Zellen lysiert. Zur Abtrennung der Zelltrümmerfraktion wurde die Aufschluslösung anschließend für 20 min bei 6.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Auch die Trennung der Membran- und Cytoplasmafraktion konnte durch Zentrifugation erreicht werden, wobei das zuvor entstandene überstehende Lysat hierbei für 1 h bei 40.000 rpm und 4 °C ultrazentrifugiert wurde. Für die anschließende Proteinaufreinigung wurden die Zelltrümmer- und Membranfraktion mit Imidazol-haltigem *Binding Buffer* und 2 % zugesetztem NLS (N-Lauroylsarcosin Natriumsalz) durch mehrere Ultraschallzyklen im 2-minütigen Intervall bei einer Leistung von 90 % solubilisiert. Die Cytoplasmafraktion hingegen wurde nur mit *Binding Buffer* versetzt und resuspendiert. Alle drei Fraktionen wurden über Nacht inkubiert, wobei die Zelltrümmer- und Membranfraktion zusätzlich geschüttelt wurde.

4.2.2.8 PROTEINAUFREINIGUNG MITTELS AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Zur Aufreinigung des rekombinant exprimierten Proteins wurde die etablierte Methode der Nickelaffinitätschromatographie (IMAC, *immobilized metal ion affinity chromatography*) angewandt. Die IMAC wurde mit Hilfe einer FPLC (*fast protein liquid chromatography*) -Anlage durchgeführt. Dabei wurde mit einer konstanten Flussrate von 5 mL/min, bei einem maximalen Druck von 5 bar sowie einer Temperatur von 20 °C gearbeitet. Der Chromatographieverlauf wurde als Funktion des Retentionsvolumens durch die UV-Absorption bei 280 nm detektiert. Als Puffersystem wurde der zuvor bereits verwendete Imidazol-haltige *Binding Buffer* (50 mM Imidazol) sowie ein Imidazol-haltiger *Elution Buffer* (500 mM Imidazol) eingesetzt. Die verwendeten Puffer wurden zuvor filtriert, entgast und für die Aufreinigung der Zelltrümmer-

und Membranfraktion zusätzlich mit 0,1 % NLS versetzt. Zur Proteinaufreinigung wurden zwei hintereinander geschaltete HisTrap HP-Chromatographiesäulen mit einem Säulenvolumen von 5 mL eingesetzt, wobei die Säulen vor jeder Aufreinigung gereinigt wurde. Die Auftragung der solubilisierten Fraktionen erfolgte über eine Probenschleife auf die Chromatographiesäule. Die Äquilibrierung wurde mit dem 5-fachen Säulenvolumen durchgeführt, wobei für den Waschschrift das 10-fache Säulenvolumen genutzt wurde. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde im Anschluss durch photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm am NanoDrop ermittelt. Das Molekulargewicht sowie der Extinktionskoeffizient wurden aus der AS-Sequenz mit dem Tool *ProtParam* von *ExPaSy* berechnet.

4.2.3 SODIUMDODECYLSULFAT-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE

Die SDS-PAGE dient der Überprüfung der Genexpression, der Zellyse sowie der Proteinaufreinigung mittels IMAC. Die Methode beruht auf der Wanderung geladener Teilchen im elektrophoretischen Feld. Dabei werden die Proteine in dem denaturierenden Detergens SDS solubilisiert, wobei die Eigenladung der Proteine durch die Anlagerung der anionischen Detergensmoleküle überdeckt wird. Dies ermöglicht die Auftrennung im elektrischen Feld ausschließlich nach Molekulargewicht (JANSOHN UND ROTHÄMEL, 2012).

Für die SDS-PAGE wurden ein 16 %iges Trenngel und ein 5 %iges Sammelgel (Zusammensetzung siehe Tabelle 18 und Tabelle 20 in Anhang 8.2.2) angesetzt. Für die Herstellung der Gele wurden die Komponenten des Trenn- und Sammelgels in zwei 50 mL Zentrifugenröhrchen vorgelegt und zuerst das Trenngel und im Anschluss das Sammelgel in einer Gelkammer auspolymerisiert. Um die Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine nachhaltig zu zerstören, wurde den Zellpellets SDS-Probenpuffer zugegeben und nach kräftigem Mischen für 10 min bei 95 °C auf dem Thermoschüttler erhitzt. Im Anschluss wurden die Proben für 5 min sonifiziert.

Die Gelelektrophoresekammer wurde mit Anodenpuffer sowie Kathodenpuffer bis zur Markierung befüllt. Die Geltaschen wurden im Anschluss mit 7 µL Probenmaterial sowie mit 4 µL eines Referenzmarkers befüllt, wobei der Marker als Standard zur späteren Molekulargewichtsbestimmung diente. Zur Vermeidung von übermäßiger Blasenbildung sowie zur besseren Fokussierung der Proteinbanden im Gel erfolgte die Auftrennung zunächst bei 15 mA für knapp 30 min und anschließend bei 30 mA bei einer konstanten Stromstärke. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel entweder für die Coomassie-Färbung fixiert oder für die Immunodetektion auf eine Trägermembran transferiert.

4.2.4 COOMASSIE-FÄRBUNG

Für die unspezifische Detektion der Proteinbanden wurde eine Färbung des SDS-Gels mit Hilfe des Coomassie Brilliantblau G250-Farbstoffes durchgeführt. Der Farbstoff bindet über elektrostatische Wechselwirkung an protonierte basische Aminosäuren (Lysin, Arginin und Histidin) und über hydrophobe Assoziationen an aromatische Reste. Er durchdringt dabei die Gelmatrix und bindet mit geringer Affinität, was einen Entfärbungsschritt erforderlich macht. Coomassie-Färbungen werden im Allgemeinen als Endpunkt-Färbung behandelt, wodurch eine zeitliche Flexibilität für Fixierungs- und Färbeschritte ermöglicht wird (STEINBERG, 2009).

Hierfür wurde das Gel zunächst mit Fixierlösung überschichtet und für 30 min auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde das fixierte Gel mit Färbelösung für 1 h oder über Nacht inkubiert. Zur Entfärbung des Hintergrundes wurde das Gel mit Entfärbelösung für 30 min gewaschen und anschließend dokumentiert.

4.2.5 WESTERN BLOT UND IMMUNODETEKTION

Für die spezifische Detektion der Proteine wurde das Verfahren des Western Blots mit anschließender Immunodetektion durchgeführt. Dabei werden die Proteine nach gelelektrophoretischer Trennung auf eine proteinbindende Trägermembran transferiert und im Anschluss durch geeignete Antikörper immunologisch detektiert. Das Standardverfahren im *Blotting* ist der elektrophoretische Transfer, bei dem die Proteine durch Anlegen einer Spannung aus dem Gel auf eine Membran überführt werden (JANSOHN UND ROTHMÄMEL, 2012).

Als Trägermembran wurde eine Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von 0,2 µm verwendet, an der sich die Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen verankern. Zunächst wurde das Trenngel vom Sammelgel gelöst und anschließend nur mit dem Trenngel weitergearbeitet. Zur Durchführung des elektrophoretischen Transfers wurde ein *Semi-Dry-Blot* eingesetzt. Dazu wurde ein Stapel aus Puffer-getränkten Filterpapieren, Nitrocellulosemembran und Polyacrylamidgel in der Mitte einer *Blotting*-Apparatur platziert. Es wurden zunächst 6 Lagen Filterpapier in Anodenpuffer I, anschließend 3 Lagen Filterpapier sowie die Nitrocellulosemembran und das Polyacrylamidgel in Anodenpuffer II und zuletzt 9 Lagen Filterpapier in Kathodenpuffer getränkt und in der aufgeführten Reihenfolge von der Anode zur Kathode geschichtet. Der elektrophoretische Blot erfolgte für 45 min bei einer konstanten Stromstärke von 150 mA. Im Anschluss wurden das Gel sowie die Filterpapiere entfernt und die Membran kurz an der Luft getrocknet.

Nach erfolgreichem Proteintransfer wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in Milchpulverlösung inkubiert, wodurch unspezifische Bindungsstellen auf der Membran blockiert wurden. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 min mit Puffer B gewaschen, bevor diese dann für 1 h bei RT mit dem Primärantikörper inkubiert wurde. Der für

die Immunodetektion eingesetzte Primärantikörper bindet dabei spezifisch an einen Hexa-Histidin-*Tag*. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Membran erneut dreimal für 5 min mit Puffer B gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 45 min bei RT auf dem Schüttler. Dabei wurde ein Sekundärantikörper eingesetzt, der eine alkalische Phosphatase gebunden hat. Dieses Enzym setzt das Substratsystem aus Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) und 5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat (BCIP) zu einem blauen unlöslichen NBT-Diformazan Endprodukt um (BLAKE *et al.*, 1984). Nach der Inkubation wurde die Membran erneut dreimal für 5 min mit Puffer B und im Anschluss zweimal für 10 min mit dem alkalischen Puffer C gewaschen. Abschließend erfolgte die Detektion mit der Färbelösung aus NBT und BICP, wobei die Farbreaktion durch einen Waschvorgang mit ddH₂O gestoppt wurde. Das bei der Farbreaktion entstandene Endprodukt ermöglichte die Detektion der Proteinbanden.

4.2.6 GELFILTRATION

Um die zuvor aufgereinigten Proben zu entsalzen, das im Elutionspuffer enthaltene Imidazol zu entfernen und einen schnellen Pufferaustausch zu gewährleisten, wurden PD-10 *Desalting Columns* von *GE Healthcare Bio-Sciences AB* eingesetzt. Dabei wird, durch die Verwendung eines *Sephadex G-25*-Harz als stationäre Phase, eine schnelle Trennung der hochmolekularen Substanzen von den niedermolekularen Substanzen ermöglicht. Diese Methode der Chromatographie beruht auf dem Prinzip der Gelfiltration, bei der Moleküle über eine wässrige mobile Phase durch eine poröse Gelmatrix nach ihrer Größe getrennt werden. So eluieren kleinere Moleküle zu einem späteren Zeitpunkt als große Moleküle, da sie in hydrophile Poren der Gelmatrix eindringen können (GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES AB, 2016).

Zu Beginn der Umpufferung wurde die Spitze der Säule abgeschnitten, die obere Kappe abgenommen und die enthaltene Flüssigkeit entfernt. Anschließend wurde die Säule mit 5 x 5 mL ddH₂O gewaschen und nachfolgend mit 5 x 5 mL Zielpuffer equilibriert. Im nächsten Schritt wurden 2,5 mL Proteinlösung auf die Säule gegeben und der Durchfluss verworfen. Im Anschluss erfolgte die Elution durch Zugabe von 10 x 1 mL Zielpuffer, wobei das Protein in den Fraktionen 1, 2 und 3 in hohen Konzentrationen zu finden war. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des NanoDrop durch Messung der Absorption bei 280 nm. Das Molekulargewicht sowie der Extinktionskoeffizient wurden aus der AS-Sequenz mit dem Tool *ProtParam* von *ExPaSy* berechnet.

4.3 SPEKTROSKOPISCHE METHODEN

Für die spektroskopischen Untersuchungen wurden zwei unterschiedliche BRCA1-Peptide der N-terminalen Domäne eingesetzt. Für die Circular dichroismus-Spektroskopie wurde das rekombinant gewonnene Peptid mit den AS 1 – 110 des BRCA1-Proteins sowie ein erworbenes,

mittels Festphasenpeptidsynthese hergestelltes BRCA1-Peptid mit den AS 22 – 77 verwendet. Die Sequenzen der beiden verwendeten Proteinfragmente sind in Tabelle 9 aufgeführt. Die UV/Vis-Spektroskopie wiederum wurde lediglich mit dem kürzeren Peptid durchgeführt.

4.3.1 SYNCHROTRON-CIRCULARDICHROISMUS-SPEKTROSKOPIE

Die Synchrotron-Circulardichroismus (SRCD) -Spektroskopie wird verwendet, um die globale Sekundärstruktur eines Proteins zu bestimmen. Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Effekt des Circulardichroismus, der bei Molekülen mit chiralen Zentren auftritt. Dabei wird zirkular polarisiertes Licht benötigt, das aus der Überlagerung zweier linear polarisierter, senkrecht zueinanderstehender Lichtwellen entsteht. Die Wellen besitzen die gleiche Amplitude, dieselbe Wellenlänge und eine Phasenverschiebung um $+90^\circ$ (rechts zirkular polarisiert) oder -90° (links zirkular polarisiert). Beim Durchgang durch eine chirale Probe wird links und rechts zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbiert, wodurch elliptisch polarisiertes Licht entsteht (Abbildung 15). Demnach wird die Differenz (ΔA) zwischen der Absorption von links zirkular polarisiertem Licht (A_L) und der Absorption von rechts zirkular polarisiertem Licht (A_R) gemessen. Dieses Phänomen wird als Circulardichroismus bezeichnet (KELLY *et al.*, 2005).

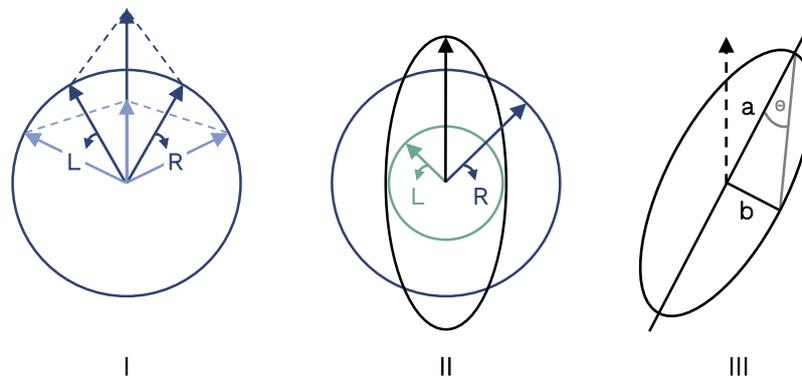


Abbildung 15: Prinzip des Circulardichroismus (CD).

(I) Weisen die links (L) und rechts (R) zirkular polarisierten Komponenten der elektromagnetischen Strahlung dieselbe Amplitude auf, ergibt sich bei deren Überlagerung wieder linear polarisiertes Licht. (II) Beim Durchgang durch eine chirale Probe, wie z.B. Proteinen, wird links (grün) und rechts (blau) zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbiert, wodurch elliptisch (schwarz) polarisiertes Licht entsteht. (III) Die dabei messbare Absorptionsdifferenz wird häufig als Elliptizität angegeben. Die große (a) und kleine (b) Halbachse der resultierenden Ellipse bilden ein rechtwinkliges Dreieck, in dem der Winkel (θ) gegenüber b die Elliptizität darstellt (modifiziert nach KELLY *et al.*, 2005; BEROVA *et al.*, 2000).

Analog zur Extinktion kann das Lambert-Beer'sche Gesetz auch auf den Circulardichroismus angewandt werden, wodurch bei bekannter Proteinkonzentration (c in $[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$) und optischer Schichtdicke der Küvette (d in $[\text{cm}]$) der molare Circulardichroismus ($\Delta \epsilon$ in $[\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$) berechnet werden kann (Gleichung 1) (WOODY, 1995).

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R = \frac{\Delta A}{c * d} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Das CD-Signal wird häufig als Elliptizität (θ in [deg]) angegeben. Die Elliptizität ist dabei über die Gleichung 2 definiert, wobei b die kleine und a die große Halbachse der resultierenden Ellipse darstellen (Abbildung 15) (KELLY *et al.*, 2005). In der Literatur wiederum wird häufig die molare Elliptizität ($[\theta]$ in [deg*cm²*dmol⁻¹]) angegeben, welche in Gleichung 3 aufgeführt ist (WOODY, 1995).

$$\theta = \tan^{-1}\left(\frac{b}{a}\right) = 32,98 * \Delta A \quad (\text{Gleichung 2})$$

$$[\theta] = \frac{\theta * 100}{c * d} \quad (\text{Gleichung 3})$$

Für Proteine wird häufig die molare Elliptizität $[\theta]$ auf die Anzahl der Peptidbindungen im Protein (n) bezogen. Unter zusätzlicher Berücksichtigung des Molekulargewichtes (M in [g*mol⁻¹]) sowie der Konzentration (c in [mg*mL⁻¹]) kann die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest (MRE, *mean residue molar ellipticity*) ($[\theta]_{\text{MRE}}$ in [deg*cm²*dmol⁻¹]) berechnet werden (Gleichung 4) (CORRÊA UND RAMOS, 2009).

$$[\theta]_{\text{MRE}} = \frac{\theta * 100 * M}{c * d * n} \quad (\text{Gleichung 4})$$

Zur Messung eines Moleküls mittels CD-Spektroskopie müssen zwei Bedingungen erfüllt sein. Zum einen muss die Probe optisch aktiv, also chiral sein, zum anderen muss die Probe in der Nähe des Chiralitätszentrums ein Chromophor besitzen. Proteine oder Peptide erfüllen diese Eigenschaften, da sie aufgrund ihrer Aminosäuren viele Chiralitätszentren besitzen sowie Chromophore in Form der Amid- oder Peptidbindungen aufweisen (WOODY, 1995). Das Amid-Chromophor der Peptidbindung dominiert das CD-Spektrum von Proteinen im fernen UV-Bereich (180 -240 nm), wobei die beiden elektronischen Übergänge π - π^* sowie n - π^* in diesem Bereich charakteristisch sind. Die nichtbindenden π -Elektronen der Amidbindung (π - π^* -Übergang; 190 – 200 nm) sowie die ungepaarten Elektronen des Sauerstoffatoms der Carbonylgruppe (n - π^* -Übergang; ~220 nm) werden hierbei jeweils in das antibindende π -Orbital (π^*) angeregt (FASMAN, 2013). Diese elektronischen Übergänge verursachen signifikante CD-Banden, die für die unterschiedlichen Sekundärelemente kennzeichnend sind. Das stärkste und charakteristischste Spektrum ist das einer α -Helix, welches zwei negative Banden mit vergleichbarer Intensität bei 222 nm (n - π^*) und 208 nm (π - π^*) sowie eine positive Bande bei 192 nm (π - π^*) aufweist. Peptide, die β -Faltblattstrukturen annehmen, zeigen ein weniger intensives und einfacheres CD-Spektrum mit einer negativen Bande bei 216 nm (n - π^*) sowie einer positiven Bande bei 197 nm (π - π^*). CD-Spektren ungeordneter (*random coil*) Proteine sind durch eine starke negative Bande bei 198 nm (n - π^*) charakterisiert. Auch β -Schleifen (β -*turns*) treten häufig in Konformationen auf, wobei jedoch kein spezifisches CD-Muster identifiziert werden konnte (CORRÊA UND RAMOS, 2009; WOODY, 1995).

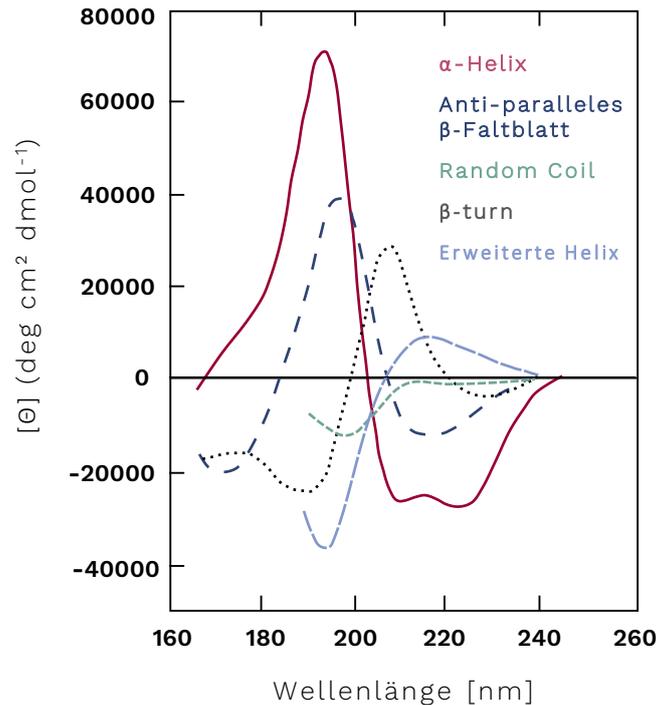


Abbildung 16: Fern-UV Circular Dichroismus (CD) -Spektren der verschiedenen Sekundärstrukturen.

Dargestellt sind Spektren einer klassischen α -Helix (rot) und eines β -Faltblatts (blau). Zudem sind Spektren einer ungeordneten Struktur (*random coil* – grün), eines β -turns (schwarz) sowie einer erweiterten Helix (hellblau) aufgezeigt. Zu beachten ist, dass insbesondere bei Proteinen mit β -Faltblattstrukturen eine hohe Variabilität der CD-Spektren besteht (modifiziert nach HOFFMANN *et al.*, 2016).

Die als Lichtquelle eingesetzte Synchrotronstrahlung hat, gegenüber den in Labor-CD-Spektrometern eingesetzte Xe-Hochdrucklampen, den Vorteil, dass sie einen etwa drei Größenordnungen intensiveren Photonenfluss unterhalb von 200 nm aufweist, wodurch das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert und der nutzbare Wellenlängenbereich bis 170 nm erweitert wird. Dies ermöglicht den Einsatz geringer Probenvolumina der wertvollen biologischen Proben und bewirkt gleichzeitig zusätzliche Strukturinformationen der erhaltenen Spektren. Des Weiteren sind Messungen in Anwesenheit von stark absorbierenden Matrices wie Salzen oder Detergenzien mittels SRCD möglich (BÜRCK *et al.*, 2015).

4.3.1.1 UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTURVERÄNDERUNG

Vom Institut für Beschleunigerphysik und Technologie (IBPT) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) wird die Synchrotronstrahlungsquelle KARA (Karlsruhe Research Accelerator) betrieben. Die SRCD-Messungen wurden am UV-CD12 Strahlrohr (*Beamline*) des Instituts für Biologische Grenzflächen (IBG-2) am KARA-Speicherring durchgeführt. Die untersuchten BRCA1-Peptide sowie die entsprechenden Sequenzen sind in Tabelle 9 dargestellt.

Während das umgepufferte, rekombinante Peptid direkt mit dem gewünschten Zielpuffer verdünnt werden konnte, musste das synthetische Peptid zunächst im reduzierenden Zielpuffer gelöst werden, um es im Anschluss auf die entsprechenden Arbeitskonzentrationen zu

verdünnen. Neben den Strukturuntersuchungen des jeweiligen Apo-peptides wurde zusätzlich der Einfluss unterschiedlicher Metallverbindungen auf die Struktur der BRCA1-Peptide analysiert. So wurde beim rekombinanten Peptid die Strukturveränderung nach Inkubation mit den Metallverbindungen Zinkchlorid (ZnCl₂), Natriumarsenit (NaAsO₂), Cobaltchlorid (CoCl₂) sowie Nickelchlorid (NiCl₂) untersucht. Die Strukturveränderungen des synthetischen Peptides wurden lediglich unter dem Einfluss von ZnCl₂, NaAsO₂ und CoCl₂ betrachtet.

Tabelle 9: Aminosäuresequenzen der zwei untersuchten BRCA1-Peptide.

Die ersten 33 Aminosäuren (AS) des rekombinanten Peptides stellen den Hexa-Histidin-*Tag*, den V5-*Tag* sowie die TEV-Proteaseschnittstelle dar. Bei den fett gedruckten Buchstaben handelt es sich um das BRCA1 AS 1 – 110 Fragment. Die rot dargestellten AS zeigen die BRCA1 Ringfinger-Domäne AS 22-77, welche ebenso die AS-Sequenz des synthetischen Peptides widerspiegeln.

Rekombinantes Peptid BRCA1 AS 1 - 110	M H H H H H H G K P I P N P L L G L D S T E N L Y F Q G I D P F T M D L S A L R V E E V Q N V I N A M Q K I L E C P I C L E L I K E P V S T K C D H I F C K F C M L K L L N Q K K G P S Q C P L C K N D I T K R S L Q E S T R F S Q L V E E L L K I I C A F Q L D T G L E Y A N S Y N F A K K
Synthetisches Peptid BRCA1 AS 22 - 77	L E C P I C L E L I K E P V S T K C D H I F C K F C M L K L L N Q K K G P S Q C P L C K N D I T K R S L Q E S T

Für die Strukturuntersuchungen des rekombinanten Peptides wurden abhängig von den gemessenen Proteinkonzentrationen die Metalllösungen als ihre entsprechenden molaren Äquivalente (me) angesetzt. Die Proteinkonzentration lag dabei im Bereich von 2 mg/mL (\cong 122 μ M). Die durch die Umpufferung erhaltenen Peptidlösungen wurden entweder mit dem Zielpuffer oder mit der entsprechenden Metalllösung versetzt und sorgfältig resuspendiert. Die Verdünnung wurde dabei für alle Untersuchungen im Verhältnis 111 angesetzt, wodurch eine Peptidendkonzentration von etwa 1 mg/mL resultierte. Demnach wurden beispielsweise 50 μ L 122 μ M Peptidlösung mit 50 μ L 61 μ M Metalllösung gemischt, um den Einfluss von 0,5 me der entsprechenden Metallverbindung zu untersuchen. Zur Messung der Probe wurde die Peptidlösung in eine Quarzglas-Küvette mit einer Schichtdicke von 100 μ m pipettiert.

Für die Strukturuntersuchungen des synthetischen Peptides wurden, analog zum rekombinanten Peptid, Peptidstammlösungen von 2 mg/mL (\cong 313 μ M) angesetzt. Diese wurden im Anschluss direkt mit dem entsprechenden Puffer im Verhältnis 111 verdünnt, sodass eine Endkonzentration des Peptides von 1 mg/mL erreicht wurde. Zur Untersuchung der Strukturveränderung nach Metallinkubation wurde dieselbe Peptidstammlösung eingesetzt und analog mit der entsprechenden Metalllösung verdünnt. Hierfür wurden ebenfalls Stammlösungen hergestellt, die als molare Äquivalente (me) der Peptidlösungen angesetzt wurden. Demnach wurden jeweils 20 μ L 313 μ M Peptidlösung mit 20 μ L Puffer- bzw. Metalllösung gemischt und gut resuspendiert. So wurden beispielsweise bei der Inkubation mit 2 me Metalllösung 20 μ L der 313 μ M Peptidlösung mit 20 μ L 626 μ M Metalllösung versetzt. Lediglich bei den konkurrierenden Bindungsuntersuchungen musste vom üblichen Verdünnungsschema abgewichen werden. Hierfür wurden 20 μ L 313 μ M Peptidlösung zunächst

mit 10 μL 4 me Zink- bzw. Arsenlösung abgesättigt und anschließend mit 10 μL 4 me bzw. 10 me Arsen- oder Zinklösung inkubiert. Abschließend wurden 30 μL Peptidlösung in eine Quarzglas-Küvette mit einer Schichtdicke von 100 μm pipettiert.

Die SRCD-Spektren wurden sowohl für das rekombinante als auch für das synthetische Peptid bei 25 °C in 0,5 nm-Intervallen im Bereich von 275 – 180 nm aufgenommen. Dabei wurden jeweils drei Messungen durchgeführt und diese anschließend gemittelt. Als Referenz wurde ein Spektrum der entsprechenden Pufferlösung aufgenommen und dieses vom Probenspektrum subtrahiert. Im Anschluss wurde die Basislinie im Wellenlängenbereich 263 – 258 nm auf null gesetzt und das Spektrum geglättet.

Zur quantitativen Auswertung wurde prinzipiell das prozessierte CD-Signal in die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest nach Gleichung 4 umgerechnet, wofür die zuvor mittels NanoDrop bestimmte (rekombinantes Peptid) oder mittels Einwaage berechnete (synthetisches Peptid) Proteinkonzentration eingesetzt wurde.

4.3.1.2 QUANTITATIVE AUSWERTUNG DER SEKUNDÄRSTRUKTUR

Um die fraktionalen Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturelemente in einem Protein zu bestimmen, muss das aufgenommene und prozessierte CD-Spektrum zunächst dekonvolutiert werden. Dabei wird grundsätzlich angenommen, dass das CD-Spektrum eines Proteins (Θ_λ) durch eine Linearkombination aus den Basisspektren der reinen Sekundärstrukturen dargestellt werden kann, plus ein „Rausch“-Term, der den Beitrag aromatischer Chromophore gemäß Gleichung 5 einschließt (GREENFIELD, 1996).

$$\Theta_\lambda = \sum F_i * S_{\lambda i} + \text{Rauschen} \quad (\text{Gleichung 5})$$

Dabei wird die Elliptizität des Proteins bei der Wellenlänge λ durch Θ_λ beschrieben. F_i stellt den fraktionalen Anteil des jeweiligen Sekundärstrukturelements i und $S_{\lambda i}$ die Elliptizität des Sekundärstrukturelements i bei der Wellenlänge λ dar. Die Summe der fraktionalen Anteile muss dabei eins ergeben $\sum F_i = 1$ (GREENFIELD, 1996). Die Basisspektren werden aus Referenzdatensätzen strukturell bekannter Proteine extrahiert. Der Gehalt der Sekundärstrukturelemente in den Referenzproteinen ist aus Strukturanalysen mit hochauflösenden Methoden wie der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) oder der Röntgenkristallographie genau bekannt. Durch die Messungen der entsprechenden CD-Referenzspektren lassen sich die Basisspektren für die verschiedenen Sekundärstrukturelemente mittels mathematischer Algorithmen berechnen. So stellt beispielweise der DICHROWEB-Server verschiedene Algorithmen zur Spektren-Dekonvolution bereit, die auf unterschiedlichen mathematischen Methoden beruhen. Detaillierte Beschreibungen der vorhandenen Algorithmen sowie Datensätzen sind in aktuellen *Reviews* zu finden (SREERAMA UND WOODY, 2004; KELLY *et al.*, 2005).

Zur Bestimmung der fraktionierten Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturen wurden die prozessierten CD-Daten im Wellenlängenbereich 175 – 260 nm bzw. 190 – 240 nm, abhängig vom Referenzdatensatz, verwendet. Als passender Algorithmus haben sich für das rekombinante Peptid CONTIN LL, SELCON3, sowie CDSSTR und für das synthetische Peptid CONTIN LL herausgestellt, welche auf dem DICHROWEB-Server des Birkbeck College (*University of London*) zu finden sind. Als Referenz wurde für das rekombinante Protein ein Datensatz aus 70 Peptiden (SP175) gewählt, während für das synthetische Peptide ein Datensatz aus 48 Proteinen, darunter 5 ungeordnete Proteine (Set 7), eingesetzt wurde.

Da bei der Festphasenpeptidsynthese TFA (Trifluoressigsäure) zur Abspaltung der Schutzgruppen verwendet wurde, kommt es, ohne Rücksichtnahme des gebundenen TFAs, zur fehlerhaften Berechnung des Molekulargewichtes des synthetischen Peptides. Unter Berücksichtigung der möglichen TFA-bindenden, positiv geladenen Seitenketten (1 x Arginin, 8 x Lysin, 1 x N-Terminus) ergibt sich ein zusätzliches Gewicht von 1.140 g/mol und somit rund 18 % der molaren Masse des Peptides. Aufgrund dessen wurde bei der quantitativen Auswertung ein *Scaling Factor* von 1,2 eingestellt, um so die Intensitätsfehler der Spektren zu kompensieren.

4.3.1.3 PROTEINSTABILITÄT MITTELS THERMISCHER DENATURIERUNG

Neben den Untersuchungen zur Strukturveränderung nach Metallbehandlung wurde zusätzlich die Proteinstabilität des rekombinanten Peptides durch thermische Denaturierung analysiert. Dabei wurde eine Hitzedestabilisierung beim unbehandelten Peptid sowie nach CoCl_2 -Inkubation durchgeführt.

Zur Untersuchung der Proteinstabilität des rekombinanten Peptides mittels thermischer Denaturierung wurden die Peptidstammlösung sowie die 10 me CoCl_2 -Stammlösung der Strukturuntersuchung verwendet und diese analog verdünnt. Anschließend wurden 60 μL Peptidlösung in eine Quarzglas-Küvette mit einer Schichtdicke von 100 μm pipettiert.

Die SRCD-Spektren wurden im Temperaturbereich von 10 °C bis 90 °C aufgenommen. Dabei wurden 5 °C-Schritte gewählt, wobei im Bereich zwischen 35 °C und 75 °C das Intervall 2 °C betrug. Auch bei diesen Messungen wurden die SRCD-Spektren im Wellenlängenbereich 275 – 180 nm in 0,5 nm-Intervallen aufgenommen. Es wurden jeweils zwei Scans jedes Temperaturschrittes gemessen und diese anschließend gemittelt. Die Prozessierung der Spektren wurde analog zu den vorherigen Strukturuntersuchungen durchgeführt.

4.3.2 UV/VIS-SPEKTROSKOPIE

Die UV/Vis-Spektroskopie wurde zur Untersuchung der Metallbindungseigenschaften des synthetischen BRCA1-Peptides durchgeführt. Die Spektren wurden am Mikotiterplattenlesegerät *Tecan Infinite® 200 Pro* in einer 96-Well-Platte bei RT aufgenommen. Während die Messungen

mit NaAsO_2 im Bereich 240 – 400 nm im 2 nm-Intervall durchgeführt wurden, wurden die Messungen mit CoCl_2 zusätzlich auf den Bereich 400 – 700 nm im 5 nm-Intervall erweitert. Für alle Titrationen wurde die Peptidlösung der SRCD-Analysen auf 100 μM verdünnt.

Zu Beginn wurde das Apozeptid mit 3 me Co(II) abgesättigt, wobei 1 μL einer 30 mM CoCl_2 -Stammlösung zu 100 μL Peptidlösung hinzugegeben wurde. Anschließend wurde nacheinander mit 1 μL 5 mM ZnCl_2 -Lösung titriert, was einem 50 μM - bzw. 0,5 me-Intervall entspricht. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Gesamtvolumen der zugegebenen Metallionenlösung 10 % des Ausgangsvolumens nicht überschreitet. Die Titration wurde so lange durchgeführt, bis keine sichtbare Veränderung der Absorption mehr vorhanden war und sich ein Sättigungsplateau bildete ($\sim 2,5$ me). Die Absorption wurde nach jedem Titrationsschritt gemessen. Neben der Titration des Peptides wurde zusätzlich die Pufferlösung analog titriert und gemessen. Die aufgenommenen Peptidspektren wurden anschließend gegen die entsprechenden Pufferspektren als Referenz korrigiert.

Des Weiteren wurde eine NaAsO_2 -Stammlösung von 2,5 mM angesetzt und je 1 μL dieser Stammlösung zu 100 μL Peptidlösung hinzugegeben. Demnach wurde im 25 μM -Intervall titriert, was einer Moläquivalenz von 0,25 zum Peptid entspricht. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Gesamtvolumen der zugegebenen Metallionenlösung 10 % des Ausgangsvolumens nicht überschreitet. Die Titration wurde solange durchgeführt, bis die Absorption nicht weiter anstieg und sich ein Sättigungsplateau bildete. Nach jeder Zugabe wurde die Absorption im genannten Bereich gemessen. Zusätzlich wurde die Pufferlösung titriert, gemessen und anschließend die aufgenommenen Peptidspektren gegen die entsprechenden Pufferdaten als Referenz korrigiert.

In einem weiteren Ansatz wurde die Peptidlösung zunächst mit 2,5 me NaAsO_2 gesättigt und anschließend mit 0,5 me ZnCl_2 -Lösung titriert. Auch hier wurden jeweils 1 μL 5 mM Metalllösung zu 100 μL Peptidlösung hinzugegeben. Analog zu den vorherigen Untersuchungen wurde die Titration bis zum auftretenden Plateau ($\sim 2,5$ me) durchgeführt.

Zur besseren Reflexion der biologischen Bedingungen wurde zusätzlich ein Ansatz durchgeführt, bei dem das Apozeptid zunächst mit Zn(II) abgesättigt wurde (3 me). Anschließend wurden im 50 μM -Intervall mit NaAsO_2 rücktitriert, wobei simultan 1 μL 5 mM Metalllösung zu 100 μL Peptidlösung hinzu pipettiert wurden.

Abschließend wurden für alle durchgeführten Titrationsversuche die für die d-d-Übergänge bzw. LMCT-Banden charakteristischen Wellenlängen gegen die eingesetzten Moläquivalente aufgetragen.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Nachfolgend werden zunächst die Ergebnisse der zellulären Analysen dargestellt, die insbesondere die Mechanismen der DDR sowohl auf transkriptioneller Ebene wie auch auf funktioneller Ebene umfassen. Im Anschluss wird die heterologe Proteinexpression zur Herstellung eines rekombinanten Peptides, welches die Sequenz der N-terminale RING-Domäne des DNA-Reparaturproteins BRCA1 beinhaltet, aufgezeigt. Weiterhin werden auch die subzellulären Untersuchungen zum Einfluss von verschiedenen Metallverbindungen auf die Ringfingerstruktur in BRCA1 beleuchtet.

5.1 AUSWIRKUNGEN EINER BRCA1-DEFIZIENZ AUF DIE DNA-SCHADENSANTWORT UNTER NaAsO₂-EINFLUSS

Die zellulären Untersuchungen zu den Mechanismen der DDR wurden mit gesondertem Fokus auf das Protein BRCA1 sowie dem Einfluss von Arsenit auf ebendieses Netzwerk betrachtet.

5.1.1 ZYTOTOXIZITÄT VON NaAsO₂

Das akute zytotoxische Potential einer Substanz kann mit Hilfe verschiedener Methoden untersucht werden. In dieser Arbeit erfolgte die Bestimmung der Zytotoxizität anhand zweier unterschiedlicher Vorgehensweisen. Dabei wurde neben der Lebendzellzahl auch der zelluläre ATP-Gehalt nach NaAsO₂-Behandlung ermittelt. Darüber hinaus wurde auch der Einfluss einer zusätzlichen Bestrahlung auf die Zytotoxizität untersucht. Mit Hilfe dieser Daten konnte anschließend ein geeigneter Bereich für die optimale Inkubationskonzentration von NaAsO₂ in UWB1.289- und UWB1.289 + BRCA1-Zellen identifiziert werden.

ATP ist in allen metabolisch aktiven Zellen nachweisbar und erfährt im Laufe einer Zellschädigung und dem darauffolgenden Absterben der Zellen eine Degradation. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der durch das Enzym Luciferase katalysierten Reaktion von ATP und D-Luciferin, bei der in Gegenwart von molekularem Sauerstoff und Magnesiumionen neben Oxyluciferin auch Energie in Form von Photonen freigesetzt werden. Die Intensität des emittierten Lichts ist dabei proportional zum zellulären ATP-Gehalt und kann als Biolumineszenz bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen werden. Das erhaltene Ergebnis wird als relative Lichteinheit (RLU) angegeben (PROMEGA CORPORATION, 2015).

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl und des zellulären ATP-Gehaltes wurden die Zellen 18 h mit NaAsO₂ behandelt, gegebenenfalls mit 1 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Für die nicht bestrahlten Zellen ergab sich somit eine Gesamtinkubationszeit von 26 h.

Die Ergebnisse der akuten Zytotoxizitätsuntersuchungen sind in Abbildung 17 dargestellt. Dabei ist neben dem Einfluss der alleinigen Arsenit-Behandlung sowie Bestrahlung auch das zytotoxische Ausmaß der Co-Exposition aufgezeigt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden jeweils auf die nicht bestrahlte Kontrolle normiert. Die Inkubation mit Arsenit führte hierbei zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Lebendzellzahl nach Behandlung mit 1 μM , 5 μM sowie 10 μM . Die beiden analysierten Zelllinien zeigten einen ähnlichen Zytotoxizitätsverlauf. Während Arsenit in niedrigen Konzentrationen von 1 μM keine zytotoxischen Effekte verursachte, induzierte die Inkubation mit 5 μM NaAsO₂ eine Abnahme der vitalen Zellen von etwa 30 %. Im Konzentrationsbereich von 10 μM waren in den UWB1.289 sowie UWB1.289 + BRCA1 nach der Inkubation noch etwa 55 % der Zellen intakt. Die zusätzliche Bestrahlung führte in keiner der beiden Zelllinien zu einer deutlichen Abnahme der Lebendzellzahl. Lediglich bei der Inkubation mit 10 μM konnte eine zusätzliche Bestrahlung die Vitalität der profizienten Zellen um weitere 5 % senken, wobei dies vermutlich auf biologische Schwankungen zurückgeführt werden kann.

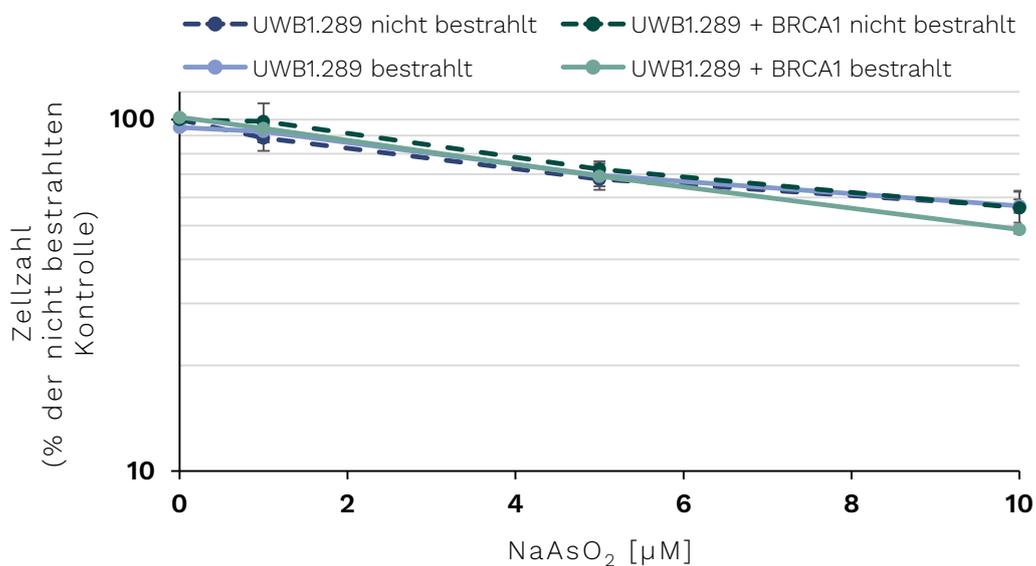


Abbildung 17: Lebendzellzahl der UWB1.289- und UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach Behandlung mit NaAsO₂. Die Zellen wurden für 18 h mit NaAsO₂ vorbehandelt, wo angezeigt mit 1 Gy bestrahlt und anschließend für 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen. Die Ergebnisse sind in Prozent der jeweiligen nicht bestrahlten Kontrolle angegeben.

Abbildung 18 präsentiert den ermittelten ATP-Gehalt der UWB1.289- und UWB1.289 + BRCA1-Zellen unter Einfluss von NaAsO₂, Röntgenstrahlung sowie der Kombinationsbehandlung. Simultan zu den Analysen der Lebendzellzahl wurden auch diese Ergebnisse jeweils auf die entsprechende nicht bestrahlte Kontrolle normiert. Die Untersuchungen zeigten lediglich leichte bis moderat akute zytotoxische Effekte in dem getesteten Konzentrationsbereich. Während die Behandlung mit 1 μM in beiden getesteten Zelllinien die Vitalität nicht beeinflusste, konnte eine Abnahme des basalen ATP-Gehaltes nach Inkubation mit 5 μM beobachtet werden. Diese resultierte bei den profizienten Zellen in einer 96 %igen und bei den defizienten Zellen in einer 88 %igen Vitalität. Auch bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 10 μM konnte ein

Unterschied von etwa 10 % des basalen ATP-Gehaltes zwischen der profizienten (93 %) und defizienten (83 %) Zelllinie festgestellt werden. Diese Diskrepanz könnte entweder auf biologische Schwankungen oder auf eine verminderte Zellproliferation, aufgrund der BRCA1-Defizienz, zurückgeführt werden. Die zusätzliche Bestrahlung führte, analog zu den Analysen der Lebendzellzahl, in keiner der beiden Zelllinien zu einer deutlichen Abnahme des ATP-Gehaltes.

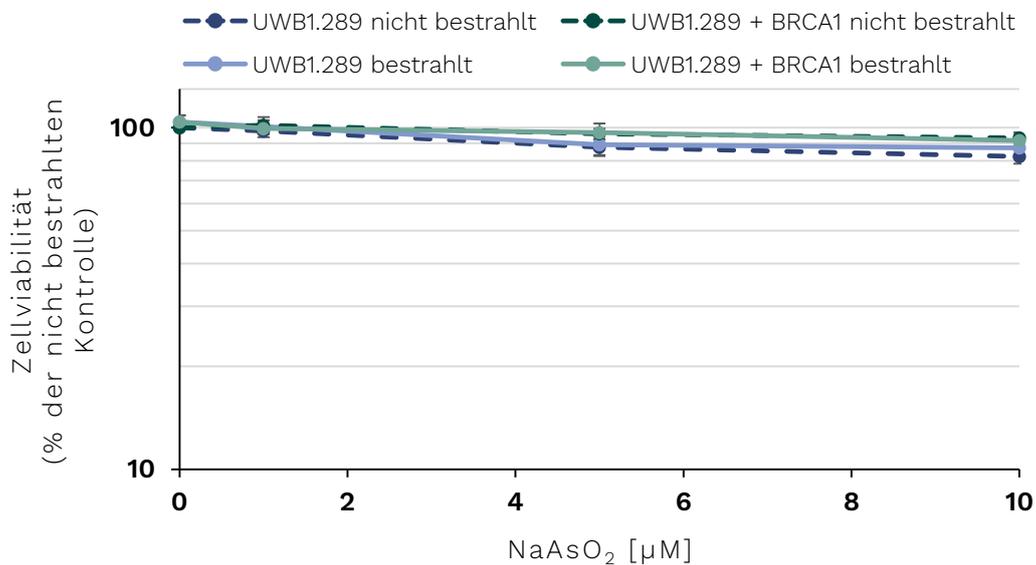


Abbildung 18: ATP-Gehalt der UWB1.289- und UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach Behandlung mit NaAsO₂.

Die Zellen wurden für 18 h mit NaAsO₂ vorbehandelt, wo angezeigt mit 1 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen. Die Ergebnisse sind in Prozent der jeweiligen nicht bestrahlten Kontrolle angegeben.

Folglich konnten durch die beiden Methoden eine leicht bis moderat zytotoxische Wirkung durch die Behandlung mit 5 μ M sowie moderat bis stark zytotoxische Effekte durch 10 μ M NaAsO₂ in den UWB1.289- sowie UWB1.289 + BRCA1-Zellen identifiziert werden. Weiterhin konnten keine signifikant verstärkenden Effekte durch eine Co-Exposition hinsichtlich der Zytotoxizität nachgewiesen werden. Außerdem schien ein BRCA1-Defizit keine eindeutigen Auswirkungen auf die As(III)-verursachte Zytotoxizität auszuüben, was durch einen ähnlichen Kurvenverlauf der beiden Zelllinien deutlich wurde. Für sensitive Methoden, wie die Immunfluoreszenz, wurden für die Folgeuntersuchungen lediglich die Konzentrationen 1 μ M und 5 μ M eingesetzt.

Die zytotoxische Wirkung von Arsenit konnte bereits mehrfach in unterschiedlichsten Zelllinien nachgewiesen werden. Dabei wurde ein zytotoxischer Effekt ebenso durch verschiedene Arsenverbindungen sowie nach unterschiedlichen Zeitpunkten und Konzentrationen beobachtet (HARTWIG *et al.*, 2003; YEH *et al.*, 2003; USLU *et al.*, 2000). Die dafür verantwortlichen Mechanismen sind bislang nicht vollständig aufgeklärt. Die Arbeitsgruppe von USLU *et al.* begründeten die von ihnen beobachtete Zytotoxizität in Prostata- und Ovarialkarzinomzellen mit der Induktion der Apoptose, wobei sie gleichzeitig die vermehrte Generierung von ROS als möglichen Mechanismus ausschließen konnten (USLU *et al.*, 2000). Auch YEH *et al.* beschrieben eine As(III)-

verursachte Apoptose, die mit der Hochregulation des p53-Proteins einherging (YEH *et al.*, 2003). Demgegenüber beschrieben Yu *et al.* eine p53-unabhängige Zelltodinduktion durch Arsenit (Yu *et al.*, 2008). Neben der Induktion der Apoptose, beschrieben JIANG *et al.* auch Auswirkungen auf die Zellproliferation sowie die Induktion von oxidativem Stress und genotoxischen Effekten (JIANG *et al.*, 2013). Die verstärkte ROS-Generierung durch Arsenit konnte auch von der Arbeitsgruppe HOSSEINI *et al.* beobachtet werden. Dieser auftretende zelluläre oxidative Stress schien dabei das Erliegen der oxidativen Phosphorylierung, die Abnahme des zellulären ATP-Gehaltes, den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials sowie eine beeinträchtigte Integrität der äußeren Mitochondrienmembran auszulösen. All diese Mechanismen führten letztendlich zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Cytosol, wodurch die Signalisierung der Apoptose eingeleitet wurde (HOSSEINI *et al.*, 2013).

Während Arsenit einen direkten und zielgerichteten Einfluss auf den ATP-Gehalt in den Mitochondrien zu nehmen scheint, kann die Abnahme der Lebendzellzahl auch durch indirekte Mechanismen ausgelöst werden. Die Zellvitalität ist dabei multikausalen Zusammenhängen unterworfen, wodurch die Diskrepanz der Ergebnisse der beiden eingesetzten Methoden begründet werden kann. Zur Untersuchung der für die Zytotoxizität spezifischen zellulären Mechanismen wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit auch Analysen zur Zellzyklusprogression sowie den Zelltodmechanismen durchgeführt.

5.1.2 ZELLULÄRE AUFNAHME VON NaAsO₂

Die Beobachtungen aus den Zytotoxizitätsanalysen wurden anschließend durch intrazelluläre Aufnahmeuntersuchungen weiterverfolgt. Zur Ermittlung der Gesamtaufnahme wurden die Zellen für 18 h mit NaAsO₂ behandelt. Der zelluläre Arsengehalt wurde im Anschluss mit Hilfe der GF-AAS bestimmt.

Die Ergebnisse der zellulären Aufnahmestudien sind in Abbildung 19 dargestellt. Dabei konnte eine konzentrationsabhängige Akkumulation der intrazellulären Arsenmenge beobachtet werden. Bereits ab einer Exposition von 1 µM NaAsO₂ wurde ein Arsengehalt von 20 µM in der Zelle detektiert. Die Behandlung mit 5 µM erhöhte die Arsenlast der Zelle auf 70 µM, im Falle der defizienten Zelllinie, sowie auf 86 µM bei den profizienten Zellen. Auch bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 10 µM war ein leichter Unterschied zwischen den beiden Zelllinien zu verzeichnen. Während die UWB1.289-Zellen 120 µM Arsen akkumulierten, erhöhte sich der Gehalt der UWB1.289 + BRCA1-Zellen auf 140 µM. Unter Betrachtung der Standardabweichungen konnte dennoch eine ähnliche intrazelluläre Aufnahme für die beiden untersuchten Zelllinien festgestellt werden.

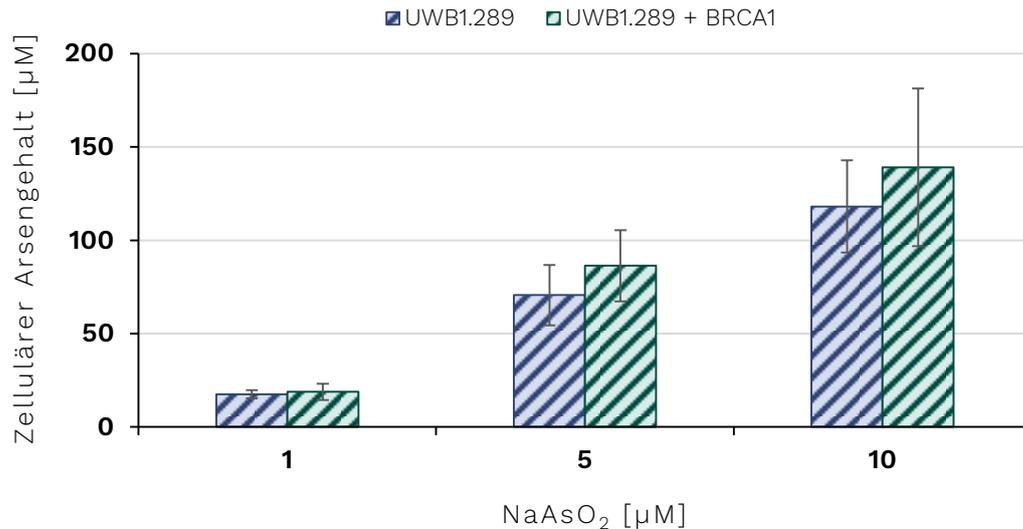


Abbildung 19: Zelluläre Aufnahme von Arsen nach Behandlung mit NaAsO₂.

UWB1.289- und UWB1.289 + BRCA1-Zellen wurden für 18 h mit NaAsO₂ inkubiert und anschließend der Arsengehalt mittels Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

Zusammenfassend konnte eine starke Akkumulation von Arsen nach 18 h sowohl in den defizienten wie auch in den profizienten Zellen festgestellt werden. Eine BRCA1-Defizienz nimmt folglich keinen Einfluss auf die intrazelluläre Arsenaufnahme.

Die konzentrationsabhängige Akkumulation von Arsen konnte in vorangegangenen, nicht veröffentlichten Untersuchungen innerhalb unseres Arbeitskreises bereits in Hela S3-Zellen gezeigt werden. Auch in weiteren Studien konnte die intrazelluläre Aufnahme von Arsen in unterschiedlichen Zelllinien, zu verschiedenen Inkubationszeiten sowie in mannigfaltigen Konzentrationen nachgewiesen werden (DOPP *et al.*, 2010; HUANG UND LEE, 1996).

5.1.3 EINFLUSS VON NaAsO₂ AUF DAS GENEXPRESSIONSPROFIL

Um den Einfluss einer BRCA1-Defizienz auf die Transkriptionsebene und somit mögliche Unterschiede im Genexpressionsprofil der UWB1.289- und UWB1.289 + BRCA1-Zellen zu identifizieren, wurden Genexpressionsanalysen mittels Hochdurchsatz RT-qPCR angewendet. Zusätzlich sollten mit Hilfe dieser Untersuchungen auch die potentiellen Wirkmechanismen von NaAsO₂ aufgeklärt werden. Die Veränderungen der Genexpressionsmuster sind im Folgenden als *Heatmaps* dargestellt. Dabei handelt es sich um Ausschnitte globaler *Heatmaps*, die in Anhang 8.4.1 aufgeführt sind. Die hier ausgewählten Ausschnitte zeigen Gene, deren Induktion um den log₂-fachen Wert ± 1 verstärkt exprimiert oder reprimiert wurden. Ergänzend sind Gene aufgeführt, deren Expressionsänderungen einer eindeutigen Dosis-Wirkungs-Beziehung unterliegen und sich nahe am log₂-fachen Expressionsniveau von ± 1 befinden.

Zur Beurteilung des transkriptionellen Einflusses einer BRCA1-Defizienz, diente die unbehandelte und nicht bestrahlte Kontrolle der Wildtyp-Zelllinie UWB1.289 als Referenz. Die entsprechenden *Heatmaps* sind in Anhang 8.4.1 aufgelistet. Lediglich die transkriptionelle Änderung des *BRCA1*-Gens ist in Form eines Balkendiagramms sowohl unter basalen Bedingungen wie auch unter Einfluss von Röntgenstrahlung mit und ohne NaAsO₂-Behandlung dargestellt.

Im Gegensatz dazu wurde, zur Betrachtung der transkriptionellen Auswirkungen von NaAsO₂ auf die UWB1.289- sowie UWB1.289 + BRCA1-Zelllinie, die unbehandelte sowie nicht bestrahlte Kontrolle der jeweiligen Zelllinie als Referenz eingesetzt. Für eine bessere Vergleichbarkeit der generierten Genexpressionsprofile, wurden die Ergebnisse der BRCA1-defizienten sowie der -profizienten Zelllinie gemeinsam in einer *Heatmap* dargestellt.

Zur Bestimmung der Transkriptionsrate wurden die Zellen 18 h mit NaAsO₂ vorbehandelt, gegebenenfalls mit 1 Gy bestrahlt und anschließend für 8 h nachinkubiert. Für die nicht bestrahlten Versuche ergab sich somit eine Gesamtinkubationszeit von 26 h. Die Experimente wurden für beiden Zelllinien in einem simultanen Versuchsaufbau angesetzt.

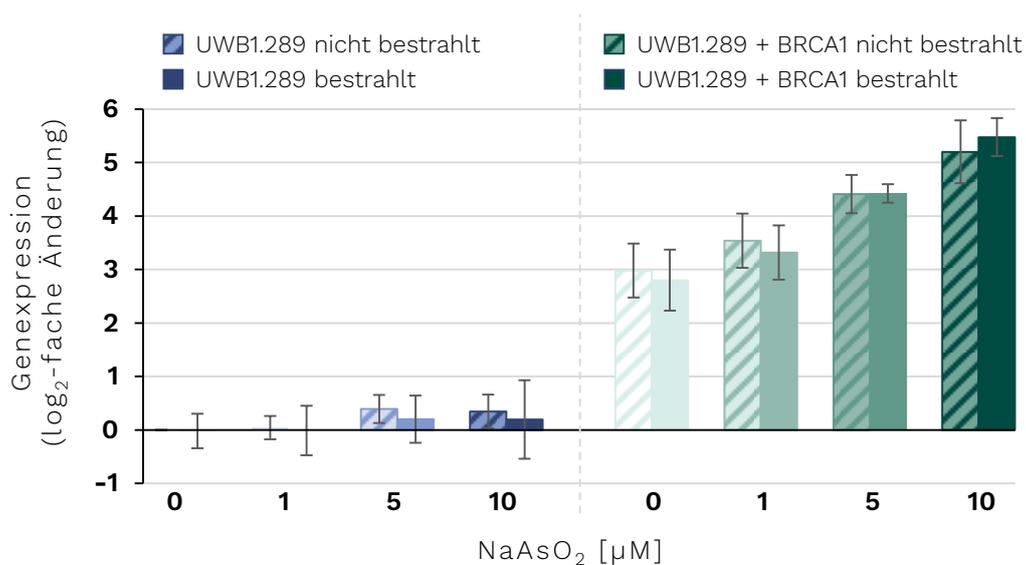


Abbildung 20: Vergleichende Darstellung der transkriptionellen (log₂-fachen) Änderung des *BRCA1*-Gens.

UWB1.289- und UWB1.289 + BRCA1-Zellen wurden für 18 h mit NaAsO₂ vorbehandelt, wo angezeigt mit 1 Gy bestrahlt und erneut für 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen. Die unbehandelte und nicht bestrahlte Kontrolle der UWB1.289-Zellen diente dabei als Referenz.

Abbildung 20 zeigt den Vergleich der transkriptionellen Änderung des *BRCA1*-Gens zwischen den UWB1.289- und UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach Behandlung mit NaAsO₂ sowie nach zusätzlicher Bestrahlung. Schon die Betrachtung der basalen Genexpression (0 μM) machte deutlich, dass das Expressionsniveau von *BRCA1* in den stabil transfizierten und somit profizienten Zellen um das 8-fache der Ausgangstranskriptmenge (log₂-Wert: 3) erhöht vorlag. Keine der Behandlungen führte zu einer Veränderung der Genexpression in den defizienten Zellen. So konnte bestätigt

werden, dass die vorliegende *BRCA1*-Mutation der UWB1.289-Zellen zu einem gänzlichen Verlust der Transkriptionsaktivität des Gens führte. Demgegenüber zeigte die Metallbehandlung eine stark erhöhte Transkriptionsrate des *BRCA1*-Gens in den profizienten Zellen. So konnte beispielweise durch die Inkubation mit 5 μM eine 20-fache Erhöhung der Transkriptionsaktivität im Vergleich zum basalen Niveau der natürlich mutierten UWB1.289-Zellen beobachtet werden. Die Behandlung mit der höchsten eingesetzten Konzentration von 10 μM ließ eine fast 40-fach verstärkte Expression im Vergleich zu den defizienten Zellen verzeichnen. Verglichen mit dem basalen Transkriptionsniveau der UWB1.289 + *BRCA1*-Zellen verursachte die Behandlung mit 10 μM eine 4-fache Verstärkung der Genexpression. Eine zusätzliche Bestrahlung bewirkte keine verstärkenden Effekte, weshalb die beobachteten Änderungen der Expressionsniveaus alleine auf die Behandlung mit der Metallverbindung NaAsO_2 zurückzuführen sind.

Das erhöhte basale *BRCA1*-Expressionsniveau der UWB1.289 + *BRCA1*-Zellen scheint dabei auf die konstitutive Aktivität des im pcDNA3-Plasmidvektor vorhandenen CMV (Cytomegalovirus) - Promotors zurückzuführen zu sein (DAMDINDORJ *et al.*, 2014). Auch die konzentrationsabhängige Induktion des Gens ist durch den vorgeschalteten CMV-Promotor zu erklären. BRUENING *et al.* beschreiben eine gesteigerte Expression CMV-regulierter Gene durch Stress-assoziierte Transkriptionsfaktoren wie c-JUN und ATF-2 (*Activating Transcription Factor 2*). Die Aktivierung der genannten Transkriptionsfaktoren erfolgte dabei durch die MAPK p38 sowie JNK, welche wiederum durch umweltbedingte Stimuli wie Arsen reguliert wurden (BRUENING *et al.*, 1998).

Neben der vergleichenden Genexpressionsanalyse des *BRCA1*-Gens wurden die Auswirkungen einer *BRCA1*-Defizienz unter NaAsO_2 -Einfluss auch in einer Vielzahl weiterer Gene untersucht. Änderungen dieser Expressionsniveaus zeigten jedoch nur marginale Unterschiede, im Vergleich zu den Ergebnissen der Zelllinien-spezifischen Auswertung, weshalb im Folgenden nicht weiter darauf eingegangen wird. Die Ergebnisse sind im Anhang 8.4.1 aufgeführt. Der Fokus wurde auf die für die jeweilige Zelllinie normierte Auswertung gelegt, um so den Vergleich der Expressionsprofile zwischen den UWB1.289 und UWB1.289 + *BRCA1* besser einordnen zu können.

Abbildung 21 stellt vergleichende Expressionsprofile von Genen der Metallhomöostase und oxidativen Stressantwort sowie von Genen apoptotischer Faktoren und Zellzyklusregulatoren dar. Die Gegenüberstellung dieser Profile zeigte ein ähnliches Genexpressionsmuster beider untersuchter Zelllinien nach Behandlung mit NaAsO_2 . Dabei konnte kein Einfluss auf die Transkriptionsaktivität nach alleiniger Bestrahlung festgestellt werden. Die Ergebnisse deuten folglich darauf hin, dass die beschriebenen Mechanismen der DDR nach Arsenit-Behandlung auf transkriptioneller Ebene weitestgehend unabhängig vom *BRCA1*-Status verlaufen.

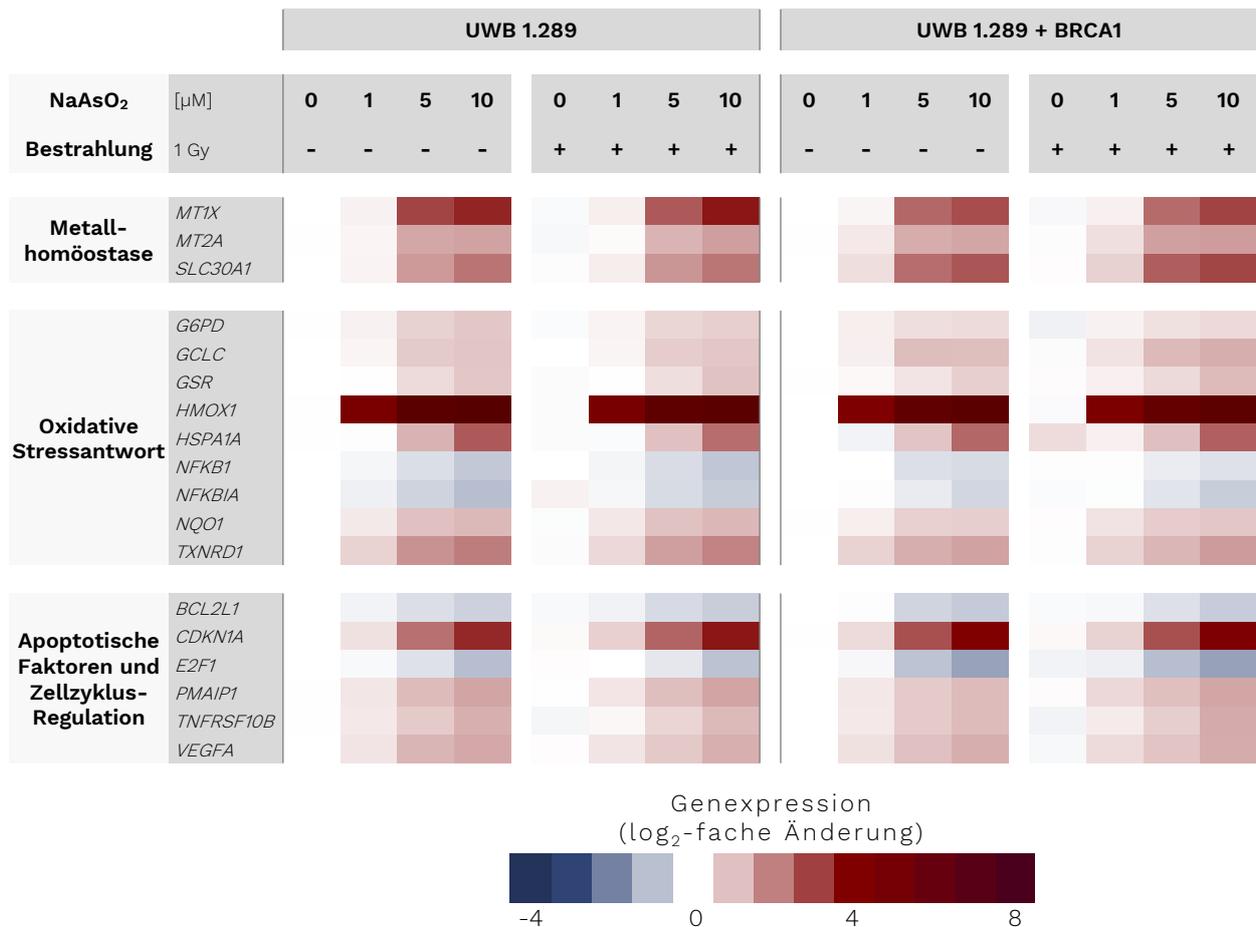


Abbildung 21: Vergleichende Expressionsprofile von Genen der Metallhomöostase, der oxidativen Stressantwort sowie apoptotischer Faktoren und Zellzyklusregulatoren nach Behandlung mit NaAsO₂.

UWB1.289- und UWB1.289 + BRCA1-Zellen wurden für 18 h mit NaAsO₂ vorbehandelt, wo angezeigt mit 1 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Die log₂-fache Änderungen der Genexpression wurden dabei auf die unbehandelte und nicht bestrahlte Kontrolle der jeweiligen Zelllinie normiert. Eine Rotfärbung stellt eine Induktion der Expression dar, während eine Blaufärbung für eine reprimierte Genexpression steht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

Die Behandlung mit NaAsO₂ verursachte eine konzentrationsabhängige Induktion der Expression von Metallhomöostase-regulierenden Genen. Die dabei untersuchten Gene der Metallothioneinfamilie *MT1X* (*Metallothionein 1X*) und *MT2A* (*Metallothionein 2A*) zeigten eine Steigerung um die log₂-fachen Werte von 3,0 bzw. 1,5. *MT1X* und *MT2A* kodieren für niedermolekulare Proteine der Metallothionein (MT) -Familie. Durch ihren hohen Cysteinanteil sind sie an der Regulation des Zinkhaushaltes sowie der Speicherung von Metallionen beteiligt. Weiterhin bewirkt die hohe Anzahl an Thiolgruppen auch die antioxidativen Eigenschaften der Proteine (KRĘŻEL UND MARET, 2017). Die Expression dieser Gene wird über den Zinkfinger-enthaltenden *metal-regulatory transcription factor 1* (MTF-1) reguliert, welcher beispielsweise direkt durch eine erhöhte intrazelluläre Zinkkonzentration aktiviert wird. Weiterhin kann der Transkriptionsfaktor auch indirekt durch die Freisetzung von Zn²⁺ aus MT nach Metallüberschuss oder oxidativem Stress reguliert werden. Ein weiteres *Target* des Transkriptionsfaktors MTF-1

stellt das für den Zinkexporter ZnT-1 codierende Gen *SLC30A1* dar (GÜNTHER *et al.*, 2012). *SLC30A1* zeigte bereits ab 5 µM NaAsO₂ eine Erhöhung der Ausgangstranskriptmenge um das 3- bis 5-fache. Die Behandlung mit 10 µM verursachte eine 4-fache Steigerung der Genexpression in den defizienten Zellen sowie eine 6-fache Zunahme in den profizienten Zellen. In Bezug auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lässt die erhöhte *MT1X*-, *MT2A*- sowie *SLC30A1*-Expression nach Metallbehandlung somit auf eine Aktivierung von MTF-1, durch die Bindung des Metalloids aufgrund einer gesteigerten intrazellulären Arsenitkonzentration schließen. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors kann zudem durch den mit der Metallbehandlung einhergehenden möglichen oxidativen Stress ausgelöst werden.

Neben den bekannten Bindungspartnern Zink und Kupfer konnte auch die Assoziation von Arsenit an MT bereits mehrfach gezeigt werden. Dabei wurde eine positive Korrelation der Expression verschiedener MT-Isoformen auf transkriptioneller sowie auf funktioneller Ebene nachgewiesen. RAHMAN UND LEY verdeutlichten in einem *Review* die intrazellulären antioxidativen Schutzmechanismen von MTs, die den durch Arsen ausgelösten oxidativen Stress minimieren oder sogar eliminieren. Auch der Zinkexporter ZnT1 (*SLC30A1*) wurde bereits als sensibler Marker für intrazelluläres Arsenit beschrieben (RAHMAN UND LEY, 2017; FALNOGA *et al.*, 2012; CÓRDOVA *et al.*, 2014; SOBH *et al.*, 2019). Demnach impliziert die Induktion der *MT*-Gene die protektive Wirkung der MTs durch die Bindung von Arsenit sowie das Abfangen von ROS.

Im Hinblick auf die mit der oxidativen Stressantwort assoziierten Gene wurden auch Veränderungen in Zielgenen des KEAP1-NRF2-Signalweges detektiert. Der KEAP1-NRF2-Komplex stellt eines der wichtigsten Schutzsysteme der Zelle gegenüber oxidativem sowie elektrophilem Stress dar. Die Aktivität des Transkriptionsfaktor NRF2 wird dabei streng durch den redox-sensitiven E3-Ubiquitin-Ligase-Substratadapter KEAP1 (*kelch-like apichlorohydrin-associated protein 1*) reguliert. Unter homöostatischen Bedingungen wird NRF2 durch Bindung an KEAP1 im Cytoplasma verankert, was wiederum die Ubiquitinierung und den anschließenden proteasomalen Abbau von NRF2 erleichtert. Als Reaktion auf oxidativen Stress wird KEAP1, durch die Oxidation von reaktiven Cysteinresten, oxidiert und somit inaktiviert, wodurch NRF2 stabilisiert, abdissoziiert und in den Nukleus translokalisiert wird. Im Zellkern dimerisiert der TF mit sMAF (*small musculoaponeurotic fibrosarcoma*)-Proteinen und bindet an Promotorregionen antioxidativer und detoxifizierender Gene, den sogenannten ARE (*antioxidative response elements*)-Motiven. NRF2 kann so seine Funktion als TF ausüben und die Expression verschiedener Gene regulieren (TONELLI *et al.*, 2018). Einige dieser Zielgene wurden im Rahmen der hier durchgeführten Genexpressionsanalysen nach Behandlung mit NaAsO₂ sowie zusätzlicher Bestrahlung beeinflusst.

Die stärkste Induktion nach Arsenit-Behandlung zeigte dabei das NRF2-assoziierte Gen *HMOX1* (Hämoxygenase-1), welches einen Biomarker einer zellulären Stressantwort darstellt und eine

essentielle Rolle im Häm-Katabolismus einnimmt. Während bereits die Inkubation mit 1 μM eine 25-fach erhöhte Ausgangstranskriptmenge verursachte, konnte die Behandlung mit 10 μM die Expression des Gens sogar um das 250-fache verstärken. *HMOX1* kann zudem auch über weitere redox-sensitive Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF- κB reguliert werden (PRONK *et al.*, 2014).

Zu den NRF2-*Targets* gehören unter anderem die Gene *G6PD* (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase), *GCLC* (Glutamat-Cystein-Ligase) sowie *GSR* (Glutathion-S-Reduktase), die dosisabhängig induziert wurden und in den höchsten Behandlungskonzentrationen eine nahezu verdoppelte Transkriptmenge aufzeigten. Die genannten Gene codieren für Proteine, die zur Aufrechterhaltung des GSH-Status beitragen. GCLC katalysiert dabei den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der GSH-Biosynthese, indem es Cystein mit Glutamat über dessen γ -Carboxylgruppe verknüpft und so das Hydrolyse-resistente Dipeptid Glutamylcystein bildet. Durch die Bindung von Glycin an das Dipeptid wird im Anschluss das Tripeptid GSH synthetisiert (NJÄLSSON UND NORGREN, 2005). GSH dient dabei, aufgrund seiner Funktion als Radikalfänger, als antioxidativer Schutzfaktor der Zellen. Das Tripeptid wird jedoch auch für den intrazellulären Arsenmetabolismus benötigt, indem es As(V) zu As(III) reduziert. Dabei erfährt GSH eine Oxidation zum Dimer GSSG, welches anschließend wieder regeneriert werden muss. Diese Regeneration wird über das Enzym GSR, unter Beteiligung von NADPH (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat), katalysiert. G6PD wiederum wird zur Homöostase von NADPH in der Zelle benötigt (THOMAS, 2009; STANTON, 2012).

Auch *NQO1* (NAD(P)H-abhängige Chinon-Oxidoreduktase 1) und *TXNRD1* (Thioredoxinreduktase) stellen Zielgene des redoxsensitiven Transkriptionsfaktors NRF2 dar. Während bei *NQO1* lediglich eine tendenziell erhöhte Transkriptionsrate beobachtet werden konnte, verursachte die Arsenit-Behandlung bei *TXNRD1* eine bis zu 4-fach erhöhte Genexpression. Das gleichnamige Genprodukt NQO1 wirkt detoxifizierend gegenüber oxidativem Stress, indem es die Entstehung von radikalbildenden Chinonen, durch seine Funktion als Zwei-Elektronen-Reduktase, verhindert (BELINSKY UND JAISWAL, 1993). Die Thioredoxinkaskade spielt, ähnlich wie das antioxidative Schutzsystem von GSH, eine wichtige Rolle bei der Regenerierung von oxidierten Proteinen. Dabei wird das entstandene, oxidierte TXN durch die TXNRD1, unter Beteiligung von NADPH, regeneriert (LEE *et al.*, 2013).

Die Betrachtung NRF2-regulierter Gene lässt so auf eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors nach Exposition gegenüber NaAsO_2 schließen. Zudem scheint die Metallbehandlung auch eine Beeinflussung des zellulären GSH- sowie TXN-Levels zu verursachen, was wiederum in einem erhöhten NADPH/ H^+ -Bedarf der Zelle resultiert. Diese antioxidativen Prozesse der Zelle deuten demnach auf ein erhöhtes oxidatives Stresslevel durch NaAsO_2 hin.

Eine Beeinflussung NRF2-regulierter Gene sowie deren Genprodukte durch die Behandlung mit Arsenit konnte auch in vorausgegangenen Studien gezeigt werden. Analog zu den hier

vorliegenden Untersuchungen beobachteten die Arbeitsgruppen von CÓRDOVA und YU eine erhöhte Expression von Genen der MT-Familie, des GSH-Metabolismus sowie weiterer antioxidativ-wirkender Enzyme. Zudem konnte auch die verstärkte Transkriptionsrate von Hitzeschockprotein-codierenden Genen festgestellt werden, wobei die Modifizierung intrazellulärer Proteine als Reaktion auf freie Radikale einen typischen Mechanismus von Arsen darstellt (CÓRDOVA *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2008).

Ein weiteres Sorgen für oxidativen Stress stellt das ebenfalls untersuchte *HSPA1A* (*heat shock protein A 1A*) dar. Während die Inkubation mit niedrigen Konzentrationen (1 μM) noch keine Effekte verursachte, konnte ab einer Behandlung von 5 μM eine konzentrationsabhängige Induktion der Genexpression beobachtet werden. Dabei verstärkten 10 μM NaAsO_2 die Transkriptionsrate auf den \log_2 -fachen Wert von 2,5, was einer Erhöhung um das 6-fache entspricht. Das Genprodukt von *HSPA1A* gehört zur Familie der Hitzeschockproteine HSP70 und wird durch eine Vielzahl an Stressstimuli aktiviert. Zu den Hauptfunktionen dieser Chaperone zählen der Abbau von instabilen sowie fehlgefalteten Proteinen, die Verhinderung und Auflösung von Proteinkomplexen sowie die Faltung und Rückfaltung von Proteinen. Demnach ist diese Proteinfamilie dazu befähigt, die Erholung gestresster Zellen durch den Wiederaufbau beschädigter Proteine sowie durch Schutz vor Denaturierung zu fördern (DAUGAARD *et al.*, 2007).

Weiterhin konnte bei dem Gencluster der oxidativen Stressantwort jedoch auch eine Repression zweier Gene beobachtet werden. Dabei handelte es sich um *NFKB1* (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1*) sowie *NFKBIA* (*NFKB inhibitor alpha*), die eine leichte, konzentrationsabhängige Verminderung der Ausgangstranskriptmenge erfuhren. Auch hier war eine dosisabhängige Repression zu beobachten, welche nahe des als relevant definierten Expressionsniveaus von $\log_2 \pm 1$ lag. Während *NFKB1* für die p50-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- κB codiert, bildet *NFKBIA* dessen Regulationsprotein $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. Unter physiologischen Bedingungen liegt NF- κB in seinem inaktiven Zustand im Cytoplasma vor, wobei $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ diese Inaktivierung durch die Bindung des Transkriptionsfaktors verursacht. Durch zelluläre Stresssituationen, die sich in einem Anstieg an Inflammationsmarkern oder einem erhöhten ROS-Niveau manifestieren, kann NF- κB durch Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ mittels $\text{I}\kappa\text{B}$ -Kinase (IKK) freigesetzt und in den Nukleus translokalisiert werden. Dort kann das Protein im Anschluss seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausüben und die Expression von Genen, die mit dem Zellwachstum und der Proliferation assoziiert sind, steuern (VALLABHAPURAPU UND KARIN, 2009). NaAsO_2 scheint demnach die Transkription von NF- κB sowie dessen Regulation zu beeinträchtigen und so möglicherweise die Induktion der Apoptose auszulösen.

Eine Arsen-bedingte Beeinflussung der mit dem Transkriptionsfaktor NF- κB -assoziierten Signalwege konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden. Hierbei wurde jedoch eine starke Zelltyp-spezifische Dosis- sowie eine Zeitabhängigkeit beschrieben, die in einer Repression

sowie einer Induktion der Transkription münden konnte. Die beeinflusste Aktivität des Transkriptionsfaktors wurde dabei entweder auf eine beeinträchtigte DNA-Bindung oder auf die direkte Inaktivierung der Cystein-reichen IKK zurückgeführt (KAPAHİ *et al.*, 2000; ROUSSEL UND BARCOWSKY, 2000). Es wurde zudem postuliert, dass NF- κ B selbst für die Genexpression seiner Untereinheit p50 sowie seines negativen Regulators I κ B α verantwortlich ist (TEN *et al.*, 1992; ITO *et al.*, 1994), was die beobachtete Arsen-vermittelte Repression dieser Gene erklärt.

Neben Genen der Metallhomöostase und der oxidativen Stressantwort wurden auch Gene apoptotischer Faktoren sowie der Zellzyklusregulation in ihrer Expression moduliert. Die stärkste Induktion erfuhr dabei das Gen *CDKN1A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*), welches für das Protein p21 codiert. Das entsprechende Genprodukt stellt dabei einen CDK-Inhibitor dar und ist somit in der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Dabei kann p21 sowohl einen G₁/S- als auch einen G₂/M-Arrest einleiten und stellt gleichzeitig ein mögliches *Target* von p53 dar. Weiterhin wird auch die Beteiligung von p21 an Signalwegen wie der DNA-Reparatur und -Replikation sowie der Apoptose diskutiert (DUTTO *et al.*, 2015). Die konzentrationsabhängige Induktion der Genexpression um den log₂-fachen Wert von 3,2 in den defizienten sowie 4,3 in den profizienten Zellen suggeriert demnach einen Zellzyklusarrest nach Behandlung mit NaAsO₂.

Ein weiteres Proliferations-assoziiertes Gen repräsentiert *E2F1* (*E2F transcription factor 1*), welches für den gleichnamigen Transkriptionsfaktor codiert. E2F1 ist ebenso an der Kontrolle der Zellzyklusprogression beteiligt und wird selbst durch die Bindung von RB reguliert. Zur Aktivierung von E2F1 wird das gebundene RB durch Phosphorylierung abgespalten. Der freigesetzte Transkriptionsfaktor kann im Anschluss an die DNA binden und dort die Expression von Genen, die in der Zellzyklusregulation sowie der DNA-Reparatur und Apoptose beteiligt sind, regulieren (SHELDON, 2017). Die hier durchgeführten Genexpressionsanalysen konnten eine konzentrationsabhängige Beeinflussung der Transkriptionsaktivität nach Metallbehandlung in beiden untersuchten Zelllinien zeigen. Während die defizienten Zellen eine Verminderung um die Hälfte der Ausgangstranskriptmenge aufzeigten, bewirkte NaAsO₂ in den BRCA1-profizienten Zellen eine Repression um 65 % der basalen Expression. Demnach deuten die verminderten Transkriptionsraten des *E2F1*-Gens auf einen Zellzyklusarrest durch eine Metallbehandlung hin.

Eine Aktivierung der DNA-Schadensantwort durch die Einleitung eines Zellzyklusarrestes nach Arsenit-Behandlung konnte auf transkriptioneller Ebene sowie auf funktioneller Ebene bereits mehrfach gezeigt werden. So wurde eine verringerte E2F1-Transkriptionsaktivität beschrieben, die durch eine Arsen-induzierte Hemmung der RB-Phosphorylierung und somit einer beeinträchtigten Dissoziation von E2F1 begründet wurde. Dabei wurde postuliert, dass nach einer Arsen-Behandlung E2F1 an seinen eigenen Promotor bindet, die Transkription aber möglicherweise nicht fortschreitet, weil E2F1 einen heterodimeren Komplex mit pRB bildet und so dessen Transkriptionsaktivität beeinflusst (SHELDON, 2017; WANG *et al.*, 2011; MU *et al.*, 2019).

Neben den Genen, die mit der Zellzyklusregulation assoziiert sind, wurden auch Gene moduliert, die apoptotische Faktoren beeinflussen. Dabei wurden Faktoren des intrinsischen sowie des extrinsischen Apoptosewegs untersucht. Die Analysen zeigten eine konzentrationsabhängige Verminderung der Transkription von *BCL2L1* (*bcl2-like 1*) nach Arsenexposition. Die Mittelwerte der Dreifachbestimmung reichten nicht an den in dieser Arbeit als wichtig erachteten Wert einer Halbierung heran. Aufgrund der klaren Dosis-Wirkungs-Beziehung soll das Gen an dieser Stelle dennoch Berücksichtigung finden. Das anti-apoptotische *BCL2L1* gehört zur Bcl2-Proteinfamilie und ist somit an der Regulation intrinsischer Signalwege beteiligt. Ein weiteres Gen, das ebenfalls Mitglied dieser Proteinfamilie darstellt und am intrinsischen Apoptoseweg beteiligt ist, stellt *PMAIP1* (*phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*) dar. *PMAIP1* codiert für das pro-apoptotische Protein NOXA und erfuhr eine nahezu 3-fach erhöhte Genexpression nach Metallbehandlung (CORY UND ADAMS, 2002). Gleichzeitig konnte auch eine Arsen-beeinflusste Beteiligung am extrinsischen Signalweg durch eine 2-fach verstärkte Expression von *TNFRSF10B* (*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b*) nachgewiesen werden. *TNFRSF10B* codiert für den Todesrezeptor DR5, der nach Aktivierung durch Ligandenbindung eine Signalkaskade zur Induktion der Apoptose einleitet (WAJANT, 2019). Zusammengefasst deuten die Repression des anti-apoptotischen *BCL2L1* sowie die Induktion der pro-apoptotischen Gene *PMAIP1* und *TNFRSF10B* auf eine Apoptose-fördernde Wirkung durch NaAsO₂ hin, wobei sowohl der intrinsische wie auch der extrinsische Signalweg beeinflusst wurden.

Analog zu den vorherigen Erkenntnissen konnte auch die Induktion der Apoptose nach Exposition gegenüber NaAsO₂ zuvor sowohl auf Genexpressions- wie auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Dabei konnte eine Aktivierung des intrinsischen sowie des extrinsischen Apoptosewegs beobachtet werden (ROY *et al.*, 2016; MU *et al.*, 2019). Während in den meisten Zellen die Induktion der Apoptose über den p53-Signalweg vermittelt wird, konnte dies von YU *et al.* auch in p53-defizienten Zellen nachgewiesen werden. Die Einleitung dieses Zelltodmechanismus schien dabei jedoch einzigartig für das Metallion As(III). Die Aktivierung des Zelltods in Zellen, die kein funktionelles p53 exprimieren, wird häufig bei verschiedenen Chemotherapeutika beobachtet. Einen solchen p53-unabhängigen Weg beschreibt die Autorengruppe auch für As(III), wobei hier ein unabhängiger NOXA-Signalweg zur Induktion der Apoptose postuliert wurde (YU *et al.*, 2008).

Das letzte Gen dieses Clusters ist durch *VEGFA* (*vascular endothelial growth factor A*) definiert, wobei eine 2,5-fach verstärkte Expression nach Behandlung mit NaAsO₂ beobachtet wurde. Das gleichnamige Genprodukt ist ein bekannter Entzündungsmarker und fördert die Proliferation sowie Migration von Endothelzellen und die Gefäßneubildung (CAI *et al.*, 2006). Die erhöhte Transkriptionsrate lässt somit auf Arsenit-verursachte Entzündungsprozesse schließen.

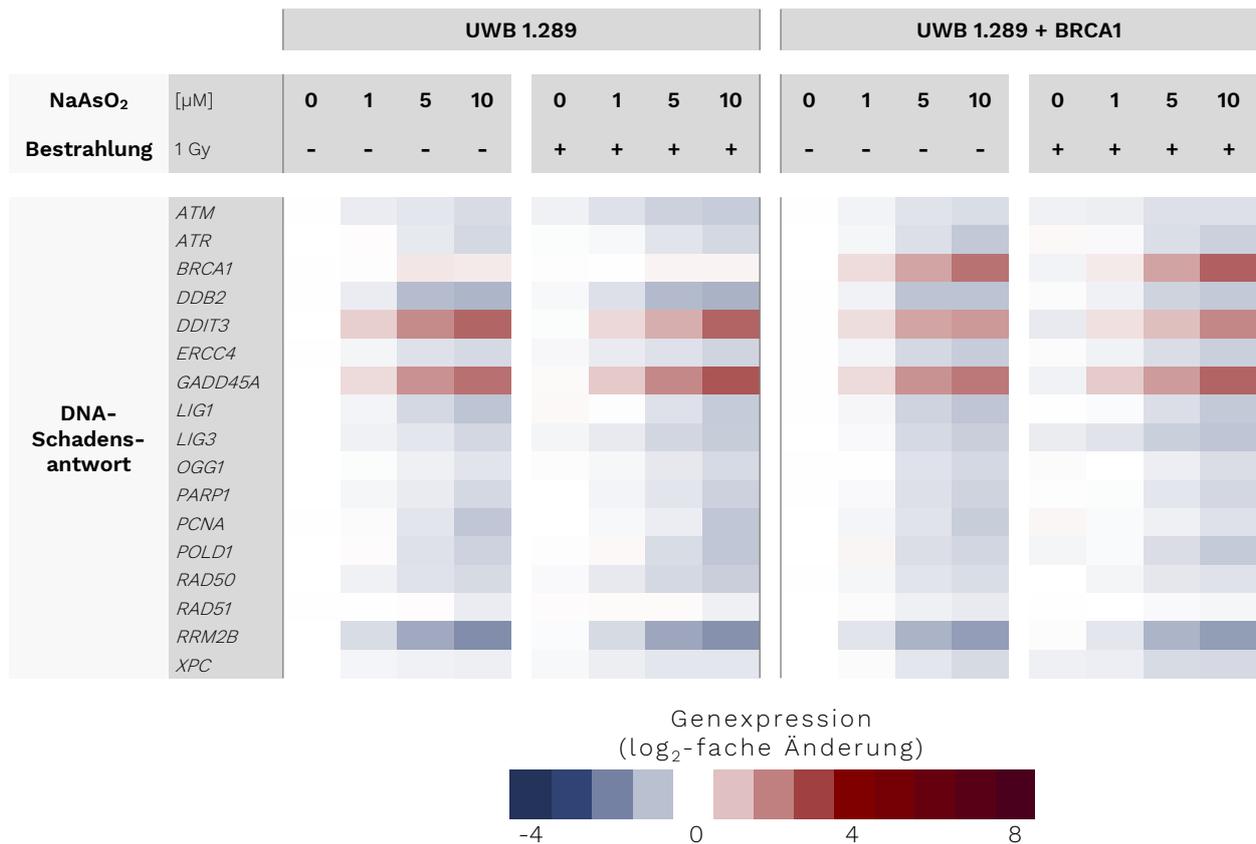


Abbildung 22: Vergleichende Expressionsprofile von Genen der DNA-Schadensantwort und -Reparatur nach Behandlung mit NaAsO₂.

UWB1.289- und UWB1.289 + BRCA1-Zellen wurden für 18 h mit NaAsO₂ vorbehandelt, wo angezeigt mit 1 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Die log₂-fache Änderungen der Genexpression wurden dabei auf die unbehandelte und nicht bestrahlte Kontrolle der jeweiligen Zelllinie normiert. Eine Rotfärbung stellt eine Induktion der Expression dar, während eine Blaufärbung für eine reprimierte Genexpression steht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

Neben den genannten Genclustern wurden auch Gene, die mit der DNA-Schadensantwort und der DNA-Reparatur assoziiert sind, untersucht. Die vergleichenden Expressionsprofile dieser Gene sind in Abbildung 22 dargestellt. Die Gegenüberstellung der Profile zeigte ein ähnliches Genexpressionsmuster der beiden Zelllinien nach Behandlung mit NaAsO₂. Zudem konnte kein Einfluss auf die Transkriptionsaktivität nach alleiniger sowie nach zusätzlicher Bestrahlung festgestellt werden. Auch diese Ergebnisse deuten demnach darauf hin, dass die beschriebenen Mechanismen der DDR nach Arsenit-Behandlung auf transkriptioneller Ebene weitestgehend unabhängig vom BRCA1-Status verlaufen.

Innerhalb dieses Clusters wurde die Expression aller Gene, mit Ausnahme des Sensorgens *GADD45A* (*growth arrest and DNA damage-inducible alpha*), *DDIT3* (*growth arrest and DNA damage inducible-protein GADD153*) sowie *BRCA1*, nach Behandlung mit NaAsO₂ reprimiert. *GADD45A* codiert für das Protein GADD45α der GADD-Familie. Es gibt als Sensorgen Rückschlüsse auf genotoxischen Stress sowie DNA-schädigendes Potential einer Noxe. Proteine dieser Familie können sowohl p53-abhängig als auch -unabhängig aktiviert werden. Sie sind,

durch ihre Interaktion mit zahlreichen Proteinen wie p21, ein entscheidender Regulator der Zellzyklusprogression (LIEBERMANN UND HOFFMAN, 2008). Neben *GADD45A* signalisiert auch *DDIT3* eine DNA-Schädigung und ist ebenso Mitglied der GADD-Familie (ZHANG *et al.*, 2009). Die Metallbehandlung löste bei beiden Genen eine konzentrationsabhängige Induktion der Expression aus, wobei die höchste eingesetzte Konzentration von 10 μ M eine etwa 5-fache (*GADD45A*) bzw. 4-fache (*DDIT3*) Erhöhung der Ausgangstranskriptmenge verursachte. Die gesteigerte Transkriptionsrate signalisiert somit eine Schädigung der DNA und lässt demnach eine genotoxische Wirkung von NaAsO_2 vermuten.

Während der mRNA-Gehalt von *BRCA1* in den UWB1.289-Zellen nach Exposition gegenüber Arsenit nahezu unverändert blieb, konnte eine konzentrationsabhängig gesteigerte Expression in den UWB1.289 + *BRCA1*-Zellen festgestellt werden. Die Ergebnisse bestätigen die *BRCA1*-Defizienz in den Wildtyp-Zellen und zeigen gleichzeitig eine deutliche Aktivität des konstitutiv exprimierten *BRCA1*-Gens in den stabil transfizierten Zellen. Die Mutation innerhalb des *BRCA1*-Gens führt somit zu dessen Funktionsverlust und infolgedessen zur *BRCA1*-Defizienz.

Alle anderen Gene dieses Genclusters wurden durch die NaAsO_2 -Behandlung in ihrer Expression gehemmt, wobei nur wenige dieser Repressionen im relevanten Bereich von ± 1 lagen. Bei den meisten Genen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Tendenz zur verminderten Expression, mit Ausnahme von *RRM2B* (*ribonucleotide reductase regulatory TP53 inducible subunit M2B*). Dabei wurden Gene, die der NER zugesprochen werden und an der Erkennung von sperrigen DNA-Läsionen beteiligt sind, beeinflusst. Neben Änderungen in der Transkription von *DDB2* (*damage-specific DNA binding protein 2*) und *XPC* (*xeroderma pigmentosum, complementation group C*) kam es auch zu einer Hemmung von *ERCC4* (*excision repair cross-complementation group 4*), *PCNA* (*proliferating cell nuclear antigen*) sowie *RRM2B*. Zudem konnte eine verminderte Expression von Genen der BER bzw. SSBR beobachtet werden, zu denen *LIG1* (*ligase 1*), *LIG3* (*ligase 3*), *OGG1* (*8-oxoguanine DNA glycosylase*) sowie *PARP1* gehören (CHRISTMANN UND KAINA, 2013; FONG *et al.*, 2013). Neben den zuvor genannten Reparaturwegen wurden auch Gene der DSBR durch Arsenit tendenziell in ihrer Transkriptionsrate reprimiert, wobei hier *ATM*, *ATR*, *RAD50* und *RAD51* zu erwähnen sind. Während die Genprodukte ATM und ATR an der Schadenserkenkung von DSB beteiligt sind, stellt Rad50 Teil des MRN-Komplexes und Rad51 Baustein des in der HR gebildeten Nukleoproteinfilaments dar (OHNISHI *et al.*, 2009).

Zusammengenommen verdeutlichen die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse, im Hinblick auf das Gencluster der DDR sowie DNA-Reparatur, eine auftretende DNA-Schädigung durch NaAsO_2 . Gleichzeitig verursachte die Metallbehandlung eine Beeinträchtigung der verschiedenen Reparaturwege, was möglicherweise die genotoxischen Effekte erklären könnte.

Eine mögliche Ursache der beobachteten Repression des mit der DDR assoziierten Gencluster, könnte mit epigenetischen Mechanismen begründet sein. Das Gebiet der Epigenetik beschäftigt

sich mit vererbaren Informationen, die durch reversible biochemische Modifikationen der DNA oder der Chromatinstruktur, ohne Veränderungen der DNA-Sequenz, manifestiert werden. Der genetische Code wird somit epigenetisch reguliert und steht in Abhängigkeit mit Umweltbedingten Stimuli, denen ein Individuum ausgesetzt ist (WEINHOLD, 2006). Es gibt Hinweise, dass Arsen globale, genomweite DNA-Hypomethylierungen, Gen-spezifische DNA-Hypermethylierung sowie veränderte Histonmodifikationen verursacht (ARITA UND COSTA, 2009).

Die DNA-Methylierung stellt die häufigste und am besten untersuchte epigenetische Modifikation dar. Dabei erfolgt die kovalente Addition einer Methylgruppe an die 5'-Position des Cytosins unter Bildung von 5-Methylcytosin (5-mC). DNMTs sind dabei für die Übertragung der Methylgruppe aus dem Cofaktor SAM verantwortlich. Die DNA-Methylierung kommt überwiegend in Cytosin-reichen Genregionen vor, die als CpG-Inseln bezeichnet werden. Eine Methylierung verschiedener Sequenzabschnitte innerhalb von Promotorregionen stellt somit einen wichtigen Regulationsmechanismus der Genaktivität dar. Hypermethylierte Promotorregionen erschweren die Bindung von Transkriptionsfaktoren an entsprechende Sequenzen und verhindern die Transkription eines Zielgens. Ein weiterer Mechanismus epigenetischen Ursprungs stellen Histonmodifikationen dar. Dazu gehören die Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Methylierung von Histonen, welche eine Lockerung der Heterochromatinstruktur bewirken und so die DNA-Kondensation und die damit einhergehende Zugänglichkeit für die Transkriptionsmaschinerie regulieren (CHRISTMANN UND KAINA, 2017).

Bislang wurden drei verschiedene Mechanismen beschrieben, inwiefern Arsen Einfluss auf die DNA-Methylierung nehmen kann. So konnte Arsen die Aktivität und Expression von DNMT, dem Enzym, das die DNA-Methylierung reguliert, verändern. Des Weiteren verringerte eine chronische Arsenexposition die Verfügbarkeit des Methyl donors SAM, aufgrund seiner Notwendigkeit im Arsenmetabolismus. Beide Mechanismen resultierten dabei in einem Verlust der globalen DNA-Methylierung. Ferner war Arsen in der Lage, Promotor-spezifische DNA-Methylierungsmuster von Tumorsuppressorgenen wie p53 zu verändern, indem das Halbmetall die Verfügbarkeit sowie Aktivität der am CpG-Methylierungsprozess beteiligten Enzyme beeinflusste. Die Arsenbedingte Beeinträchtigung der Histonmodifikation wurde in der direkten Interaktion mit Histonmethyltransferasen (HMT), Histonacetyltransferasen (HAT), Histondeacetyltransferasen (HDAC) und Kinasen beschrieben. Dabei wurde eine Inhibierung der HDAC-Aktivität beobachtet, was in einer erhöhten globalen Histonacetylierung resultierte. Im Gegensatz dazu konnte jedoch auch eine direkte Bindung von Arsen an HATs festgestellt werden, die in einer verminderten Acetylierung der Histone mündete (MEAKIN *et al.*, 2017; ARITA UND COSTA, 2009; TAM *et al.*, 2020).

So konnte beispielsweise eine Arsen-induzierte globale Hypomethylierung sowie Promotor-Hypomethylierung des Brustkrebs-assoziierten Gens *ESR1* (*estrogen receptor α*) beobachtet werden, welche mit einer gesteigerten Expression verbunden war. Des Weiteren konnten bereits

Gen-spezifische Hypermethylierungen von verschiedenen DNA-Reparaturgenen nachgewiesen werden, welche in einer supprimierten Expression mündeten. Zudem wurde beispielgebend eine direkte Verbindung der durch Arsenit-Verursachten Erhöhung der Modifikation H3K27Me3 und einer inhibierten Transkription von Tumorsuppressorgenen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind, beobachtet. Gleichzeitig wurde eine Beeinflussung von H2BK120Ub und H4K16Ac festgestellt, wodurch die Zugänglichkeit des Chromatins für DNA-Reparaturenzyme beeinträchtigt wurde (TAM *et al.*, 2020).

In Bezug auf die hier vorliegende reprimierte Expression von DDR-assoziierten Genen könnte Arsenit spezifische Hypermethylierungen in Promotorregionen von DNA-Reparaturproteinen verursachen, die in einer Inaktivierung der entsprechenden Genexpression resultierten. Weiterhin scheint eine Arsenit-Exposition zu einer kondensierten Chromatinstruktur zu führen, indem Histon-modifizierende und Chromatin-dekompaktierende Enzyme beeinträchtigt werden. Zusammengenommen stören die Chromatinverdichtung und das veränderte DNA-Methylierungsmuster wichtige epigenetische Mechanismen, was zur Minderung der Effizienz von wichtigen Reparaturmechanismen führt und so die Stabilität des Genoms beeinträchtigt.

Ein weiterer möglicher Mechanismus zur Arsenit-vermittelten Repression DDR-assoziiierter Gene könnte mit der Einleitung der Seneszenz begründet werden. Bei der Seneszenz handelt es sich um einen irreversiblen Arrest des Zellzyklus, welcher durch einen irreparablen Schaden oder Stress bei proliferierenden Zellen induziert werden kann. Dieser Mechanismus kann als Antwort auf verschiedenste Stimuli, wie einer Telomer-Dysfunktion, oxidativem Stress, aktiven Onkogenen sowie DNA-Schäden, auftreten. Dabei wird als Reaktion auf Stress die DDR initiiert, welche wiederum zur Aktivierung von p53- und p16-Signalwegen und somit zur Einleitung und Aufrechterhaltung des Zellzyklusarrestes führt. Die Unfähigkeit, DNA-Schäden zu reparieren, löst eine persistierende DDR und somit eine Hochregulation von p16 und p21 aus. Dies wiederum resultiert in einer Inhibition des Komplexes aus Cyclin D und CDK4/6 und somit einer verminderten Phosphorylierung von RB (SHMULEVICH UND KRIZHANOVSKY, 2021).

COLLIN *et al.* konnten 2018 eine Repression verschiedener DNA-Reparaturgene beobachten, welche mit der Einleitung der Seneszenz einherging. Die Arbeitsgruppe beschrieb die Regulation über den E2F/RB-Signalweg, wobei RB und E2F bekannte Faktoren der zellulären Seneszenz darstellen. Es konnte demnach eine beeinträchtigte Phosphorylierung von RB und nachfolgend verminderter E2F-Aktivität bei der Vermittlung der Repression von DNA-Reparaturgenen während der Seneszenz nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Funktionsverlust bereits eines einzelnen DNA-Reparaturgens Merkmale der vorzeitigen Seneszenz fördert. Dabei stellte die Autorengruppe jedoch gleichzeitig fest, dass die Repression zahlreicher DNA-Reparaturgene als Reaktion auf den Verlust eines einzelnen DNA-Reparaturgens dem p53/p21/RB-Signalweg folgte. COLLIN *et al.* beobachteten weiterhin eine

verminderte Expression von DNA-Reparaturproteinen insbesondere nach ROS-induzierter Seneszenz. Demnach postulierten sie, dass die verminderte Fähigkeit der Zellen zur DNA-Reparatur in diesen Systemen zur Akkumulation von DNA-Schäden beiträgt, die beispielsweise durch kollabierte Replikationsgabeln oder oxidativen Stress initiiert werden (COLLIN *et al.*, 2018). Ein erhöhtes ROS-Level ist neben der replikativen Seneszenz auch mit der Schadens- sowie mit der Onkogen-induzierten Seneszenz assoziiert. Dabei scheint es eine Verbindung zwischen ROS und dem Transkriptionsfaktor p16 zu geben. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ROS die Demethylierung in der Promotorregion von p16 induziert, was wiederum in einer erhöhten Expression und gleichzeitig einer Seneszenz resultierte (SHMULEVICH UND KRIZHANOVSKY, 2021).

Die Induktion der Seneszenz durch Arsen konnte zuvor bereits gezeigt werden. Dabei wurde neben dem klassischen p53/p21/Rb-Signalweg auch eine Weiterleitung über p16 beschrieben. Während die p53/p21/Rb-Kaskade dabei durch JNK (*Jun N-terminal kinase*) reguliert wurde, konnte eine davon abgekoppelte p38 MAPK (*mitogen-activated protein*) -abhängige Einleitung der Seneszenz durch p16 beobachtet werden (NINOMIYA *et al.*, 2014; CHUNG *et al.*, 2020). In Ergänzung dazu ist eine Aktivierung der MAPK-Kaskaden, über eine EGFR (*epidermal growth factor receptor*) -abhängige Signaltransduktion, durch Arsen-verursachten oxidativen Stress bereits bekannt. Dieser Signalweg besteht unter anderen aus JNK sowie p38, welche durch umweltbedingte Stimuli aktiviert werden (KUMAGAI UND SUMI, 2007).

Unter Anbetracht dieser Wissensstände kann die reprimierte Expression der DNA-Reparaturgene durch NaAsO₂ auch auf die Induktion der Seneszenz zurückgeführt werden. Die Signalisierung über den oftmals beschriebenen und vermutlich vorherrschenden p53/p21/Rb-Weg scheint in den eingesetzten UWB1.289- sowie UWB1.289 + BRCA1-Zellen, aufgrund der vorhandenen *Frameshift*-Mutation und einer damit verbundenen p21-Inaktivität, ausgeschlossen. Die Weiterleitung könnte demnach beispielsweise über die p16/Rb-Kaskade erfolgen, was durch die Repression des *E2F1*-Gens bekräftigt wird.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die transkriptionelle Regulation DDR-assoziiierter Gene nach Arsenit-Schädigung unabhängig vom BRCA1-Status stattfindet. Hierbei rief NaAsO₂ insbesondere in den Genclustern der oxidativen Stressantwort, der Zellzyklusregulation sowie der Apoptose eine starke Veränderung hervor. Folglich war abzuleiten, dass die UWB1.289- sowie UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach Aufnahme von Arsenit geschädigt wurden und bereits Konzentrationen im niedrigen mikromolaren Bereich eine hohe Zytotoxizität aufweisen. Insbesondere nach Inkubation mit der höchsten eingesetzten Konzentration konnte ein vorherrschender oxidativer Stress vermutet werden, worauf die Zellen den Zellzyklusarrest und die Apoptose auf transkriptioneller Ebene einleiten. Gleichzeitig konnte eine beeinträchtigte DNA-Reparatur vermutet werden, welche möglicherweise auf seneszierende Zellen zurückzuführen ist (Abbildung 23).

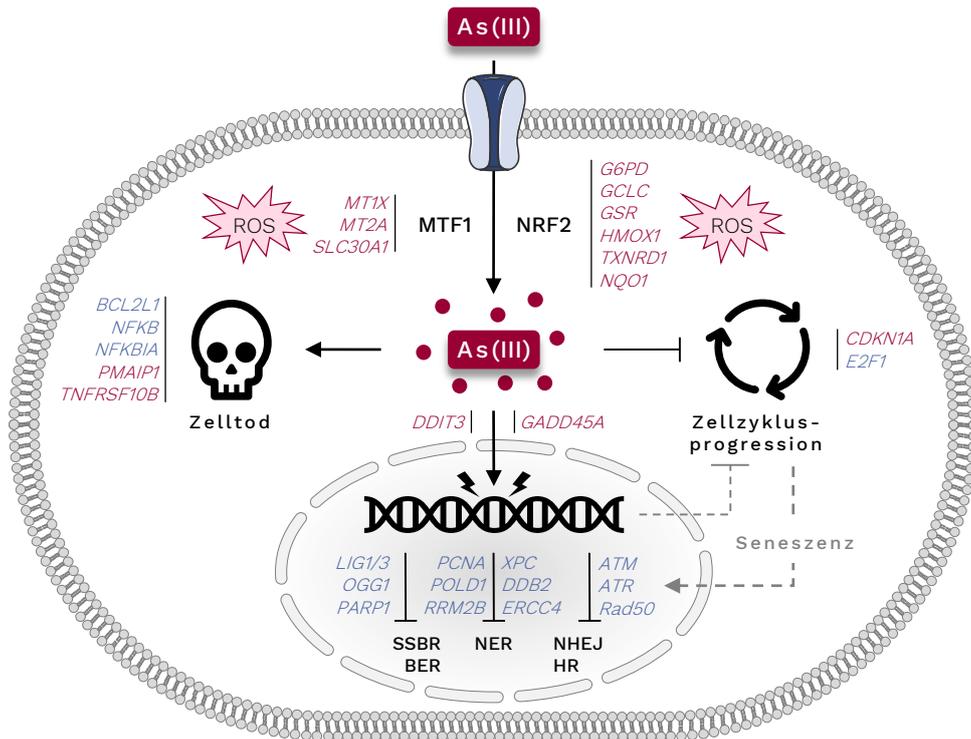


Abbildung 23: Postulierter Einfluss von Arsenit auf das Genexpressionsprofil.

Die Abbildung zeigt den aus den Hochdurchsatz RT-qPCR postulierten Einfluss von NaAsO_2 auf das Genexpressionsprofil. Dabei sind verstärkt exprimierte Gene in rot dargestellt, während blau abgebildete Gene eine verminderte Transkription erfuhren. Die Untersuchungen ließen auf eine zelluläre Akkumulation von Arsenit und einen damit einhergehenden oxidativen Stress schließen. Dieser verursachte die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren MTF1 sowie NRF2, welche durch die gesteigerte Transkriptionsrate der aufgeführten Gene postulierten wurde. Zudem konnten eine DNA-Schädigung, eine Beeinflussung der Zellzyklusprogression sowie eine Induktion des programmierten Zelltods vermutet werden. Des Weiteren wurde eine Repression DNA-Schadensantwort-assoziiierter Gene durch das Halbmetall beobachtet. Ein möglicher Zusammenhang könnte aus einer anhaltenden DNA-Schädigung resultieren, die in einem andauernden Zellzyklusarrest und somit einer Seneszenz mündet. Eine solche zelluläre Seneszenz geht häufig mit einer Repression von DNA-Reparaturgenen einher.

5.1.4 EINFLUSS VON NaAsO_2 AUF DIE ZELLYKLUSSPHASENVERTEILUNG

Die Genexpressionsprofile der isolierten Arsenit-Behandlung sowie der Co-Exposition deuteten in beiden Zelllinien auf einen Zellzyklusarrest hin. Um die dabei erhaltenen Ergebnisse auf funktioneller Ebene zu verifizieren, wurde im Anschluss die Zellzyklusphasenverteilung in UWB1.289- sowie UWB1.289 + BRCA1-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Da die Intensität des eingesetzten DNA-interkalierenden Farbstoffes DAPI mit der DNA-Menge korreliert und in der G_2/M -Phase der doppelte DNA-Gehalt im Vergleich zur G_1 -Phase vorliegt, konnte zwischen den unterschiedlichen Zellzyklusphasen differenziert werden.

Zur Bestimmung der Zellzyklusphasenverteilung wurden die Zellen 18 h mit NaAsO_2 vorbehandelt, im Falle der bestrahlten Proben und der Co-Exposition mit 1 Gy bestrahlt und anschließend für 8 h nachinkubiert. Für die nicht bestrahlten Zellen ergab sich somit eine

Gesamtinkubationszeit von 26 h. Die Experimente wurden für beiden Zelllinien in einem simultanen Versuchsaufbau angesetzt.

Abbildung 24 präsentiert die Zellzyklusphasenverteilung der UWB1.289- und UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach der Behandlung mit NaAsO₂ sowie nach zusätzlicher Bestrahlung mit 1 Gy. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorherigen Untersuchungen konnte erstmalig ein klarer Unterschied zwischen den beiden Zelllinien beobachtet werden. Dabei zeigte sowohl die basale wie auch die Schadens-induzierte Zellzyklusphasenverteilung eine Diskrepanz. Analog zu den zuvor erhaltenen Ergebnissen führte eine alleinige Bestrahlung zu keinerlei Effekten. Auch bei der Co-Exposition konnten, im Einklang zu den zuvor durchgeführt Analysen, keine verstärkenden Effekte zur isolierten Metallbehandlung identifiziert werden.

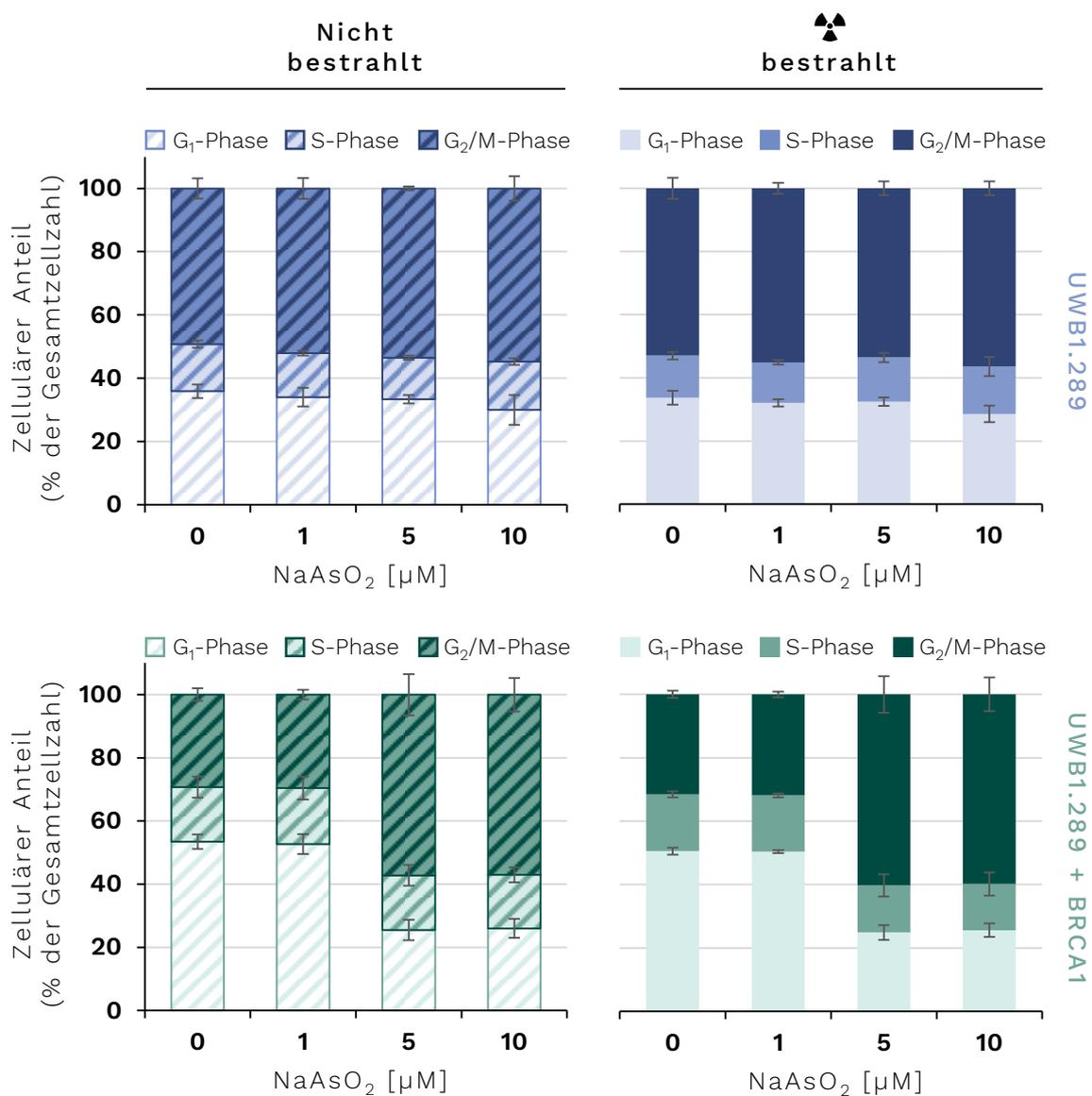


Abbildung 24: Vergleichende Zellzyklusphasenverteilung der UWB1.289- sowie UWB1.289 + BRCA1-Zellen. Beide Zelllinien wurden für 18 h mit NaAsO₂ vorbehandelt, wo angezeigt mit 1 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

Bei Betrachtung der basalen Zellzyklusphasenverteilung (0 μM) der defizienten Zellen konnte die höchste Population, mit fast 50 %, in der G₂/M-Phase charakterisiert werden. 35 % der Zellen befanden sich dabei in der G₁-Phase, während die S-Phase mit lediglich 15 % den geringsten zellulären Anteil ausmachte. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den profizienten Zellen unter basalen Bedingungen ein etwas anderes Bild. Der höchste zelluläre Anteil mit 53 %, konnte hierbei in der G₁-Phase identifiziert werden. Lediglich die Population in der S-Phase ließ mit 17 % ein ähnliches Maß verglichen mit den defizienten Zellen verzeichnen, wohingegen 30 % der Zellen in der G₂/M-Phase detektiert wurden. Der Vergleich der basalen Zellzyklusphasenverteilung der beiden Zelllinien verdeutlichte demnach eine erhöhte Population der BRCA1-profizienten Zellen in der G₁-Phase.

Auch nach NaAsO₂-Behandlung sowie nach zusätzlicher Bestrahlung zeigte sich eine unterschiedliche Verteilung zwischen den beiden Zelllinien. Während die UWB1.289-Zellen über den gesamten Konzentrationsbereich weitestgehend die basale Phasenverteilung beibehielten, zeichnete sich in den profizienten Zellen ein deutlicher G₂/M-Arrest ab, der bei leicht zytotoxischen Konzentrationen von 5 μM ersichtlich wurde. Dabei konnte eine Akkumulation der UWB1.289 + BRCA1 in der G₂/M-Phase auf bis zu 57 % und eine damit verbundene Abnahme des zellulären Anteils in der G₁-Phase auf 26 % verzeichnet werden. Die Population in der S-Phase blieb mit 17 % weitestgehend unverändert. NaAsO₂ induzierte folglich einen G₂/M-Arrest in den BRCA1-profizienten Zellen, was gleichzeitig auf eine Schädigung der DNA hindeutete. Die BRCA1-defizienten Zellen hingegen zeigten keine Zellzykluskontrolle, was eine direkte Beteiligung von BRCA1 bei den *Checkpoints* beschreibt.

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte möglicherweise zeitabhängig auftraten, wurde zusätzlich eine Zeitreihe der nicht behandelten, der mit 5 μM NaAsO₂- oder 1 Gy- behandelten sowie der Co-Exposition durchgeführt. Dafür wurde die Zellzyklusphasenverteilung 24, 48, 72 sowie 96 h nach der entsprechenden Behandlung bestimmt. Die Experimente wurden für beide Zelllinien in einem simultanen Versuchsaufbau angesetzt.

Abbildung 25 stellt dabei zunächst die Behandlung mit der leicht zytotoxischen Konzentration von 5 μM dar, wobei jeweils die nicht behandelten Kontrollen mitaufgeführt wurden. Die basale Zellzyklusphasenverteilung zeigte zu Beginn der Analysen (24 h) ähnliche zelluläre Anteile im Vergleich zu den vorherigen Untersuchungen. Während die Population der defizienten Zellen in 42 % G₁-Phase, 14 % S-Phase und 44 % G₂/M-Phase aufgeteilt war, wiesen die profizienten Zellen eine Verteilung von 60 % G₁-Phase, 11 % S-Phase sowie 29 % G₂/M-Phase auf. Die beobachtete Kinetik der nicht behandelten UWB1.289-Zellen verdeutlichte eine weitestgehend konstante Phasenverteilung. Auch die Population der UWB1.289 + BRCA1-Zellen ließ, unter Anbetracht der Standardabweichungen, eine nahezu unveränderte Zellzyklusprogression verzeichnen.

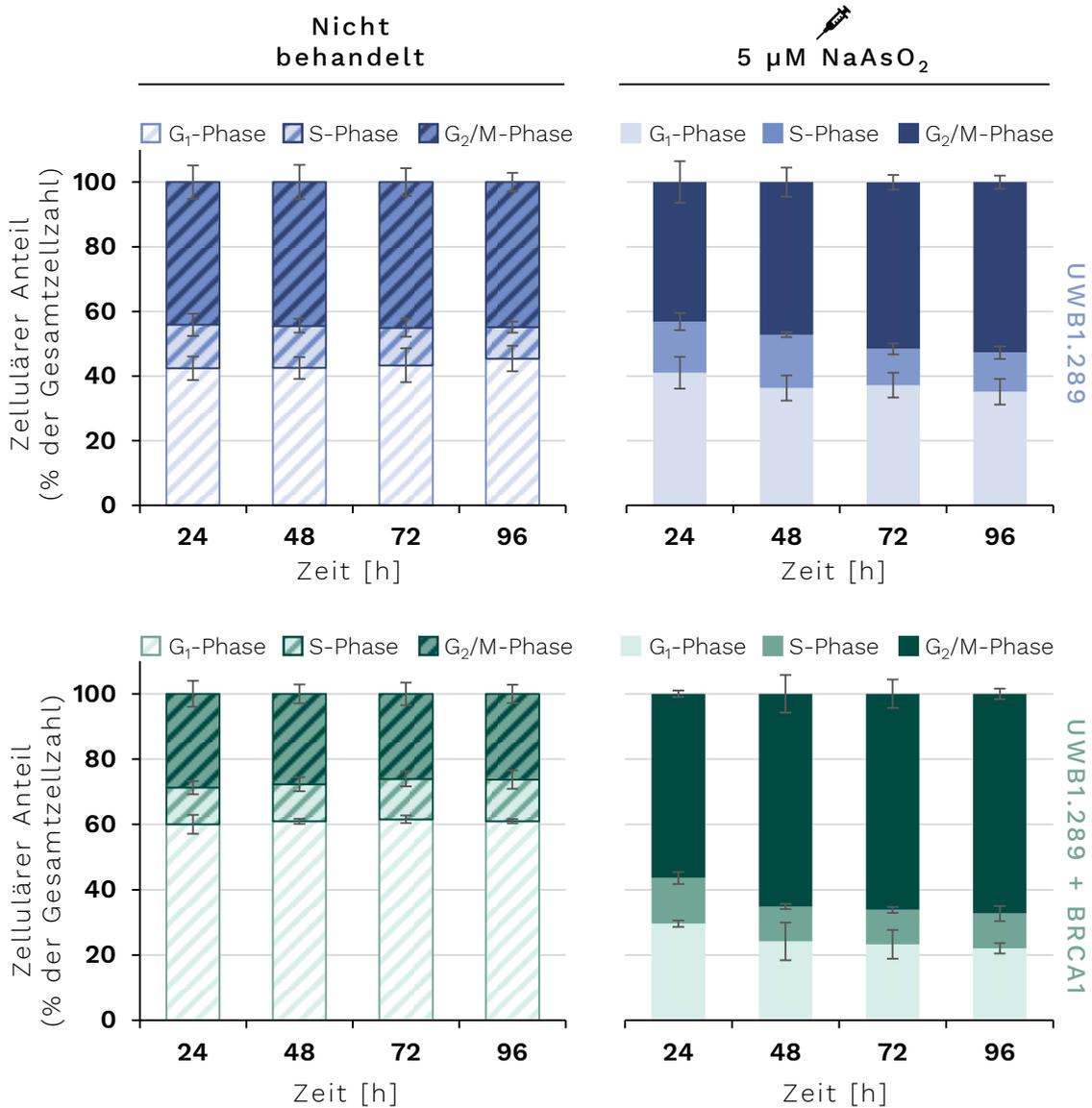


Abbildung 25: Vergleichende Darstellung der zeitabhängigen Zellzyklusphasenverteilung nach Inkubation mit 5 µM NaAsO₂.

UWB1.289- und UWB1.289 + BRCA1-Zellen wurden mit 5 µM NaAsO₂ vorbehandelt und für 24, 48, 72 sowie 96 h nachinkubiert. Neben den Arsen-behandelten Proben (rechts – ausgefüllt) ist zusätzlich auch die Kinetik der unbehandelten Zellen (links – straffiert) mitaufgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

Die Exposition gegenüber 5 µM NaAsO₂ löste in den UWB1.289-Zellen keine signifikante Änderung der Zellzyklusphasenverteilung im Vergleich zum basalen Level auf. Folglich lassen auch diese Ergebnisse auf einen Verlust der Zellzykluskontrolle durch eine BRCA1-Defizienz schließen. Dementgegen zeigte die UWB1.289 + BRCA1-Zelllinie bereits nach 24 h eine Akkumulation der Zellen in der G₂/M-Phase. Während der zelluläre Anteil der G₂/M-Zellen von 29 % auf 56 % stieg, nahm die Population in der G₁-Phase von 60 % auf 29 % ab. Die weitere Kinetik blieb in einem ähnlichen Bereich, was einen anhaltenden G₂/M-Arrest durch NaAsO₂ vermuten lässt. Dieser persistierende Zellzyklusarrest könnte möglicherweise in einer Seneszenz der Zellen resultieren.

Abbildung 26 zeigt die zeitabhängige Zellzyklusphasenverteilung nach Bestrahlung mit 1 Gy, wobei hier die nicht behandelte Kontrolle erneut zur besseren Vergleichbarkeit mitaufgeführt wurde. Auch nach Bestrahlung mit IR konnte, analog zu den NaAsO₂-Experimenten, keine veränderte Zellzyklusphasenverteilung im Vergleich zum basalen Level in den UWB1.289-Zellen beobachtet werden. Dementgegen zeigte sich in den UWB1.289 + BRCA1 ein von den NaAsO₂-Untersuchungen abweichendes Muster. Dabei konnte, unter Berücksichtigung der Standardabweichungen sowie dem zusätzlichen Vergleich der nicht behandelten Kontrolle, keine Veränderung der Zellzyklusphasenverteilung festgestellt werden.

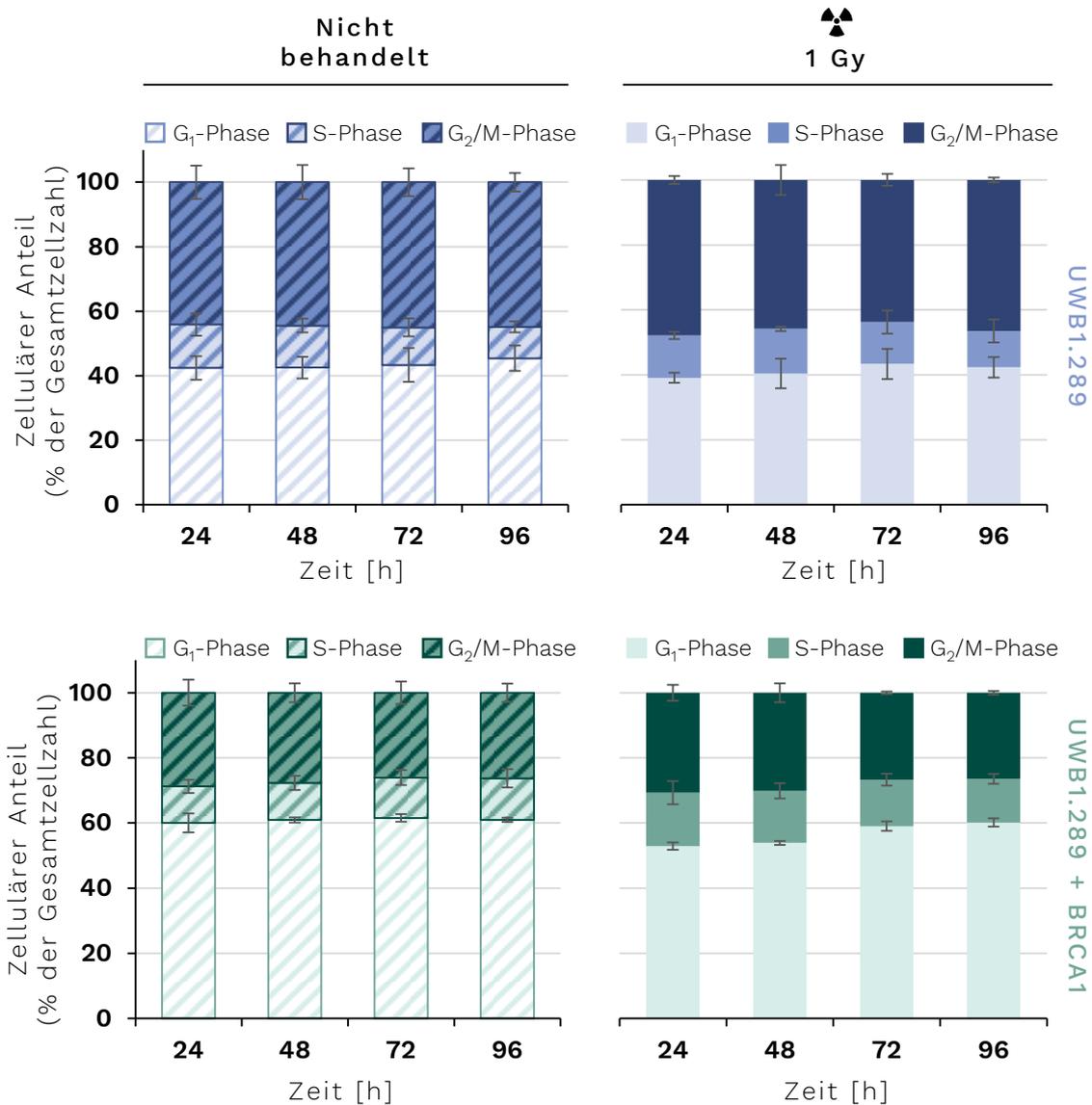


Abbildung 26: Vergleichende Darstellung der zeitabhängigen Zellzyklusphasenverteilung nach Bestrahlung mit 1 Gy.

UWB1.289- und UWB1.289 + BRCA1-Zellen wurden mit 1 Gy bestrahlt und für 24, 48, 72 sowie 96 h nachinkubiert. Neben bestrahlten Proben (rechts – ausgefüllt) ist zusätzlich auch die Kinetik der unbehandelten Zellen (links – straffiert) mitaufgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

Neben den alleinigen Behandlungen mit 5 μM NaAsO₂ sowie 1 Gy IR wurde zusätzlich deren Co-Exposition analysiert, welche in Abbildung 27 abgebildet ist. Auch hier wurde die nicht behandelte Kontrolle zur besseren Vergleichbarkeit mitgeführt. Die basale Phasenverteilung sowie deren Kinetik zeigte dabei ein ähnliches Muster im Vergleich zu den vorherigen Analysen, weshalb an dieser Stelle nicht detaillierter darauf eingegangen wird. Im Einklang mit den zuvor erhaltenen Ergebnissen implizieren auch diese Daten eine unveränderte Phasenverteilung in den defizienten Zellen, was die fehlende Zellzykluskontrolle erneut bestätigt. Auch die profiziente Zelllinie ließ eine gleichartige Zellzyklusphasenverteilung im Vergleich zur alleinigen Arsenit-Behandlung verzeichnen. Hierbei verursachte die Co-Exposition eine Akkumulation der G₂/M-Zellen auf 64 % sowie eine Abnahme der G₁-Population auf 21 %, welche über den gesamten Zeitraum konstant blieb. Folglich deuten die Ergebnisse auf einen andauernden G₂/M-Arrest nach Kombinationsbehandlung mit NaAsO₂ sowie IR hin, wobei dieser vermutlich vorherrschend durch das Halbmetall ausgelöst wurde. Analog zu der alleinigen Arsenit-Exposition könnte auch hier der anhaltende Zellzyklusarrest auf eine Seneszenz der Zellen hindeuten.

Zusammenfassend implizierten die basalen Bedingungen eine unterschiedliche Zellzyklusphasenverteilung zwischen den beiden Zelllinien, wobei die BRCA1-profiziente Zelllinie im Vergleich zu den defizienten Zellen eine erhöhte Population in der G₁-Phase aufwies.

Die Funktion von BRCA1 in der basalen Regulation des G₁/S-*Checkpoints* konnte bereits zuvor identifiziert werden. Dabei verursachte eine BRCA1-Überexpression einen G₁-Arrest, indem BRCA1 an hypophosphoryliertes RB bindet (APRELIKOVA *et al.*, 1999). Außerdem konnte eine Inhibierung der CDK2-Aktivität durch eine BRCA1-Überexpression bereits beobachtet werden, wobei die Kinase für die Phosphorylierung von RB verantwortlich ist (MACLACHLAN *et al.*, 2000). Die beeinträchtigte CDK2-Aktivität könnte auf den CDK-Inhibitor p27 zurückgeführt werden (FUNK, 2001), welcher durch BRCA1 verstärkt exprimiert wird (WILLIAMSON *et al.*, 2002). Sowohl die Interaktion wie auch die Inhibierung der CDK2-Aktivität verhinderte somit die Phosphorylierung von RB, wodurch der Transkriptionsfaktor E2F nicht abgelöst und die Translokation in den Nukleus verhindert wurde. Infolgedessen fand keine Transkription von Genen der S-Phase statt. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Komplex aus RB und BRCA1 Histondeacetylasen rekrutierte, was ebenfalls in einer gehemmten Transkription mündete (DENG, 2006).

Die weiteren Ergebnisse zeigten keinerlei Zellzykluskontrolle innerhalb der BRCA1-defizienten UWB1.289-Zellen, weder in den konzentrationsabhängigen noch den zeitabhängigen Untersuchungen, sowie unabhängig von der Behandlungsart. Dementgegen konnte in den BRCA1-profizienten Zellen eine deutliche Regulation der Zellzyklusprogression nach Inkubation mit NaAsO₂ sowie nach Co-Exposition beobachtet werden. So führten schon leicht zytotoxische Konzentrationen (5 μM) zu einem deutlichen und andauernden G₂/M-Arrest. Hierbei gilt jedoch zu beachten, dass die durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchungen keine

Unterscheidung zwischen einem G₂- und einem M-Arrest ermöglichten. Die isolierte Bestrahlung mit 1 Gy wiederum ließ keine signifikant veränderte Zellzyklusphasenverteilung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verzeichnen.

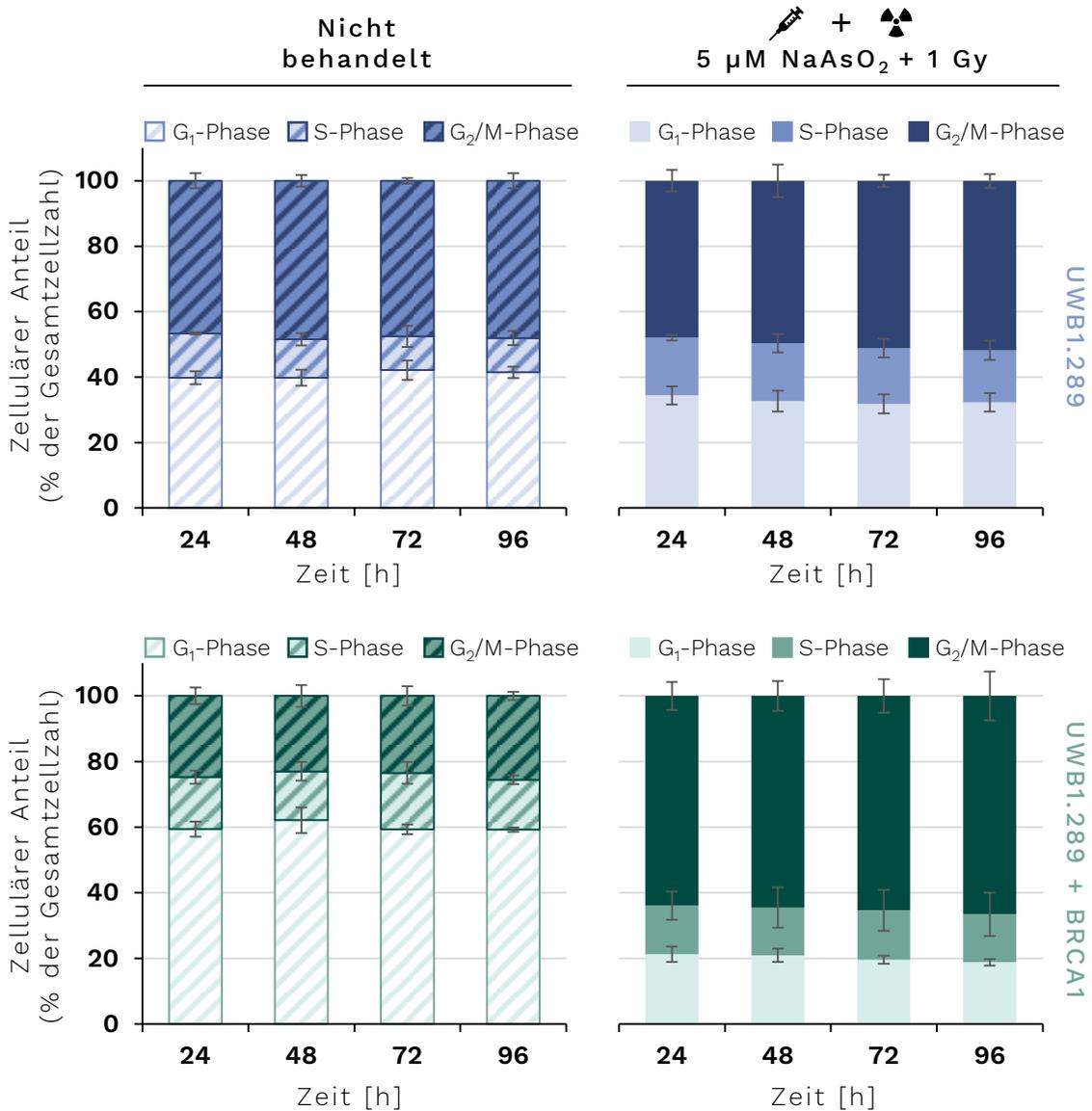


Abbildung 27: Vergleichende Darstellung der zeitabhängigen Zellzyklusphasenverteilung nach Co-Exposition von 5 µM NaAsO₂ sowie 1 Gy-Bestrahlung.

UWB1.289- und UWB1.289 + BRCA1-Zellen wurden für 18 h mit NaAsO₂ vorbehandelt, wo angezeigt mit 1 Gy bestrahlt und für 24, 48, 72 sowie 96 h nachinkubiert. Neben den behandelten Proben (rechts – ausgefüllt) ist zusätzlich auch die Kinetik der unbehandelten Zellen (links – straffiert) mitaufgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte demnach erstmalig die direkte Beteiligung von BRCA1 an der Kontrolle der Zellzyklusregulation auch nach Schädigung durch Arsen-Exposition nachgewiesen werden. Vorausgegangene Studien konnten lediglich die regulierende Funktion von BRCA1 in der Zellzyklusprogression nach IR-Schädigung beschreiben.

So konnten DELORUSSO *et al.* bereits die fehlende Regulation des Intra-S- sowie G₂/M-*Checkpoints* nach IR-Schädigung in den hier verwendeten BRCA1-defizienten UWB1.289-Zellen zeigen. Dabei konnte die Arbeitsgruppe eine Abnahme der Population in der S-Phase sowie eine deutlich erhöhte Anzahl an mitotischen Zellen im Vergleich zu den G₂-arrestierten Zellen nach Bestrahlung mit 10 Gy beobachten. Dementgegen zeigten die UWB1.289 + BRCA1-Zellen eine deutliche Zellzykluskontrolle, die sich in einem S-Phasenarrest 15 h nach der Bestrahlung sowie einem G₂/M-Arrest 24 h Post-Exposition bemerkbar machte (DELLORUSSO *et al.*, 2007). Auch XU *et al.* postulierten eine Aufhebung der Zellzykluskontrolle in BRCA1- sowie p53-defizienten Zellen nach IR. Dabei nutzten sie die Brustkrebszelllinie HCC1937, die ähnliche molekulare Eigenschaften im Vergleich zur UWB1.289-Zelllinie aufweist und daher häufig als Vergleichszelllinie eingesetzt wird. Die Autorengruppe beschrieb in ihrer Studie eine fehlende Regulation des Intra-S- (5 – 20 Gy) sowie des G₂/M-*Checkpoints* (6 Gy) nach IR. Gleichzeitig beobachteten sie, analog zu DELORUSSO *et al.*, die Wiederherstellung der Zellzykluskontrolle durch eine transiente Transfektion von *BRCA1* in die HCC1937-Zellen. Demnach bestätigten sie die Rolle von BRCA1 in der Regulation des Intra-S- sowie G₂/M-Kontrollpunktes nach IR-induzierter Schädigung (XU *et al.*, 2001A). Auch YARDEN *et al.* untersuchten den Einfluss von BRCA1 in der Regulation des G₂/M-Kontrollpunktes in HCC1937-Zellen nach IR. Die Arbeitsgruppe zeigte dabei konvergierende Ergebnisse zu den bereits beschriebenen Studien. Zusätzlich verwendeten sie verschiedene Kontroll-Zelllinien, wobei ein deutlicher G₁/S-Arrest in p53- sowie BRCA1-profizienten Zellen nach Bestrahlung mit 10 Gy beobachtet werden konnte (YARDEN *et al.*, 2002).

Während die zuvor aufgeführten Studien einen Zellzyklusarrest nach IR in BRCA1-profizienten Zellen postulierten, zeigte sich bei den hier durchgeführten Untersuchungen keinerlei Zellzyklusstopp nach Bestrahlung. Dies kann vermutlich auf die unterschiedlichen Bestrahlungsintensitäten sowie Fixierungszeitpunkte zurückgeführt werden, die zur Beurteilung der Zellzyklusphasenverteilung angewandt wurden. So wurde beispielsweise in der hier vorliegenden Arbeit lediglich eine Intensität von 1 Gy eingesetzt, während die aufgeführten Forschungsarbeiten zwischen 5 Gy und 20 Gy wählten (DELLORUSSO *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2001A; YARDEN *et al.*, 2002). Eine weitere Möglichkeit besteht in einer verfehlten Detektion des in den UWB1.289 + BRCA1-Zellen potentiell auftretenden Arrestes. In der hier vorliegenden Arbeit stellte der früheste untersuchte Zeitpunkt die 8-stündige Nachinkubation in den konzentrationsabhängigen Analysen dar (Abbildung 24). Die zeitabhängigen Experimente wiederum behandelten den Zeitraum zwischen 24 h und 96 h (Abbildung 26). Dabei wäre denkbar, dass bis zum Zeitpunkt von 8 h die induzierten Schäden bereits repariert wurden, sodass keine Notwendigkeit eines Zellzyklusarrestes mehr bestand. Weiterhin wäre möglich, dass ein Zellzyklusarrest in dem Zeitraum zwischen 8 h und 24 h eintrat und daher in den durchgeführten Analysen nicht detektiert werden konnte. Diese Vermutung wird durch die Analysen von YIH *et al.* bekräftigt, die eine starke Zeitabhängigkeit der prozentualen G₂/M-

Population nach Bestrahlung mit 10 Gy beobachteten. Dabei stieg die Anzahl der G₂/M-Zellen erst nach 8 h deutlich an, erreichte nach 11 – 14 h das Maximum und fiel allmählich auf den Ausgangswert bei 22 h zurück (Yin *et al.*, 2005). Ähnliche Ergebnisse publizierten auch Ho *et al.*, die im Zeitraum von 6 – 12 h nach Bestrahlung mit 4 Gy IR eine Zunahme der G₂/M-Population beobachteten, welche nach etwa 24 h wieder dem Kontrollniveau entsprach (Ho *et al.*, 2009).

Neben dem zuvor genannten S-Phasen- sowie G₂-Arrest konnte auch ein Zellzyklusstopp in der G₁-Phase nach IR bereits beschrieben werden. Dabei verursachte die Bestrahlung mit 4 Gy eine Zunahme der Zellen in der G₀/G₁-Phase, welche jedoch auf die Funktionalität von p53 zurückgeführt werden konnte. Die Arbeitsgruppe von Ho *et al.* beschrieb dabei eine p53-abhängige Induktion des G₁-Arrestes, während der S- sowie G₂/M-Arrest p53-unabhängig verlief. Gleichzeitig konnten sie eine fehlende IR-induzierte Verstärkung der p21-Expression in p53-defizienten Zellen beobachten, wie sie in den p53-profizienten Zellen deutlich erkennbar war (Ho *et al.*, 2009). Auch Xu *et al.* untersuchten den Einfluss von p53 auf den G₁/S-Kontrollpunkt, wobei sie unter anderem BRCA1-Exon 11-depletierte Zellen einsetzten. So konnte die Arbeitsgruppe bei *BRCA1*^{Δ11/Δ11} *p53*^{+/+}-Zellen eine Reduktion der S-Zellen nach 10 Gy und somit einen funktionsfähigen *Checkpoint* feststellen, während die *BRCA1*^{Δ11/Δ11} *p53*^{-/-}-Zellen nach IR-Behandlung weiterhin in die S-Phase übergingen (Xu *et al.*, 2001b). Die in den vorliegenden Ergebnissen beobachtete fehlende Zellzykluskontrolle in der G₁-Phase kann demnach vermutlich auf die in den UWB1.289- sowie UWB1.289 + BRCA1-Zellen vorhandene *Frameshift*-Mutation von *p53* zurückgeführt werden. Um die Funktionalität von p53 auf Proteinebene zu untersuchen, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Aktivität von p53 selbst sowie dessen *Downstream*-Protein p21 immunfluorimetrisch analysiert. Dabei konnte zwar eine Phosphorylierung am Ser15 des p53-Proteins beobachtet werden, die Expression des nachfolgenden und Zellzyklusstopp-fördernden Proteins p21 konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die im Anhang 8.4.3 aufgeführten Ergebnisse bestätigen demnach die Vermutung, dass die Funktionalität von p53 durch die Mutation beeinträchtigt ist.

Zusammengenommen verursachte die BRCA1-Defizienz mit gleichzeitiger p53-Defizienz der UWB1.289-Zellen das Ausbleiben einer Zellzykluskontrolle, wodurch geschädigte Zellen vermutlich den gesamten Zellzyklus durchlaufen und direkt in die Mitose übergingen. Xu *et al.* beschrieben dabei mehrere Kopien von Centrosomen sowie abnorme mitotische Spindelapparate in *BRCA1*^{Δ11/Δ11}-Zellen. Diese wiederum führten zu einer fehlerhaften Chromosomenteilung, welche in einer ungleichen Kernteilung resultierte und somit zur Bildung mehrerer Kerne innerhalb einer einzigen Zelle führte. Folglich lieferten die erhaltenen Daten molekulare Hinweise auf die Rolle von BRCA1 bei der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität (Xu *et al.*, 1999). Projiziert auf die hier vorliegenden Ergebnisse könnte demnach eine hohe genomische Instabilität in den UWB1.289-Zellen zu Grunde liegen.

Ebenso konnte die konzentrationsabhängige Zunahme der G₂/M-Population nach Arsen-Inkubation in einer p53-defizienten Zelllinie bereits von YIH *et al.* gezeigt werden. Mikroskopische Untersuchungen bestätigten hierbei, dass es sich bei dem beobachteten Anstieg überwiegend um mitotische Zellen handelte. Weitere Analysen zeigten, dass Zellen mit Arsen-induzierten Schäden in die Mitose eintraten, ohne dabei einen korrekten Zellzyklusarrest zu durchlaufen. Zudem konnte die Aufhebung des durch Röntgenstrahlung-induzierten G₂-Arrestes durch Arsenit beobachtet werden. Dabei verursachte das Metalloid eine Reduktion der durch Röntgenstrahlung-induzierten konzentrationsabhängigen G₂-Akkumulation und zwang gleichzeitig die G₂-arrestierten Zellen in die Mitose. Auch eine verminderte IR-induzierte Phosphorylierung von ATM und Cdc25C, welche entscheidend für die Aktivierung des G₂/M-*Checkpoints* und des G₂-Arrests ist, konnte nach Arsen-Behandlung identifiziert werden. Des Weiteren postulierte die Arbeitsgruppe, dass der M-Arrest mit einer erhöhten Induktion der Apoptose einherging. Ähnliche Effekte wurden auch in HeLa S3-Zellen festgestellt. Zusammenfassend deuteten die Ergebnisse der Autorengruppe darauf hin, dass Arsenit die Funktion des *Checkpoints* stört und somit einer geschädigten Zelle die weitere Progression im Zellzyklus bis zur Mitose erlaubt (YIH *et al.*, 2005). Auch Ho *et al.* untersuchten die Wirkung von Arsenit als As₂O₃ sowie deren Co-Exposition gegenüber IR. Im Gegensatz zu den hier vorliegenden Untersuchungen wurden die Zellen dabei zunächst mit 4 Gy bestrahlt und erst im Anschluss mit 5 µM Arsenit für weitere 6 – 36 h behandelt. Hierbei konnte ein progressiver Anstieg der G₂/M-Fraktion der Co-Exposition im Vergleich zu den bestrahlten Kontrollzellen beobachtet werden, was zu einem signifikant stärkeren und längeren Arrest führte. Die Arbeitsgruppe konnte zudem einen deutlich erhöhten zellulären Anteil dieser Population in der M-Phase identifizieren. 24 h Post-Exposition konnte hierbei in der Kombinationsbehandlung eine etwa 4-fache Erhöhung im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle nachgewiesen werden, während lediglich eine 1,5-fache Steigerung verglichen mit der isolierten Arsenit-Behandlung verursacht wurde. Der beobachtete M-Arrest ging auch bei diesen Untersuchungen mit einer erhöhten apoptotischen Zellrate einher (Ho *et al.*, 2009).

Wie bereits bei den Genexpressionsuntersuchungen erläutert, deuten die Erkenntnisse anderer Forschungsgruppen auf eine Induktion der Seneszenz durch Arsen hin. So scheint die Akkumulation der durch das Metalloid ausgelösten DNA-Schäden, über einen p38/p16/RB-Signalweg, eine Arretierung des Zellzyklusarrestes zu veranlassen (CHUNG *et al.*, 2020). Der CDK-Inhibitor p16 kann dabei mit CDK4 sowie CDK6 interagieren und so deren Assoziation an Cyclin D verhindern, wodurch eine Phosphorylierung von RB und somit die Transkriptionsaktivität von E2F beeinträchtigt wird (SHMULEVICH UND KRIZHANOVSKY, 2021). Neben der bekannten Wirkung in der frühen G₁-Phase konnte auch eine Beteiligung der E2F/RB-Paarung am G₂/M-*Checkpoint* nachgewiesen werden (BROOKES *et al.*, 2015). Folglich scheint Arsenit einen G₂-Arrest auszulösen, der in einer zellulären Seneszenz mündet.

Auch der Literaturvergleich lässt keine eindeutige Aussage über die arretierte Zellpopulation zu. So könnte Arsenit durch eine Aufhebung der Zellzyklusregulation einen M-Arrest verursachen, wodurch geschädigte Zellen bis zum Spindel-Kontrollpunkt der mitotischen Metaphase keinerlei Zellzykluskontrolle unterliegen. Gleichzeitig wäre jedoch auch ein G₂-Arrest denkbar, der zu einer zellulären Seneszenz der Arsenit-behandelten Proben führen könnte.

5.1.5 EINFLUSS VON NaAsO₂ AUF DIE DNA-DOPPELSTRANGBRUCHREPARATUR

Da die DNA-Schadensantwort und damit auch die DNA-Reparatur nach NaAsO₂-Behandlung auf transkriptioneller Ebene weitestgehend unabhängig vom BRCA1-Status verliefen, wurden die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen auf funktioneller Ebene mittels IF überprüft. Die dabei beobachtete inhibierende Wirkung von NaAsO₂ auf die Mechanismen der DNA-Reparatur wurde zusätzlich auf Proteinebene analysiert. Der Fokus wurde hierbei auf die Schadenserkennung von DSB sowie die nachfolgende Reparatur über die Mechanismen des NHEJ sowie der HR gelegt.

Mit Hilfe der IF-Färbung konnte die Rekrutierung spezifischer DNA-Reparaturproteine an den Schaden sowie deren Dissoziation analysiert werden. Bei dieser Methode können mittels Fluorochrom-markierter Antikörper ausgewählte Proteine der unterschiedlichen DNA-Reparaturwege innerhalb des Zellkerns angefärbt und mikroskopisch sichtbar gemacht werden. Dabei wird zunächst durch einen nicht-fluoreszierenden Primärantikörper ein Antigen-Antikörper-Komplex zwischen dem Antikörper und dem zu untersuchenden Protein ausgebildet. Im Anschluss wird mit Hilfe eines Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper, der spezifisch an den Primärantikörper bindet, ein sogenannter Focus ausgebildet, der aus dem Antigen und den beiden Antikörpern besteht (BEUTNER *et al.*, 1965). Die Anlagerung sowie Abdissoziation der Proteine wurde durch Auszählen der Foci betrachtet, wobei ein Focus einen DSB widerspiegelt. Zur Vergleichbarkeit der beiden DSB-Reparaturmechanismen HR sowie NHEJ wurden lediglich die Zellen in der G₂-Phase zur Auswertung herangezogen.

Dazu wurden die Zellen zunächst 18 h mit NaAsO₂ vorbehandelt, gegebenenfalls mit 1 Gy bestrahlt und anschließend über einen Reparaturzeitraum von 1 - 24 h nachinkubiert. Die Experimente wurden für beiden Zelllinien in einem analogen Versuchsaufbau angesetzt. Im Gegensatz zu den vorherigen Untersuchungen wurden für die sensitive Methode der IF lediglich die Konzentrationen 1 µM sowie 5 µM NaAsO₂ eingesetzt. Da die IF-Färbung der nachfolgend genannten Reparaturproteine zeigte, dass die alleinige Arsenit-Behandlung in den eingesetzten Konzentrationen keine DSB verursachte, wurde jeweils die Foci-Anzahl des nicht bestrahlten Versuchsansatzes von der des bestrahlten Ansatzes subtrahiert.

5.1.5.1 SCHADENSERKENNUNG

Die initiale Reparatur von DSB wurde mit Hilfe des Proteins 53BP1 verfolgt, welches ein wesentliches Protein der Schadenserkennung von DSB darstellt. Das Signalprotein kann die Resektion in der G₁-Phase negativ regulieren, wodurch die Reparatur mittels NHEJ gefördert wird. BRCA1 wiederum begünstigt die Entfernung von 53BP1 in der späten S- sowie G₂-Phase, wodurch die für die HR notwendige Endresektion wieder stattfinden kann (DALEY UND SUNG, 2014).

Abbildung 28 zeigt den Einfluss von NaAsO₂ auf die Reparatur von IR-induzierten DSB in BRCA1-defizienten sowie -profizienten Zellen, gemessen an der Anzahl IF-markierter 53BP1-Foci. Die ermittelten Ergebnisse verdeutlichen, dass sich das DNA-Reparaturprotein 53BP1 in der G₂-Phase beider Zelllinien an die durch IR-induzierten DSB anlagerte. Die alleinige Bestrahlung verursachte in den BRCA1-defizienten Zellen 40 Foci, wohingegen die BRCA1-profiziente Zelllinie lediglich 30 Foci verzeichnen ließ. Dennoch konnte mit zunehmender Zeit in beiden Zelllinien eine Abnahme der IR-generierten Foci um etwa die Hälfte beobachtet werden, was auf eine Abdissoziation mit ähnlicher Kapazität hindeutet.

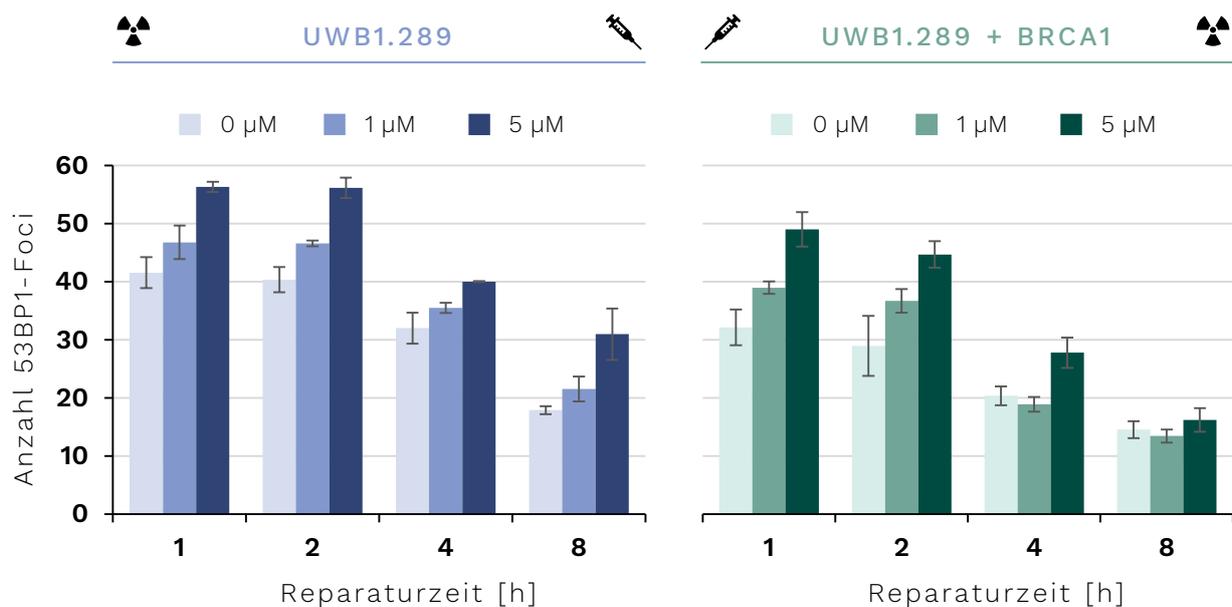


Abbildung 28: Vergleichende Darstellung der Anzahl an 53BP1-Foci in UWB1.289 sowie UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach Behandlung mit NaAsO₂, in Co-Exposition mit Röntgenstrahlung.

Beide Zelllinien wurden für 18 h mit NaAsO₂ vorbehandelt, mit 1 Gy bestrahlt und für 1, 2, 4 und 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

Die zusätzliche Behandlung mit NaAsO₂ führte in den UWB1.289- sowie UWB1.289 + BRCA1-Zellen zu einem synergistischen Effekt. Während die Inkubation mit 1 µM nur eine leicht erhöhte Foci-Anzahl beim 1 h-Zeitpunkt verursachte, bewirkte die Exposition gegenüber 5 µM eine Zunahme der Foci um 25 % in den defizienten Zellen sowie 35 % in den profizienten Zellen. Auch bei den co-exponierten Zellen konnte eine Abnahme der Foci über die Zeit beobachtet

werden. So wurden nach 8-stündiger Reparaturzeit in den co-exponierten UWB1.289-Zellen noch 30 53BP1-Foci in der höchsten eingesetzten Konzentration festgestellt. Zwar verursachte Arsenit eine erhöhte Anzahl an IR-induzierten DSB, die Reparaturkapazität blieb jedoch auf einem ähnlichen Niveau im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung. Demgegenüber zeigten die profizienten Zellen eine verstärkte Abnahme der Arsenit-verstärkten Schäden, verglichen mit der defizienten Zelllinie. Dabei waren zum 8-stündigen Reparaturzeitpunkt sowohl in den Proben der alleinigen Bestrahlung wie auch der Co-Exposition noch etwa 15 Foci zu verzeichnen.

Den vorliegenden Ergebnissen zufolge scheint eine BRCA1-Defizienz die Schadenserkenkung von DSB nicht zu beeinflussen. Dennoch konnte eine leicht erhöhte Anzahl an IR-vermittelten DSB in den defizienten Zellen im Vergleich zu den profizienten Zellen verzeichnet werden. Die Abdissoziation der 53BP1-Proteine lief in beiden Zelllinien mit einer ähnlichen Effizienz ab.

MARTINEZ-OUTSCHOORN *et al.* untersuchten ebenfalls die in dieser Arbeit eingesetzten UWB1.289- sowie UWB1.289 + BRCA1-Zellen. Dabei konnte die Autorengruppe bereits unter physiologischen Bedingungen neben einem erhöhten ROS-Level auch einen höheren γ -H2AX-Gehalt in den BRCA1-defizienten Zellen beobachten. Diese Ergebnisse demonstrierten ein erhöhtes Auftreten an DNA-Schäden durch eine BRCA1-Defizienz, was die hier vorliegenden Beobachtungen der unterschiedlichen Behandlungen bekräftigt (MARTINEZ-OUTSCHOORN *et al.*, 2012). Dabei gilt jedoch zu beachten, dass H2AX auch durch oxidativen Stress phosphoryliert werden kann und so die Art der DNA-Schäden in der publizierten Studie nicht identifiziert werden konnten. In der hier vorliegenden Arbeit wurden jedoch lediglich DSB untersucht, was den Unterschied an DNA-Schäden im basalen Niveau erklären könnte.

Denkbar wäre zudem, dass die von MOYNAHAN *et al.* und SNOUWAERT *et al.* postulierte beeinträchtigte HR in *BRCA1*-defizienten Zellen die erhöhte Anzahl an DSB in den UWB1.289-Zellen verursachte (MOYNAHAN *et al.*, 1999; SNOUWAERT *et al.*, 1999). Demnach wäre in den BRCA1-defizienten Zellen vermutlich lediglich der Reparaturmechanismus des NHEJ aktiv, während in den UWB1.289 + BRCA1-Zellen zusätzlich auch eine funktionsfähige HR vermutet werden kann.

Ebenso scheint die Behandlung mit NaAsO₂ keine nachteiligen Effekte auf die Schadenserkenkung von IR-induzierten DSB zu verursachen. Das Halbmetall bewirkte lediglich eine Verstärkung des Effektes der alleinigen Bestrahlung in beiden untersuchten Zelllinien. Folglich blieb die Abdissoziation des 53BP1-Proteins unbeeinflusst. BRCA1 förderte hierbei vermutlich die Reparatureffizienz der durch Co-Exposition induzierten Schäden.

BEUCHER *et al.* postulierten, dass lediglich 15 - 20 % der IR-induzierten DSB in der G₂-Phase durch den Mechanismus der HR behoben wurden und das NHEJ demnach nicht nur in der G₁-Phase, sondern auch in der G₂-Phase der vorherrschende Reparaturmechanismus IR-induzierter Schäden war. Zusätzlich beschrieb die Arbeitsgruppe das NHEJ als schnellen Mechanismus, wohingegen der Reparaturmechanismus der HR vergleichsweise langsam verlief (BEUCHER *et al.*,

2009). Folglich könnten die Ergebnisse erste Hinweise darauf geben, dass die erhöhte Anzahl an 53BP1-Foci, nach Inkubation mit 5 μM in den BRCA1-defizienten Zellen zum späten Reparaturzeitpunkt von 8 h, auf eine Beeinträchtigung der HR zurückzuführen sein könnte. Zusammen mit den bereits veröffentlichten Daten zu einer gestörten HR durch eine *BRCA1*-Defizienz (MOYNAHAN *et al.*, 2001) wurde im Nachfolgenden der Reparaturmechanismus der HR genauer untersucht.

5.1.5.2 HOMOLOGE REKOMBINATION

Da in vorangegangenen Arbeiten bereits eine Beeinträchtigung der HR-Kapazität in *BRCA1* ^{$\Delta 11/\Delta 11$} -Zellen beschrieben werden konnte, wurden zunächst die Auswirkungen einer BRCA1-Defizienz unter Einfluss von NaAsO₂ auf spezifische Reparaturproteine der HR untersucht.

Zu Beginn wurde das Tumorsuppressorprotein BRCA1 selbst immunfluorimetrisch betrachtet. Wie eingangs erwähnt, sind die verschiedenen BRCA1-Komplexe an mannigfaltigen Schritten der HR beteiligt. So fördern diese beispielsweise die für die HR notwendige Endresektion und sichern die korrekte Anlagerung von weiteren DNA-Reparaturproteinen (SAVAGE UND HARKIN, 2015).

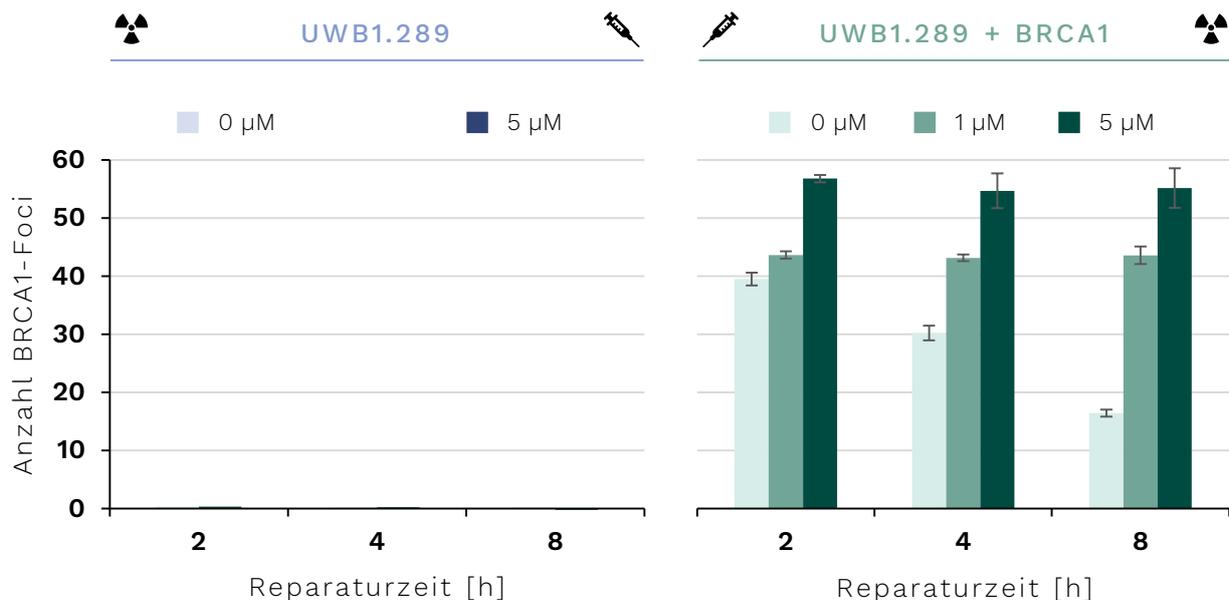


Abbildung 29: Vergleichende Darstellung der Anzahl an BRCA1-Foci in UWB1.289 und UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach Behandlung mit NaAsO₂, in Co-Exposition mit Röntgenstrahlung.

Beide Zelllinien wurden für 18 h mit NaAsO₂ vorbehandelt, mit 1 Gy bestrahlt und für 2, 4 und 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

Abbildung 29 zeigt den Einfluss von NaAsO₂ auf die Reparatur von IR-induzierten DSB in BRCA1-defizienten sowie -profizienten Zellen, gemessen an der Anzahl IF-markierter BRCA1-Foci. Dabei bestätigen die Ergebnisse, dass die *BRCA1*-Mutation innerhalb des Exons 11 in der UWB1.289-Zelllinie zu einer BRCA1-Defizienz führte. So konnte bei keiner der eingesetzten Behandlungen sowie zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine Anlagerung von BRCA1 an den IR-induzierten

DSB in der G₂-Phase beobachtet werden. Demgegenüber zeigten die stabil transfizierten UWB1.289 + BRCA1-Zellen eine deutliche Expression des Proteins sowie dessen Bindung an IR-vermittelte DSB innerhalb der zellulären G₂-Phase. Zudem konnte eine Abnahme der BRCA1-Foci und somit vermutlich eine effektive Reparatur der durch 1 Gy-induzierten DSB beobachtet werden, was eine erfolgreiche Wiederherstellung der Reparaturkapazität durch die Transfektion widerspiegelt. Analog zu den vorherigen Untersuchungen konnte auch die Betrachtung der BRCA1-Foci eine deutliche synergistische Wirkung von 5 µM Arsenit auf die IR-induzierten Schäden darstellen. Dabei zeigte der erste untersuchte Reparaturzeitpunkt (2 h) nach Inkubation mit 5 µM rund 40 % mehr BRCA1-Foci im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Ergebnissen konnte hier jedoch eine konzentrationsabhängige Beeinflussung der Reparaturfähigkeit durch die NaAsO₂-Inkubation vermutet werden. So war das Protein zwar noch in der Lage, an den DSB anzulagern und nukleäre Foci auszubilden, verlor jedoch gleichzeitig seine Dissoziationsfähigkeit. Schon die Inkubation mit der nicht-zytotoxischen Konzentration von 1 µM erhöhte leicht die Anzahl an gebildeten BRCA1-Foci und bewirkte eine Persistenz des Proteins. Während die Behandlung mit 1 µM dabei eine konstante Anzahl von 44 BRCA1-Foci verursachte, belief sich die Foci-Anzahl bei der Inkubation mit 5 µM über den gesamten Zeitraum auf 55.

Zusammengefasst konnte die fehlende IF-Färbung des BRCA1-Proteins in den UWB1.289-Zellen eine vorherrschende BRCA1-Defizienz bestätigen. Aufgrund der bekannten Co-Lokalisation von DNA-Reparaturproteinen zu nukleären Foci konnte vermutet werden, dass die fehlende Anlagerung von BRCA1 auch die Rekrutierung weiterer Proteine und somit den Mechanismus der nahezu fehlerfreien HR beeinträchtigt. Demgegenüber konnte durch die Bestrahlung der stabil transfizierten BRCA1-profizienten Zelllinie und die anschließende Betrachtung der Anlagerungs- sowie Dissoziationskinetik eine erfolgreiche Wiederherstellung der HR-Reparaturkapazität vermutet werden.

Auch in Gegenwart von Arsenit konnte eine Rekrutierung von BRCA1 in den UWB1.289 + BRCA1-Zellen beobachtet werden. Die persistierenden Foci legen jedoch die Vermutung nahe, dass Arsenit die Dissoziationsfähigkeit von BRCA1 beeinträchtigt. Um zu überprüfen, ob das fehlende Ablösen des Proteins nachteilige Effekte auf den weiteren Reparaturverlauf der HR ausüben kann, wurde im Nachfolgenden das *Downstream*-Protein Rad51 untersucht.

Das Markerprotein Rad51 liegt im BRCA1-D-Komplex gebunden an BRCA1, BARD1 und PALB2 vor. Dieser Komplex ermöglicht den Austausch des zuvor gebundenen RPAs und Rad51, wodurch sich das Nukleoproteinfilament ausbilden kann. Rad51 windet sich anschließend als Proteinfilament um die prozessierten DNA-Überhänge und vermittelt so die Paarung der homologen Sequenzen sowie den Strangaustausch (SAVAGE UND HARKIN, 2015).

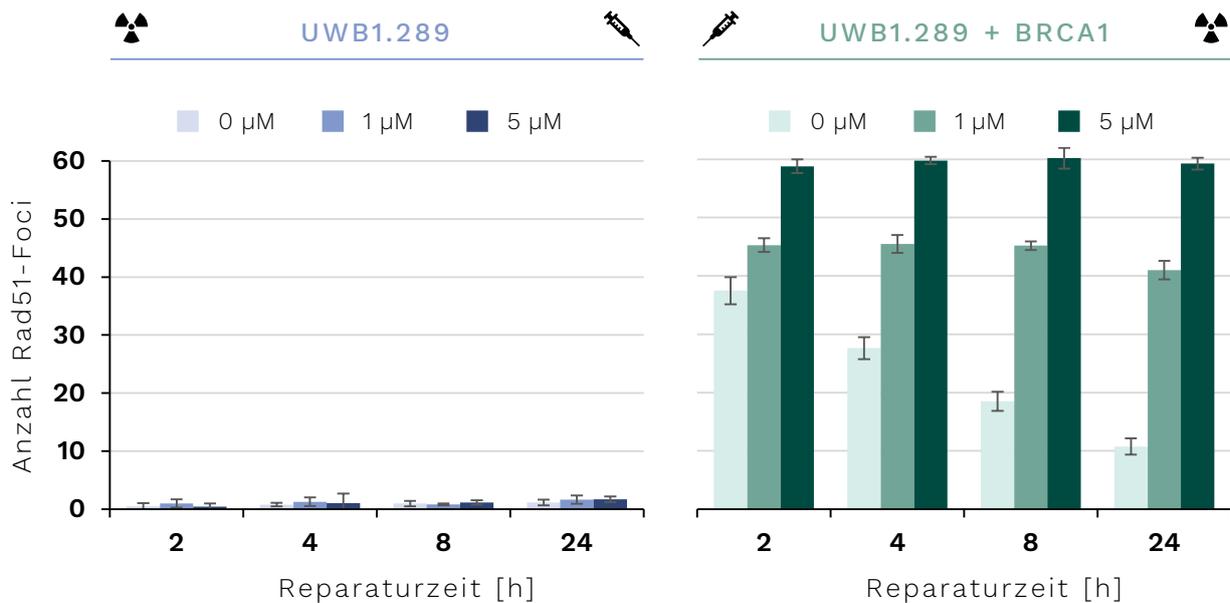


Abbildung 30: Vergleichende Darstellung der Anzahl an Rad51-Foci in UWB1.289 und UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach Behandlung mit NaAsO₂, in Co-Exposition mit Röntgenstrahlung.

Beide Zelllinien wurden für 18 h mit NaAsO₂ vorbehandelt, mit 1 Gy bestrahlt und für 2, 4, 8 und 24 h nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

Abbildung 30 zeigt den Einfluss von NaAsO₂ auf die Reparatur von IR-induzierten DSB in BRCA1-defizienten sowie -profizienten Zellen, gemessen an der Anzahl IF-markierter Rad51-Foci. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Anlagerung von Rad51, an die durch IR-induzierten Schäden in den BRCA1-defizienten Zellen zu keinem der untersuchten Reparaturzeitpunkte möglich war. Dementgegen zeigte sich eine deutliche Assoziation von Rad51 in den BRCA1-profizienten Zellen in der G₂-Phase. Analog zu den vorherigen Untersuchungen konnte auch hier eine deutliche Abnahme der durch 1 Gy-induzierten DSB sowie eine deutliche synergistische Wirkung von Arsenit auf diese Schäden beobachtet werden. Bei Betrachtung des frühen Reparaturzeitpunktes von 2 h zeigte sich nach Inkubation mit 5 µM eine etwa 50 %ige Zunahme der Rad51-Foci im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung. Ebenso stand die konzentrationsabhängige Beeinflussung der Reparaturfähigkeit im Einklang mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen des BRCA1-Proteins. Auch hier konnte die Anlagerung von Rad51 nach Arsenit-Behandlung festgestellt werden, wohingegen die Dissoziation des Proteins verhindert wurde. Schon die Inkubation mit der nicht-zytotoxischen Konzentration von 1 µM verursachte dabei eine konstante Anzahl an Rad51-Foci von 45, während sich die Foci-Anzahl bei der Inkubation mit 5 µM über den gesamten Zeitraum auf 59 belief.

Die fehlende Anlagerung der Rad51-Foci in den UWB1.289-Zellen legt die Vermutung nahe, dass die BRCA1-Defizienz die Rekrutierung des Proteins an induzierte DSB beeinträchtigt. Dies könnte möglicherweise auf die zuvor beobachtete fehlende Assoziation bzw. vollständige Expression des BRCA1-Proteins und die damit verbundene ausbleibende Bildung des BRCA1-D-Komplexes zurückgeführt werden. Demgegenüber lässt auch hier die Reparaturkinetik der bestrahlten,

stabil transfizierten UWB1.289 + BRCA1-Zelllinie, im Hinblick auf das Reparaturprotein Rad51 und somit dem Mechanismus der HR, eine erfolgreiche Wiederherstellung der Reparaturkapazität annehmen.

Im Einklang mit der Assoziation des BRCA1-Proteins konnte auch eine Anlagerung des Rad51-Proteins in den UWB1.289 + BRCA1-Zellen in Gegenwart von Arsenit beobachtet werden. Dabei scheint Arsenit jedoch bereits in nicht-zytotoxischen Konzentrationen die Dissoziationsfähigkeit des Proteins zu beeinflussen, was durch die persistierenden Rad51-Foci über den gesamten Zeitraum deutlich wurde. Da Rad54 für die Dissoziation von Rad51 verantwortlich ist, wurde im Nachfolgenden der Einfluss von NaAsO_2 auf das *Downstream*-Protein Rad54 untersucht.

Rad54 interagiert mit Rad51 und unterstützt so die Invasion des gebildeten Filaments in das Schwesterchromatid. Neben der Stabilisierung der helikal gewundenen Rad51-Moleküle ist Rad54 auch, wie bereits erwähnt, für die Abdissoziation von Rad51 verantwortlich, welche unter ATP-Verbrauch stattfindet (MAZIN *et al.*, 2010; GORODETSKA *et al.*, 2019).

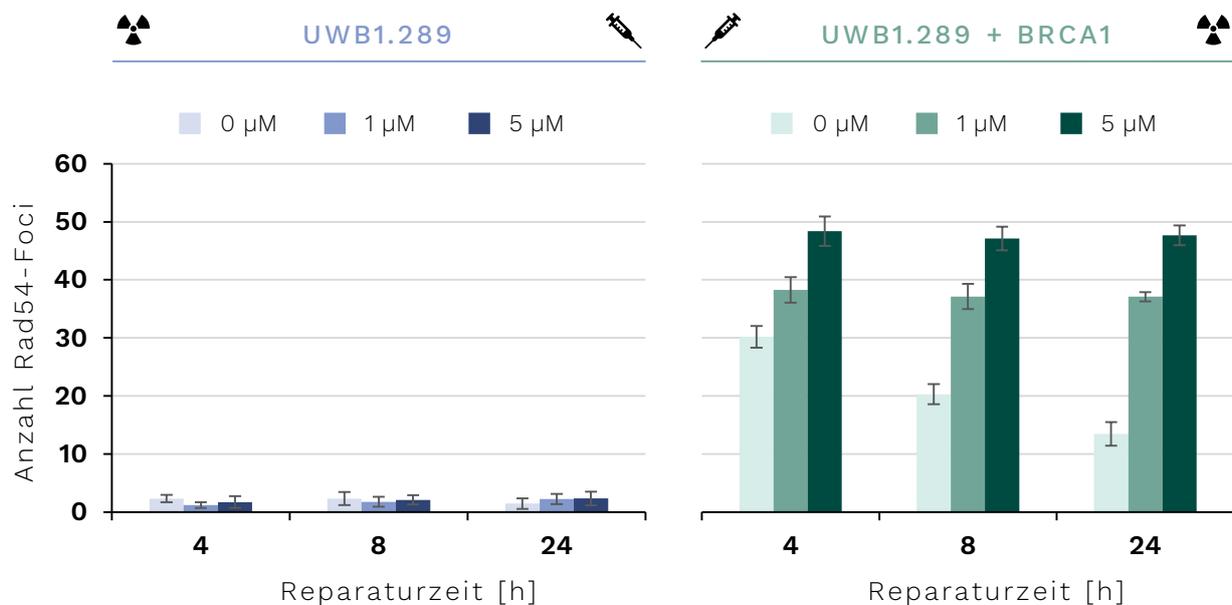


Abbildung 31: Vergleichende Darstellung der Anzahl an Rad54-Foci in UWB1.289 und UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach Behandlung mit NaAsO_2 , in Co-Exposition mit Röntgenstrahlung.

Beide Zelllinien wurden für 18 h mit NaAsO_2 vorbehandelt, mit 1 Gy bestrahlt und für 4, 8 und 24 h nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

Abbildung 31 zeigt den Einfluss von NaAsO_2 auf die Reparatur von IR-induzierten DSB in BRCA1-defizienten sowie -profizienten Zellen, gemessen an der Anzahl IF-markierter Rad54-Foci. Im Einklang mit den vorherigen Untersuchungen konnte auch für das *Downstream*-Protein Rad54 keine Anlagerung an die IR-generierten Schäden in den UWB1.289-Zellen beobachtet werden. Dementgegen konnte durch Betrachtung der Reparaturkinetik der UWB1.289 + BRCA1-Zellen eine kontinuierliche Reduktion der IR-induzierten Rad54-Foci beobachtet werden, was auf eine fortschreitende Reparatur der DSB hindeutet. Die bereits zuvor identifizierte synergistische

Wirkung von Arsenit auf die IR-vermittelten DSB konnte auch im Hinblick auf die Rad54-Foci-Anzahl festgestellt werden. So verursachte die Inkubation mit 5 μM nach 4-stündiger Reparaturzeit noch 60 % mehr Foci im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung. Analog zu den vorherigen Ergebnissen ermöglichte die Inkubation mit NaAsO_2 demnach zwar eine Rekrutierung des Rad54-Proteins, verhinderte jedoch gleichzeitig dessen Dissoziation. So belief sich die Foci-Anzahl nach Inkubation mit 1 μM über den gesamten Zeitraum auf 37, wobei eine Behandlung mit 5 μM die Anzahl sogar auf 48 Foci erhöhte.

Auch diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die BRCA1-Defizienz die Rekrutierung des Rad54-Proteins an induzierte DSB beeinträchtigte. Die ausbleibende Anlagerung des Proteins war vermutlich auf die fehlende Assoziation der vorangeschalteten Proteine BRCA1 und Rad51 zurückzuführen, wodurch die Reparaturkaskade der HR nicht vollzogen werden konnte. Demgegenüber zeigte sich eine Rekrutierung von Rad54 in den BRCA1-profizienten Zellen nach Bestrahlung und somit, analog zu den vorherigen Untersuchungen, eine erfolgreiche Wiederherstellung der DNA-Reparatur mittels HR.

Ebenso konnte die Betrachtung der Rad54-Foci nach zusätzlicher NaAsO_2 -Behandlung in UWB1.289 + BRCA1-Zellen die zuvor erhaltenen Ergebnisse bestätigen. So konnte zwar die Anlagerung von Rad54 beobachtet werden, eine Dissoziation war jedoch auch bei diesem Protein nicht möglich. Demnach scheint Arsenit die Reparatur mittels HR durch einen fehlenden Abbau der DNA-Reparaturmaschinerie zu beeinflussen.

Die fehlende Formation der BRCA1-Foci in den UWB1.289-Zellen kann auf die in der Zelllinie enthaltene 2594delC-Mutation im *BRCA1*-Gen zurückgeführt werden. Wie eingangs erwähnt, führt die Mutation zu einem Stopp beim Codon 845, wodurch lediglich ein verkürztes BRCA1-Protein entsteht, wie bereits von DELLORUSSO *et al.* gezeigt (DELLORUSSO *et al.*, 2007). Demnach resultiert ein unvollständiges Protein, das lediglich den N-terminalen Bereich und nicht die C-terminalen BRCT-Domänen aufweist. AU UND HENDERSON konnten jedoch feststellen, dass ein Zusammenspiel der RING-Domäne sowie der BRCT-Domänen für die Rekrutierung von BRCA1 an nukleäre Foci nötig ist (AU UND HENDERSON, 2005). Die unvollständige Translation des BRCA1-Proteins und die daraus resultierende fehlende Interaktion der genannten Domänen begründet die ausbleibende Bildung der BRCA1-Foci in den UWB1.289-Zellen.

Eine beeinträchtigte Ausbildung von Rad51-Foci nach DNA-Schädigung in Anwesenheit einer *BRCA1*-Defizienz konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden. Dabei führten HUBER *et al.* die fehlende Formation auf die Deletion des Exons 11 in den untersuchten Zellen zurück, welche für die effektive Rekrutierung von Rad51 nach IR-Schädigung verantwortlich ist. Gleichzeitig konnten sie eine verminderte Phosphorylierung nach DNA-Schädigung feststellen, welche die Lokalisation weiterer Reparaturproteine zu nukleären Foci beeinflussen könnte. BHATTACHARYYA

et al. beschrieben, dass die fehlende Ausbildung der Rad51-Foci nicht auf eine verminderte Proteinexpression zurückzuführen war (HUBER *et al.*, 2001; BHATTACHARYYA *et al.*, 2000).

BEUCHER *et al.* konnten, ähnlich zu den hier vorliegenden Ergebnissen, eine fehlende Assoziation von Rad51 in Folge einer siRNA-vermittelten reduzierten Expression von BRCA2, CtIP und Rad51 beobachten (BEUCHER *et al.*, 2009). Wie eingangs erwähnt, bildet CtIP zusammen mit dem BRCA1/BARD1-Heterodimer und dem MRN-Komplex den BRCA1-C-Komplex. Auch Rad51 sowie BRCA2 komplexieren über das Brückenprotein PALB2 an das BRCA1/BARD1-Heterodimer. Diese in der Gesamtheit als BRCA1-D-Komplex bezeichnete Interaktion begünstigt die Ausbildung des Nukleoproteinfilaments (SAVAGE UND HARKIN, 2015).

Auch MOYNAHAN *et al.* untersuchten die Auswirkungen einer *BRCA1*-Defizienz auf die DNA-Reparatur. Ihre Ergebnisse beschreiben BRCA1 als eine Art *Caretaker*, welcher zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität, durch Förderung der HR und Limitierung der mutagenen nicht-homologen Reparaturprozesse, beiträgt. Die Forschungsgruppe konnte in ihren Studien ein vermindertes Reparaturniveau mittels HR sowie ein leicht erhöhtes Auftreten der NHEJ-Reparatur von Endonuklease-generierten DSB in *BRCA1*-defizienten embryonalen Mausstammzellen beobachten. Dabei beschrieben sie unter anderem eine beeinträchtigte Rad51 Foci-Formation nach DNA-Schädigung durch Cisplatin. Zudem stellte die Arbeitsgruppe deutliche Defekte im *Gene Targeting* dieser Zellen fest, welche auf eine Beeinträchtigung der homologen Rekombination zurückzuführen sind (MOYNAHAN *et al.*, 1999; MOYNAHAN *et al.*, 2001). Ähnliche Ergebnisse wurde auch von SNOUWAERT *et al.* publiziert (SNOUWAERT *et al.*, 1999).

Die Literaturvergleiche bestätigen die Vermutung, dass die fehlende Expression des vollständigen BRCA1-Proteins und der damit einhergehende Verlust der BRCA1-Assoziation die nachfolgend ausbleibende Co-Lokalisation der *Downstream*-Proteine Rad51 sowie Rad54 an nukleäre Foci verursachte. Die fehlende Anlagerung der DNA-Reparaturproteine in BRCA1-defizienten Zellen resultierte somit vermutlich in einer Beeinträchtigung des nahezu fehlerfreien Reparaturmechanismus der HR.

Eine weitere Möglichkeit der fehlenden Rad51-Foci Formation könnte jedoch auch in der von CECCALDI *et al.* publizierten antagonistischen Wirkung der Polymerase θ , dem Schlüsselprotein des MMEJ, gegenüber der HR in HR-defizienten Zellen begründet sein. Dabei konnte eine Interaktion der Polymerase θ und Rad51 festgestellt werden, wodurch die Ausbildung des Nukleoproteinfilaments verhindert wurde. Zudem dokumentierte die Arbeitsgruppe eine erhöhte Expression des für die Polymerase θ codierenden Gens *PolQ* in HR-defizienten Zellen unter physiologischen Bedingungen, wobei in der publizierten Studie auch die in dieser Arbeit eingesetzten UWB1.289-Zellen untersucht wurden. Gleichzeitig konnten sie eine wiederhergestellte HR-Funktion und ein normalisiertes *PolQ*-Expressionslevel durch das Einbringen von BRCA1 beobachten (CECCALDI *et al.*, 2015). Ebenso konnten AHRABI *et al.* eine

BRCA1-Depletion mit einer reduzierten HR-Kapazität sowie einer erhöhten Mutationshäufigkeit, assoziiert mit einem vermehrtem MMEJ, in Verbindung bringen (AHRABI *et al.*, 2016).

Um zu überprüfen, ob die verminderte Formation der Rad51-Foci möglicherweise auf eine erhöhte Expression des *PolQ*-Gens zurückzuführen war, wurden im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit qPCR-Untersuchungen durchgeführt (Anhang 8.4.4). Dabei konnte, entgegen den von CECCALDI *et al.* publizierten Erkenntnissen, keine Unterscheidung im basalen Expressionsniveau von *PolQ* zwischen den beiden Zelllinien beobachtet werden. Erst nach IR-induzierter Schädigung zeigte sich eine deutlich erhöhte Expression des Gens in den BRCA1-defizienten Zellen im Vergleich zur profizienten Zelllinie. Zusätzlich wurden auch die alleinige NaAsO₂- sowie die Co-Exposition, analog zu den HT RT-qPCR-Untersuchungen, im Hinblick auf die Expression des *PolQ*-Gens analysiert. Dabei zeigte sich in keiner der beiden Zelllinie eine Veränderung im Genexpressionsniveau nach isolierter Arsenit-Behandlung. Dementgegen verursachte die Co-Exposition eine Tendenz zur Verstärkung der Ausgangstranskriptmenge in den BRCA1-defizienten Zellen, wohingegen die profizienten Zellen keine relevanten Veränderungen aufzeigte. Unter Berücksichtigung der erhöhten Standardabweichungen kann vermutet werden, dass die beeinträchtigte HR in den BRCA1-defizienten Zellen nach IR-induzierter und Arsenit-verstärkter Schädigung die Expression des MMEJ-assoziierten Gens *PolQ* förderte. Demgegenüber blieb die Expression des Gens in den BRCA1-profizienten Zellen mit einer funktionsfähigen HR unbeeinflusst.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Wiederherstellung der HR-Reparaturkapazität durch das Einbringen von BRCA1 konnte auch von PARVIN *et al.* bereits demonstriert werden. Dabei depletierte die Autorengruppe zunächst das endogene BRCA1, was zu einer Reduktion der HR-Aktivität führte. Die anschließende Transfektion eines Wildtyp BRCA1-Plasmids stellte die HR-Funktion vollständig wieder her (PARVIN *et al.*, 2011).

Wie eingangs erwähnt, stellen Proteine mit Dithiol- und Trithiolstrukturen ein mögliches *Target* für dreiwertiges Arsen dar. Die Bindung von Arsenit an Thiolgruppen sowie deren Oxidation können die Funktion von DNA-Reparaturproteinen beeinträchtigen (ZHOU *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2014). Da sowohl BRCA1 als auch Rad54 Zink-Bindungsstellen in ihren Strukturen aufweisen, wäre eine negative Beeinflussung durch Arsenit vorstellbar (MAZIN *et al.*, 2010; BRZOVIC *et al.*, 2001). Ebenso enthält Rad51 kritische Thiolgruppen innerhalb der AS-Sequenz, wodurch auch dieses Protein ein potentiell Angriffsziel für das Halbmetall darstellt (MODESTI *et al.*, 2007). Die beobachtete beeinträchtigte Dissoziationsfähigkeit dieser Reparaturproteine könnte demnach auf eine Veränderung ihrer Sekundärstruktur und somit ihrer Funktion zurückzuführen sein. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden im späteren Verlauf dieser Arbeit Bindungs- sowie Strukturuntersuchungen unterschiedlicher Fragmente des Ringfingerproteins BRCA1 mittels UV/Vis- sowie CD-Spektroskopie durchgeführt (Kapitel 5.3 und 5.4).

Eine beeinflusste DSBR durch Arsenit konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden. Während in der hier vorliegenden Arbeit der Reparaturverlauf der HR durch eine fehlende Dissoziation der DNA-Reparaturproteine gestört wurde, verursachte die Behandlung mit 20 μM NaAsO_2 in der Studie von ZHANG *et al.* eine verminderte BRCA1-Rekrutierung an durch Laserbestrahlung induzierte DSB. Zusätzlich stellte die Autorengruppe in Folge eine inhibierte Rekrutierung des *Downstream*-Proteins Rad51 fest. Eine konzentrationsabhängig beeinflusste Anlagerung des BRCA1-Proteins nach Arsenit-Behandlung konnte ebenso in einer noch unveröffentlichten Studie unseres Arbeitskreises beobachtet werden. Konträr zur Studie von ZHANG *et al.* konnte dabei jedoch eine Assoziation von Rad51 beobachtet werden, was im Einklang zu den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen steht. Hierbei gilt jedoch zu beachten, dass ZHANG *et al.* in ihrer Forschungsarbeit, neben der unterschiedlichen Bestrahlungsart und den höheren Arsenit-Konzentrationen, auch eine deutlich kürzere Reparaturzeit von lediglich 10 min wählten, während die unveröffentlichte Studie dieses Arbeitskreises einen analogen Versuchsaufbau zu dem in dieser Arbeit gewählten Ansatz aufwies (ZHANG *et al.*, 2014).

Die Unterschiede in der Anlagerung von BRCA1 könnten demnach auf die Überexpression des Proteins in den eingesetzten UWB1.289 + BRCA1-Zellen zurückzuführen sein. So stellten SCHLEGEL *et al.* fest, dass eine Überexpression von BRCA1 die Bildung von ssDNA als Antwort auf IR verstärkte. Dabei konnte die Arbeitsgruppe über einen Zeitraum von 24 h keine Abnahme der gebildeten ssDNA-positiven Zellen verzeichnen, wohingegen die Wildtyp-BRCA1-profiziente Kontrollzelllinie eine deutliche Abnahme dieser Zellen zeigte. Die erhaltenen Ergebnisse dieser Studie deuteten demnach auf eine Co-Lokalisation der durch die Überexpression gebildeten BRCA1-Foci mit ssDNA und somit einer direkten Rolle von BRCA1 in der Endresektion der HR hin. Die Arbeitsgruppe postulierte dabei, dass die ssDNA-fördernde Wirkung auf den artifiziell hohen BRCA1-Spiegel in G_1 -Zellen zurückzuführen ist. Hierbei könnte BRCA1 die Strangresektion in Zellpopulationen fördern, in denen normalerweise das NHEJ vorherrschend ist. Während in der Publikation eine deutlich höhere Bestrahlungsintensität von 10 Gy eingesetzt wurde (SCHLEGEL *et al.*, 2006), könnte die in dieser Arbeit beobachtete synergistische Wirkung von Arsenit auf die IR-induzierten Schäden (1 Gy) die persistierenden Foci der co-exponierten Proben erklären.

Eine weitere Möglichkeit zur beobachteten Persistenz der Foci könnte in einem fehlenden Abbau der DNA-Reparaturproteine begründet sein. So konnte beispielsweise für BRCA1 bereits ein Ubiquitin-vermittelter proteasomaler Abbau beschrieben werden, wobei dieser weniger von der eigenen Enzymaktivität, sondern mehr von anderen E3-Ubiquitin-Ligasen abhängig war (CHOUDHURY *et al.*, 2004). Demnach wäre denkbar, dass Arsenit an die RING-Domäne dieser E3-Ubiquitin-Ligasen bindet und so dessen Funktionalität beeinträchtigt. Die Beeinflussung eines solchen Proteinkomplexes durch Arsenit konnte bereits von ZHANG *et al.* gezeigt werden. Dabei untersuchten sie das RNF20/RNF40-Heterodimer, welches für die Ubiquitinierung vom Histon H2B und somit der Chromatinkondensation wichtig ist. Im Gegensatz zu den hier

vorliegenden Untersuchungen konnte dabei jedoch eine verminderte Anlagerung von DNA-Reparaturproteinen beobachtet werden (ZHANG *et al.*, 2014). Der beeinträchtigte Abbau von Rad51 wiederum könnte auf einen Funktionsverlust von Rad54, welches für die Dissoziation von Rad51, durch Fortbewegung auf der dsDNA, verantwortlich ist, zurückgeführt werden. Während die Rad51-Bindungsstelle im Rad54-Protein im N-terminalen Bereich liegt, konnte die Bindungsstelle für dsDNA nahe des C-terminalen Bereiches identifiziert werden. Gleichzeitig weist der C-Terminus des Proteins auch eine Zinkbindungsstelle auf (MAZIN *et al.*, 2010). Denkbar wäre demnach, dass die Bindung von Arsenit an kritische Thiolgruppen oder deren Oxidation durch ROS zu einer Konformationsänderung im C-terminalen Bereich des Proteins führte und so die Dissoziation von Rad51, jedoch nicht die Assoziation von Rad54 gestört wurde.

JHA *et al.* wiederum beschrieben eine erhöhte Häufigkeit Röntgenstrahlung-induzierter DNA-Schädigung durch NaAsO₂, was die in den IF-Untersuchungen beobachtete synergistische Wirkung bestätigt. Dabei vermuteten sie eine Hemmung der Ligase-Aktivität und somit eine Beeinträchtigung der DNA-Reparaturprozesse. So konnte die Arbeitsgruppe eine Zunahme DNA-Replikations-abhängiger Prozesse und Chromatidabberationen, sowie einen vermehrten Schwesterchromatidaustausch feststellen (JHA *et al.*, 1992). Ebenso könnten die Untersuchungen von YING *et al.* die erhöhte Anzahl der IR-generierten DSB nach zusätzlicher Arsenit-Behandlung erklären. Die Autorengruppe konnte bei ihren Analysen feststellen, dass das Metalloid selbst keine DSB verursachte. Die erhöhte Anzahl an DSB nach Arsenit-Behandlung wurde folglich auf eine indirekte Wirkung des Halbmetalls zurückgeführt, indem Arsenit die Reparatur von SSB hemmt. Bei einem Zusammenbruch der Replikationsgabel während der Replikation resultierte ein solch unreparierter SSB anschließend in einem DSB (YING *et al.*, 2009).

Zusammengenommen postulierten alle Forschungsarbeiten eine beeinträchtigte DNA-Reparatur, insbesondere der HR, durch die Inkubation mit Arsenit. In den vorgestellten Studien wurden entweder Reparaturproteine, die mit der HR assoziiert sind, analysiert oder es wurde keine Differenzierung der Mechanismen durchgeführt.

Um zu überprüfen, ob sich der beobachtete nachteilige Effekt von Arsenit auch auf den Hauptreparaturmechanismus des NHEJ auswirkt, wurde im Nachfolgenden die NHEJ-assoziierte DNA-PK_{cs} immunfluorimetrisch untersucht. Des Weiteren wurden die von MOYNAHAN *et al.* sowie SNOUWAERT *et al.* publizierten Ergebnisse einer verminderten HR-Kapazität mit gleichzeitiger Erhöhung des NHEJ-Reparaturmechanismus in *BRCA1*-defizienten Zellen auch in den hier eingesetzten UWB1.289-Zellen mit Hilfe dieser IF-Färbung analysiert (MOYNAHAN *et al.*, 2001; MOYNAHAN *et al.*, 1999; SNOUWAERT *et al.*, 1999).

5.1.5.3 NICHT-HOMOLOGES END-JOINING

Die DNA-PK_{cs} stellt die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) dar und spielt insbesondere im DSB-Reparaturmechanismus des NHEJ eine entscheidende Rolle. Durch die Interaktion von Ku70/Ku80 mit der DNA-PK_{cs} bildet sich am DNA-Schaden das aktive Holoenzym aus. Die zentrale Aufgabe des Proteinkomplexes besteht in dem Schutz der DNA-Enden vor frühzeitiger Ligation (DAVIS UND CHEN, 2013).

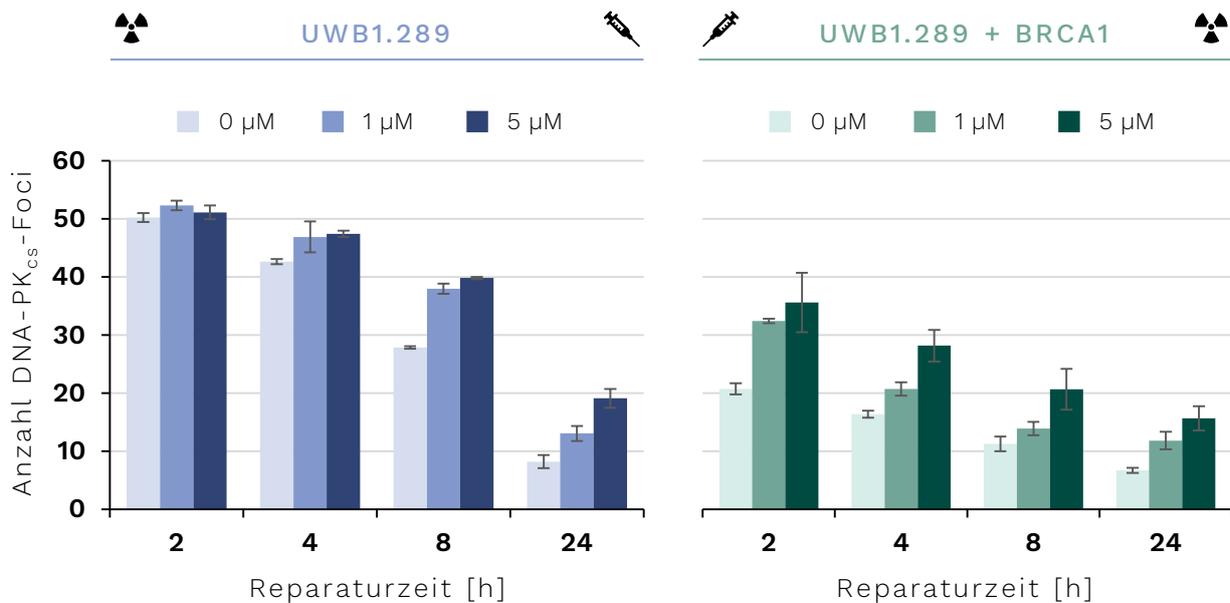


Abbildung 32: Vergleichende Darstellung der Anzahl an DNA-PK_{cs}-Foci in UWB1.289 und UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach Behandlung mit NaAsO₂, in Co-Exposition mit Röntgenstrahlung.

Beide Zelllinien wurden für 18 h mit NaAsO₂ vorbehandelt, mit 1 Gy bestrahlt und für 2, 4, 8 und 24 h nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

Abbildung 32 zeigt den Einfluss von NaAsO₂ auf die Reparatur von IR-induzierten DSB in BRCA1-defizienten sowie -profizienten Zellen, gemessen an der Anzahl IF-markierter DNA-PK_{cs}-Foci. Im Gegensatz zu den vorherigen Analysen des HR-Mechanismus konnte bei dem NHEJ-assoziierten Protein DNA-PK_{cs} eine Anlagerung an die IR-induzierten DSB in den BRCA1-defizienten Zellen beobachtet werden. Auch in den BRCA1-profizienten Zellen zeigte sich eine Rekrutierung des Proteins nach IR, wobei sie weniger als die Hälfte an Foci im Vergleich zu den UWB1.289-Zellen aufwies. Während die defizienten Zellen nach 2 h Reparaturzeit 50 DNA-PK_{cs}-Foci aufwiesen, verursachte die IR-Exposition in den profizienten Zellen zum gleichen Zeitpunkt eine Anzahl von lediglich 20 DSB. Dennoch konnte in beiden Zelllinien eine fortschreitende Reparatur dieser Schäden, durch die abnehmende Foci-Anzahl, vermutet werden. Dabei wurden nach 24-stündiger Reparaturzeit in beiden Zelllinien nur noch etwa 8 Foci nachgewiesen.

Die Behandlung der UWB1.289-Zellen mit NaAsO₂ führte zu den frühen Reparaturzeiten zu keinerlei additiven oder synergistischen Effekten der IR-induzierten Schäden. Die Betrachtung der Reparaturkinetik zeigte eine kontinuierliche Reduktion der IR-generierten Foci, was auf eine

fortschreitende Reparatur der DSB hindeutet. Im Laufe der Reparatur konnte jedoch eine erhöhte Foci-Anzahl der Arsenit-behandelten Zellen im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung beobachtet werden. Dabei verursachte die Inkubation mit 5 μM nach 24-stündiger Reparatur noch nahezu 20 Foci, was eine verlangsamte Reparatur durch Arsenit vermuten lässt. Dementgegen zeigte sich in den UWB1.289 + BRCA1-Zellen bereits nach 2 h der auch zuvor beschriebene synergistische Effekt von Arsenit auf die IR-vermittelten DSB. Denkbar wäre jedoch auch, dass die zuvor beobachtete beeinträchtigte HR zu einer Verlagerung der Reparaturmechanismen führte und so das NHEJ in den Arsenit-behandelten Zellen gefördert wurde. Eine fortschreitende Reparatur dieser Schäden konnte auch in den UWB1.289 + BRCA1-Zellen vermutet werden. So wurden nach 24-stündiger Reparaturzeit noch etwa 15 Foci in den 5 μM -exponierten BRCA1-profizienten Zellen festgestellt. Die Reparaturkapazität blieb dabei auch nach zusätzlicher Arsenit-Behandlung auf einem ähnlichen Niveau.

Eine BRCA1-Defizienz scheint demnach die Rekrutierung des NHEJ-assoziierten Proteins DNA-PK_{cs} an IR-induzierte Schäden sowie dessen Abdissoziation nicht zu beeinträchtigen. Folglich scheint das NHEJ durch eine BRCA1-Defizienz nicht beeinflusst. Vielmehr scheint dieser Mechanismus, im Vergleich zu den UWB1.289 + BRCA1-Zellen, verstärkt abzulaufen. Dies wiederum könnte durch den beeinträchtigen HR-Mechanismus in den UWB1.289-Zellen begründet sein, wodurch vermehrt das fehlerbehaftete NHEJ abläuft. Die bereits beschriebenen Studien von SNOUWAERT *et al.* und MOYNAHAN *et al.* bekräftigen diese Vermutung (SNOUWAERT *et al.*, 1999; MOYNAHAN *et al.*, 2001; MOYNAHAN *et al.*, 1999). Folglich konnte erstmalig die Verlagerung des fehlerfreien HR zum fehlerbehafteten NHEJ nach IR-induzierter Schädigung durch eine BRCA1-Defizienz auf Ebene spezifischer DNA-Reparaturproteine gezeigt werden.

Während die Reparaturkinetik der UWB1.289 + BRCA1-Zellen keine Beeinflussung des NHEJ nach Arsenit-Behandlung vermuten ließen, verdeutlichten die UWB1.289-Zellen eine leicht beeinträchtigte Abnahme der Foci und somit vermutlich verlangsamte Reparatur nach Metallinkubation. Eine schwache Beeinflussung des NHEJ durch Arsenit konnte bereits von MORALES *et al.* demonstriert werden, wobei hier ein GFP-basiertes Reporterassay-System angewandt wurde (MORALES *et al.*, 2016). Möglich wäre, dass die erhöhte Foci-Anzahl in den BRCA1-profizienten Zellen nach Exposition gegenüber NaAsO₂ auf einen verminderten HR-Reparaturweg und somit einem verstärktem NHEJ zurückzuführen war. Folglich konnte erstmalig gezeigt werden, dass Arsenit zu einer Verlagerung der DSB-Reparaturmechanismen von der nahezu fehlerfreien HR zum fehlerbehafteten NHEJ nach IR-induzierter Schädigung führte.

Um nachfolgend zu überprüfen, welche Auswirkungen die beeinträchtigte HR sowie die Verschiebung zum fehlerbehafteten NHEJ durch eine BRCA1-Defizienz sowie durch Arsenit-Behandlung auf nachfolgende zelluläre Mechanismen hat, wurden anschließend Untersuchungen zu den Zelltodmechanismen durchgeführt.

5.1.6 EINFLUSS VON NaAsO₂ AUF DIE ZELLTODMECHANISMEN

Die Genexpressionsprofile der isolierten Arsenit-Behandlungen sowie der Co-Exposition deuteten in beiden Zelllinien auf eine Induktion des Zelltods über den Weg der Apoptose hin. Um die erhaltenen Ergebnisse dieser Genexpressionsanalysen im Hinblick auf die Zelltodmechanismen auch auf funktioneller Ebene zu verifizieren, wurde im Anschluss die Viabilität in UWB1.289- sowie UWB1.289 + BRCA1-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Bei apoptotischen Zellen verlagert sich das Membran-Phospholipid Phosphatidylserin (PS) von der inneren Membranseite zur äußeren Membran. Annexin V bindet dementsprechend bei apoptotischen Zellen an das äußere PS und erzeugt mit Hilfe des gekoppelten Fluorochroms FITC ein Signal. Um apoptotische Zellen von nekrotischen bzw. spät-apoptotischen Zellen unterscheiden zu können, wurde zusätzlich der Farbstoff PI eingesetzt. PI kann nur die Membran von geschädigten, nicht aber von lebenden Zellen durchdringen, wodurch eine Unterscheidung der einzelnen Zellpopulationen möglich ist. Eine Differenzierung zwischen nekrotisch und spät-apoptotisch ist über diese Methode jedoch nicht möglich.

Zur Bestimmung der Zelltodmechanismen wurden die Zellen 18 h mit NaAsO₂ vorbehandelt, gegebenenfalls mit 1 Gy bestrahlt und anschließend für 8 h nachinkubiert. Für die nicht bestrahlten Versuche ergab sich somit eine Gesamtinkubationszeit von 26 h. Die Experimente wurden für beiden Zelllinien in einem simultanen Versuchsaufbau angesetzt.

Abbildung 33 präsentiert die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen in UWB1.289- und UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach der Behandlung mit NaAsO₂ sowie nach zusätzlicher Bestrahlung mit 1 Gy. Dabei zeigt die vergleichende Darstellung leichte Unterschiede in der Viabilität der beiden Zelllinien. Dennoch konnte sowohl bei den BRCA1-defizienten als auch den -profizienten Zellen eine konzentrationsabhängige Zunahme der apoptotischen sowie nekrotischen und spät-apoptotischen Zellen beobachtet werden. Analog zu den zuvor erhaltenen Ergebnissen führte eine alleinige Bestrahlung nicht zu apoptotischen oder nekrotischen Effekten. Auch bei der Co-Exposition konnten, im Einklang zu den zuvor durchgeführten Analysen, keine additiven oder synergistischen Effekte zur isolierten Metallbehandlung identifiziert werden.

Die Betrachtung der basal verteilten zellulären Anteile in Bezug auf die Vitalität zeigte eine nahezu identische Verteilung zwischen den beiden Zelllinien. So konnten etwa 88 % vitale Zellen, 4 % apoptotische Zellen sowie 7 % nekrotische und spät-apoptotische Zellen verzeichnet werden. Die beschriebene konzentrationsabhängige Abnahme der Vitalität resultierte in den UWB1.289-Zellen nach 10 µM NaAsO₂ in 8 % apoptotischen Zellen sowie nahezu 16 % nekrotischen und spät-apoptotischen Zellen. Auch in den UWB1.289 + BRCA1-Zellen zeigte sich die Induktion des Zelltods nach Behandlung, wobei diese etwas stärker ausgeprägt war als bei

den defizienten Zellen. Die Inkubation mit 10 μM führte dabei zu einer zellulären Populationsverteilung von 8 % Apoptose sowie 26 % Nekrose und späte Apoptose und somit zu 10 % weniger vitale Zellen im Vergleich zu den UWB1.289-Zellen. Eine signifikante Zunahme der nekrotischen Zellen konnte in keiner der beiden Zelllinien nach den verschiedenen Behandlungsarten identifiziert werden.

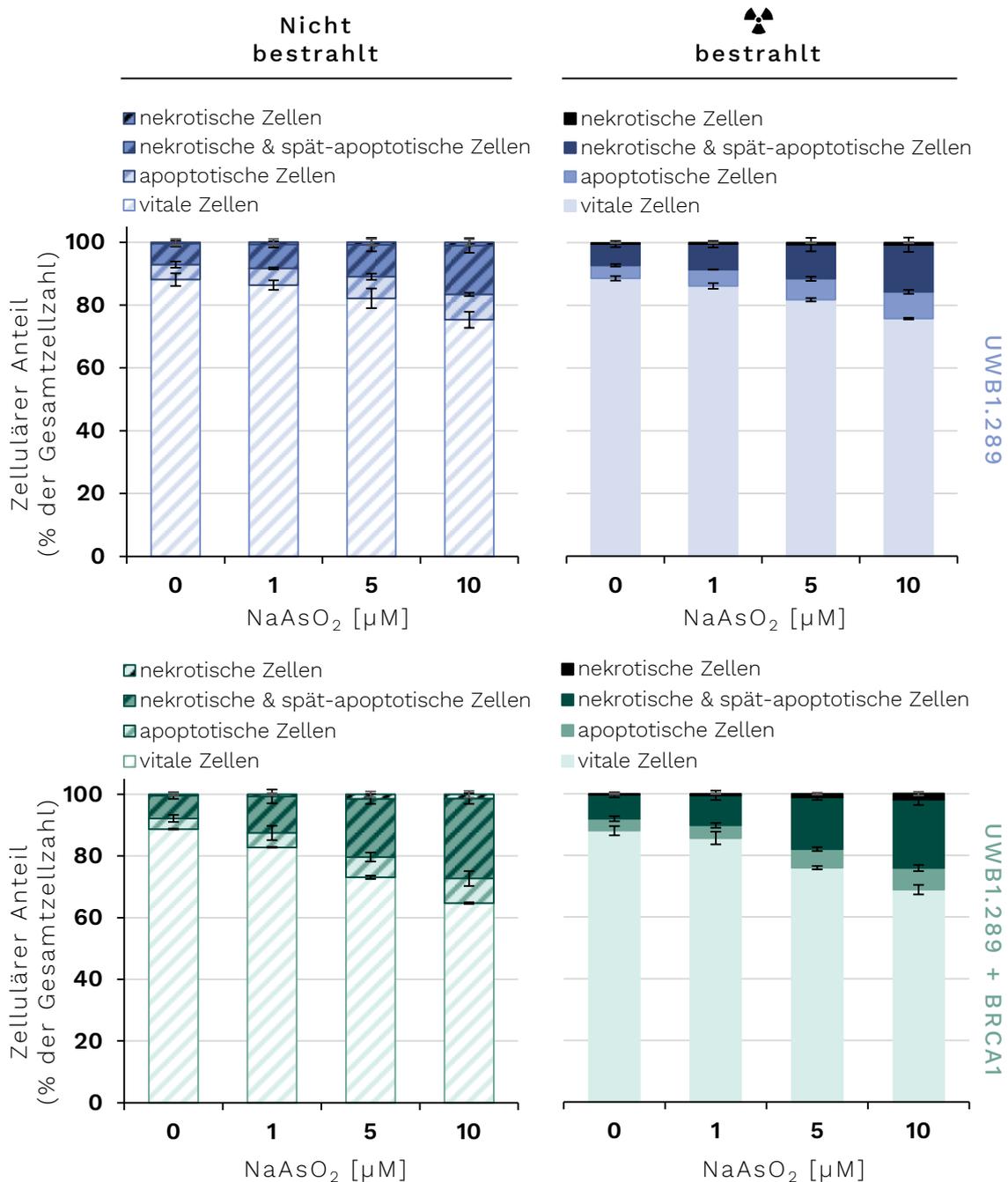


Abbildung 33: Vergleichende Darstellung der unterschiedlichen Zelltodmechanismen in UWB1.289- sowie UWB1.289 + BRCA1-Zellen.

Beide Zelllinien wurden für 18 h mit NaAsO₂ vorbehandelt, wo angezeigt mit 1 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

NaAsO₂ induzierte demnach konzentrationsabhängig den Zelltod sowohl in den BRCA1-defizienten wie auch in den -profizienten Zellen. Eine Unterscheidung zwischen den beiden Zelltodmechanismen Apoptose und Nekrose konnte jedoch nicht gemacht werden. Zusätzlich zeigten die UWB1.289 + BRCA1-Zellen eine verstärkte Induktion des Zelltods im Vergleich zu den UWB1.289-Zellen, was eine funktionelle Rolle von BRCA1 in diesen Mechanismen vermuten lässt. Folglich konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig die direkte Beteiligung von BRCA1 an der Induktion des Zelltods nach Schädigung durch eine Arsen-Exposition nachgewiesen werden.

Die vergleichende Vitalität der beiden Zelllinien unter basalen Bedingungen lässt sich durch die Studie von Xu *et al.* erklären, wobei die Arbeitsgruppe den Einfluss von p53 auf eine BRCA1-Defizienz untersuchte. Dabei wurde unter anderem die Wirkung auf die Apoptose analysiert, da p53 die Proliferation durch die Einleitung der Apoptose fördern kann. Während BRCA1^{Δ11/Δ11} p53^{+/+}-Zellen zu einer Induktion des Zelltods führte, konnte bereits der Verlust von nur einem p53-Allel die durch eine BRCA1-Defizienz vermittelte Apoptose vermindern (Xu *et al.*, 2001B).

Auch das ähnliche Level an vitalen Zellen nach Schädigung durch IR im Vergleich zum basalen Niveau kann möglicherweise auf die in den eingesetzten Zelllinien vorhandene p53-Defizienz zurückgeführt werden. So konnten BUNTING *et al.* in ihrer Studie zeigen, dass ein IR-induzierter Zelltod p53-abhängig ablief, was sich in einer Apoptoseresistenz der BRCA1^{Δ11/Δ11} p53^{-/-}-Zellen verdeutlichte. Gleichzeitig verlief die Induktion der Apoptose von BRCA1-defizienten Zellen nach Behandlung mit einem PARP-Inhibitor unabhängig von p53 (BUNTING *et al.*, 2012). Demnach scheint die Einleitung der Apoptose in den untersuchten UWB1.289-Zellen von der Art der Behandlung und der damit einhergehenden Schadensart abhängig.

Die erhaltenen Ergebnisse der alleinigen Arsenit-Behandlung sowie der Co-Exposition konnten durch bereits vorliegende Literaturdaten bekräftigt werden. Dabei wurde die Induktion der Apoptose durch Arsenit bereits in mehreren Studien sowie in unterschiedlichen Zelllinien und zu verschiedenen Zeitpunkten beobachtet. So untersuchten Ho *et al.* neben der Zellzyklusphasenverteilung auch die Wirkung von Arsen, IR sowie deren Co-Exposition auf die Apoptose. Dabei konnte die Arbeitsgruppe eine leichte Induktion der Apoptose durch die isolierten Behandlungen feststellen, wobei die Co-Exposition diesen Effekt deutlich verstärkte. Hierbei gilt jedoch zu erwähnen, dass in der publizierten Studie die Zellen zunächst bestrahlt und erst im Anschluss mit Arsenit inkubiert wurden, was die Diskrepanz zu den vorliegenden Ergebnissen erklären könnte. Außerdem wiesen die Studien eine starke Zeitabhängigkeit des apoptotischen Effekts auf. Die erhöhte apoptotische Zellrate ging dabei mit einer Induktion des M-Arrests, einer intrazellulären ROS-Generierung, einem verminderten Expressionslevel von anti-apoptischen Bcl-Proteinen, einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials sowie der Aktivierung der Caspase-3 einher (Ho *et al.*, 2009). Auch YIH *et al.* beschrieben einen Zusammenhang zwischen einem mitotischen Arrest und dem Arsenit-induzierten Zelltod (YIH

et al., 2005). HUANG *et al.* konnten ebenso die Induktion der Apoptose durch Arsenit in p53-defizienten Zellen beobachten. Die Autorengruppe beschrieb dabei die Signalisierung des Zelltods über die Aktivierung des MAPK-Mitglieds JNKs (HUANG *et al.*, 1999). Weiterhin zeigte sich eine sensibilisierende Wirkung von Arsenit anhand der Hochregulation des Todesrezeptors DR5, was auf eine TRAIL-induzierte Apoptose hindeutete. Dabei konnte die Wirkung direkt auf Arsenit und weniger auf die durch das Metalloid generierten ROS zurückgeführt werden. Die Forscher beschrieben dabei ebenfalls die Aktivierung des Caspase-Wegs (KIM *et al.*, 2008). Neben der Arsen-eingeleiteten Apoptose über den intrinsischen sowie den extrinsischen Signalweg konnten KIM *et al.* auch die Induktion der Nekrose durch das Halbmetall feststellen. Als ein möglicher Mechanismus diskutierten die Forscher die Akkumulation der intrazellulären ROS und damit die Einleitung der Zelltodmechanismen durch oxidativen Stress (KIM *et al.*, 2014).

Folglich scheint Arsenit über den in den Zellzyklusuntersuchungen postulierten mitotischen Arrest den Mechanismus der Apoptose einzuleiten. Dabei könnte Arsenit selbst sowie die vom Metalloid generierten ROS das mitochondriale Membranpotential beeinträchtigen, so Cytochrom c freisetzen und über die Aktivierung der Caspase-Kaskade den Zelltod induzieren. Die Signalisierung könnte dabei über den JNK-Weg verlaufen, wodurch zusätzlich anti-apoptotische Bcl-Proteine vermindert exprimiert werden. Auch eine Weiterleitung über den TRAIL/DR5-Signalweg wäre eine Möglichkeit zur Initiierung der Caspase-Kaskade. Neben dem Mechanismus der Apoptose kann jedoch auch die Nekrose als zusätzlicher Teil des Arsenit-induzierten Zelltods nicht ausgeschlossen werden.

QUINN *et al.* konnten neben einer sensibilisierende Wirkung auch einen Resistenz-vermittelten Effekt von BRCA1 auf den Zelltodmechanismus der Apoptose beobachten. Die Forscher postulierten demnach, dass BRCA1 als differentieller Regulator der Apoptose, in Abhängigkeit von der Art des zellulären Angriffs, dient. Die sensibilisierende Wirkung und damit verstärkte Apoptose trat insbesondere bei chemotherapeutischen Spindelgiften auf, wohingegen BRCA1 bei DSB-induzierende Agentien wie Etoposid eine verminderte Apoptoserate verursachte. Die Arbeitsgruppe postulierte zudem, dass diese fördernde sowie inhibierende Wirkung von BRCA1 unabhängig von p53 ausgelöst wird. Des Weiteren beschrieben sie einen BRCA1-vermittelten G₂/M-Arrest, der jedoch für beide verschiedenen Schadensarten beobachtet werden konnte. Demnach wäre möglich, dass der unterschiedliche Effekt auf die Apoptose verschiedene Subpopulationen von Zellen in der G₂/M- und der mitotischen Phase als Reaktion auf die verschiedenen Wirkstoffe widerspiegelt. So konnte die Arbeitsgruppe zuvor bereits eine Aktivierung des mitotischen *Checkpoints* durch BRCA1 als Reaktion auf das Spindelgift Paclitaxel beobachten, was eine direkte Rolle von BRCA1 innerhalb dieses Kontrollpunktes impliziert (QUINN *et al.*, 2003). Zusammen mit der Vermutung, dass Arsenit zu einem M-Arrest führt, scheint BRCA1 eine sensibilisierende Wirkung auf die Apoptose nach Arsenit-vermittelter Schädigung auszuüben und somit auf ähnliche Art und Weise wie im Falle der Spindelgifte zu wirken.

5.2 REKOMBINANTE EXPRESSION EINES BRCA1-KONSTRUKTES

Die ersten Strukturuntersuchungen eines BRCA1-Konstruktes wurden von ROEHM UND BERG veröffentlicht. Die Arbeitsgruppe nutzte dafür ein synthetisches Peptid, das aus dem reinen Ringfinger von BRCA1 (AS 22 – 77) bestand. Untersucht wurden damals die Sekundärstruktur des Apo-peptides sowie die Metallbindung von Co(II) und die daraus resultierenden Konformationsänderungen (ROEHM UND BERG, 1997). Kurz darauf wurden weitere Forschungsarbeiten publiziert, die sich ebenfalls mit der funktionellen RING-Domäne des BRCA1-Proteins beschäftigten. Dabei wurde postuliert, dass die ersten 110 AS von BRCA1 eine einzigartige Struktur ausbilden. Die durchgeführten Analysen zeigten eine Proteolyse-resistenten Strukturdomäne, die die ersten 110 AS von BRCA1 umfasste. Demnach wurde angenommen, dass Ringfinger-Motive selbst keine stabilen strukturellen Domänen ausbilden, sondern stattdessen integraler Teil von größeren Domänen sind (BRZOVIC *et al.*, 1998; MEZA *et al.*, 1999).

Aufgrund dieser Tatsache wurde ein Peptid mit den ersten 110 AS von BRCA1 rekombinant exprimiert, wodurch im Anschluss der Einfluss unterschiedlicher Metallverbindungen auf die Ringfingerstruktur im BRCA1-Protein analysiert werden konnte. Die DNA-Sequenz für die bakterielle Proteinexpression wurde von Rachel Klevit zur Verfügung gestellt und von der Firma Addgene vertrieben (RRID: Addgene_12645). Die Mutagenese zur Verkürzung des Peptides sowie die Klonierung des Konstruktes wurden in Zusammenarbeit mit Frau Stefanie Vollmer vom IBG-2 des KIT durchgeführt.

Bei dem für die Überexpression eingesetzten Expressionsstamm handelt es sich um einen genetisch veränderten Bakterienstamm, der im Chromosom eine Kopie des Gens der T7-RNA-Polymerase trägt. Diese Polymerase des Phagen T7 ist hoch selektiv für seinen eigenen Promotor und kommt natürlicherweise nicht in *E.coli* vor. Unmittelbar vor dem eingefügten Gen für die T7-RNA-Polymerase besitzt das Chromosom der *E.coli* BL21 (DE3) ein *lac*-Operon, das einer negativen Regulation unterliegt. Dabei verhindert der gebundene *lac*-Repressor die Synthese der T7-RNA-Polymerase. Durch Zugabe von Lactose oder eines Lactoseanalogs, meist IPTG, dissoziiert der Repressor ab und die Transkription der T7-RNA-Polymerase wird initiiert. Die eingesetzten Expressionsvektoren besitzen dabei, unmittelbar vor der Insertionsstelle für das zu exprimierende Gen, den sogenannten späten Promotor des Phagen T7. Die synthetisierte Polymerase ist in der Lage, an diesen späten T7-Promotor zu binden, wodurch die Transkription des Zielgens gestartet wird (Abbildung 34). Der Anteil des rekombinanten Proteins beträgt nach Zugabe von IPTG etwa 50 % des Gesamtproteingehaltes (STUDIER UND MOFFATT, 1986).

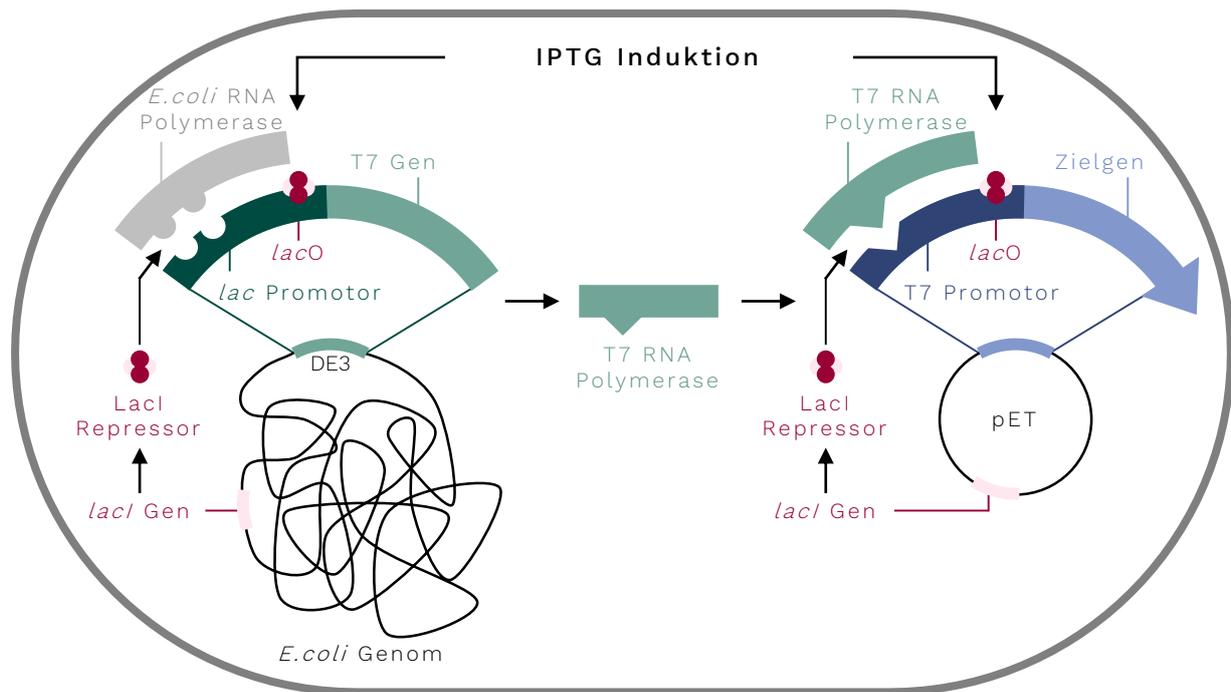


Abbildung 34: Schematische Darstellung des verwendeten pET Vektor Expressionssystems.

Die eingesetzten *E. coli* BL21 DE3-Zellen sind gentechnisch so verändert, dass sie im Chromosom eine Kopie des Gens der T7 RNA-Polymerase tragen. Der pET-Plasmidvektor nutzt den Phagen T7 Promotor, um die Synthese des Zielgens zu regulieren. Sowohl die Bakterienzellen als auch der Plasmidvektor besitzen unmittelbar vor dem Gen für die T7 Polymerase bzw. für das Zielgen ein *lac*-Operon (*lacO*), wodurch die Transkription reguliert wird. Der gebundene *lac*-Repressor verhindert dabei die Synthese. Durch Zugabe von IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid), dissoziiert der Repressor ab und die Synthese der T7 Polymerase wird gestartet. Die dabei gebildete Polymerase ist nun in der Lage, an den T7 Promotor im Plasmidvektor zu binden, wodurch die Transkription des Zielgens initiiert wird (modifiziert nach NOVAGEN, 2003).

Der eingesetzte Expressionsvektor pET151D topo codiert für einen N-terminalen Hexa-Histidin-*Tag*, wodurch das Protein nach der Expression über eine Nickelaffinitätschromatographie aufgereinigt werden konnte. Durch die selektive Bindung der im N-terminalen Protein-*Tag* enthaltenen Histidine an das Säulenmaterial Nickel-Nitriloessigsäure (Ni-NTA) erfolgt die Abtrennung der Zellbestandteile sowie unspezifischer Proteine. Die Elution des rekombinanten Proteins erfolgt anschließend über eine Pufferlösung mit hoher Imidazolkonzentration. Imidazol besitzt im Vergleich zum Histidin eine höhere Affinität gegenüber Nickel und verdrängt so das gebundene Protein. Zur Erhöhung der Reinheit des Eluats wird in der Regel vor der Elution ein Waschschriff mit niedriger Imidazolkonzentration und hoher Salzkonzentration durchgeführt.

Das in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) transformierte verkürzte Konstrukt wurde zunächst auf die Expression des BRCA1-Peptides getestet und das Gesamtlysate über eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung oder anschließendem Western Blot mit Immunodetektion analysiert. Dabei wurden ab dem Zeitpunkt der Induktion stündlich Proben zur Dokumentation des Expressionsverlaufes entnommen und analysiert. Während das Ausbleiben einer Bande vor der Induktion (0 h) darauf schließen lässt, dass keine

Basalexpression vorliegt, verdeutlichen die unverkennbaren Banden ab dem Zeitpunkt der Induktion ein hohes Expressionsniveau (Abbildung 35). So konnte eine Bande bei etwa 16 kDa im Coomassie-gefärbten Gel sowie auf der immunologisch detektierten Membran identifiziert werden. Das mittels *ProtParam* von *Expasy* berechnete Molekulargewicht der eingesetzten AS-Sequenz lag bei 16,4 kDa und bestätigte damit die Expression des BRCA1-Peptides. Neben der deutlich sichtbaren Bande des BRCA1-Monomers (~ 16 kDa) konnte auf der Membran zudem eine zweite Bande bei etwa 30 kDa beobachtet werden. Möglich wäre hierbei die Bildung eines Homodimers, was einem Molekulargewicht von etwa 32 kDa entspricht. Die Homodimerisierung N-terminaler BRCA1-Konstrukte konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden und bekräftigt so die hier beschriebene Vermutung der Dimerbildung (BRZOVIC *et al.*, 1998; MEZA *et al.*, 1999). Auch nach knapp 24 h (ON; *over night*) zeigte sich kein merklicher Proteinabbau, weshalb für die nachfolgenden Untersuchungen über Nacht exprimiert wurde.

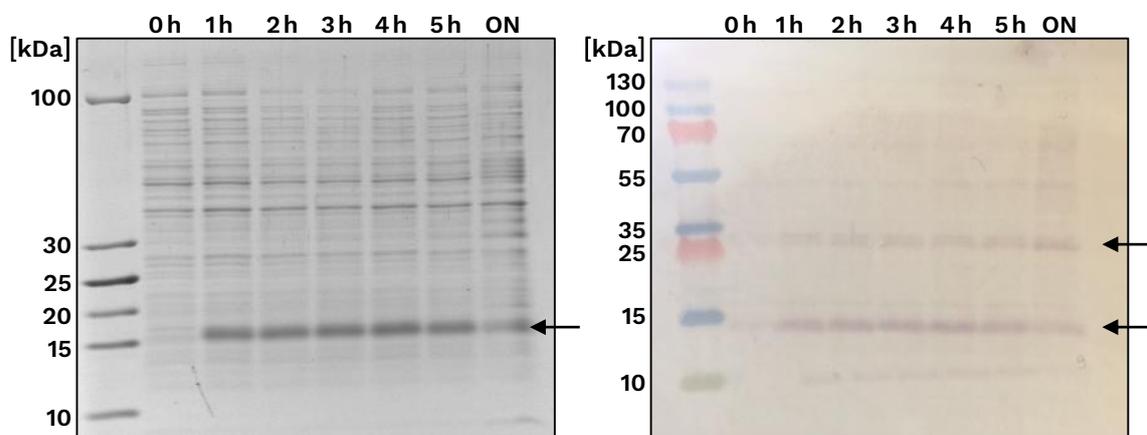


Abbildung 35: Testexpression des BRCA1-Konstruktes im Gesamtlysat.

Dargestellt sind die Coomassie-Färbung der SDS-PAGE (links) sowie der Western Blot mit anschließender Immunodetektion (rechts) der Testexpression des verkürzten BRCA1-Peptides. Dabei sind die Spuren vor (0 h) sowie nach (1 – 5 h bzw. ON (*over night*)) der Induktion sichtbar. Der untere Pfeil markiert dabei die Position des BRCA1-Monomers, während der obere Pfeil im Western Blot ein BRCA1-Dimer vermuten lässt.

Ausgehend von den Ergebnissen der Testexpression wurde das BRCA1-Peptid bei 37 °C für 24 h im präparativen Maßstab exprimiert. Im Anschluss wurden der Zellaufschluss sowie die Auftrennung in Cytoplasma (CP), Zelltrümmer (ZT) sowie Membran (MF) -Fraktion durchgeführt. Mit Hilfe des fusionierten Hexa-Histidin-*Tags* konnte das Peptid über die IMAC aus den genannten Fraktionen gewonnen und über eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung oder anschließendem Western Blot mit Immunodetektion analysiert werden.

Abbildung 36 zeigt das Coomassie-gefärbte Gel sowie die immunologisch detektierte Membran der gewonnenen Elutionsfraktionen der IMAC. Dabei wird deutlich, dass in der löslichen CP- und der unlöslichen MF-Fraktion nur sehr wenig BRCA1-Peptid vorhanden war. Das eingesetzte Konstrukt schien überwiegend in der ZT-Fraktion und somit der unlöslichen Fraktion lokalisiert, was durch die Bande bei 16 kDa (Monomer) sowie die Bande bei 32 kDa (Dimer) verdeutlicht

wurde. Die anionischen Detergenzien NLS und SDS erwiesen sich als besonders nützlich, um das Peptid zu solubilisieren und in der Lösung zu stabilisieren. Da die Proteinausbeute in der ZT-Fraktion am höchsten war, wurden diese für die nachfolgenden Analysen eingesetzt.

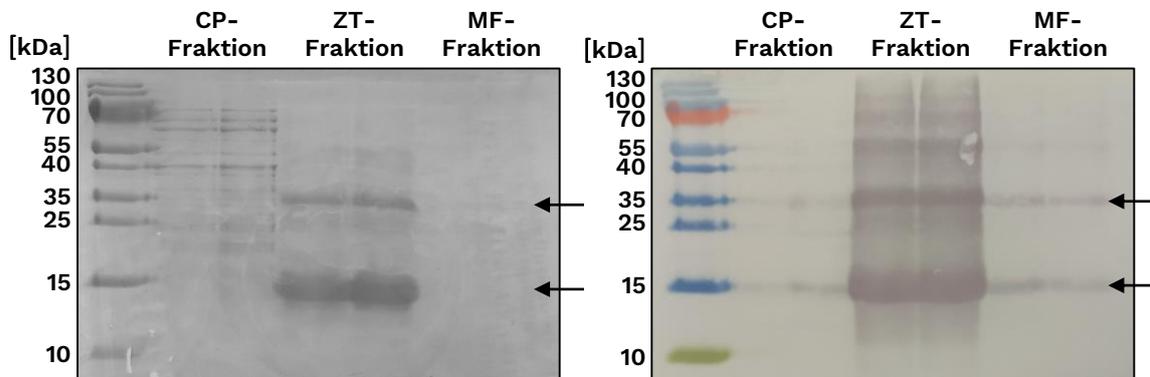


Abbildung 36: Vergleich der mittels Nickelaffinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigten Fraktionen.

Dargestellt sind die Coomassie-Färbung der SDS-PAGE (links) sowie der Western Blot mit anschließender Immunodetektion (rechts) der mittels IMAC-aufgereinigten Proben. Dabei zeigen jeweils zwei Spuren die Cytoplasma (CP), zwei Spuren die Zelltrümmer (ZT) und zwei Spuren die Membran (MF) -Fraktion. Der untere Pfeil markiert dabei die Position des Monomers, während der obere Pfeil die Position des BRCA1-Dimers darstellt.

Nach erfolgreicher Aufreinigung sollte eine Abspaltung des Hexa-Histidin-*Tags* mittels TEV-Protease stattfinden. Trotz vorhandener Schnittstelle war die Entfernung des *Tags*, vermutlich aufgrund sterischer Hinderung, nicht möglich. Demnach wurde für die folgenden Untersuchungen immer mit einem Überschuss an Metallionen gearbeitet. So konnte sichergestellt werden, dass die zweiwertigen Metallionen nicht von den Histidinen des *Tags* gebunden wurden, sondern in der Lage waren, an die Bindungsstellen im Peptid zu assoziieren.

Die Elutionsfraktion der ZT wurde anschließend einer Gelfiltration unterzogen, wodurch Verunreinigungen entfernt und der Imidazol- sowie Salz-haltige Puffer ausgetauscht werden konnte. Dem Zielpuffer wurden 10 mM SDS zur Solubilisierung und Stabilisierung des Peptides zugesetzt. Im Anschluss wurde der Proteingehalt der Gelfiltrationsfraktionen bestimmt und die Fraktion mit der höchsten Konzentration des BRCA1-Konstruktes für die nachfolgenden spektroskopischen Untersuchungen eingesetzt.

5.3 STRUKTURUNTERSUCHUNGEN MITTELS CIRCULARDICHROISMUS-SPEKTROSKOPIE

Neben den Aussagen über die globale Sekundärstruktur eines Proteins erlaubt die CD-Spektroskopie im fernen UV-Bereich auch die schnelle und empfindliche Analyse von Konformationsänderungen nach Substratbindung oder einer thermischen Denaturierung. Um eine mögliche Strukturveränderung der Ringfinger-Domäne von BRCA1 nach Metallbindung zu untersuchen, wurde in der hier vorliegenden Arbeit die SRCD-Spektroskopie eingesetzt. Die

Domäne enthält zwei mögliche Bindungsstellen, in denen natürlicherweise Zn(II) als Cofaktor vorliegt. Neben dem natürlichen Bindungspartner wurden Untersuchungen mit den beiden Metallverbindungen CoCl_2 und NiCl_2 durchgeführt, die ebenfalls eine hohe Affinität gegenüber Thiolgruppen aufweisen. Zudem wurde die Assoziation des toxischen Halbmetalls Arsen analysiert, um die beeinträchtigte Dissoziationsfähigkeit des BRCA1-Proteins vom DSB mit einer Veränderung der Sekundärstruktur in Verbindung zu bringen.

5.3.1 REKOMBINANTES PEPTID

Abbildung 37 stellt die durch die SRCD-Untersuchungen generierten Spektren des rekombinant exprimierten Peptides (schwarz) dar. Dabei zeigten sich charakteristische Kurvenverläufe für ein helikales Peptid mit einem gewissen unstrukturierten Anteil. Das Maximum bei 192 nm sowie die negativen Banden bei ~ 208 nm und ~ 222 nm deuteten auf eine α -helikale Struktur hin.

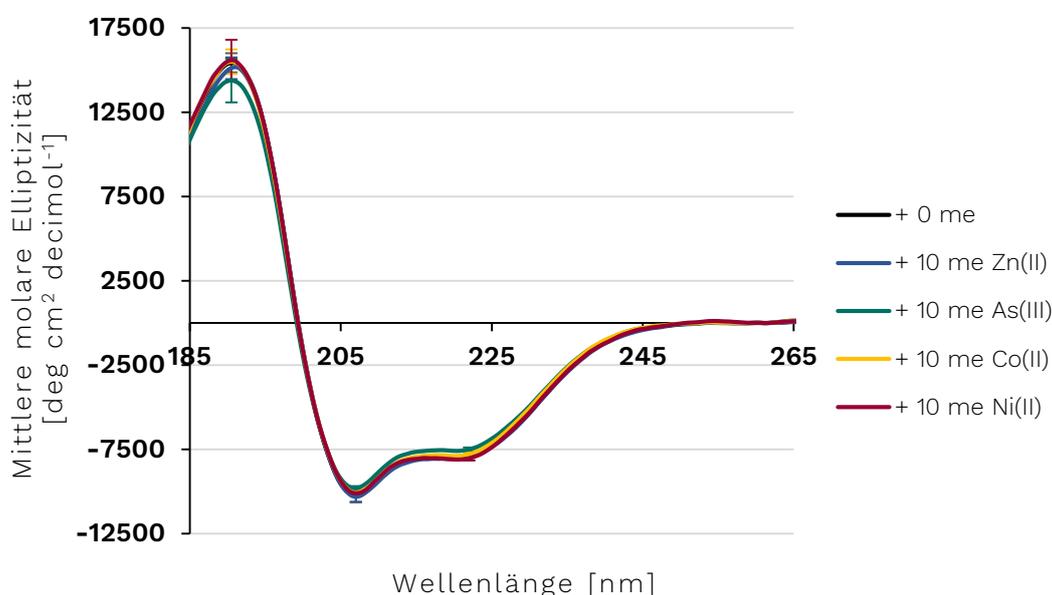


Abbildung 37: SRCD-Spektren des rekombinanten BRCA1-Peptides nach Behandlung mit verschiedenen Metalllösungen.

Dargestellt sind neben dem Spektrum des unbehandelten Peptides (schwarz) auch die Spektren nach Inkubation mit 10 Moläquivalenten (me) ZnCl_2 (blau), 10 me NaAsO_2 (grün), 10 me CoCl_2 (gelb) und 10 me NiCl_2 (rot). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Messungen.

Bei den erhaltenen Spektren konnte davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um das Apo-peptid, sondern um das mit Zink-besetzte rekombinante Peptid von BRCA1 handelt. *E.coli* Bakterien sind in der Lage das Zink aus dem Kulturmedium bis zum 2000-fachen der verfügbaren extrazellulären Menge zu akkumulieren. Die intrazelluläre freie Zinkkonzentration in *E.colis* bleibt dabei jedoch stets niedrig und liegt im femtomolaren Bereich. Die Menge an intrazellulärem Zink, die für das optimale Wachstum von *E.coli* Bakterien benötigt wird, ist auch unter dem Begriff *zinc quota* bekannt. Dieser *zinc quota* beläuft sich bei *E.coli* Bakterien, deren Kultivierung in LB-Medium erfolgte, auf circa $100 \mu\text{M}$ (OUTTEN UND O'HALLORAN, 2001). Ein für die

vollständige Peptidfaltung ausreichend hohes Maß an freien Zinkionen stand somit zum Zeitpunkt der Kultivierung zur Verfügung.

Mit Hilfe des DICHROWEB-Servers konnte der Gehalt der Sekundärstrukturen berechnet werden. Dafür wurde das CD-Signal zunächst in die mittlere molare Elliptizität pro Peptidbindung ($[\Theta]_{MRE}$) umgerechnet. Für die Auswertung wurden die drei auf dem Server verfügbaren, mathematischen Algorithmen SELCON 3, CONTIN LL und CDSSTR eingesetzt. Die daraus berechneten Werte wurden im Anschluss gemittelt. Als Referenz diente der Datensatz SP175, da dieser mittels SRCD gemessene Proteinspektren beinhaltet. Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Prozentuale Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturelemente von rekombinanten BRCA1-Peptiden.

Vergleich der mit Hilfe des DICHROWEB-Servers berechneten Sekundärstrukturanteile des in dieser Arbeit exprimierten BRCA1-Peptides mit den bereits in BRZOVIC *et al.*, 2001 veröffentlichten Strukturinformationen. Dabei ist zu beachten, dass die dort ermittelten Anteile gefalteter Aminosäuren (AS) hier in der Tabelle prozentual auf die Gesamtzahl an AS des in dieser Arbeit verwendeten Konstruktes (143 AS) bezogen wurden.

	<i>Random coil</i>	α -Helix	β -Faltblatt	<i>Turns</i>
Peptid der vorliegenden Arbeit Σ AS 143 (BRCA1 AS 1 – 110)	35,7 \pm 0,3	25,2 \pm 0,4	25,4 \pm 0,4	13,5 \pm 0,4
Peptid publiziert in BRZOVIC <i>et al.</i> , 2001 Σ AS 112 (BRCA1 AS 1 – 110)		27,3	6,3	

Die quantitative Sekundärstrukturauswertung der durchgeführten Experimente zeigte einen ungeordneten Anteil von circa 36 % sowie einen helikalen Anteil von etwa 25 %. Des Weiteren konnten ~ 25 % β -Faltblattstrukturen sowie circa 14 % β -Schleifen (*turns*) zugeordnet werden.

BRZOVIC *et al.* veröffentlichten bereits 2001 Ergebnisse zu Strukturuntersuchungen des BRCA1/BARD1-Heterodimers, welche auch in der Proteindatenbank *RCSB PDB* unter der Identifikationsnummer „1JM7“ zu finden sind. Die hierbei generierten Daten wurden mit Hilfe der Flüssig-NMR ermittelt, wobei die eingesetzten Peptide ebenfalls mittels bakterieller Proteinexpression hergestellt wurden. Das in der Publikation verwendete Konstrukt beinhaltete, analog zu dem in dieser Arbeit exprimierten Peptid, die AS 1 – 110 der BRCA1-Sequenz (BRZOVIC *et al.*, 2001). Dabei ist jedoch zu beachten, dass durch die fehlende Abspaltung des Hexa-Histidin-*Tags* und somit auch des V5-*Tags* und der TEV-Proteaseschnittstelle das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte rekombinante Peptid aus insgesamt 143 AS bestand. Für die weiterführende Diskussion der Ergebnisse wurde angenommen, dass lediglich die ersten 110 AS des BRCA1-Proteins zur Faltung des Peptides beitragen. Diese Annahme begründete sich darin, dass der N-terminale Teil vor dem eigentlichen Fragment, welcher sich aus den beiden *Tags* und der Proteaseschnittstelle zusammensetzt, in der Regel ungeordnet vorliegt (CARSON *et al.*, 2007). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Ergebnisse der Strukturuntersuchungen von

BRZOVIC *et al.*, 2001 auf dieselbe Anzahl an AS (143 AS) extrapoliert (Tabelle 10). Die in der Veröffentlichung beobachteten drei α -Helices (genauer siehe Kapitel 2.2.1) umfassen insgesamt 39 AS, was bei einem Konstrukt aus 112 AS etwa 35 % ausmacht. Umgerechnet auf 143 AS konnte demnach ein helikaler Anteil von etwa 27 % nachgewiesen werden. Der in dieser Arbeit berechnete α -Helix-Strukturanteil von circa 25 % stand demnach im Einklang mit den bereits publizierten Daten. Deutliche Unterschiede waren jedoch im Anteil der β -Faltblattstrukturen ersichtlich. Wie bereits in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, identifizierte die Arbeitsgruppe von BRZOVIC insgesamt 9 AS, die als β -Strang gefaltet vorliegen und zusammen ein antiparalleles β -Faltblatt bilden. Demnach waren im reinen BRCA1-Konstrukt (110 AS) etwa 8 % der Sekundärstrukturelemente auf β -Faltblattstrukturen zurückzuführen, was bei einem 143 AS-Konstrukt einem Anteil von etwa 6 % entsprach. Verglichen mit den mittels SRCD-Untersuchungen erhaltenen Ergebnissen zeigten sich demnach Abweichungen von etwa 19 %. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte die allgemein geringere Intensität des CD-Signals für β -Faltblattstrukturen sein, wodurch kleine Differenzen große Abweichungen verursachen. Des Weiteren sind die Spektren für β -Faltblattstrukturen vielfältiger als die helikaler Proteine, da sie in parallelen, antiparallelen oder gemischten Konformationen vorliegen können und auf viele Arten gewunden sein können. Die quantitative Auswertung von β -Faltblatt-haltigen Proteinen bei der CD-Spektroskopie ist aufgrund der enormen morphologischen und spektralen Vielfalt dieser Strukturen ein weit verbreitetes und bekanntes Problem. Zudem hängt das CD-Signal dieser Strukturen stark von den Umgebungsfaktoren, wie dem Lösungsmittel, ab. Demnach könnten auch die unterschiedlich eingesetzten Puffer den Unterschied der quantitativen Auswertung erklären (CORRÉA UND RAMOS, 2009; WOODY, 1995; MICSONAI *et al.*, 2015).

Um den potentiellen Einfluss von unterschiedlichen Metallionen auf die Ringfingerstruktur von BRCA1 zu untersuchen, wurde das rekombinant hergestellte Peptid zunächst mit unterschiedlichen Moläquivalenten (me) ZnCl_2 , NaAsO_2 , CoCl_2 oder NiCl_2 inkubiert und nach kurzer Äquilibrierungszeit die jeweiligen SRCD-Spektren erfasst. Abbildung 37 zeigt die gewonnenen Elliptizitätswerte nach der entsprechenden Behandlung, wobei lediglich die Spektren mit 10 me Metalllösung dargestellt sind. Verglichen mit dem unbehandelten Peptid (0 me) konnte bei keinem der getesteten Metallionen eine Konformationsänderung festgestellt werden. Um sicherzustellen, dass genügend Zeit zur Metall-Ligand-Interaktion vorhanden war, wurden zusätzlich Untersuchungen nach 24 h Äquilibrierungszeit durchgeführt. Analog zu den vorherigen Analysen zeigte sich auch hier keine Strukturveränderung (Daten nicht dargestellt).

Unter der Annahme, dass es sich bei dem rekombinanten Peptid um die mit Zink-gesättigte Form handelte, deuten die Ergebnisse demnach auf eine höhere Bindungsaffinität von Zn(II) im Vergleich zu den anderen, hier getesteten Metallionen hin. So kann geschlussfolgert werden,

dass keines der Metalloide in der Lage ist, Zink aus seiner bevorzugten Koordinationsumgebung herauszulösen, um so eine Strukturveränderung zu verursachen.

Bei den erhaltenen Ergebnissen ist jedoch zu beachten, dass die Proben in einem Natriumphosphat (PB) -Puffer mit SDS als Detergenz angesetzt wurden. SDS ist dabei in der Lage, kugelförmige Mizellen zu bilden, wodurch das Peptid in Lösung gehalten wird. Durch die negative Ladung des Detergenz wäre denkbar, dass die positiv geladenen Metallionen durch die Mizellen abgefangen wurden und gegebenenfalls keine Interaktion mit den Zinkbindungsstellen eingegangen werden konnte. Um dies zu überprüfen, wurde das rekombinante Peptid mittels Gelfiltration in unterschiedliche Lösungsmittel (H₂O, 150 mM NaF) umgepuffert. Zwar wurde durch diese Methode der SDS-Gehalt deutlich verringert, eine vollständige Entfernung des Detergenz konnte jedoch nicht garantiert werden. Auch die SRCD-Spektren dieser Analysen ließen keine deutliche Strukturänderung verzeichnen (Daten nicht dargestellt).

Da ROEHM UND BERG die Bindung von Co(II) an ein kürzeres BRCA1-Konstrukt (AS 22 – 77) bereits zeigen konnten, wurde die Assoziation von Cobalt über eine weitere Methode untersucht. Hierbei gilt es nochmals hervorzuheben, dass es sich bei dem von der Arbeitsgruppe eingesetzten Konstrukt um ein synthetisches Peptid in seiner unbesetzten Form handelte (ROEHM UND BERG, 1997). Um zu überprüfen, ob die ausbleibende Konformationsänderung tatsächlich auf eine fehlende Bindung zurückzuführen ist, oder ob als Ursache eine unzureichende Sensitivität der Methode verantwortlich ist, wurden zudem thermische Denaturierungskurven aufgenommen.

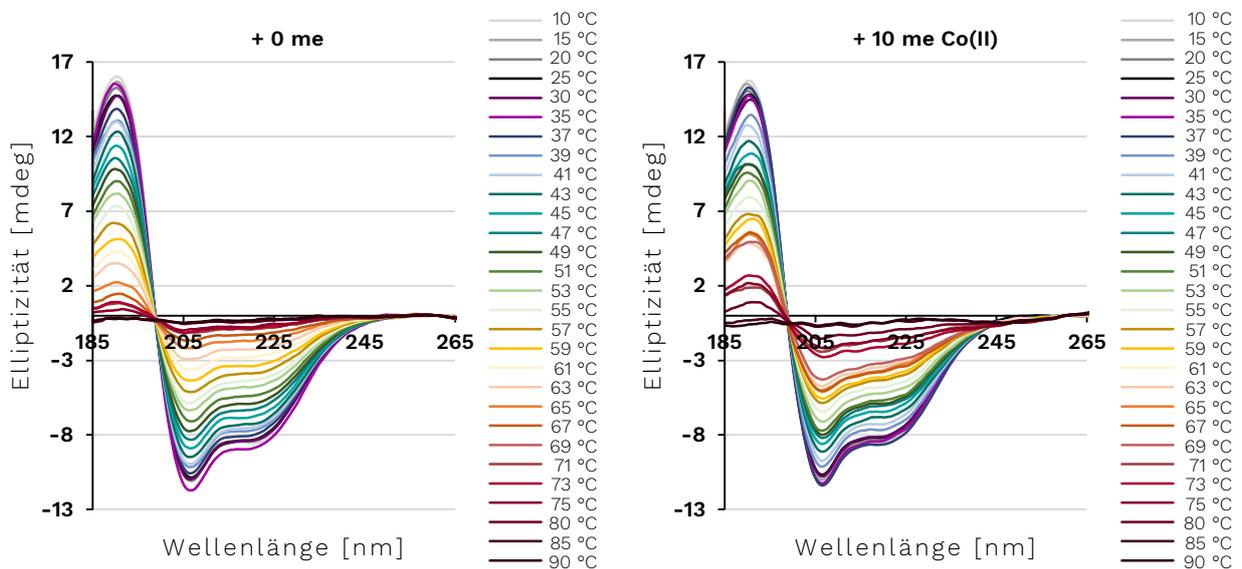


Abbildung 38: SRCD-Spektren einer thermischen Denaturierung des rekombinanten BRCA1-Peptides vor und nach Behandlung mit CoCl₂.

Dargestellt sind exemplarisch die SRCD-Spektren des unbehandelten (links) sowie des mit 10 Moläquivalent (me) Co(II)-behandelten (rechts) Peptides als Funktion der Temperatur. Dabei wurden Probertemperaturen zwischen 10 °C und 90 °C gewählt.

Die Proteinstabilitätsuntersuchungen des rekombinanten Peptides wurden dabei mit und ohne Zugabe von 10 me CoCl_2 durchgeführt. Abbildung 38 zeigt die entsprechenden SRCD-Spektren im Temperaturbereich zwischen 10 °C und 90 °C. Die erhaltenen Spektren der beiden Behandlungen zeigten weitestgehend ähnliche Verläufe. Lediglich im Bereich zwischen 60 °C und 70 °C konnten diverse Unterschiede beobachtet werden. Um geeignete Aussagen über die Hitzestabilität der Konstrukte treffen zu können, wurden sogenannte Schmelzkurven erstellt. Anhand solcher Kurven kann der Schmelzpunkt – diejenige Temperatur, bei der 50 % des Proteins ungefaltet vorliegt – bestimmt werden. Dafür wurden zunächst die erhaltenen Elliptizitätswerte der charakteristischen Bande bei 222 nm in die prozentuale Faltung der Peptide umgerechnet. Unter der Annahme, dass bei 25 °C eine vollständige Faltung der Peptide vorliegt, konnten die Werte berechnet und anschließend gegen die Temperatur aufgetragen werden. Zur Generierung der Schmelzkurven wurde nachfolgend mit Hilfe der Analysesoftware *Origin* gefittet, wobei ein sigmoidaler Fit anhand der Funktion *BiDoseResp* Anwendung fand (Abbildung 39). Während das reine Peptid einen sigmoidalen Kurvenverlauf zeigte, wies das Co(II) -behandelte Konstrukt einen bisigmoidalen Verlauf auf.

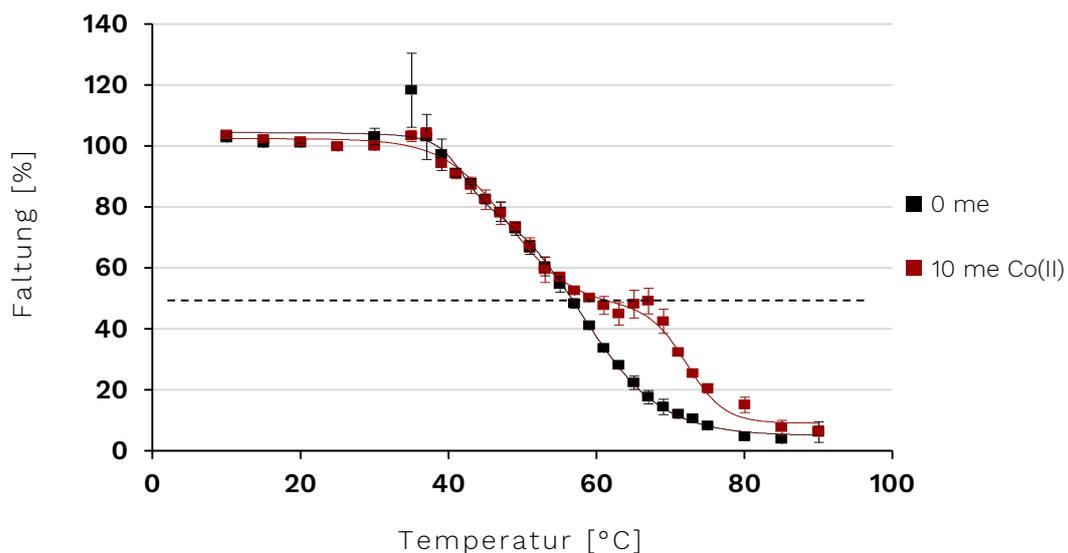


Abbildung 39: Schmelzkurven des rekombinanten BRCA1-Peptides vor und nach Behandlung mit CoCl_2 .

Zur Berechnung der prozentualen Faltung wurden die Elliptizitätswerte bei 222 nm eingesetzt und eine vollständige Faltung des Peptides bei 25 °C angenommen. Dargestellt sind die Werte des unbehandelten Peptides (0 me) (schwarz) sowie das mit 10 Moläquivalenten (me) Co(II) behandelte Peptid (rot). Es wurde ein sigmoidaler Fit mit der Funktion *BiDoseResp* angewandt. Die Schnittpunkte der gestrichelten Linie mit den Kurven illustrieren definitionsgemäß den Schmelzpunkt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Range/2 aus zwei unabhängigen Messungen.

Unter der Annahme, dass Co(II) nicht in der Lage ist, das gebundene Zink zu verdrängen, wäre eine Bindung des Metallions an den Hexa-Histidin-*Tag* des Peptides denkbar. Während die beiden Peptide zu Beginn der Denaturierung einen relativ ähnlichen Schmelzverlauf zeigten, konnte eine Stabilisierung ab etwa 60 °C durch die Co(II) -Behandlung beobachtet werden. Hierbei besteht die Möglichkeit, dass sich nach partieller Entfaltung eine intermediäre

Konformation durch den mit Co(II) besetzten *Tag* bildet, die zur Stabilisierung des Peptides beiträgt. Der weitere Verlauf wurde demnach durch das gebildete Intermediat beeinflusst, was die unterschiedliche Auffaltung erklären könnte.

Sollte Cobalt jedoch, entgegen der beschriebenen Annahme, dazu befähigt sein, gebundenes Zink aus den Ringfingerstrukturen herauszulösen, wäre eine unzureichende Sensitivität der Methode denkbar. Möglicherweise beschränkte sich die auftretende Strukturveränderung nur auf wenige AS und war demnach bei solch einem großen Peptid (143 AS) zu gering, um sie mittels SRCD-Spektroskopie nachzuweisen (Abbildung 37). Die Ergebnisse könnten damit auf die Bildung eines Mischkomplexes durch die Co(II)-Behandlung hindeuten. Dabei könnte eine Spezies bei etwa 60 °C schmelzen, während die zweite Spezies erst bei circa 67 °C schmilzt.

5.3.2 SYNTHETISCHES PEPTID

Um zu überprüfen, ob bei einem kurzen BRCA1-Konstrukt eine Konformationsänderung nach Inkubation mit verschiedenen Metallverbindungen auftritt, wurde ein Peptid aus lediglich 56 AS gewählt. Dafür wurde analog zu den Analysen von ROEHM UND BERG ein synthetisches Peptid mit dem reinen Ringfinger von BRCA1 (AS 22 – 77) eingesetzt. Nach MEZA *et al.* und BRZOVIC *et al.* handelt es sich hierbei um den integralen Teil einer größeren Domäne (AS 1 – 110) (BRZOVIC *et al.*, 1998; MEZA *et al.*, 1999; ROEHM UND BERG, 1997).

Bei den nachfolgenden Ergebnissen gilt es zu beachten, dass keine exakte Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt wurde. Aufgrund fehlender absorbierender AS war die spektroskopische Bestimmung mittels NanoDrop, wie sie in 4.2.6 für das rekombinante Peptid beschrieben wurde, nicht möglich. Als alternative Bestimmungsmethode gilt der Ellman´s Test. Die Etablierung der Methode sowie eine exakte Massenquantifizierung konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht erfolgen. Die Berechnung der eingesetzten molaren Äquivalente wurde anhand der Einwaage vorgenommen. Die Anwesenheit von TFA sowie anderen Salzen, die der Synthese entstammen und die Konzentration verfälschen, können hierbei zu geringen Massendifferenzen beitragen. Die angegebenen molaren Äquivalente besitzen daher einen gewissen Unsicherheitsfaktor und dienen ausschließlich als Richtwert.

5.3.2.1 EINFLUSS VON CoCl₂

Zur Reproduktion und Vergleichbarkeit der von ROEHM UND BERG generierten Daten, wurde das erworbene synthetische Peptid zunächst mit unterschiedlichen molaren Äquivalenten Co(II) behandelt (Anhang 8.4.5 - Abbildung 68). Übereinstimmend mit den bereits publizierten Ergebnissen konnte dabei eine Strukturveränderung nach Metallzugabe beobachtet werden. Während das Apo-peptid weitestgehend unstrukturiert vorlag, wies das Spektrum nach Zugabe von Co(II) eine leicht helikale Struktur auf. Dies konnte durch die Steigerung des Maximums bei 185 nm, die spektrale Verschiebung des Minimums in Richtung langwelligen Bereich sowie die

Veränderung der Bande bei 222 nm identifiziert werden. Verglichen mit der Literatur schien die Änderung der Sekundärstruktur jedoch weniger intensiv (ROEHM UND BERG, 1997).

Eine quantitative Auswertung der Sekundärstrukturelemente wurde bei diesen Analysen nicht durchgeführt, da sie lediglich zum Vergleich der bereits publizierten Daten dienen sollten. Außerdem gilt es zu erwähnen, dass ein zusätzlicher Konzentrationsfehler durch eine fehlerhafte Einwaage auftrat. Die Diskrepanz wurde jedoch erst anhand des Vergleichs der Apo-peptid-Messungen deutlich. Während das Minimum des Apo-peptides der Co(II)-Versuche lediglich bei etwa $-11.600 \text{ deg cm}^2 \text{ decimol}^{-1}$ lag, zeigten die nachfolgend aufgeführten ZnCl_2 - bzw. NaAsO_2 -Daten eine Minimumsintensität von rund $-13.700 \text{ deg cm}^2 \text{ decimol}^{-1}$.

5.3.2.2 EINFLUSS VON ZnCl_2

Zur Identifizierung des Einflusses von Zink auf die BRCA1-Konformation wurde die Strukturänderung nach stufenweiser Absättigung mit dem natürlich vorliegenden Cofaktor Zn(II) untersucht (Abbildung 40). Dabei war bereits ab etwa 0,5 me eine deutliche Strukturänderung erkennbar. Analog zu den Spektren der Co(II)-Behandlung zeigte sich auch hier ein Anstieg des Maximums bei etwa 185 nm. In Verbindung mit der spektralen Verschiebung des Minimums in Richtung höherer Wellenlängen sowie die Intensitätsveränderung der charakteristischen Bande bei 222 nm kann von einer Zunahme der Helizität des Peptides ausgegangen werden. Weiterhin konnte bereits ab etwa 1 me keine weitere Strukturveränderung mehr festgestellt werden.

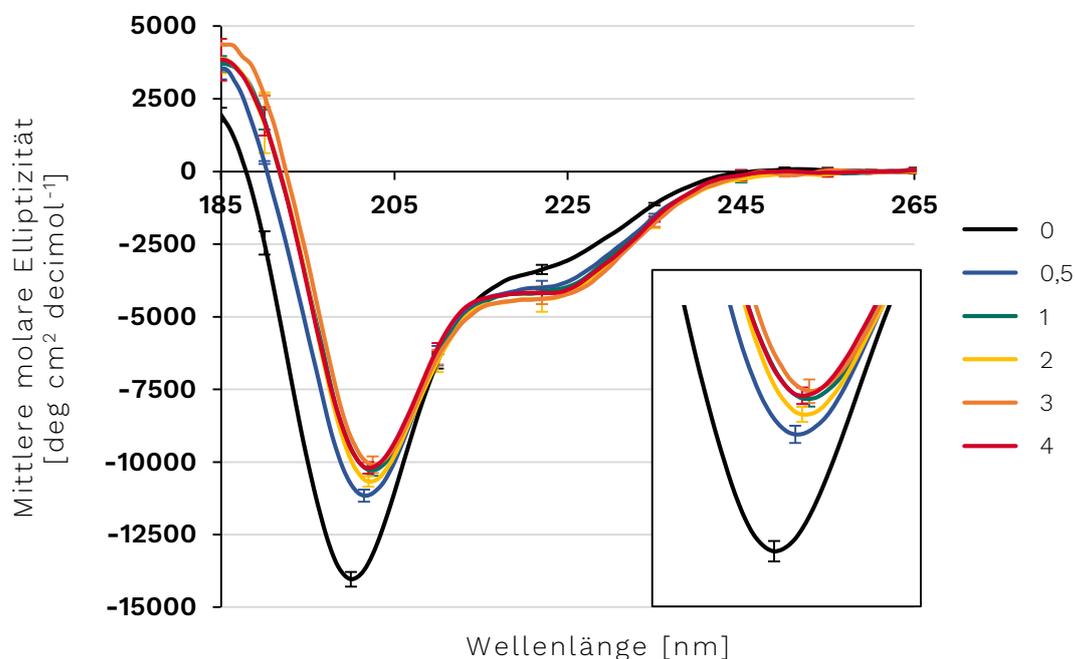


Abbildung 40: SRCD-Spektren des synthetischen BRCA1-Peptides nach Behandlung mit unterschiedlichen molaren Äquivalenten (me) an ZnCl_2 .

Dargestellt sind neben dem Spektrum des Apo-peptides (0 me) (schwarz) auch die Spektren nach Inkubation mit 0,5 me (blau), 1 me (grün), 2 me (gelb), 3 me (orange) sowie 4 me (rot) ZnCl_2 . Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen bzw. Range/2 aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

Zur Verdeutlichung der Ergebnisse wurden die MRE-Werte einer charakteristischen Wellenlänge (200 nm) gegen die entsprechenden molaren Äquivalente aufgetragen (Abbildung 41). Dabei konnte durch den sprunghaften Anstieg der MRE-Werte zunächst eine starke Bindung von Zn(II) an den Liganden beobachtet werden. Bei steigender Metallkonzentration schien die Bindung des Metallions schwächer zu werden, was zu einer Abweichung der Titrationskurve von der anfänglichen Tangente zu einem gehemmten Anstieg bis hin zum Erreichen eines Sättigungsplateaus führte. Die in Abbildung 41 eingetragenen Tangenten lassen, unter Berücksichtigung der Standardabweichungen, eine Sättigung bereits ab etwa 1 me vermuten.

Um sicherzustellen, dass beide Zinkbindungsstellen vollständig reduziert vorlagen, wurde die TCEP-Konzentration im Puffer variiert. So konnte zusätzlich überprüft werden, ob lediglich eine Bindungsstelle des Peptids für potentielle Bindungspartner zur Verfügung stand. Die Auswertung der TCEP-Anpassung suggerierten, dass auch unter stark reduzierenden Bedingungen keinerlei Strukturveränderung nach Zugabe hoher Moläquivalenten beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Eine vollständige Faltung der RING-Domäne wurde demnach bereits durch die Besetzung von nur einer Bindungsstelle erreicht.

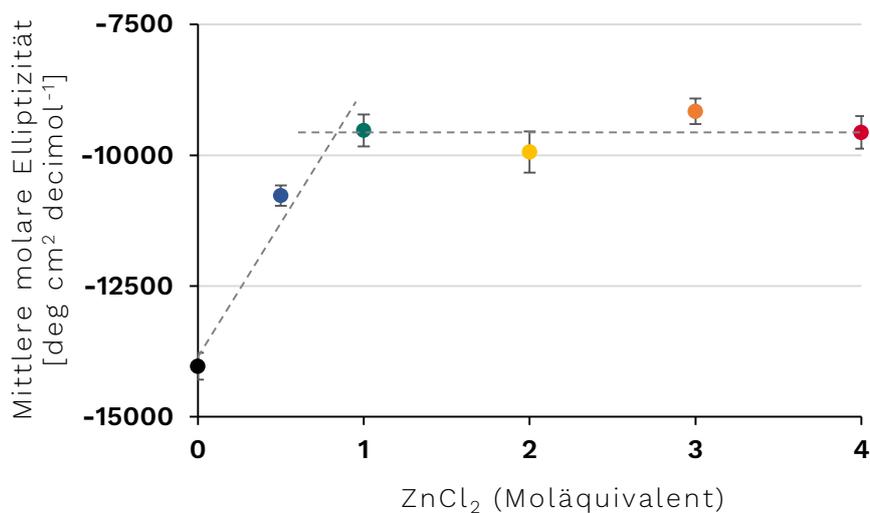


Abbildung 41: Sättigungskurve des mit ZnCl₂-behandelten synthetischen BRCA1-Peptides.

Aufgetragen sind die MRE (Mittlere molare Elliptizität) -Werte bei 200 nm gegen die unterschiedlichen molaren Äquivalente der Zn(II)-Behandlung. Die illustrierten Tangenten (unterbrochenen Linien) dienen der besseren Nachvollziehbarkeit des Kurvenverlaufs. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen bzw. Range/2 aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

Simultan zu der quantitativen Auswertung des rekombinanten Peptides wurden für das synthetische Peptid Informationen der Sekundärstrukturelemente anhand der durchgeführten SRCD-Analysen berechnet. Auch hierbei fand die Analyse unter Zuhilfenahme des DICHROWEB-Servers statt. Im Gegensatz zum rekombinanten Peptid zeigte für die 56 AS umfassende, kurze Sequenz lediglich der mathematische Algorithmus CONTIN annehmbare NRMSD (*normalized root mean squared deviation*) -Werte. Diese Werte geben, durch den Vergleich des experimentell

gewonnenen Spektrums mit dem, aus den berechneten Sekundärstrukturanteilen ermittelten, zurückgerechneten CD-Spektrums, Hinweis auf die Qualität der Ergebnisse. Als Referenz wurde der Datensatz Set7 gewählt, da dieser zusätzlich Spektren ungeordneter Peptide enthält. Auch hierbei wurde, wie unter 4.3.1.2 beschrieben, aufgrund der TFA-bindenden AS ein Skalierungsfaktor von 1,2 bei der Berechnung verwendet. Die Ergebnisse der durchgeführten quantitativen Auswertung sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Prozentuale Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturelemente nach ZnCl₂-Behandlung.
 Dargestellt sind die mit Hilfe des DICHROWEB-Servers berechneten Sekundärstrukturanteile des verwendeten synthetischen BRCA1-Peptides nach Zugabe von unterschiedlichen molaren Äquivalenten an ZnCl₂. Zur Berechnung wurde der mathematische Algorithmus CONTIN, der Referenzdatensatz Set7 sowie der Skalierungsfaktor 1,2 angewandt.

		<i>Random coil</i>	α -Helix	β -Faltblatt	<i>Turns</i>
ZnCl ₂ (Moläquivalent)	0	69,4 ± 1,3	8,1 ± 0,7	12,6 ± 0,7	9,9 ± 0,7
	0,5	60,5 ± 0,9	10,0 ± 0,2	18,5 ± 1,1	11,0 ± 0,5
	1	58,2 ± 0,9	13,8 ± 0,3	15,5 ± 0,5	12,7 ± 0,4
	2	57,9 ± 2,0	13,4 ± 3,2	16,3 ± 4,1	12,4 ± 0,8
	3	57,5 ± 2,0	15,0 ± 0,8	15,3 ± 2,5	12,4 ± 0,2
	4	56,6 ± 2,2	12,0 ± 2,5	18,3 ± 3,1	13,2 ± 1,6

In Einklang mit den SRCD-Spektren zeigte auch die quantitative Auswertung der Sekundärstrukturelemente die Änderung der Konformation. Während das Apozeptid (0 me) einen ungeordneten Anteil von etwa 69 % aufwies, konnte nach Inkubation mit Zn(II) eine deutliche Abnahme der *random coil*-Strukturen auf etwa 58 % verzeichnet werden. Gleichzeitig konnte die Zunahme des helikalen Teils von lediglich 8 % beim Apozeptid auf knapp 14 % bei Behandlung mit 2 me Zn(II) beobachtet werden. Auch die β -Faltblattstrukturen manifestierten eine Zunahme von nahezu 13 % auf circa 16 % nach Metallbehandlung. Die geringste Änderung konnte bei den β -Schleifen (*turns*) festgestellt werden.

Hieraus wurde ersichtlich, dass es zu einer Bindung des natürlichen Cofaktors Zn(II) an das Apozeptid der 56 AS umfassenden BRCA1-Ringfinger-Domäne kam. Weiterhin konnte eine Konformationsänderung durch Bindung von Zn(II) demonstriert werden, bei der das eingesetzte Peptid von einer zunächst unstrukturierten Faltung in einen geordneteren Zustand überging.

5.3.2.3 EINFLUSS VON NaAsO₂

Um zu überprüfen, ob auch die toxische Metallverbindung NaAsO₂ in der Lage ist, an den Ringfinger von BRCA1 zu binden und eine Konformationsänderung auszulösen, wurde zusätzlich eine stufenweise Absättigung mit dieser Metallverbindung durchgeführt (Abbildung 42). Auch bei diesen Analysen zeigte sich bereits ab der ersten Zugabe von As(III) (0,5 me) eine leichte Strukturänderung, die mit steigender Konzentration zunahm. Analog zu den Co(II)- sowie Zn(II)-

Experimenten konnte die Konformationsänderung durch die Zunahme des Maximums bei etwa 185 nm, die spektrale Verschiebung des Minimums in Richtung höherwellige Bereiche sowie die Intensitätsveränderung der 222 nm-Bande identifiziert werden.

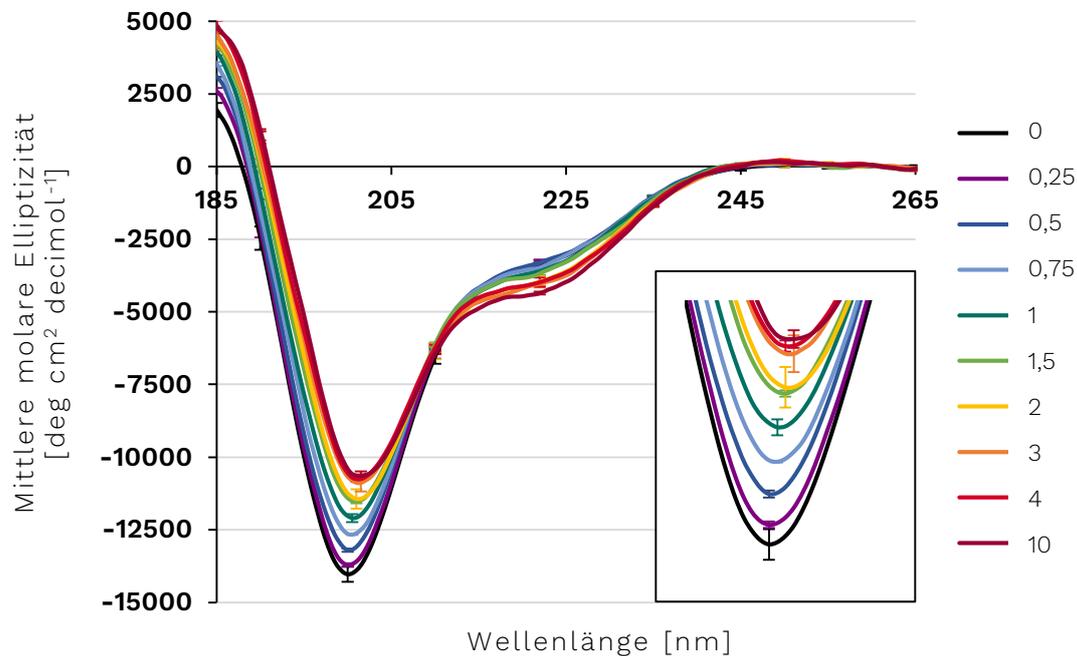


Abbildung 42: SRCD-Spektren des synthetischen BRCA1-Peptides nach Behandlung mit unterschiedlichen molaren Äquivalenten (me) an NaAsO₂.

Dargestellt sind neben dem Spektrum des Apo-peptides (0 me) (schwarz) auch die Spektren nach Inkubation mit 0,25 me (lila), 0,5 me (blau), 0,75 me (hellblau), 1 me (grün), 1,5 me (hellgrün), 2 me (gelb), 3 me (orange), 4 me (rot) sowie 10 me (dunkelrot) NaAsO₂. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen bzw. Range/2 aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

Analog zu den Zinkbindungsuntersuchungen wurde auch hier eine Titrationskurve erstellt. Dabei sind die MRE-Werte der charakteristischen Wellenlänge bei 200 nm gegen die entsprechenden molaren Äquivalente an NaAsO₂ aufgetragen. Dabei konnte durch den sprunghaften Anstieg der MRE-Werte zunächst eine starke Bindung von As(III) an den Liganden beobachtet werden. Ab etwa 1,5 me schien die Bindung des Metallions schwächer zu werden, was sich in einer retardierten Zunahme der MRE-Werte bemerkbar machte. Der erneute sprunghafte Anstieg ließ eine sequentielle, kooperative Bindung vermuten. Folglich kann postuliert werden, dass sich das anfangs gebundene As(III) vorteilhaft auf die weitere Bindungskinetik ausübt. Dabei scheinen die beiden Bindungsstellen im Peptid auf unterschiedliche Weise zur Konformationsänderung beizutragen. Analog zu den vorherigen Analysen konnte auch hier ein Sättigungsplateau identifiziert werden.

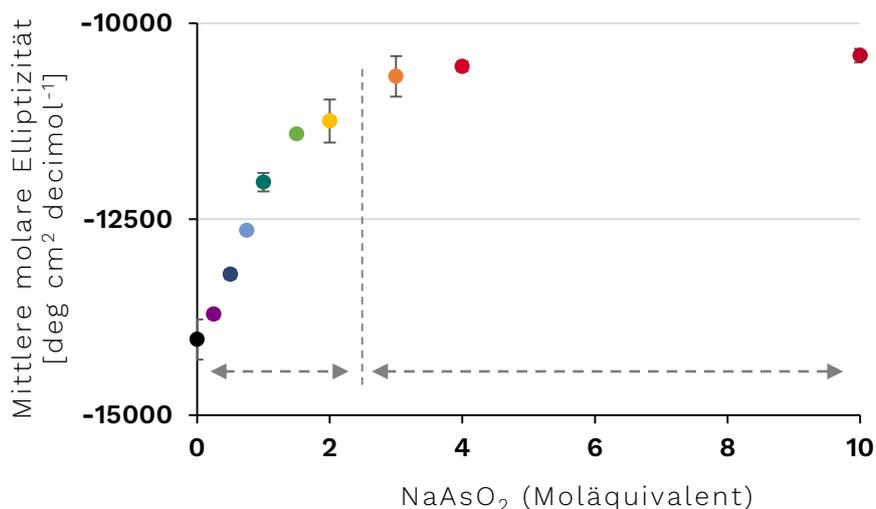


Abbildung 43: Sättigungskurve des mit NaAsO₂-behandelten synthetischen BRCA1-Peptides.

Aufgetragen sind die MRE (Mittlere molare Elliptizität) -Werte bei 200 nm gegen die unterschiedlichen molaren Äquivalente der As(III)-Inkubation. Die unterbrochene Linie verdeutlicht dabei die sequentielle Bindung des Halbmetalls. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen bzw. Range/2 aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

Entsprechend vorausgegangener Analysen wurde auch bei diesen Untersuchungen der Gehalt der Sekundärstrukturelemente mit Hilfe des DICHROWEB-Servers berechnet. Dabei wurde übereinstimmend mit der vorherigen Berechnung der mathematische Algorithmus CONTIN, der Referenzdatensatz Set7 sowie der Skalierungsfaktor von 1,2 verwendet. Die generierten Ergebnisse der quantitativen Auswertung sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Prozentuale Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturelemente nach NaAsO₂-Behandlung.

Dargestellt sind die mit Hilfe des DICHROWEB-Servers berechneten Sekundärstrukturanteile des verwendeten synthetischen BRCA1-Peptides nach Zugabe von unterschiedlichen Moläquivalenten an NaAsO₂. Zur Berechnung wurde der mathematische Algorithmus CONTIN, der Referenzdatensatz Set7 sowie der Skalierungsfaktor 1,2 angewandt.

	<i>Random coil</i>	α -Helix	β -Faltblatt	<i>Turns</i>
0	69,4 \pm 1,3	8,1 \pm 0,7	12,6 \pm 0,7	9,9 \pm 0,7
0,25	69,6 \pm 0,5	7,5 \pm 0,6	12,5 \pm 0,8	10,4 \pm 0,6
0,5	68,4 \pm 0,7	7,3 \pm 0,3	13,3 \pm 0,3	11,1 \pm 0,1
0,75	67,0 \pm 0,2	7,8 \pm 0,4	13,8 \pm 0,5	11,4 \pm 0,1
1	65,1 \pm 0,4	8,4 \pm 0,5	14,7 \pm 0,3	11,8 \pm 0,2
1,5	63,5 \pm 0,3	8,8 \pm 0,6	17,1 \pm 2,3	10,7 \pm 1,5
2	62,4 \pm 0,5	9,9 \pm 0,6	15,8 \pm 0,8	12,0 \pm 0,6
3	59,7 \pm 1,4	10,7 \pm 0,3	17,3 \pm 0,9	12,4 \pm 0,7
4	60,6 \pm 1,8	10,4 \pm 0,6	16,3 \pm 1,4	12,7 \pm 0,3

Harmonisierend mit den SRCD-Spektren belegte auch die quantitative Auswertung der Sekundärstrukturelemente die Änderung der Konformation nach Metallzugabe. Die Behandlung

mit bis zu 4 me As(III) verursachte dabei eine Abnahme des ungeordneten Anteils von 69 % auf nahezu 60 %. Gleichzeitig konnte eine Zunahme helikaler Strukturelemente von 8 % auf 10 % beobachtet werden. Auch bei den β -Faltblattstrukturen sowie den β -Schleifen (*turns*) konnte eine leichte Steigerung der prozentualen Anteile verzeichnet werden.

Eine Bindung des toxischen Metallions As(III) an das Apozeptid der reinen BRCA1-Ringfinger-Domäne konnte mit Hilfe der durchgeführten Analysen bestätigt werden. Weiterhin konnte eine Änderung der Konformation durch Bindung von As(III) dargelegt werden, bei der ein relativ unstrukturiertes Peptid in einen etwas geordneteren Zustand überging.

5.3.2.4 VERGLEICH DER ZnCl_2 - UND NaAsO_2 -EINFLÜSSE

Um bessere Aussagen über die Bindungsaffinität, das Sättigungsverhalten sowie die unterschiedlichen Konformationsänderungen nach Behandlung mit den zwei verschiedenen Metallverbindungen ZnCl_2 und NaAsO_2 treffen zu können, wurden diese zusätzlich gemeinsam in einem Diagramm aufgetragen. Während Abbildung 44 links die Inkubation mit je ~ 1 me demonstriert, sind im rechten Graph die Spektren der Behandlung mit jeweils ~ 4 me dargestellt.

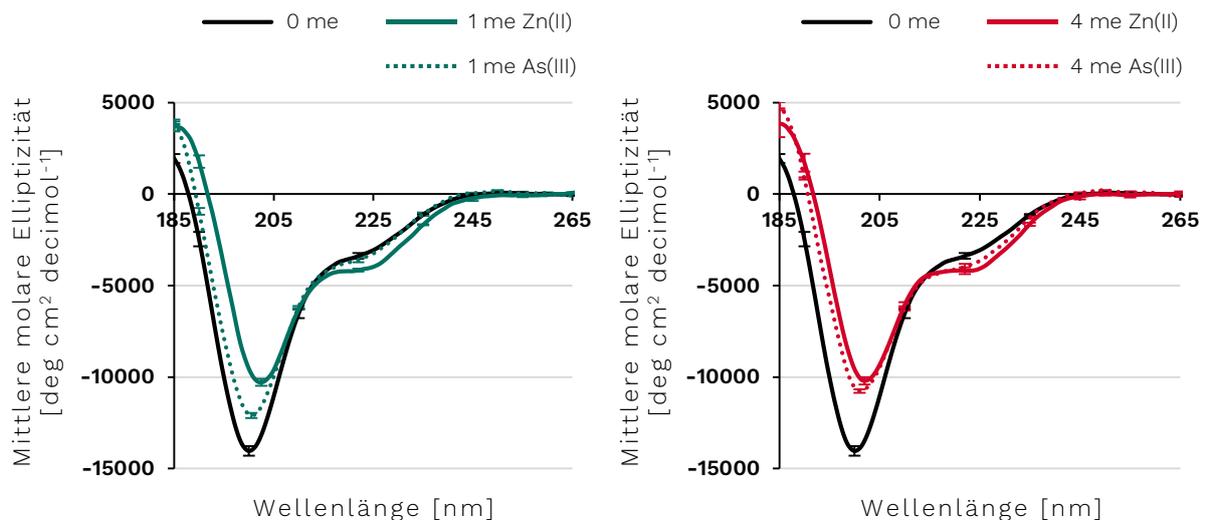


Abbildung 44: SRCD-Spektren des synthetischen BRCA1-Peptides nach Behandlung mit unterschiedlichen molaren Äquivalenten (me) an ZnCl_2 sowie NaAsO_2 .

Die linke Abbildung zeigt neben dem Spektrum des Apozeptides (0 me) (schwarz) auch die Spektren nach Inkubation mit ~ 1 me Zn(II) (grün) bzw. ~ 1 me As(III) (grün gepunktet). Im rechten Graphen wiederum sind ebenso das Apozeptid (0 me) (schwarz) sowie zusätzlich die Behandlungen nach ~ 4 me Zn(II) (rot) bzw. ~ 4 me As(III) (rot gepunktet) dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen bzw. Range/2 aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

Die SRCD-Spektren veranschaulichen deutlich, dass die Behandlung mit etwa 1 me des natürlichen Bindungspartners Zn(II) eine stärkere Konformationsänderung im Vergleich zur äquimolaren Behandlung mit 1 me As(III) verursachte. Gleichzeitig war erkennbar, dass sich die Struktur des Zn(II)-behandelten Peptides auch bei höheren Konzentrationen von 4 me nicht mehr änderte und eine vollständige Faltung bereits durch etwa 1 me Zn(II) erreicht wurde.

Demgegenüber konnte bei dem As(III)-behandelten Konstrukt eine deutliche Änderung der Konformation durch höhere Arsenitkonzentrationen beobachtet werden.

Gleichzeitig ermöglichten die gemessenen SRCD-Spektren den Vergleich der, durch die verschiedenen Metallbehandlungen auftretenden, Konformationen. Beide Verbindungen zeigten dabei eine Zunahme des Maximums bei etwa 185 nm, eine Verschiebung sowie Abnahme des Minimums sowie eine veränderte Intensität der charakteristischen Bande bei etwa 222 nm. Insbesondere durch die Abbildung 44 rechts wird deutlich, dass die Intensität sowie die auftretende Verschiebung des Minimums in den langwelligen Bereich bei den Zn(II)-behandelten im Vergleich zu den As(III)-inkubierten Proben stärker ausgeprägt war. Folglich scheint das BRCA1-Peptid Konformationen anzunehmen, die abhängig vom gebundenem Cofaktor sind.

Tabelle 13: Vergleich der prozentualen Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturelemente nach ZnCl₂- und NaAsO₂-Behandlung sowie der Literatur von BRZOVIC *et al.*, 2001.

Dargestellt sind die mit Hilfe des DICHROWEB-Servers berechneten Sekundärstrukturanteile des verwendeten synthetischen BRCA1-Peptides vor und nach Zugabe von unterschiedlichen molaren Äquivalenten (me) an ZnCl₂ sowie NaAsO₂. Zur Berechnung wurde der mathematische Algorithmus CONTIN, der Referenzdatensatz Set7 sowie der Skalierungsfaktor 1,2 angewandt.

		<i>Random coil</i>	α -Helix	β -Faltblatt	<i>Turns</i>
Apopeptid	0 me	69,4 ± 1,3	8,1 ± 0,7	12,6 ± 0,7	9,9 ± 0,7
ZnCl ₂	1 me	58,2 ± 0,9	13,8 ± 0,3	15,5 ± 0,5	12,7 ± 0,4
	4 me	56,6 ± 2,2	12,0 ± 2,5	18,3 ± 3,1	13,2 ± 1,6
NaAsO ₂	1 me	65,1 ± 0,4	8,4 ± 0,5	14,7 ± 0,3	11,8 ± 0,2
	4 me	60,6 ± 1,8	10,4 ± 0,6	16,3 ± 1,4	12,7 ± 0,3
BRZOVIC <i>et al.</i> , 2001			14,3	16,1	

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Werte der quantitativen Auswertung erneut aufgeführt und in Tabelle 13 zusammengefügt. Dabei ist neben dem Apopeptid (0 me) sowie den Zn(II)- bzw. As(III)-Behandlungen auch ein Literaturvergleich (BRZOVIC *et al.*, 2001) durchgeführt worden. Die Berechnung der Sekundärstrukturanteile veranschaulichte deutlich, dass bei beiden Behandlungen der ungeordnete Peptidanteil abnahm. Während die Zn(II)-Proben eine Zunahme der helikalen Strukturen von 8 % auf circa 14 % offenbarten, konnte die As(III)-Inkubation lediglich eine Steigerung auf etwa 10 % hervorrufen. Auch die quantitative Auswertung manifestierte, unter Betrachtung der Standardabweichungen, die vollständige Faltung bereits nach 1 me ZnCl₂. Die weitere Strukturveränderung durch 4 me im Vergleich zu 1 me Arsenit konnte gleichermaßen hier bestätigt werden. Eine Zunahme der Sekundärstrukturelemente machte sich in den β -Faltblattstrukturen sowie den β -Schleifen (*turns*) bemerkbar, wobei diese Veränderung bei beiden Behandlungen relativ ähnlich ausgeprägt waren. Die erhaltenen Sekundärstrukturanteile bekräftigen die Vermutung, dass leicht unterschiedliche

Konformationen des Peptides auftreten, welche maßgeblich durch die jeweiligen assoziierten Cofaktoren beeinflusst werden.

Analog zur Beurteilung der Sekundärstrukturelemente des rekombinanten Peptides wurde auch die quantitative Auswertung des synthetischen Peptides mit den bereits veröffentlichten Daten von BRZOVIC *et al.*, 2001 verglichen (Tabelle 13). Da es sich bei den publizierten Werten um ein rekombinantes Peptid handelt, welches in Gegenwart von Zinkionen exprimiert wurde, wurden die Daten des Zn(II)-gesättigten Konstruktes zum Vergleich herangezogen. Der Anteil der helikalen (~ 14 %) und der β -Faltblattstrukturen (~ 16 %) zeigten ein hohes Maß an Übereinstimmung der bereits veröffentlichten Werte, was eine korrekte Faltung des Peptides schlussfolgern lässt.

ZHOU *et al.* untersuchten die Bindung von unterschiedlichen Arsenverbindungen an verschiedene Zinkfingerproteine. Dabei konnte die selektive Bindung von As(III) an Cys3His1- sowie Cys4-Motive, jedoch nicht an Cys2His2-Finger beobachtet werden. Das As(III)-Atom interagiert innerhalb dieser Assoziation lediglich mit drei Cysteinen, wodurch die Tertiärstruktur verändert wurde (ZHOU *et al.*, 2014). Da die RING-Domäne von BRCA1 aus einem Cys4- sowie einem Cys3His1-Motiv zusammengesetzt ist, kann davon ausgegangen werden, dass bei der beobachteten Konformationsänderung durch die As(III)-Bindung ein Cystein in Bindungsstelle I sowie das Histidin in Bindungsstelle II frei vorliegen. Im Gegensatz dazu bindet Zn(II) bekanntermaßen an alle vier Cysteine bzw. ebenso an das Histidin, wodurch alle Liganden innerhalb der Bindungsstellen besetzt sind. Die bei der As(III)-Behandlung frei vorliegenden AS könnten so mit anderen Liganden in der Peptidkette interagieren, was die unterschiedliche Konformation im Vergleich zu Zn(II) erklären würde. Gleichermäßen könnte auch die Variabilität der Ligandenbindung im Cys4-Motiv die Diskrepanz der resultierenden Strukturen begründen.

5.3.2.5 KONKURRIERENDE UNTERSUCHUNGEN VON ZnCl_2 UND NaAsO_2

Um zu überprüfen, ob As(III) in der Lage ist, Zn(II) aus seiner nativen Koordinationsumgebung herauszulösen, zu ersetzen und so eine Strukturveränderung hervorzurufen, wurden weitere SRCD-Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurde das Peptid zunächst mit Zn(II) behandelt, bevor anschließend unterschiedliche Mengen an As(III) hinzugegeben wurden.

Um physiologische Bedingungen nachzuempfinden, unter denen eine Strukturausbildung von BRCA1 im Organismus stattfindet, wurde das Peptid zunächst mit Zn(II) abgesättigt (2 me). Im Anschluss wurden Untersuchungen mit äquimolaren Konzentrationen an As(III) sowie Experimente mit einem Überschuss an As(III) (5 me) durchgeführt. Die aufgenommenen SRCD-Spektren beider Behandlungen brachten eine deutliche Konformationsänderung hervor (Abbildung 45). Im Einklang mit den vorherigen Untersuchungen zeigte sich auch hier die Zunahme des Maximums bei etwa 185 nm, eine veränderte Intensität des Minimums sowie dessen

Verschiebung in den langwelligen Spektralbereich. Verglichen mit den bereits generierten Spektren der Apo-peptid-Bindungsuntersuchungen, wiesen die beiden auftretenden Kurvenverläufe Ähnlichkeiten mit der Konformation des mit Zn(II)-abgesättigten Peptides auf. Während das Spektrum der äquivalenten Konzentrationen (2 me Zn(II) + 2 me As(III)) nahezu identisch zu dem zuvor aufgenommenen 4 me Zn(II)-Spektrum verlief, zeigte sich bei der As(III)-Überschuss-Behandlung (2 me Zn(II) + 5 me As(III)) kein eindeutiges Bild. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen lassen sich jedoch auch bei diesen Analysen Rückschlüsse treffen, dass keine eindeutige Strukturveränderung im Vergleich zu dem mit 4 me Zn(II) behandelten Peptid auftraten. Folglich scheint As(III) nicht in der Lage zu sein, den natürlichen Cofaktor Zn(II) aus der vorliegenden, abgesättigten Ringfingerstruktur zu verdrängen.

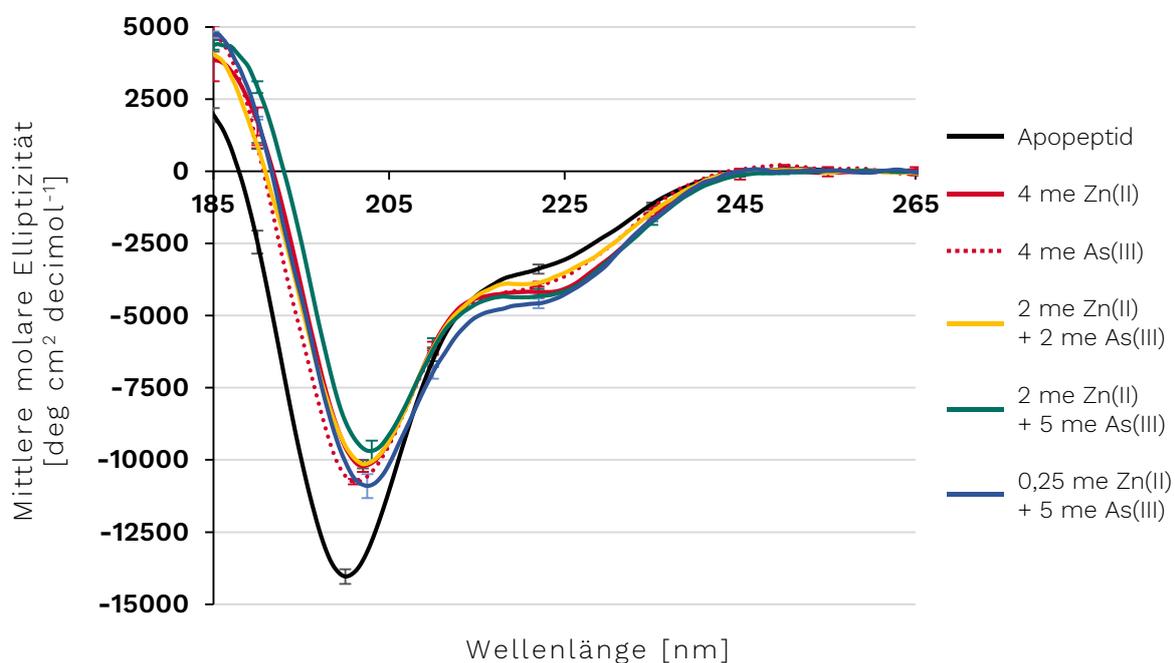


Abbildung 45: SRCD-Spektren des synthetischen BRCA1-Peptides nach kompetitiver Behandlung mit unterschiedlichen molaren Äquivalenten (me) an $ZnCl_2$ sowie $NaAsO_2$.

Dargestellt sind neben dem Spektrum des Apo-peptides (schwarz) auch die Spektren nach Inkubation mit 4 me Zn(II) (rot) sowie 4 me As(III) (rot gepunktet). Zudem sind die Spektren der kompetitiven Untersuchungen 2 me Zn(II) + 2 me As(III) (gelb), 2 me Zn(II) + 5 me As(III) (grün) sowie 0,25 me Zn(II) + 5 me As(III) (blau) abgebildet. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen bzw. Range/2 aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

Weiterhin wurden Experimente durchgeführt, bei denen das Peptid nicht vollständig mit Zn(II) abgesättigt, sondern lediglich geringe Mengen des Bindungspartners (0,25 me) hinzugegeben wurden. Nach anschließender Zugabe von As(III) im Überschuss (5 me) konnte eine ähnliche Intensität des Minimums im Vergleich zu der mit 4 me As(III) behandelten Probe verzeichnet werden, wobei eine leichte Verschiebung in Richtung höherwellige Bereiche erkennbar war. Möglich wäre die Ausbildung eines Mischkomplexes, wobei sich die beiden Metallionen entweder eine Bindungsstelle teilen könnten oder aber die beiden Bindungsstellen mit den zwei verschiedenen Ionen besetzt werden könnten.

Aufgrund der relativ hohen Standardabweichungen der durchgeführten konkurrierenden Untersuchungen konnte jedoch keine eindeutige Aussage über die resultierende Konformation getroffen werden. Die auftretenden Strukturänderungen dieser Analysen waren nicht aussagekräftig genug, um hier abschließende Erkenntnisse über das konkurrierende Verhalten der Metallionen und der daraus resultierenden Konformation geben zu können.

Um zu untersuchen, ob Zn(II) in der Lage ist, an einen, mit dem toxischen Metallion As(III) besetzten Ringfinger, zu binden, wurden weiterführende SRCD-Analysen durchgeführt. Dabei wurde zunächst das Peptid mit As(III) (2 me) abgesättigt und anschließend mit Zn(II) im Überschuss (5 me) behandelt. Auch hier zeigte sich ein ähnlicher Kurvenverlauf im Vergleich zu dem Spektrum des mit 4 me Zn(II)-behandelten Apozeptides (Abbildung 46). In weiteren Experimenten wurde das Peptid zunächst mit As(III) im deutlichen Überschuss (5 me) abgesättigt und anschließend mit unterschiedlichen, jedoch geringeren Mengen an Zn(II) (0,5 me, 1 me, 2 me) behandelt. Da auch diese Untersuchungen keinen prägnanten Unterschied im Kurvenverlauf im Vergleich zu den hier präsentierten Spektren zeigten, wurden diese Messungen lediglich in Einfachbestimmung durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

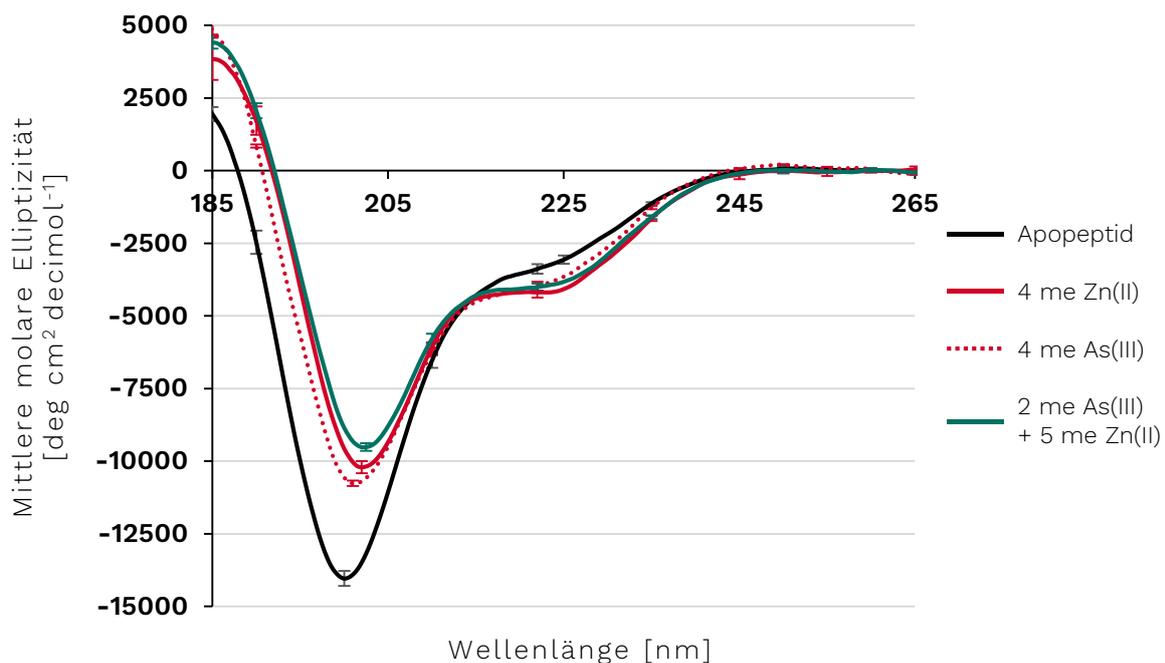


Abbildung 46: SRCD-Spektren des synthetischen BRCA1-Peptides nach kompetitiver Behandlung mit unterschiedlichen molaren Äquivalenten (me) an NaAsO_2 sowie ZnCl_2 .

Dargestellt sind neben dem Spektrum des Apozeptides (schwarz) auch die Spektren nach Inkubation mit 4 me Zn(II) (rot) sowie 4 me As(III) (rot gepunktet). Zudem ist das Spektrum der kompetitiven Untersuchungen 2 me As(III) + 5 me Zn(II) (grün) abgebildet. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen bzw. Range/2 aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

Die finale Beurteilung der Ergebnisse spricht dafür, dass der natürliche Cofaktor Zn(II) dazu befähigt ist, im Apozeptid-gebundenes As(III) aus der Ringfingerstruktur zu verdrängen, selbst

zu binden und eine Strukturveränderung hervorzurufen. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen sowie der geringen Änderungen der Sekundärstrukturelemente, ist eine eindeutige Aussage über die kompetitiven Eigenschaften der Metallionen jedoch erschwert.

Die Methode der quantitativen Auswertung mittels DICHROWEB-Server kann lediglich auf reine Proteinlösungen angewendet werden. Da durch die Behandlung mit zwei verschiedenen Metallionen jedoch die Möglichkeit zweier Spezies bestand, konnte diese Auswertung bei den kompetitiven Untersuchungen nicht durchgeführt werden.

5.3.3 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Zur besseren Übersicht wurde die nachfolgende Diskussion, der durch die Strukturuntersuchungen erhaltenen Ergebnisse, aufgegliedert. Dabei wird zunächst auf einen Vergleich der verschiedenen Anteile der Sekundärstrukturelemente zwischen den beiden eingesetzten BRCA1-Peptiden eingegangen, bevor die Metalloid-abhängigen Änderungen der Konformation genauer betrachtet werden.

5.3.3.1 VERGLEICH DER EINGESETZTEN BRCA1-KONSTRUKTE

Während das rekombinante Peptid (AS 1 – 110) die Proteolyse-resistente und somit stabilere Strukturdomäne darstellt, handelt es sich bei dem synthetischen Konstrukt (AS 22 – 77) um einen integralen Teil dieser Domäne (BRZOVIC *et al.*, 1998; MEZA *et al.*, 1999). Die durchgeführten SRCD-Untersuchungen des rekombinanten Peptides deuteten auf eine relativ helikale Struktur mit einem gewissen ungeordneten Anteil hin. Die Berechnung der Sekundärstrukturelemente ließ einen helikalen Teil von 25 % sowie einen *Random Coil*-Anteil von 36 % verzeichnen. Dementgegen zeigten die SRCD-Analysen des kürzeren, unbesetzten Konstruktes ein relativ ungeordnetes Peptid mit einer geringen Helizität unter 10 %. Bei Zugabe des natürlichen Cofaktors Zn(II) konnte eine Erhöhung der geordneten Strukturen beobachtet werden. Hierbei konnte durch die Berechnung der Sekundärstrukturanteile eine Zunahme der helikalen Strukturen auf nahezu 14 % durch Zugabe von 2 mM Zn(II) bestimmt werden. Gleichzeitig konnte eine Abnahme der ungeordneten Anteile von 69 % auf 60 % beobachtet werden. Der Vergleich der beiden analysierten Konstrukte zeigt somit einen deutlichen Unterschied im prozentualen Anteil der verschiedenen Sekundärstrukturelemente. Wie bereits in Kapitel 2.2.1 beschrieben, wird das RING-Motiv (AS 22 – 77) von einer antiparallelen α -Helix, die sich aus den AS-Resten 8 – 22 sowie 81 – 96 bildet, flankiert. Innerhalb dieses Motivs wird zudem eine zentrale α -Helix aus den AS 46 – 53 geformt (BRZOVIC *et al.*, 2001). In Anbetracht dieser Erkenntnisse enthält das synthetische Peptid lediglich die zentrale α -Helix, während das rekombinante Peptid weitere helikalen Strukturen aufweist. Unter Zuhilfenahme der Abbildung 47 soll der Unterschied im prozentualen Sekundärstrukturanteil der beiden Konstrukte erklärt werden. Verglichen mit der von BRZOVIC *et al.* veröffentlichten BRCA1-Struktur (PDB: 1JM7) zeigte sich demnach bei beiden

Konstrukten ein gutes Maß an Übereinstimmung, was auf die korrekte Faltung der Peptide hindeutet. Gleichzeitig identifizierte die Arbeitsgruppe ein kurzes antiparalleles, dreisträngiges β -Faltblatt, das sich innerhalb des RING-Motivs bildet. Entsprechend dieser Ergebnisse müssten die berechneten strukturellen Anteile dieser Sequenzen ähnliche prozentuale Werte der beiden verwendeten Peptide aufzeigen. Während das synthetische Konstrukt eine gute Übereinstimmung verglichen mit den Literaturdaten aufwies, zeigt sich im rekombinanten Peptid ein relativ hoher Anteil an β -Faltblattstrukturen. Die Gründe für diesen Sachverhalt wurden bereits in Kapitel 5.3.1 genauer diskutiert.



Abbildung 47: Schematische Darstellung der ersten 110 AS der BRCA1-Sequenz sowie ihre verschiedenen Sekundärstrukturanteile.

Aufgezeigt sind die ersten 110 Aminosäuren von BRCA1 (grau), die in der Sequenz des rekombinant hergestellten Peptides enthalten sind. Zusätzlich ist die reine RING-Domäne (blau) abgebildet, die den integralen Teil der größeren Domäne darstellt und die Sequenz des synthetisch verwendeten Peptides beinhaltet. Unterhalb der Sequenz sind die verschiedenen Sekundärstrukturen sowie deren Positionen nach BRZOVIC *et al.*, 2001 aufgezeigt.

Die Arbeitsgruppe von LOVERING führte bereits 1993 Strukturuntersuchungen eines synthetischen Ringfinger-Peptides durch, wobei es sich ebenfalls um ein Apozeptid handelte. Dabei wurden neben NMR-Analysen auch die hier eingesetzte Methode der CD-Spektroskopie angewandt. Die Arbeitsgruppe konnte eine Struktur des reduzierten Apozeptides feststellen, die einen 20 % igen α -Helix-Anteil enthielt und 20 % β -Faltblattstrukturen aufzeigte. Die Zugabe von Zink verursachte eine leicht gesteigerte Elliptizität, die mit der Zunahme des helikalen Anteils um etwa 5 % übereinstimmte. Dies könnte auf eine Zink-induzierte Stabilisierung der Sekundärstruktur hindeuten (LOVERING *et al.*, 1993).

5.3.3.2 EINFLUSS DER VERSCHIEDENEN METALLVERBINDUNGEN

Die durchgeführten Strukturuntersuchungen des synthetischen BRCA1-Peptides zeigten für alle drei Metallbehandlungen (CoCl_2 , ZnCl_2 , NaAsO_2) eine deutliche Konformationsänderung im Vergleich zum unbesetzten Peptid. Dabei konnte geschlussfolgert werden, dass alle getesteten Metallionen befähigt waren, unter reduzierenden Bedingungen an die unbesetzte RING-Domäne von BRCA1 zu binden und die Peptidstruktur in einen Zustand höherer Ordnung zu überführen.

Übergangsmetallionen mit unvollständig besetzten d-Schalen, wie beispielsweise Co(II) und Ni(II) , gelten als spektroskopische Sonden für die Titration von Zinkfingerpeptiden. Eine erfolgreiche Bindung der beiden Metallionen an unbesetzte Zink- sowie Ringfingerpeptide konnte bereits in einer Reihe von Studien nachgewiesen werden, wie in KLUSKA *et al.* zusammengefasst. Auch die eingangs erwähnte Bindung des Metallions As(II) an unbesetzte

Zinkfingerpeptide war bereits Gegenstand diverser Untersuchungen. Die Studienlage ist sich dabei einig, dass eine Zugabe der genannten Metallspezies mit einer Konformationsänderung einhergeht, die das jeweilige Apozeptid durch Komplexbildung mit dem ionischen Bindungspartner in eine Form höher Ordnung überführt (ZHOU *et al.*, 2014; KLUSKA *et al.*, 2018). In der hier vorliegenden Arbeit konnte jedoch erstmalig die Bindung von As(III) an die unbesetzte RING-Domäne von BRCA1 und eine damit einhergehende Konformationsänderung nachgewiesen werden.

So führten ROEHM UND BERG bereits 1997 Analysen zur Metallbindung sowie zu den Metall-abhängigen Faltungseigenschaften der BRCA1 Ringfinger-Domäne durch, wobei jedoch lediglich die Co(II)-Bindung im Fokus stand. Die Autorengruppe verwendete ein synthetisches Peptid aus der isolierten RING-Domäne (AS 22 – 77), woran sich auch die Sequenz des in dieser Arbeit eingesetzten synthetischen Peptides orientierte. Dabei zeigte sich die RING-Domäne bereits in Abwesenheit von Metallionen zu einem gewissen Maße strukturiert, wobei deutliche Konformationsänderungen nach Cobaltbindung verzeichnet werden konnten. Die Autorengruppe beschrieb eine sequentielle Co(II)-Bindung, bei der das Metallion zunächst an die erste Bindungsstelle assoziierte, wodurch das Peptid etwas stärker und möglicherweise starrer strukturiert wurde. Es wurde davon ausgegangen, dass diese Bindung sowie die starre Struktur die Bildung der umliegenden Regionen und somit die Assoziation von Metallen an die zweite Bindungsstelle erschwert und dadurch zur beobachteten Antikooperativität führen könnte (ROEHM UND BERG, 1997). Auch LAI *et al.* beschrieben eine kompakte Konformation sowie eine antikooperative Bindung im Falle eines Co(II)-besetzten Ringfingers. Zudem konnte eine leichte, aber erkennbare Strukturveränderung durch Zugabe des natürlichen Bindungspartners Zn(II) beobachtet werden (LAI *et al.*, 1998).

Auch CHASAPIS *et al.* untersuchten die Zinkbindungseigenschaften sowie die strukturellen Veränderungen eines Ringfinger-Proteins nach Metallbindung. Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit analysierten RING-Domäne handelte es sich bei dem in der Publikation verwendeten Peptid um ein Cys3His1-Cys3His1 Motiv. Dabei wurde durch eine Punktmutation ein Cystein in der zweiten Bindungsstelle durch die AS Alanin ersetzt. Obwohl die Mutation lediglich im zweiten Bindungsmotiv vorhanden war, verloren beide Bindungsstellen ihre Metallbindungskapazität. Zusätzlich konnte durch NMR-Studien eine deutliche Strukturveränderung gezeigt werden, wobei das mutierte Konstrukt seine korrekte Faltung im Vergleich zum nativen Peptid verlor. Die Arbeitsgruppe vermutete demnach, dass die zweite Stelle ein wichtiger Regulator für die Bildung der ersten Bindungsstelle sowie für die gesamte Metall-abhängige Faltung des Peptides sein könnte (CHASAPIS *et al.*, 2010).

SUN und Kollegen wiederum analysierten den Einfluss von Arsenit auf das Zinkfingerprotein PARP1. Dabei wurden neben Bindungsanalysen auch Strukturuntersuchungen durchgeführt. Mit

Hilfe von Fluoreszenzanalysen konnte die Arbeitsgruppe die Veränderung der Tertiärstruktur genauer beurteilen. Während die Bindung von Zn(II) an ein synthetisches PARP1-Apopeptid hierbei zu einer dichteren Struktur im Vergleich zum unbesetzten Peptid führte, konnte nach As(III)-Bindung eine lockerere Struktur nachgewiesen werden (SUN *et al.*, 2014).

Vor dem Hintergrund der Datenlage wird daher postuliert, dass die in dieser Dissertation gewonnenen Daten auf eine Konformationssättigung ab 1 me Co(II) schließen lassen, welche wiederum auf eine antikooperative Bindung hindeutet (ARNIM UND DENG, 1993; ROEHM UND BERG, 1997). Da Co(II) isostrukturelle Komplexe zu entsprechenden Zn(II)-Komplexen ausbildet, kann auch für die Bindung des natürlichen Cofaktors ein sequentieller, antikooperativer Verlauf postuliert werden. So scheint, analog zu den Ergebnissen von CHASAPIS *et al.*, 2010, bereits die Besetzung von nur einer Bindungsstelle die finale Konformation zu regulieren. Unter Betrachtung der zuvor beschriebenen Befunde handelte es sich dabei vermutlich um das mit vier Cys-Liganden aufgebaute Motiv. Dementgegen konnte durch die aufgenommenen SRCD-Spektren eine kooperative Bindung im Falle von As(III) beobachtet werden. Während Zn(II) und Co(II) isostrukturelle Komplexe mit tetraedrischer Koordination ausbilden (ROEHM UND BERG, 1997), formt As(III) typischerweise drei-koordinative trigonal-pyramidale Komplexe mit zellulären Cystein-haltigen Proteinen (ZHANG *et al.*, 2014; SPUCHES *et al.*, 2005). Hierbei ist denkbar, dass die kooperative Bindung durch eine gelockerte Struktur des As(III)-besetzten Ringfingers, wie sie von SUN *et al.*, 2014 im Falle von PARP1 beschrieben wurde, hervorgerufen wird. Diese positive Kooperativität würde somit die Besetzung der zweiten Bindungsstelle begünstigen. Die von derselben Arbeitsgruppe beobachtete starre Konformation scheint nur bei tetraedrischen Komplexen aufzutreten, was die Antikooperativität der Co(II)- und Zn(II)-Bindung begründen würde. Um jedoch eindeutige Aussagen über die Kooperativität der Bindungsmechanismen treffen zu können, müssten die Bindungskurven mathematischen Linearisierungsverfahren, wie beispielsweise der Hill-Gleichung, unterzogen werden.

Demgegenüber stellen die Strukturuntersuchungen des rekombinanten Peptides vermutlich keine reinen Bindungsanalysen, sondern konkurrierende Metallbindungsuntersuchungen dar. Da *E.coli* Bakterien in der Lage sind Zink aus dem Kulturmedium zu akkumulieren (OUTTEN UND O'HALLORAN, 2001) und die Dissoziationskonstante von Zn(II) an Ringfingerproteine unterhalb der freien zellulären Zinkkonzentration liegt (KLUSKA *et al.*, 2018), kann von einer Besetzung der Zinkbindungsstellen des Peptides während der Expression ausgegangen werden. Zusammengefasst konnte bei diesen Experimenten nach keiner der Metallinkubationen (CoCl₂, ZnCl₂, NaAsO₂, NiCl₂) eine Konformationsänderung beobachtet werden. Die physiologisch relevanten Metallspezies waren somit nicht in der Lage, Zn(II) aus seiner gewohnten Koordinationsumgebung herauszulösen, was auf eine höhere Affinität von Zn(II) im Vergleich zu As(III), Co(II) und Ni(II) schließen lässt.

Ähnliche Ergebnisse lieferten auch die konkurrierenden Bindungsanalysen des synthetischen Peptides. Dabei konnten As(III) weder durch Zugabe von äquimolaren Mengen noch durch *overload* Bedingungen das gebundene Zn(II) aus den Bindungsstellen verdrängen, was sich durch ein ähnliches Spektrum bei der konkurrierenden Metallbehandlung im Vergleich zur reinen Zinkbehandlung deutlich machte. Demnach scheint As(III) nicht in der Lage, den natürlichen Cofaktor aus den hier verwendeten Peptidsequenzen zu verdrängen und zu ersetzen.

Zugleich konnte durch die Absättigung des Ringfingers mit As(III) und anschließender Behandlung mit einem Zn(II)-Überschuss eine Konformationsänderung ähnlich der des reinen Zink-gesättigten Peptides beobachtet werden. Zn(II) scheint demnach in der Lage, das gebundene As(III) aus dem Ringfinger zu verdrängen, selbst zu binden und die Struktur des Peptides zu bestimmen. Zusammengenommen wurden durch die konkurrierenden Untersuchungen der verschiedenen Metallverbindungen eine höhere Affinität von Zn(II) im Vergleich zu As(III) postuliert, welche durch die Analysen des rekombinanten Peptides nochmal bekräftigt werden konnten.

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten von Zinkfingerpeptiden bzw. deren Proteinkomplexen mit unterschiedlichen Metallionen wurde bereits für viele verschiedene Zinkfingerproteine durchgeführt, wobei eine Auflistung in KLUSKA *et al.* zu finden ist. Die höhere Bindungsaffinität von Zn(II) im Vergleich zu Co(II) bzw. Ni(II) in Zinkfingerproteinen konnte zuvor mehrfach identifiziert werden. Während die Dissoziationskonstanten von Zn(II) gegenüber natürlichen Zinkfingerdomänen im niedrigen nanomolaren bis subfemtomolaren Bereich beschrieben wurden, wiesen As(III) und Ni(II) häufig Affinitäten im mikromolaren Bereich auf. Für die isostrukturelle spektroskopische Sonde Co(II) lagen die beschriebenen Bindungskonstanten meist etwa drei bis vier Größenordnungen unter denen der Zn(II)-Komplexe (KLUSKA *et al.*, 2018; ROEHM UND BERG, 1997). Strukturuntersuchungen nach konkurrierender Metallbindung an Zink- oder Ringfingerproteine, wie sie in dieser Arbeit vorgestellt wurden, sind nach aktuellem Kenntnisstand nicht bekannt.

5.4 METALLBINDUNGSUNTERSUCHUNGEN MITTELS UV/VIS-SPEKTROSKOPIE

Da die durchgeführten SRCD-Experimente keine eindeutigen Aussagen über die Besetzung der Bindungsstellen im Peptid lieferten, wurden zusätzlich Metallbindungsuntersuchungen mittels UV/Vis-Spektroskopie vollzogen. Im Gegensatz zu den SRCD-Untersuchungen wurde für die nachfolgenden Analysen lediglich das synthetische Peptid, bestehend aus den AS 22 – 77 von BRCA1, eingesetzt.

Zn(II) ist aufgrund seiner vollbesetzten d^{10} -Schale spektroskopisch inaktiv, weshalb die Bindungseigenschaften indirekt gemessen werden müssen. Co(II) wiederum besitzt eine d^7 -Elektronenschale und bindet ähnlich wie Zn(II) an Zink-bindende Domänen in tetraedrischer Geometrie. Das Ion des d^7 -Übergangsmetalls eignet sich daher als spektroskopische Sonde zur Untersuchung der Zn(II)-Bindung an Zink- und Ringfingerproteine. Bei der Bildung des Co(II)-Thiolat-Komplexes treten spezifische d-d-Übergänge im sichtbaren Bereich (550 – 750 nm) auf. Neben den charakteristischen Absorptionsmaxima können zudem *ligand-to-metal* Ladungstransferbanden (LMCT, *ligand-to-metal charge transfer*) durch die $S^- \rightarrow Co(II)$ -Bindung auftreten. Diese sind im nahen UV-Bereich bei etwa 310 nm detektierbar. Wird folglich ein Apozeptid mit Co(II) bis zur Sättigung titriert, treten d-d-Übergänge und LMCT-Banden auf, welche nach anschließender kompetitiver Titration mit Zn(II) wieder verschwinden (KOPERA *et al.*, 2004; MICHALEK *et al.*, 2011).

Auch As(III) ist in der Lage, an das Schwefelatom (S) im Cystein der Zink-bindenden Domänen zu binden, wobei die entstehende As-S-Bindung ebenfalls zu LMCT-Banden im nahen UV-Bereich (250 – 320 nm) führen. Durch Messung der Absorption repräsentativer Wellenlängen kann die Ausbildung und Stabilität des As(III)-Thiolat-Komplexes untersucht werden (SPUCHES *et al.*, 2005). Auch hier kann nach Sättigung des Apozeptides mit As(III) im Anschluss eine kompetitive Titration mit Zn(II) durchgeführt werden, wobei die zuvor sichtbaren LMCT-Banden wieder verschwinden.

5.4.1 SYNTHETISCHES PEPTID

Um die Zinkbindung zu überprüfen, wurde zunächst die klassische spektroskopische Sonde Co(II) eingesetzt und eine Rücktitration mit Zn(II) durchgeführt. Dabei wurde das Peptid zu Beginn mit 3 me Co(II) abgesättigt. Während das resultierende Spektrum die charakteristische $S^- \rightarrow Co(II)$ LMCT-Bande (~ 310 nm) im nahen UV-Bereich zeigte, konnten die für einen d-d-Übergang von Co(II) spezifischen Banden bei etwa 550 – 750 nm jedoch nicht beobachtet werden (Anhang 8.4.3 - Abbildung 69). Im Anschluss wurde $ZnCl_2$ im Intervall von 0,5 me hinzugefügt und nach jeder Zugabe ein Absorptionsscan durchgeführt. Wider Erwarten konnte keine Abnahme der spezifischen LMCT-Bande in Richtung des Apozeptids festgestellt werden. Dennoch schien Zn(II) auf unspezifische Art und Weise mit den Bindungsstellen zu interagieren. Eine Veränderung des ursprünglichen Co(II)-abgesättigten Spektrums nach Zugabe des natürlichen Cofaktors konnte dabei detektiert werden. Demnach wäre denkbar, dass sich Mischkomplexe ausbilden, welche Veränderungen der Strukturen hervorrufen könnten.

Da die beschriebenen spektroskopischen Untersuchungen erneut keine eindeutige Aussage über die Metallbindung zuließen, wurde die in einigen Studien (ZHOU *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2014) beschriebene LMCT-Bande der $S^- \rightarrow As$ -Bindung (250 – 320 nm) aufgenommen. Dafür wurde

zunächst mit As(III) titriert und im Anschluss eine Zn(II)-Rücktitration durchgeführt. Die Spektren zeigten eine deutliche Zunahme der Absorption im angegebenen Wellenlängenbereich bei Zugabe steigender As(III)-Mengen (Abbildung 48). Gleichzeitig war deutlich erkennbar, dass ab einer gewissen As(III)-Konzentration eine Sättigung auftrat und sich die Absorption nicht weiter veränderte. Zur Verdeutlichung des Bindungsverhaltens wurde die Wellenlänge 250 nm gewählt, ihre x-fache Änderung im Vergleich zum Apopeptid berechnet und diese gegen die molaren Äquivalente an NaAsO₂ aufgetragen (Abbildung 48 Inset). Die Titrationskurve zeigte analog zu den SRCD-Untersuchungen zunächst einen sprunghaften Anstieg der Absorption, was auf eine starke Bindung von As(III) an den Liganden hindeutet. Anschließend konnte zunächst eine geringere Änderung und somit schwächere Assoziation verzeichnet werden, die sich jedoch in einem erneuten sprunghaften Anstieg der Absorption äußerte. Auch diese Ergebnisse lassen eine sequentielle, kooperative Bindung vermuten, bei der sich das anfänglich gebundene As(III) vorteilhaft auf die weitere Bindungskinetik ausübt. Ab einer Konzentration von etwa 2 me konnte ein Sättigungsplateau identifiziert werden.

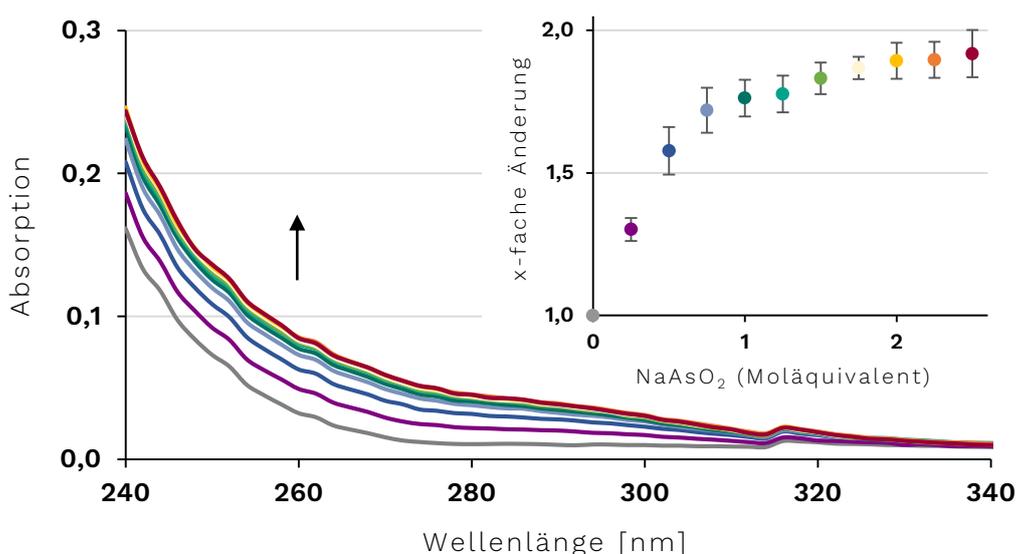


Abbildung 48: UV/Vis-Spektren des synthetischen BRCA1-Peptides nach Titration mit NaAsO₂.

Dargestellt sind exemplarische UV/Vis-Spektren der Metallbindungsuntersuchungen. Neben dem Apopeptid (grau) ist auch die Titration von As(III) mit 0,25 me (lila), 0,5 me (blau), 0,75 me (hellblau), 1 me (grün), 1,25 me (türkis), 1,5 me (hellgrün), 1,75 me (hellgelb), 2 me (gelb), 2,25 me (orange) sowie 2,5 me (rot) aufgezeigt. Das Inset veranschaulicht die x-fache Änderung der S⁻ → As(III) LMCT-Bande (250 nm), aufgetragen gegen die entsprechenden molaren Äquivalente von As(III). Die x-fache Änderung wurde dabei auf das Signal des Apopeptids normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen.

Das Spektrum der darauffolgenden Rücktitration mit ZnCl₂ signalisierte eine Abnahme der Absorption im beschriebenen Wellenlängenbereich mit steigender Zn(II)-Konzentration, wobei auch hier eine Sättigung beobachtet werden konnte (Abbildung 49). Analog zu den zuvor beschriebenen Untersuchungen wurde die relative Änderung bei 250 nm gegen die

entsprechenden molaren Äquivalente an ZnCl_2 aufgetragen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die relative Änderung auf das mit As(III) -abgesättigte Peptid bezogen wurde (Abbildung 49 Inset). Die deutlich Abnahme der Absorption hin zum Sättigungsplateau lässt darauf schließen, dass Zn(II) dazu befähigt ist, im Ringfinger gebundenes As(III) komplett zu verdrängen und selbst zu binden. Die höhere Bindungsaffinität von Zn(II) im Vergleich zu As(III) gegenüber der RING-Domäne konnte somit auch durch diese Untersuchungen bestätigt werden.

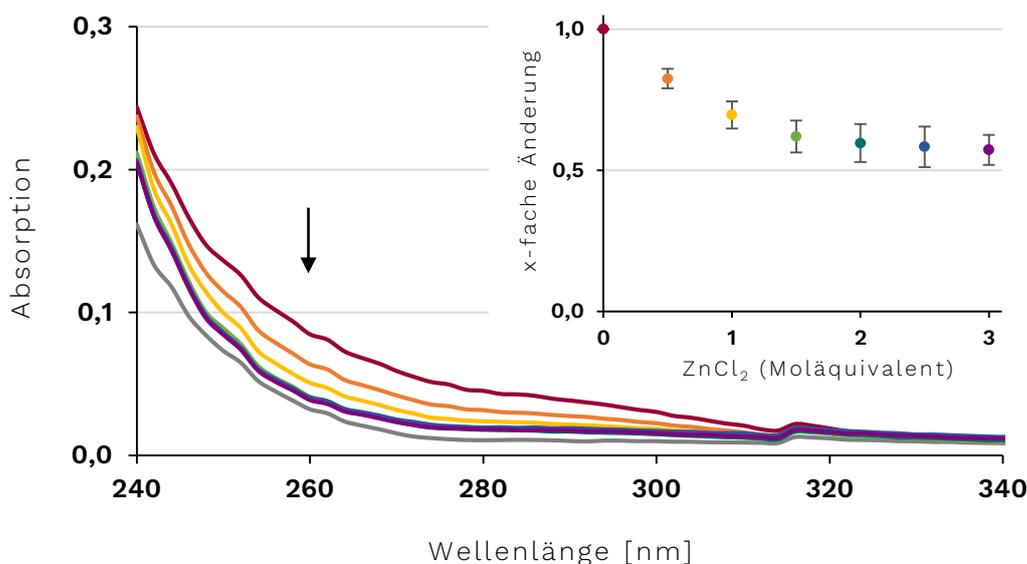


Abbildung 49: UV/Vis-Spektren des synthetischen BRCA1-Peptides nach Absättigung mit NaAsO_2 und anschließender Rücktitration mit ZnCl_2 .

Dargestellt sind exemplarische UV/Vis-Spektren der Metallbindungsuntersuchungen. Neben dem Apopeptid (grau) sind auch die Absättigung mit 2,5 Moläquivalenten (me) As(III) (rot) sowie die Rücktitration von Zn(II) mit 0,5 me (orange), 1 me (gelb), 1,5 me (hellgrün), 2 me (grün), 2,5 me (blau) sowie 3 me (lila) aufgezeigt. Das Inset veranschaulicht die x-fache Änderung der $\text{S}^- \rightarrow \text{As(III)}$ LMCT-Bande (250 nm), aufgetragen gegen die entsprechenden molaren Äquivalente von Zn(II) . Die x-fache Änderung wurde dabei auf das Signal des As(III) -abgesättigten Peptids normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen.

Da im biologischen System jedoch Zn(II) als natürlicher Cofaktor vorliegt, wurde zusätzlich untersucht, inwiefern andere Metallionen Zink in seiner nativen Koordinationsumgebung ersetzen können. Dabei wurde das Peptid zunächst mit 3 me Zn(II) abgesättigt und anschließend mit As(III) titriert. Da Zn(II) selbst nicht spektroskopisch aktiv ist, zeigten die aufgenommenen UV/Vis-Spektren keine Veränderung nach Absättigung mit ZnCl_2 (Abbildung 50). Vorausgesetzt As(III) wäre in der Lage, gebundenes Zn(II) aus den Bindungsstellen zu verdrängen und selbst zu komplexieren, sollte die charakteristische $\text{S}^- \rightarrow \text{As(III)}$ LMCT-Bande (250 – 320 nm) nach Zugabe von As(III) auftreten und sich die Absorption in diesem Wellenlängenbereich verändern. Wie in Abbildung 50 ersichtlich, konnte keine Veränderung der Spektrenintensität nach Titration mit NaAsO_2 beobachtet werden. Demnach scheint As(III) nicht in der Lage, Zn(II) aus seiner nativen Koordinationsumgebung zu verdrängen und selbst an den Ringfinger zu binden. Die Ergebnisse

deuten folglich erneut darauf hin, dass Zn(II) eine höhere Bindungsaffinität im Vergleich zu As(III) innerhalb der hier vorliegenden BRCA1-Sequenz aufweist.

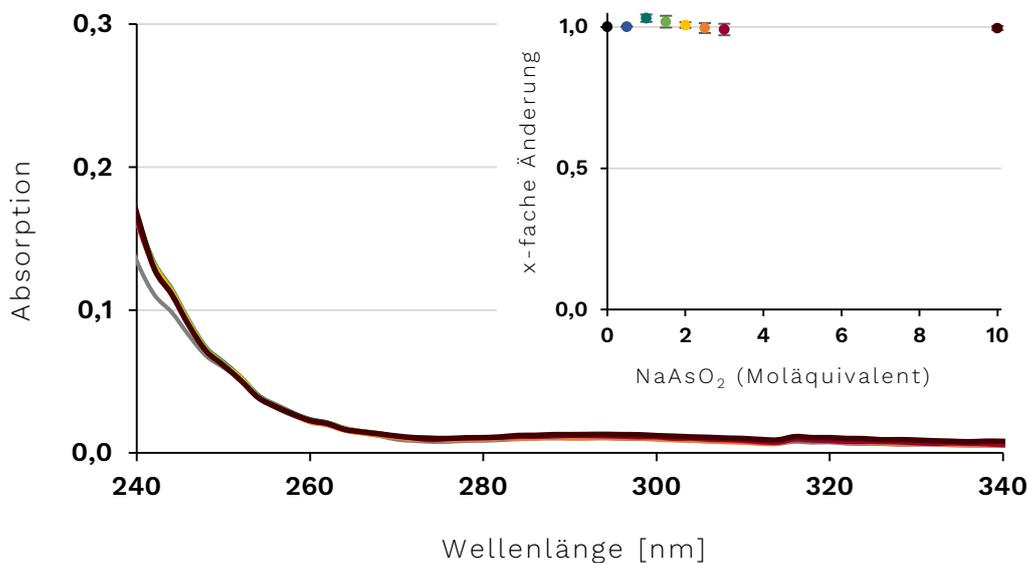


Abbildung 50: UV/Vis-Spektren des synthetischen BRCA1-Peptides nach Absättigung mit ZnCl₂ und anschließender Rücktitration mit NaAsO₂.

Dargestellt sind exemplarische UV/Vis-Spektren der Metallbindungsuntersuchungen. Neben dem Apopeptid (grau) sind auch die Absättigung mit 3 Moläquivalenten (me) Zn(II) (schwarz) sowie die Rücktitration von As(III) mit 0,5 me (blau), 1 me (grün), 1,5 me (hellgrün), 2 me (gelb), 2,5 me (orange), 3 me (rot) sowie 10 me (dunkelrot) aufgezeigt. Das Inset veranschaulicht die x-fache Änderung der S⁻ → As(III) LMCT-Bande (250 nm), aufgetragen gegen die entsprechenden molaren Äquivalente von As(III). Die x-fache Änderung wurde dabei auf das Signal des Zn(II)-abgesättigten Peptids normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen.

5.4.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Während die Untersuchungen mit der spektroskopischen Sonde Co(II) keine eindeutigen Ergebnisse lieferten, konnten durch die Beobachtungen der S⁻ → As(III) LMCT-Bande klare Aussagen getroffen werden. Dabei wurde neben der sequentiellen, kooperativen Assoziation des toxischen Metallions As(III) an das Apopeptid auch dessen Verdrängungen durch den natürlichen Cofaktor Zn(II) identifiziert. Weiterhin konnte die starke Bindung von Zn(II) an das BRCA1-Konstrukt, aufgrund der fehlenden Verdrängung durch das Metallion As(III), belegt werden. Somit konnte erstmalig die Bindung von As(III) an die unbesetzte RING-Domäne des BRCA1-Proteins sowie die höhere Affinität des natürlichen Bindungspartner Zn(II) im Vergleich zu As(III) nachgewiesen werden.

Wie bereits beschrieben, analysierten ROEHM UND BERG neben den Metalloid-abhängigen Faltungseigenschaften auch die Metallbindung der BRCA1 RING-Domäne. Die Arbeitsgruppe konnte, unter Verwendung von Co(II) als spektroskopische Sonde, eine sequentielle Metallbindung beobachten. Die Forscher beschrieben dabei eine antikooperative Bindung, bei der zunächst die Bindungsstelle 1 nahezu vollständig besetzt wurde, bevor das Übergangsmetall an

die zweite Bindungsstelle assoziierte. Die Intensitäten der aufgenommenen Spektren deuteten auf eine tetraedrische Geometrie hin. Außerdem konnte durch den Vergleich mit anderen Publikationen, in denen Co(II)-Komplexe mit verschiedenen Kombinationen von Cys- und His-Liganden untersucht wurden, die Bindungsstelle identifiziert werden, die eine erhöhte Affinität aufweist. Entsprechend der Literaturdaten handelt es sich dabei um das Motiv mit vier Cys-Liganden. Mit Hilfe von Faktoranalysen sowie *Fittings* konnte die Arbeitsgruppe zusätzlich die Dissoziationskonstanten der Co(II)-Bindung bestimmen. Dabei konnte für das erste Zink-bindende Motiv eine Konstante von $2,6 \times 10^{-8}$ M identifiziert werden. Für die zweite Bindungsstelle wurde eine Dissoziationskonstante von $4,5 \times 10^{-7}$ M, wenn die Stelle 1 unbesetzt bzw. von $7,9 \times 10^{-6}$ M, wenn das erste Motiv besetzt ist, berechnet. Zwar bildet Cobalt isostrukturelle Komplexe mit Zink-bindenden Peptiden, dennoch sind die Bindungsaffinitäten etwa drei Größenordnungen unter denen der Zn(II)-Komplexe (ROEHM UND BERG, 1997). Demnach scheint Zink im nano- bis picomolaren Bereich an den Ringfinger von BRCA1 zu binden.

Die unterschiedlichen Affinitäten der beiden, in RING-Domänen enthaltenen, Bindungsstellen konnten ebenso bei weiteren Proteinen bestätigt werden. So konnten ARNIM UND DENG die sequentielle Bindung auch für den natürlich Cofaktor Zn(II) nachweisen (ARNIM UND DENG, 1993; LAI *et al.*, 1998).

Die Arbeitsgruppe von LOVERING untersuchte als eine der ersten Forschungsgruppen ein Ringfingerprotein, wobei neben der DNA- auch die Metallbindung Teil dieser Experimente darstellte. Die spektroskopischen Analysen der Arbeitsgruppe deuteten, durch das auftretende Absorptionsmaximum bei 307 nm, auf die LMCT-Bande der $S^{-} \rightarrow Co(II)$ -Bindung und somit auf die Beteiligung der Cysteine an der Metallbindung hin. Gleichzeitig konnten verschiedene Maxima im Bereich der d-d-Übergänge identifiziert werden, was für eine tetraedrische Koordination der Co(II)-Ionen durch die Cystein-Liganden sprach. Zusätzlich konnte die bevorzugte Bindung von Zink, durch Intensitätsabnahme der charakteristischen Co(II)-Übergänge, beobachtet werden. Die Untersuchungen deuteten auf eine bevorzugte Bindung von Zink gegenüber anderen physiologischen zweiwertigen Metallionen hin, wobei Zink mindestens 10-fach stärker gebunden wurde, als dies für Cobalt der Fall war (LOVERING *et al.*, 1993).

Wie zuvor beschrieben, untersuchten CHASAPIS *et al.* neben den strukturellen Eigenschaften eines Ringfingerproteins auch dessen Zinkbindungseigenschaften. Dabei konnte durch die Mutation von nur einer Bindungsstelle ein vollständiger Verlust der Metallbindungskapazität identifiziert werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Abhängigkeit der beiden Bindungsstellen sowie deren regulatorische Funktion und die gegenseitige Einflussnahme auf die Assoziation von ionischen Bindungspartnern (CHASAPIS *et al.*, 2010).

Neben den beschriebenen Assoziationen von Zn(II) sowie Co(III) konnte auch die Bindung von As(III) an unterschiedliche Ringfinger-Domänen bereits 2014 von ZHANG *et al.* sowie 2017 von

JIANG *et al.* nachgewiesen werden. Die Forscher verwendeten dabei ein synthetisches Apozeptid und behandelten dies mit NaAsO₂. Durch die durchgeführten MALDI-TOF MS-Untersuchungen konnte die Bindung von As(III) sowie die Freisetzung von drei Protonen beobachtet werden, was wiederum die Koordination von As(III) mit drei Cysteinen bestätigte (ZHANG *et al.*, 2014; JIANG *et al.*, 2017). Die zunehmende Absorptionsbande im nahen UV-Bereich ließ ebenfalls die Bindung von As(III) an die Sulfhydryl (SH) -Gruppen der Cysteine vermuten (ZHANG *et al.*, 2014).

Die Arbeitsgruppen von SUN *et al.* und ZHOU *et al.* untersuchten in mehreren Forschungsarbeiten ebenfalls die Bindung von Arsenit sowie Zink an verschiedene Zinkfingerproteine. Dabei wurde neben der Bindung der beiden Metallionen an das Apozeptid auch deren kompetitive Bindung genauer betrachtet. Während die Bindung von Zink sowie Arsenit an das Apozeptid synthetischer Zinkfingerproteine nachgewiesen werden konnte, zeigten die spektroskopischen Methoden gleichzeitig eine Konkurrenz der beiden Metallionen um dieselbe Bindungsstelle im Peptid. Zn(II) war dabei in der Lage, das im Zinkfinger gebundene As(III) zu verdrängen. Neben den subzellulären Untersuchungen führten die Arbeitsgruppen auch zelluläre Experimente durch. Hierbei fand unter anderem die Methode der Immunopräzipitation mit nachfolgender kolorimetrischer Bestimmung des Zinkgehaltes Anwendung. Im Gegensatz zu den hier aufgeführten Ergebnissen konnte die Arbeitsgruppe die Freisetzung von Zn(II) durch As(III) im zellulären System beobachten. Zusätzlich konnte die Zugabe von Zn(II) den Zinkgehalt in den As(III)-exponierten Zellen wiederherstellen (ZHOU *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2014). Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die zelluläre As(III)-Bindung an ein mit Zink besetztes Peptid nie direkt, sondern lediglich indirekt über die Bestimmungen der durch H₂O₂ freigesetzten Zinkmengen analysiert wurde. Demnach wäre möglich, dass die Wirkung von As(III) im zellulären System eher auf indirekte Mechanismen zurückzuführen ist, bei denen Zink beispielsweise durch die Bildung von Disulfidbrücken, im Falle eines vorherrschenden zellulären oxidativen Stresses, freigesetzt werden könnte.

Demgegenüber konnte die Arbeitsgruppe von DING *et al.* jedoch eine direkte Konkurrenz von Zn(II) und As(III) um dieselbe Bindungsstelle im Zinkfingerprotein PARP1 beobachten. Dabei wurde mittels MALDI-TOF MS-Untersuchungen die dosisabhängige Abnahme des ZnPARPzf Signals durch As(III)-Behandlung mit gleichzeitiger Erhöhung der Signalintensität des AsPARPzf identifiziert. Die Forscher postulierten einen Zusammenhang zwischen dem Metallaustausch und der nachgewiesenen Beeinträchtigung der Proteinfunktion (DING *et al.*, 2009).

Die zuvor erwähnten Forschungsarbeiten von ZHANG *et al.* sowie JIANG *et al.* führten neben den Bindungsuntersuchungen des Apozeptides ebenfalls zelluläre Bindungsanalysen durch. Dabei wurde in beiden Publikationen ein Streptavidin Agarose Affinitätsassay verwendet. Die Ergebnisse zeigten, dass die Behandlung der Zellen mit Biotin-As den *Pull-Down* der ektopisch exprimierten Ringfingerproteine erleichterte, was wiederum auf die Bindung der Biotin-As-

Sonde an diese Proteine hindeutete (ZHANG *et al.*, 2014; JIANG *et al.*, 2017). Unter der Annahme, dass diese zellulären Ringfingerproteine gesättigt vorlagen, würde dies den in dieser Arbeit beobachteten Ergebnissen widersprechen.

Sowohl die Diskussion der zuvor beschriebenen Ergebnisse der SRCD-Analysen wie auch der Vergleich der bereits veröffentlichten Bindungsuntersuchungen erschweren eine finale Aussage über die Konkurrenzsituation der beiden untersuchten Metallverbindungen im BRCA1-Ringfinger. Während die durchgeführten spektroskopischen Experimente eine deutliche kooperative Bindung von As(III) aufzeigten, konnte der antikooperative Mechanismus der Zn(II)-Assoziation lediglich über Literaturvergleiche spekuliert werden. Zwar konnte die Literatur bereits die Freisetzung von Zn(II) durch As(III) in anderen Peptiden sowie in zellulären Systemen beobachten, die hier durchgeführten kompetitiven Untersuchungen ließen dennoch eine höhere Affinität von Zn(II) im Vergleich zu As(III) gegenüber den in dieser Arbeit verwendeten BRCA1-Sequenzen vermuten. Abschließend lässt sich demnach schlussfolgern, dass ein direkter Einfluss von Arsenit auf die biologische Funktion des gesamten, nativen BRCA1-Proteins aus den hier vorliegenden Analysen nicht abgeleitet werden kann.

6 ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf der multifunktionalen Rolle von BRCA1 in verschiedenen Signalwegen der DDR sowie deren Beeinflussung durch das toxische Metallion Arsenit. Das Tumorsuppressorprotein BRCA1 wird meist mit seiner tragenden Rolle in der Reparatur von DSB in Verbindung gebracht. Die zunächst postulierte Beteiligung an der nahezu fehlerfreien HR wurde im Laufe der Jahre um weitere, mannigfaltige Funktionen anderer zellulärer Signalwege der DDR wie der Zellzyklusregulation, der Transkriptionsregulation, der Proteinubiquitinierung, der Apoptose sowie der Chromatinremodellierung erweitert. BRCA1 stellt somit einen essentiellen Faktor in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität dar, dessen Fehlen schwerwiegende Folgen für einen Organismus aufweist (SAVAGE UND HARKIN, 2015).

DDR-assoziierte Proteine besitzen häufig Zink-bindende Motive, die zur Struktur sowie zur Stabilität beitragen. Aufgrund ihrer ausgeprägten Fähigkeit der Cofaktorsubstitution sowie der Redoxsensitivität stellen Zinkfingerstrukturen potentielle Angriffspunkte für chemische Substanzen dar. Insbesondere Metallverbindungen weisen eine hohe Thiolaffinität auf, wodurch Wechselwirkungen mit diesen Strukturen und in Folge dessen Funktionsstörungen der Proteine auftreten können. Eine Beeinträchtigung von Zinkfingerproteinen durch das ubiquitär vorkommende As(III) konnte bereits mehrfach gezeigt werden (SCHWERDTLE *et al.*, 2003A; ZHOU *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2014). Demgegenüber ist jedoch nur wenig über eine Arsenit-vermittelte Beeinflussung von Ringfingerproteinen bekannt. Erste Hinweise gab die Studie von ZHANG *et al.*, die eine Bindung von Arsenit an die RING-Domänen einer E3-Ubiquitinligase mit einer beeinträchtigten H2B-Ubiquitinierung und einer gestörten DSBR beschrieben (ZHANG *et al.*, 2014). Da auch die Struktur des DDR-assoziierten Proteins BRCA1 einen Zn(II)-komplexierenden Ringfinger aufweist, stellt der Tumorsuppressor ebenfalls ein potentielles Target dar. Aufgrund seiner weitreichenden Funktionen in den Signalwegen der DDR und damit der Bewahrung der genomischen Integrität, sollte die vorliegende Arbeit einen wichtigen Beitrag zur mechanistischen Aufklärung des Einflusses von Arsenit auf die BRCA1-vermittelte DDR leisten. Weiterhin sollte untersucht werden, ob das Metalloid eine Konformationsänderung in der RING-Domäne von BRCA1 verursacht und ob diese Einfluss auf dessen Funktionsfähigkeit nimmt.

Um die Beteiligung von BRCA1 an der DDR aufzuklären, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Zelllinie eingesetzt, die eine natürliche Mutation im *BRCA1*-Gen aufweist (UWB1.289). Vergleichende Analysen erfolgten mit einem stabil transfizierten BRCA1-profizienten Pendant (UWB1.289 + BRCA1). Zu Beginn der Experimente wurde ein geeigneter Konzentrationsbereich von NaAsO₂ identifiziert. Die Analysen zur akut toxischen Wirkung ergaben dabei eine konzentrationsabhängige Abnahme der vitalen Zellen sowie eine Depletion des intrazellulären ATP-Gehaltes nach Inkubation mit Arsenit. So führte erst die Behandlung mit 5 µM zu einer

leicht bis moderat zytotoxischen Wirkung, wohingegen die Exposition gegenüber 10 μM NaAsO_2 moderat bis stark zytotoxische Effekte hervorrief. Beide Zelllinien zeigten dabei einen ähnlichen Zytotoxizitätsverlauf. Für die im späteren Verlauf der vorliegenden Arbeit geplante Analyse der vergleichenden DNA-Reparatur in den BRCA1-defizienten und -profizienten wurden gezielt DSB mittels Röntgenstrahlung gesetzt. Die Zytotoxizitätsuntersuchungen der Strahlendosis von 1 Gy (1 Joule/kg) ließen dabei keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen verzeichnen. Ebenso konnten keine verstärkenden Effekte durch die Co-Exposition von NaAsO_2 und IR beobachtet werden, welche für die nachfolgenden Analysen der DNA-Reparatur unter Arsenit-Einfluss von Bedeutung waren. Die toxischen Effekte waren in beiden Zellen ähnlich und konnten demnach alleinig der Arsenbehandlung zugesprochen werden. Zusammenfassend zeigte Arsenit eine, vom BRCA1-Status weitestgehend unabhängige, zytotoxische Wirkung.

Um die zytotoxischen Effekte auf den zellulären Gehalt von Arsen zurückführen zu können, wurde im Anschluss die Gesamtaufnahme des Halbmetalls mittels GF-AAS untersucht. Dabei konnte eine konzentrationsabhängige Akkumulation der intrazellulären Arsenmenge beobachtet werden, wobei die zelluläre Aufnahme für beide Zelllinien vergleichbar war. Folglich verursachte die Exposition gegenüber NaAsO_2 eine starke intrazelluläre Akkumulation von Arsen, welche ebenfalls unabhängig vom BRCA1-Status stattfand.

Damit neben dem transkriptionellen Einfluss einer BRCA1-Defizienz auch potentielle zelluläre Antwortmechanismen nach Einzelbehandlungen mit NaAsO_2 und IR sowie nach deren Co-Exposition abgeleitet werden können, wurden im Anschluss Genexpressionsanalysen mittels Hochdurchsatz RT-qPCR durchgeführt. Die hierbei ausgewählten Gene codieren für Proteine der Metallhomöostase, der oxidativen Stressantwort, der Zellzyklusregulation, apoptotischer Faktoren sowie der DNA-Schadensantwort und bilden damit verschiedene Aspekte der genomischen Stabilität ab. Zur Beurteilung der transkriptionellen Auswirkungen einer BRCA1-Defizienz diente die unbehandelte Kontrolle der natürlich mutierten UWB1.289-Zelllinie als Referenz. Die Gegenüberstellung der basalen Expressionsprofile zeigte dabei lediglich für das *BRCA1*-Gen eine Veränderung der Transkriptionsrate. So wurde in der BRCA1-profizienten Zelllinie ein 8-fach erhöhtes Expressionsniveau im Vergleich zur basalen Genexpression der *BRCA1*-mutierten Zellen festgestellt. Während Arsenit in den UWB1.289-Zellen keinerlei Veränderungen der Transkriptionsrate verursachte, wurde in den BRCA1-profizienten Zellen eine konzentrationsabhängig verstärkte Expression des Gens beobachtet. Sowohl das basal erhöhte *BRCA1*-Expressionsniveaus als auch die Arsenit-vermittelte gesteigerte Transkriptmenge können dabei auf die konstitutive Aktivität sowie die Stress-induzierte Regulation des im pcDNA3-Plasmidvektor vorhandenen CMV-Promotors zurückgeführt werden (BRUENING *et al.*, 1998; DAMDINDORJ *et al.*, 2014). Die Co-Exposition resultierte in ähnlichen Genexpressionsmustern, wodurch eine verstärkende Wirkung der Bestrahlung ausgeschlossen werden konnte und die beobachteten Effekte, wie auch in den Zytotoxizitätsstudien, alleinig der Arsenit-Behandlung

zugesprochen wurden. Daraus wurde gefolgert, dass die *BRCA1*-Mutation der UWB1.289-Zellen Einfluss auf die basale sowie die Schadens-induzierte Expression des Gens nimmt.

Für den nachfolgenden Vergleich der NaAsO_2 -Auswirkungen auf die potentiell *BRCA1*-vermittelte transkriptionelle Regulation wurde eine Zelllinien-spezifische Auswertung durchgeführt. Die Gegenüberstellung der Genexpressionsprofile zeigte hierbei ein analoges Muster für beide Zelllinien nach Behandlung mit Arsenit sowie nach Co-Exposition. Analog zu den vorherigen Ergebnissen konnte auch hier kein Einfluss der isolierten Bestrahlung auf die Transkriptionsaktivität der analysierten Gene beobachtet werden. Die Arsenit-vermittelte Transkriptionsregulation scheint demnach unabhängig vom *BRCA1*-Status zu verlaufen.

Die Inkubation mit NaAsO_2 verursachte eine konzentrationsabhängige Induktion der Expression Metallhomöostase-regulierender Gene. Dabei wurden die Gene der MT-Familie *MT1X* und *MT2A*, sowie das für den Zinkexporter ZnT-1 codierende Gen *SLC30A1* verstärkt exprimiert. Demnach lassen die Ergebnisse auf eine Aktivierung des Zinkfinger-enthaltenden Transkriptionsfaktors MTF-1 schließen, die durch die Bindung des Metalloids oder durch oxidativen Stress ausgelöst wird (KRĘŻEL UND MARET, 2017; GÜNTHER *et al.*, 2012). Die mittels GF-AAS beobachtete zelluläre Akkumulation von Arsen konnte somit auch auf transkriptioneller Ebene bestätigt werden.

Zusätzlich wurden nach alleiniger Arsenitbehandlung sowie nach Co-Exposition eine Vielzahl an Zielgenen induziert, die mit der Aktivierung des redoxsensitiven Transkriptionsfaktors NRF2 in Verbindung gebracht werden. Eine besonders starke Induktion zeigte hierbei das Sensorgen *HMOX1* (PRONK *et al.*, 2014). Die Gegenwart von oxidativem Stress war auch an Genen abzulesen, die für die Aufrechterhaltung des GSH-Levels einer Zelle codieren. Dabei zeigten *G6PD*, *GCLC* sowie *GSR* eine leichte, dosisabhängige Induktion (NJÄLSSON UND NORRGREN, 2005; THOMAS, 2009; STANTON, 2012). Auch das gleichnamige Gen der Thiothioninreduktase TXNRD1 sowie die Chinon-detoxifizierende *NQO1* stellen Ziele von NRF2 dar und wurden in ihrer Transkriptionsrate moduliert (BELINSKY UND JAISWAL, 1993; LEE *et al.*, 2013). Die Ergebnisse lassen demnach die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NRF2 durch Arsenit vermuten, welcher über den KEAP1-NRF2-Signalweg als wichtiges Schutzsystem der Zelle gegenüber oxidativem Stress agiert. Ein weiteres durch Arsenit induziertes Sensorgen stellt *HSPA1A* dar. Dieses codiert für ein Hitzeschockprotein und dient dem Wiederaufbau geschädigter Proteine sowie dem Schutz vor Denaturierung (DAUGAARD *et al.*, 2007). Lediglich die redoxsensitiven Gene *NFKB1* sowie *NFKBIA* zeigten eine verminderte Expression. Während *NFKB1* für eine Untereinheit des Proliferations-assoziierten Transkriptionsfaktors NF- κ B codiert, bildet *NFKBIA* dessen Regulationsprotein $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (VALLABHAPURAPU UND KARIN, 2009). Eine Repression kann somit auf einen Zelltod hindeuten. Zusammenfassend lassen die transkriptionellen Veränderung dieser antioxidativen Prozesse auf ein erhöhtes oxidatives Stresslevel durch NaAsO_2 schließen.

Auch Gene, die mit der Proliferation und der Zellzyklusregulation in Verbindung stehen, wurden in ihrer Expression durch Arsenit moduliert. Die stärkste Induktion erfuhr dabei *CDKN1A1*, das für den CDK-Inhibitor p21 codiert (DUTTO *et al.*, 2015). Demgegenüber wurde das Proliferations-assoziierte Gen *E2F1* in seiner Transkriptionsrate reprimiert. Dieses Gen codiert für den gleichnamigen Transkriptionsfaktor, welcher die Expression von Zellzyklus-assoziierten Genen reguliert (SHELDON, 2017). Die veränderte Transkriptionsrate beider genannter Gene deutet hierbei auf eine Aktivierung der DNA-Schadensantwort durch die Einleitung eines Zellzyklusarrestes hin.

Basierend auf den Genexpressionsanalysen wurde im Anschluss die Zellzyklusregulation auf funktioneller Ebene mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die basale Phasenverteilung der UWB1.289-Zellen zeigte hierbei die höchste Population in der G₂/M-Phase (~ 50 %), wohingegen der größte zelluläre Anteil in den UWB1.289 + BRCA1-Zellen in der G₁-Phase (~ 50 %) vorlag. Die Diskrepanz in der Zellzyklusphasenverteilung kann dabei auf die Überexpression von BRCA1 in den UWB1.289 + BRCA1-Zellen zurückgeführt werden. So wurde bereits postuliert, dass BRCA1 durch unterschiedliche Mechanismen die Phosphorylierung von RB unterdrückt und somit die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F verhindert. Folglich wurde die Transkription von *Downstream*-Genen der S-Phase gehemmt, was wiederum in einem G₁-Arrest resultierte (DENG, 2006). Die potentiellen Mechanismen sind dabei in Abbildung 51 zusammengefasst.

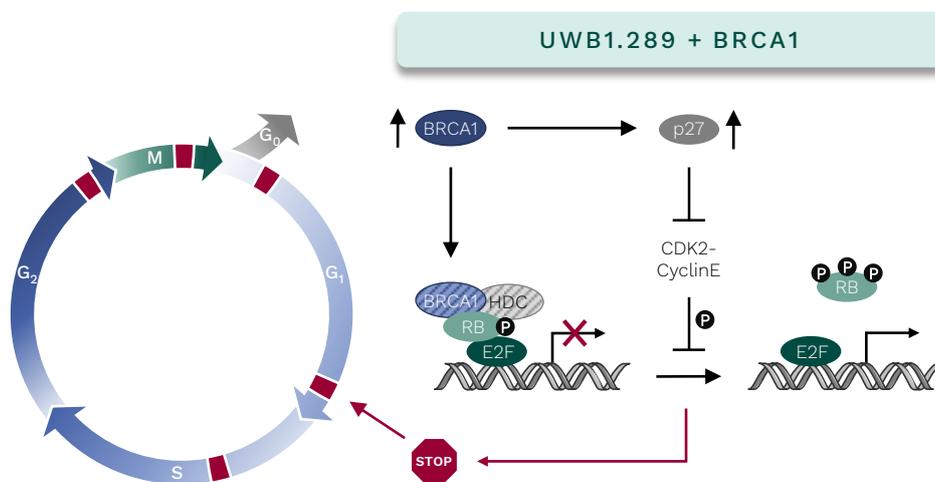


Abbildung 51: BRCA1-vermittelte Regulation des G₁/S-Checkpoints.

Eine Überexpression an BRCA1 kann über verschiedene Wege die Induktion eines G₁-Arrestes verursachen. Dabei kann das Protein entweder durch eine direkte Bindung an hypophosphoryliertes RB (Retinoblastom Protein) oder durch die Beeinträchtigung der CDK2-Aktivität, über eine verstärkte Expression des CDK-Inhibitors p27, die Phosphorylierung von RB hemmen. In Folge dessen kann der Transkriptionsfaktor E2F nicht abgelöst werden, wodurch die Expression von Genen der S-Phase zum Erliegen kommt. Zudem scheint der Komplex aus BRCA1 und RB die Rekrutierung von HDCs (Histondeacetylasen) zu verursachen, was ebenfalls eine Hemmung der Transkription begünstigt (modifiziert nach DENG, 2006).

Die konzentrationsabhängigen und zeitabhängigen Analysen zeigten keinerlei Regulation der Zellzyklusprogression in den UWB1.289-Zellen. So wurde nach allen drei Behandlungsarten Zellzyklusphasenverteilungen ähnlich der physiologischen Niveaus beobachtet. Demgegenüber

zeichnete sich nach alleiniger Arsenit- sowie nach Co-Exposition in den UWB1.289 + BRCA1-Zellen ein deutlicher G₂/M-Arrest ab, welcher sich ab der leicht zytotoxischen Konzentration von 5 µM manifestierte. Die beiden Metalloid-abhängigen Behandlungen resultierten dabei in einer vergleichbaren Phasenverteilung. Zudem führte die alleinige Bestrahlung mit 1 Gy in den BRCA1-profizienten Zellen zu keinerlei Veränderung. Folglich konnten die beschriebenen Effekte, analog zu den vorherigen Analysen, alleinig der Arsenitbehandlung zugesprochen werden.

Die fehlende Funktionsfähigkeit der verschiedenen *Checkpoints* in den UWB1.289-Zellen scheint jedoch nicht alleine auf die BRCA1-Defizienz, sondern zusätzlich auf die in den Zelllinien vorhandene *Loss-of-Function*-Mutation im *p53*-Gen zurückzuführen zu sein (Ho *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2001b). Möglicherweise verursacht die Doppel-Defizienz die fehlende Zellzykluskontrolle der UWB1.289-Zellen, die unabhängig von der Schadensart zu sein scheint (Abbildung 52 links).

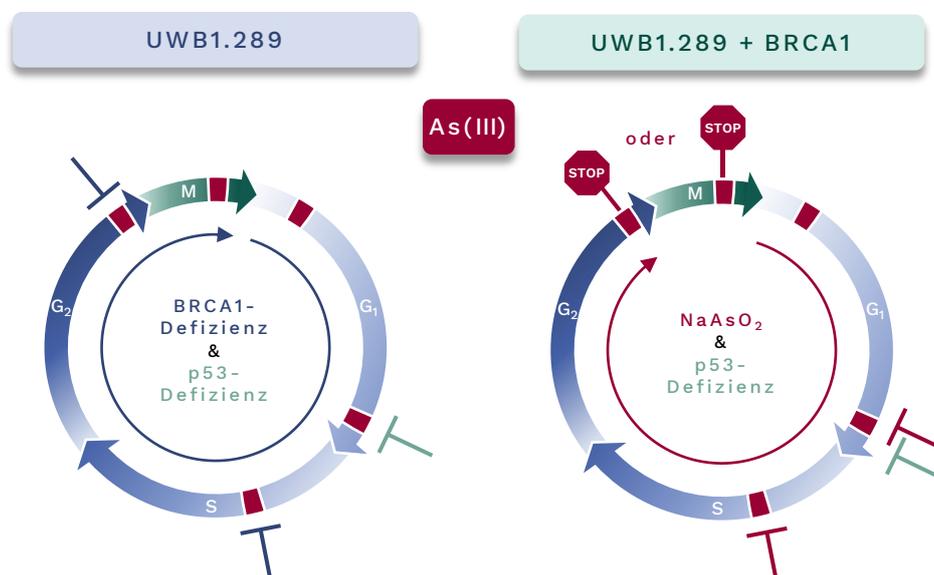


Abbildung 52: Vergleichende Zellzyklusprogression der UWB1.289- sowie UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach Arsenit-Behandlung.

Die fehlende Zellzykluskontrolle der UWB1.289-Zellen (links) nach Arsenit-Schädigung kann vermutlich auf die Doppel-Defizienz der Zelllinie zurückgeführt werden. So scheint die *p53*-Mutation für den ausbleibenden G₁-Arrest verantwortlich, während die fehlende Induktion des Intra-S- sowie G₂-Arrestes eher durch die BRCA1-Defizienz verursacht wird. Demgegenüber scheint der beobachtete G₂/M-Arrest in den UWB1.289 + BRCA1-Zellen neben der *p53*-Defizienz auch durch eine Arsen-vermittelte Beeinträchtigung der *Checkpoints* zu resultieren.

Sowohl die durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchungen der UWB1.289 + BRCA1-Zellen wie auch verschiedene Literaturvergleiche ließen keine eindeutige Aussage über die arretierte Zellpopulation nach Arsenit-Behandlung zu. Daher kann nur vermutet werden, dass Arsenit die Funktion der *Checkpoints* stört und so einer geschädigten Zelle die Progression im Zellzyklus bis hin zur Mitose gewährt (Abbildung 52 rechts). Eine erhöhte mitotische Population geht dabei häufig mit einer vermehrten Induktion der Apoptose einher (Yin *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2009). Demgegenüber kann jedoch auch eine Arsenit-vermittelte Induktion der Seneszenz postuliert werden, wobei die Signalisierung möglicherweise über einen p38 MAPK-abhängigen

2009). Zusammengenommen könnten eine durch Arsenit ausgelöste kondensierte Chromatinstruktur sowie ein verändertes DNA-Methylierungsmuster das komplexe epigenetische Netzwerk der DNA-Reparaturmaschinerie stören, was die Stabilität des Genoms beeinträchtigt. Ein weiterer möglicher Mechanismus zur Arsenit-vermittelten Repression der DDR-assoziierten Gene könnte mit der Einleitung der Seneszenz begründet sein. So lassen der Metalloid-vermittelte, persistierende G₂/M-Arrest der UWB1.289 + BRCA1-Zellen sowie verschiedene Literaturvergleiche auf eine zelluläre Seneszenz schließen (COLLIN *et al.*, 2018; SHMULEVICH UND KRIZHANOVSKY, 2021; CHUNG *et al.*, 2020). Dabei könnten die durch die Arsenit-Behandlung generierten ROS, auf deren Anwesenheit die Erkenntnisse aus den Genexpressionsanalysen schließen lassen, die Seneszenz über einen p38 MAPK-abhängigen p16/RB-Signalweg auslösen. Auch die beobachtete Repression des *E2F1*-Gens, welche aus einer Arsen-vermittelten Heterodimerbildung von E2F1 und RB am *E2F1*-Promotor resultieren könnte (SHELDON, 2017), bekräftigten die Vermutung diesen Signalweges (Abbildung 54).

Um die mögliche Beeinträchtigung sowie den teilweisen Funktionsverlust der DNA-Reparatur auch auf funktioneller Ebene nachvollziehen zu können, wurden nachfolgend die Assoziation sowie Dissoziation spezifischer DNA-Reparaturproteine an IR-induzierte Schäden mittels IF-Färbung analysiert. Ein gesonderter Fokus lag dabei auf Proteinen der DSBR, wobei neben der Schadenserkennung (53BP1) auch die beiden Hauptreparaturmechanismen HR (BRCA1, Rad51, Rad54) sowie NHEJ (DNA-PK_{cs}) differenziell betrachtet wurden. Hierbei gilt zu erwähnen, dass die alleinige Arsenit-Behandlung bei keinem der genannten Reparaturproteine eine Rekrutierung auslöste. Folglich scheint das Halbmetall selbst keine DSB zu generieren, was die Vermutung nahelegt, dass die durch die Genexpressionsanalysen postulierte DNA-Schädigung eher auf indirekt schädigende Mechanismen des Arsenits zurückzuführen sind. Die initiale Reparatur dieser Schäden wurde mit Hilfe des Proteins 53BP1 verfolgt. Dabei konnte in beiden Zelllinien eine Anlagerung des Proteins nach isolierter IR- sowie nach Kombinationsbehandlung beobachtet werden. Die Co-Exposition führte jedoch in beiden Zelllinien zu einer erhöhten Anzahl an 53BP1-Foci im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung. Dennoch konnte in allen behandelten Proben eine Abnahme der Foci über die gesamte Zeitreihe hinweg beobachtet werden. Die Präsenz von BRCA1 zeigte dabei eine positive Wirkung auf den Rückgang der durch die Co-Exposition induzierten Foci, was eine positive Rolle von BRCA1 in der Reparatur dieser Schäden impliziert. Unter dem Aspekt, dass das NHEJ einen schnellen und die HR einen vergleichsweise langsamen Reparaturmechanismus darstellen (BEUCHER *et al.*, 2009), könnten die Ergebnisse erste Hinweise auf eine beeinträchtigte HR in den BRCA1-defizienten Zellen geben. Zusammenfassend scheint sich weder eine BRCA1-Defizienz noch eine Arsenit-Behandlung nachteilig auf die Erkennung von IR-induzierten DSB auszuwirken.

Für die spezifische Untersuchung des Reparaturmechanismus der HR wurden die charakteristischen Proteine BRCA1, Rad51 sowie Rad54 genauer betrachtet. Dabei konnte

keinerlei IF-Färbung und somit keine Rekrutierung dieser Reparaturproteine an die IR-induzierten DSB in den BRCA1-defizienten Zellen beobachtet werden. Die fehlende Bindung von BRCA1 konnte hierbei auf die in den UWB1.289-Zellen vorhandene *BRCA1*-Mutation zurückgeführt werden, welche zu einem stark verkürzten BRCA1-Protein führt. So wurde bereits gezeigt, dass das Zusammenspiel der im Protein enthaltenen N-terminalen RING-Domäne mit der C-terminalen BRCT-Domäne für die Rekrutierung an nukleäre Foci benötigt wird (AU UND HENDERSON, 2005). Die nachfolgend ausbleibende Assoziation von Rad51 lässt sich dabei durch die fehlende Rad51-Bindungsstelle des verkürzten BRCA1-Proteins erklären. Demnach scheint die fehlende Co-Lokalisation auch die Rekrutierung des Rad54-Proteins zu verhindern. Die ausbleibende Anlagerung der DNA-Reparaturproteine in BRCA1-defizienten Zellen resultierte somit vermutlich in einer Beeinträchtigung des nahezu fehlerfreien Reparaturmechanismus der HR. Demgegenüber zeigten die BRCA1-profizienten Zellen eine deutliche Rekrutierung der drei DNA-Reparaturproteine. Zusätzlich konnte für alle Proteine eine Abnahme der Foci-Anzahl mit zunehmender Zeit identifiziert werden, was eine fortschreitende Reparatur IR-induzierter Schäden postulieren lässt. Die stabile Transfektion von BRCA1 in den UWB1.289 + BRCA1-Zellen führte demnach vermutlich zu einer erfolgreichen Wiederherstellung der Reparaturkapazität.

Auch nach zusätzlicher Metallbehandlung konnte eine Rekrutierung des BRCA1-, Rad51- sowie Rad54-Proteins festgestellt werden, wobei hier ebenfalls der synergistische Effekt von Arsenit auf IR-induzierte Schäden auftrat. Konträr zur alleinigen Bestrahlung verhinderte die zusätzliche Arsenit-Inkubation jedoch die Dissoziation der Proteine, was sich in einer Persistenz der DSB manifestierte. Ein möglicher Mechanismus dieser beeinflussten Dissoziationsfähigkeit könnte dabei eine direkte Beeinträchtigung der Reparaturproteine aufgrund ihrer Thiol-reichen AS-Zusammensetzung sein. Während BRCA1 und Rad54 Zink-Bindungsstellen und somit potentielle Angriffspunkte für dreiwertiges Arsen aufweisen, stellt auch Rad51 durch kritische Thiolgruppen ein Target dar (BRZOVIC *et al.*, 2001; MAZIN *et al.*, 2010; MODESTI *et al.*, 2007). Um zu überprüfen, ob die bereits publizierte Funktionseinschränkung von Zinkfingern durch die Bindung von Arsenit oder die ROS-vermittelte Oxidation der Thiolgruppen auch auf das kritische Ringfingerprotein der HR BRCA1 zutrifft, wurden im späteren Verlauf dieser Arbeit subzelluläre Konformations- sowie Bindungsanalysen verschiedener BRCA1-Fragmente nach Metallbehandlung durchgeführt.

Im Gegensatz zum Signalweg der HR scheint der Mechanismus des NHEJ in den BRCA1-defizienten Zellen funktionsfähig. Die Rekrutierung der DNA-PK_{cs} sowie die fortschreitende Abnahme der Foci ließen eine Reparatur IR-induzierter Schäden postulieren. Dasselbe Bild zeigte sich auch für die BRCA1-profizienten Zellen. Die vergleichende Darstellung beider Zelllinien verdeutlichte jedoch eine signifikant erhöhte Foci-Anzahl in den BRCA1-defizienten im Vergleich zu den BRCA1-profizienten Zellen. Folglich scheint eine BRCA1-Defizienz den Reparaturmechanismus des NHEJ nicht zu beeinflussen. Ferner konnte die Vermutung aufgestellt werden, dass das NHEJ durch den gestörten HR-Mechanismus in den UWB1.289-

Zellen bevorzugt abläuft. Eine Verlagerung der fehlerfreien HR zum fehlerbehafteten NHEJ nach IR-induzierter Schädigung konnte hierbei erstmalig in BRCA1-defizienten Zellen auf Ebene der spezifischen DNA-Reparaturproteine gezeigt werden (Abbildung 55).

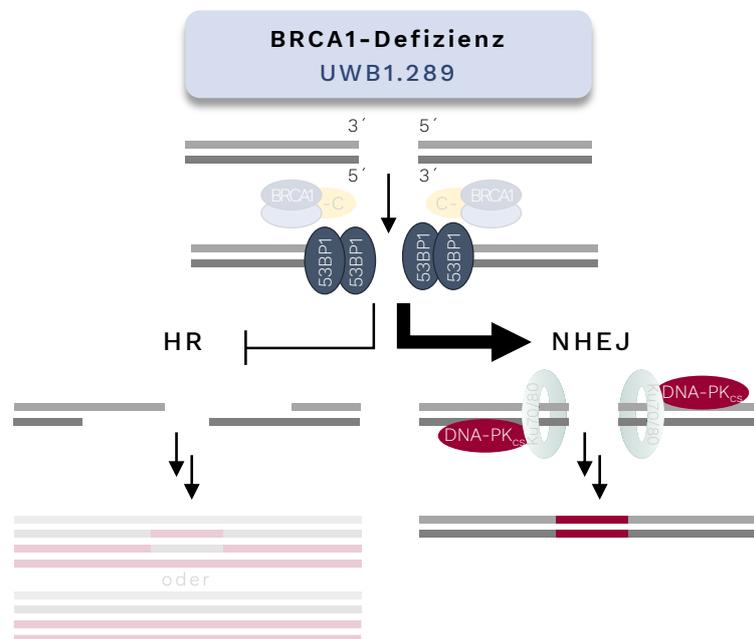


Abbildung 55: Vergleich der Doppelstrangbruchreparaturmechanismen im Falle einer BRCA1-Defizienz.

Die Erkennung von Doppelstrangbrüchen (DSB) mittels des DNA-Reparaturproteins 53BP1 scheint durch eine BRCA1-Defizienz unbeeinflusst. Demgegenüber führte die Mutation im *BRCA1*-Gen der UWB1.289-Zellen zu einer fehlenden Anlagerung der HR (Homologen Rekombination) -assoziierten Proteine BRCA1, Rad51 sowie Rad54 an IR-induzierte Schäden und somit zu einer Beeinträchtigung des nahezu fehlerfreien Reparaturmechanismus. Die Zelle scheint auf die inhibierte HR zu reagieren und die Reparatur verstärkt über den Mechanismus des NHEJ (Nicht-Homologes *End-Joining*) durchzuführen.

Auch nach zusätzlicher Behandlung mit NaAsO₂ konnte eine Rekrutierung der DNA-PK_{cs} an IR-induzierte Schäden sowie eine stetige Abnahme der Foci in beiden Zelllinien beobachtet werden. Während die UWB1.289-Zellen keine synergistische Wirkung zum frühen Zeitpunkt aufwiesen, zeigten die UWB1.289 + BRCA1-Zellen erneut den verstärkenden Effekt von Arsenit auf IR-generierte Schäden. Möglich ist jedoch auch, dass die erhöhte Foci-Anzahl auf eine Verschiebung der zuvor beschriebenen beeinträchtigten HR zum NHEJ zurückzuführen ist. Aufgrund des hier dargestellten Erkenntnisgewinns, kann eine Arsenit-vermittelte Verlagerung des nahezu fehlerfreien HR zum fehlerbehaftete NHEJ nach IR-induzierter Schädigung postuliert werden (Abbildung 56).

Zusammenfassend lässt sich durch die vorausgegangenen Expressionsanalysen DDR-assoziiierter Gene die Hypothese aufstellen, dass die transkriptionelle Regulation der DNA-Reparaturmaschinerie nach Arsenit-Behandlung weitestgehend unabhängig vom BRCA1-Status verläuft. Demgegenüber verdeutlichen die funktionellen Analysen eine BRCA1-Abhängigkeit im Hinblick auf die Assoziation sowie Dissoziation verschiedener DNA-Reparaturproteine nach

DNA-Schädigung. Die oben aufgeführten Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass sowohl eine BRCA1-Defizienz wie auch eine Inkubation bereits mit nicht-zytotoxischen Arsenit-Konzentrationen die Reparatur IR-induzierter DSB mittels HR auf unterschiedliche Wege beeinträchtigen und gleichzeitig den Mechanismus des NHEJ fördern.

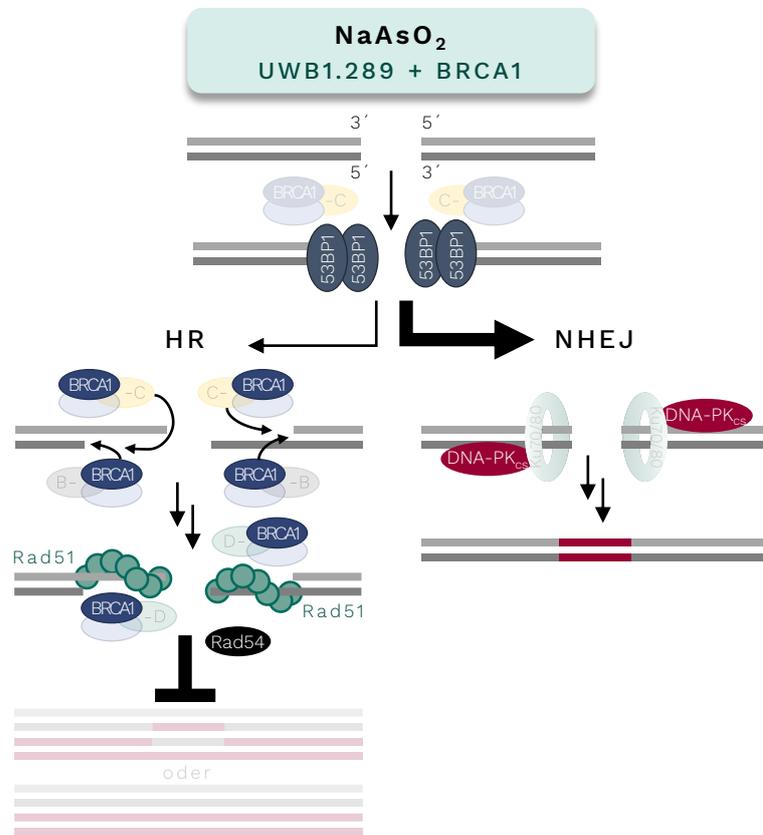


Abbildung 56: Vergleich der Doppelstrangbruchreparaturmechanismen unter NaAsO₂-Einfluss.

Die Erkennung von Doppelstrangbrüchen (DSB) mittels des DNA-Reparaturproteins 53BP1 scheint durch eine Arsenit-Behandlung unbeeinflusst. Auch die Assoziation der HR (Homologen Rekombination) -assoziierten Proteine BRCA1, Rad51 sowie Rad54 war unter Arsenit-Einfluss möglich, das Halbmetall scheint jedoch eine Persistenz dieser Proteine auszulösen. Folglich vermag Arsenit den Reparaturmechanismus der nahezu fehlerfreien HR durch eine fehlende Dissoziation und somit eine unvollständige Reparatur negativ zu beeinflussen. Demgegenüber zeigte sich keine Beeinträchtigung des fehlerbehafteten NHEJ (Nicht-Homologes *End-Joining*). Vielmehr ließ sich eine Verlagerung durch die blockierte HR vermuten. Die untersuchten Proteine sind dabei farbig dargestellt, während weitere Reparaturproteine der beiden Mechanismen transparent abgebildet sind.

Um nachfolgend zu überprüfen, welche Auswirkungen die beeinträchtigte HR sowie das verstärkte Ablaufen des fehlerbehafteten NHEJ zeigten, wurden weitere Untersuchungen zu den Mechanismen des Zelltods angeschlossen. Dabei wurden, analog zu den vorherigen Analysen, zunächst die Auffälligkeiten der Transkriptionsebene betrachtet. So konnte eine verminderte Transkriptionsrate des anti-apoptotischen Gens *BCL2L1* sowie eine verstärkte Expression der pro-apoptotischen Gene *PMAIP1* und *TNFRSF10B* nach Arsenit-Behandlung beobachtet werden (CORY UND ADAMS, 2002; WAJANT, 2019). Zusammengefasst implizieren die Ergebnisse eine

Apoptose-fördernde Wirkung von NaAsO_2 , wobei sowohl der intrinsische wie auch der extrinsische Signalweg auf Transkriptionsebene beeinflusst scheinen.

Ergänzend zu den Genexpressionsanalysen wurden im Anschluss die Zelltodmechanismen auf funktioneller Ebene mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Betrachtung des Basallevels zeigte für die beiden Zelllinien eine vergleichende Vitalität. Die isolierte Bestrahlung verursachte, im Einklang mit den vorherigen Analysen, keine nachteiligen Effekte auf die Lebensfähigkeit der Zellen. Die vergleichbare Vitalität der Zelllinien, unter basalen Bedingungen sowie nach IR-Schädigung, kann durch die Doppel-Defizienz der UWB1.289-Zellen erklärt werden. Weiterhin wird postuliert, dass die Einleitung der Apoptose von der Art der Behandlung und dem damit einhergehenden Schadenscharakter abhängig ist (BUNTING *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2001B).

So verursachte die Metallbehandlung in beiden Zelllinien eine dosisabhängige Steigerung der apoptotischen sowie nekrotischen und spät-apoptotischen Population. BRCA1 scheint sich hierbei sensibilisierend auf den Arsenit-induzierten Zelltod auszuwirken, was durch eine verminderte Viabilität der BRCA1-profizienten im Vergleich zu den BRCA1-defizienten Zellen deutlich wurde. Eine zusätzliche Bestrahlung führte, im Einklang zu den vorherigen Untersuchungen, zu keinerlei Effektverstärkung. Die Ergebnisse implizieren demnach eine funktionelle und differentielle Rolle von BRCA1 in den Mechanismen des Zelltods. In der vorliegenden Arbeit konnte folglich erstmalig die direkte Beteiligung von BRCA1 an der Induktion der Apoptose nach Schädigung durch eine Arsenit-Exposition nachgewiesen werden.

Die Interpretation der Genexpressionsanalysen zusammen mit dem Vergleich der Literaturdaten lassen demnach vermuten, dass Arsenit über den in den Zellzyklusuntersuchungen postulierten mitotischen Arrest den Mechanismus der Apoptose einleitet. So könnten sowohl die durch Arsenit generierten ROS als auch das Metalloid selbst den intrinsischen Apoptoseweg induzieren (Ho *et al.*, 2009; YIH *et al.*, 2005). Ersterer der beiden Mechanismen ließ sich in der vorliegenden Arbeit bereits durch die Induktion ROS-sensitiver Sensorgene nachvollziehen. So ist bekannt, dass das durch *PMAIP1* codierte Genprodukt NOXA an Proteine der Bcl2-Familie, wie beispielsweise das Translationsprodukt von *BCL2L1*, bindet und so dessen Aktivität inhibiert. Zudem wurde bereits eine Assoziation von NOXA an die Effektoren Bak und Bax beschrieben, welche nach Aktivierung oligomerisieren und durch Porenbildung die Permeabilität der mitochondrialen Außenmembran erhöhen. Dies wiederum resultiert in einer erhöhten Freisetzung von Cytochrom c und dient als Ausgangspunkt der Caspase-Kaskade (MORSI *et al.*, 2018). Die gesteigerte Expression von NOXA wiederum könnte über den JNK₁-Signalweg gefördert werden (PIETKIEWICZ *et al.*, 2013). Die Aktivierung dieses Signalwegs könnte dabei durch eine Inhibierung von NF- κ B und nachfolgend einer erhöhten GADD45 α -Expression ausgelöst werden (ZERBINI *et al.*, 2004), was durch die vorliegenden Genexpressionsdaten unterstützt wird. Neben dem intrinsischen Weg scheint auch die extrinsische Signalkaskade durch As(III) aktiviert.

Dabei kann die Induktion über die Hochregulation des Todesrezeptors DR5 (KIM *et al.*, 2008), durch die verstärkte Expression von *TNFRSF10B*, postuliert werden (Abbildung 57). Weiterhin ist neben der Apoptose auch die Nekrose als Teil des Arsenit-induzierten Zelltods möglich.

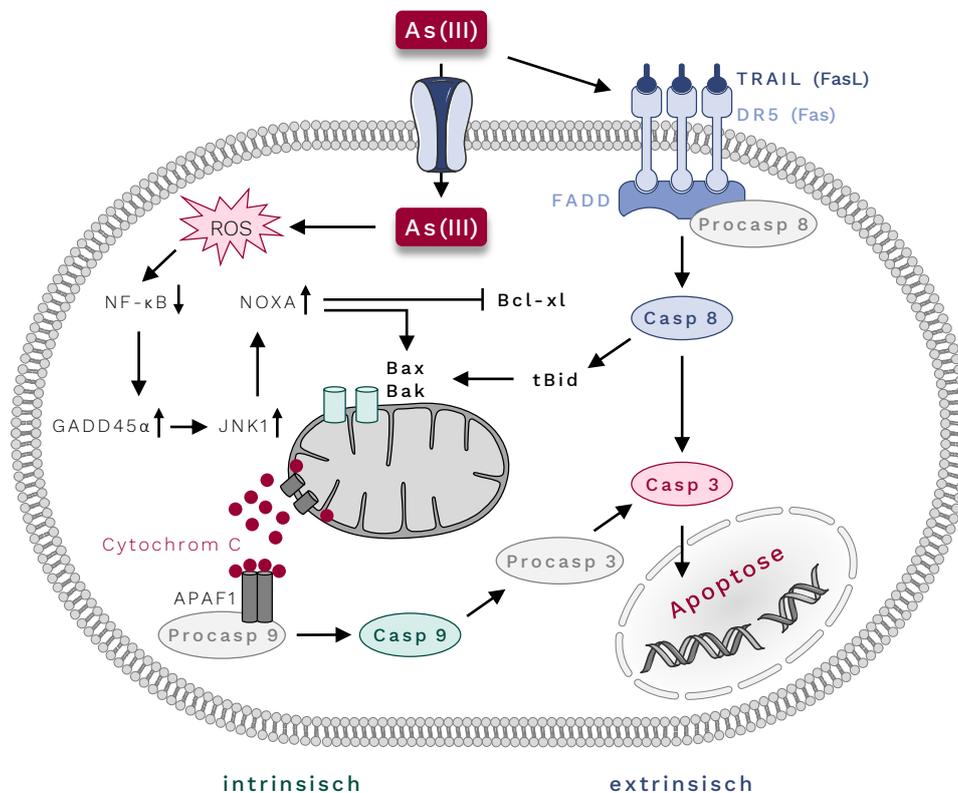


Abbildung 57: Postulierter Mechanismus der Arsenit-vermittelten Apoptose.

Der dargestellte Mechanismus des Zelltodes begründet sich auf den im Rahmen dieser Arbeit erfassten Genexpressionsanalysen sowie auf vorausgegangenen Publikationen bezüglich apoptotischer Signalwege. Arsenit vermag über den intrinsischen sowie den extrinsischen Weg die Apoptose einzuleiten. Der intrinsische Signalweg scheint dabei über die durch das Metalloid generierten ROS (*HMOX1*, *HSPA1A*) vermittelt. ROS führen zu einer Repression von NF-κB (*NFKB1*), was wiederum eine erhöhte GADD45α (*GADD45A*)-Expression zur Folge hat. GADD45α stellt einen wichtigen Aktivator des JNK_i-Signalwegs dar, dessen Induktion in einer NOXA (*PMAIP1*)-vermittelten Apoptose mündet, wobei Bcl-xl (*BCL2L1*)-Proteine inhibiert werden und die Rekrutierung der Effektoren Bax und Bak erfolgt. Durch Porenbildung erhöht sich die Permeabilität der mitochondrialen Außenmembran, was in einer Freisetzung von Cytochrom c resultiert, wodurch die Caspase-Kaskade eingeleitet wird. Weiterhin scheint Arsenit die Hochregulation des Todesrezeptors DR5 (*TNFRSF10B*) zu verursachen, wodurch der extrinsische Weg eingeleitet wird (modifiziert nach EMADI UND GORE, 2010; RUDNER, 2013).

Um den beschriebenen möglichen Einfluss von Arsenit auf die Ringfingerstruktur im BRCA1-Protein genauer zu untersuchen, wurde zunächst ein Konstrukt dieses N-terminalen Bereiches mittels bakterieller Proteinexpression rekombinant hergestellt. Dabei sollte das Peptid nicht nur die RING-Domäne selbst (AS 22 - 77), sondern die Proteolyse-resistente und stabile Strukturdomäne der ersten 110 AS von BRCA1 umfassen (BRZOVIC *et al.*, 1998; MEZA *et al.*, 1999). Dazu wurde ein Plasmidvektor mit der passenden cDNA-Sequenz von BRCA1 (AS 1 - 304) kommerziell erworben und mittels Mutagenese verkürzt. Der rekombinanten Proteinexpression folgte eine

Aufreinigung mittels Nickelaffinitätschromatographie, wobei sowohl ein Monomer als auch ein Dimer des Peptides in den gewonnenen Elutionsfraktionen identifiziert werden konnte.

Aufschlussreiche Informationen zur Sekundärstruktur des aufgereinigten Peptides wurden mittels SRCD-spektroskopischen Analysen erhalten. Das aufgenommene Spektrum zeigte dabei charakteristische Kurvenverläufe für ein helikales Peptid mit einem gewissen unstrukturierten Anteil. Hierbei konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem Konstrukt nicht um das Apo-peptid, sondern um das mit Zink besetzte rekombinante Peptid handelte. Die quantitative Auswertung der prozentualen Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturlemente erfolgte mittels DICHROWEB-Server und bestätigte zusammen mit Literaturdaten diese Vermutung. So konnte mit ~ 25 % eine hohe Übereinstimmung des helikalen Anteils mit den von BRZOVIC *et al.* publizierten Daten festgestellt werden, wobei die Arbeitsgruppe ebenfalls ein mit Zink-besetztes Konstrukt des BRCA1-Proteins untersuchte. Demgegenüber zeigte sich eine hohe Diskrepanz im Anteil der β -Faltblattstrukturen (BRZOVIC *et al.*, 2001), was jedoch durch die allgemein sehr geringere Intensität des CD-Signals sowie die enorme morphologische und spektrale Vielfalt dieser Strukturen zu erklären ist (CORRÊA UND RAMOS, 2009; MICSONAI *et al.*, 2015).

Um die zuvor beschriebene Arsenit-vermittelte Beeinträchtigung von BRCA1 nun mit einer möglichen Konformationsänderung in Verbindung zu bringen, wurde das rekombinante Peptid für nachfolgende SRCD-Analysen herangezogen. Die NaAsO₂-Behandlung führte dabei jedoch zu keinerlei Strukturveränderung, wobei das Metalloid bis hin zu 10 molaren Äquivalenten getestet wurde. Die Ergebnisse legen somit die Vermutung nahe, dass As(III) in den untersuchten Konzentrationen nicht in der Lage ist, Zn(II) aus seiner bevorzugten Koordinationsumgebung im BRCA1-Ringfinger herauszulösen und so eine Strukturveränderung zu verursachen.

Ergänzende Experimente wurden mit einem kürzeren BRCA1-Fragment durchgeführt, wodurch gleichzeitig die Sensitivität der Methode überprüft werden konnte. Hierbei wurde ein kommerziell erworbenes, synthetisches Konstrukt eingesetzt, das lediglich die isolierte RING-Domäne (AS 22 - 77) umfasste. Im Gegensatz zum rekombinanten Peptid handelte es sich bei diesem Konstrukt um das Apo-peptid, weshalb alle Analysen unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt wurden. Die im Nachfolgenden angegebenen molaren Äquivalente besitzen einen gewissen Unsicherheitsfaktor und dienen lediglich als Richtwert. Zunächst galt herauszufinden, wie sich der natürliche Cofaktor auf die Konformation des unbesetzten Peptides auswirkt. Die Titration mit Zn(II) zeigte dabei eine deutliche Konformationsänderung, welche sich als charakteristisch für eine Zunahme der Helizität auszeichnete. Die aus den MRE-Werten abgeleitete Sättigungskurve deutete zunächst auf eine starke Bindung des Halbmetalls an den Liganden hin, welche bei steigender Konzentration schwächer wurde. Das Sättigungsplateau und somit die vollständige Faltung konnte bereits ab etwa 1 me identifiziert werden. Im Einklang mit den SRCD-Spektren zeigte auch die quantitative Auswertung der Sekundärstrukturlemente

mittels DICHROWEB-Server eine deutliche Änderung der Konformation an. So konnte nach Zugabe von ZnCl_2 eine Abnahme der ungeordneten Anteile sowie eine Zunahme der helikalen Teile, der β -Faltblattstrukturen und der β -Schleifen verzeichnet werden. Verglichen mit bereits publizierten Literaturdaten zeigte sich mit 14 % α -Helix und 16 % β -Faltblatt eine hohe Übereinstimmung zu den in dieser Arbeit generierten Ergebnissen (BRZOVIC *et al.*, 2001). Folglich konnte eine Bindung des natürlichen Cofaktors Zn(II) an die unbesetzte RING-Domäne von BRCA1 postuliert werden, welche in einer Konformationsänderung resultierte, bei der das Peptid von einer zunächst unstrukturierten Faltung in einen Zustand höherer Ordnung überging.

Um nun weiterhin zu überprüfen, ob auch die toxische Metallverbindung NaAsO_2 in der Lage ist, an den Ringfinger von BRCA1 zu binden und eine Konformationsänderungen hervorzurufen, wurde zusätzlich eine stufenweise Absättigung mit dieser Metallverbindung durchgeführt. Hierfür wurde neben der SRCD-Spektroskopie auch die UV/Vis-Spektroskopie eingesetzt, welche durch eine spezifische LMCT-Bande der $\text{S}^- \rightarrow \text{As}$ -Bindung (250 – 320 nm) die Metall-Liganden-Interaktion anzeigt. Während die UV/Vis-Spektren durch eine Zunahme der Absorption eine Bindung von As(III) an die Thiolgruppen der Cysteine verdeutlichten, konnte durch die Ergebnisse der SRCD-Spektroskopie eine Strukturveränderung nachgewiesen werden. Sowohl die aus den MRE-Daten generierte als auch die aus den A_{250} -Werten erstellte Titrationskurve suggerieren hierbei eine sequentielle, kooperative Bindung, die in einem Sättigungsplateau mündete. Folglich scheint sich das anfangs gebundene As(III) vorteilhaft auf die weitere Bindungskinetik auszuüben. Weiterhin implizieren die vergleichende Betrachtung der SRCD-Spektren sowie die durchgeführte quantitative Auswertung der prozentualen Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturlemente eine divergente Konformation des As(III)-gebundenen Peptides im Vergleich zum Zn(II)-assoziierten Fragment. So führte die NaAsO_2 -Behandlung zwar ebenfalls zu einer Abnahme des ungeordneten Anteils und einer Zunahme geordneter Strukturen, die Veränderungen waren jedoch weniger stark ausgeprägt im Vergleich zur ZnCl_2 -Behandlung. Folglich konnte auch für das toxische As(III) eine Bindung an die unbesetzte RING-Domäne von BRCA1 postuliert werden, welche in einer Konformationsänderung resultierte, bei der das Peptid in einen Zustand höherer Ordnung überführt wurde.

Der Vergleich der beiden Metalloid-gebundenen Peptide ließ die Schlussfolgerung zu, dass das BRCA1-Peptid Konformationen annimmt, die maßgeblich vom jeweiligen gebundenen Cofaktor beeinflusst werden. Die Diskrepanz der resultierenden Sekundärstrukturen kann dabei durch die Anzahl der Bindungspartner sowie die mögliche Variabilität der Ligandenbindung begründet werden (ZHOU *et al.*, 2014). Während für das toxische As(III) eine sequentielle, koordinative Assoziation an die unbesetzte RING-Domäne von BRCA1 identifiziert wurde, konnte durch verschiedene Literaturvergleiche eine sequentielle, antikooperative Bindung für den natürlichen Cofaktor postuliert werden. Dabei scheint die As(III)-Bindung zu einer Auflockerung der Struktur und somit einer positiven Kooperativität zu führen. Demgegenüber vermag die Assoziation von

Zn(II) an die erste Bindungsstelle vermutlich zu einer komplexierten Form zu führen, wodurch das Peptid möglicherweise eine starre Struktur einnimmt (Abbildung 58) (ROEHM UND BERG, 1997; ARNIM UND DENG, 1993). Weiterhin wird vermutet, dass die Cys4-Bindungsstelle im Ringfinger einen wichtigen Regulator für die zweite Stelle sowie die gesamte Zn(II)-abhängige Faltung darstellt (CHASAPIS *et al.*, 2010). Diese Erkenntnis bekräftigt die zuvor aufgestellte Theorie, dass bereits die Besetzung von nur einer Bindungsstelle mit Zn(II) die finale Konformation reguliert.

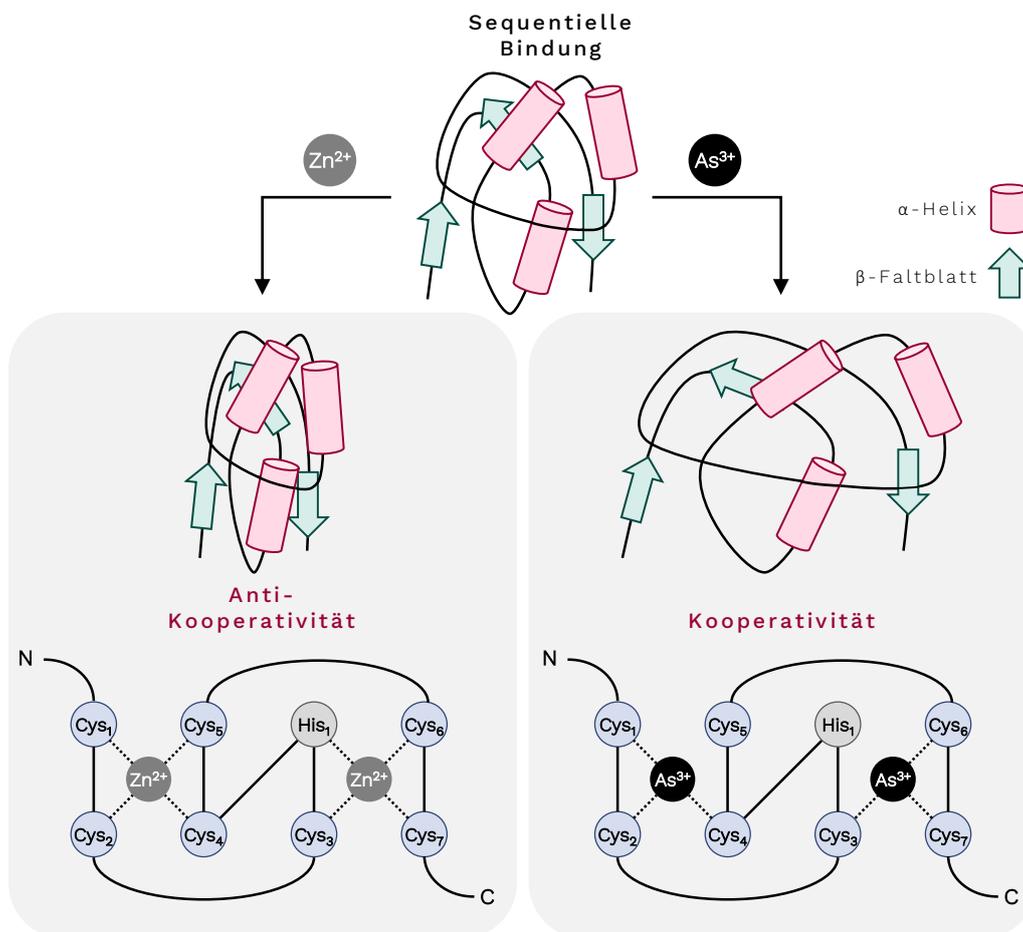


Abbildung 58: Schematische Darstellung der postulierten sequentiellen Bindung von Zn²⁺ und As³⁺ an den unbesetzten Ringfinger von BRCA1 (AS 22 – 77).

Sowohl Zn²⁺ als auch As³⁺ binden jeweils über eine sequentielle Bindung an die beiden Bindungsstellen der RING-Domäne des BRCA1-Proteins. Dabei geht die Interaktion mit einer Konformationsänderung einher, die das Apopeptid durch Komplexbildung mit dem ionischen Partner in eine Form höherer Ordnung überführt. So scheint Zn²⁺ zunächst an die erste Bindungsstelle zu assoziieren, wodurch das Peptid möglicherweise starrer strukturiert vorliegt und so die Besetzung der zweiten Stelle erschwert. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass bereits die Besetzung von nur einer Stelle die vollständige Faltung reguliert. Demgegenüber scheint sich das anfangs gebundene As³⁺ vorteilhaft auf die weitere Bindungskinetik auszuüben. Dabei wird vermutet, dass die Besetzung der ersten Bindungsstelle zu einer gelockerten Struktur führt, was wiederum die Besetzung der zweiten Stelle begünstigt.

Um die physiologischen Bedingungen eines biologischen Systems, in denen das BRCA1-Protein mit dem natürlichen Cofaktor Zn(II) assoziiert vorliegt, nachzuempfinden, wurden ergänzende SRCD-Analysen mit Mischkonzentrationen von ZnCl₂ und NaAsO₂ durchgeführt. Dabei wurde

das Peptid zunächst mit Zn(II) abgesättigt und anschließend mit äquimolaren Mengen sowie mit einem Überschuss As(III) versetzt, wobei beide Behandlungen zu einer Konformationsänderung führten. Verglichen mit den bereits generierten Spektren wiesen beide Kurvenverläufe jedoch Ähnlichkeiten mit der Konformation des mit Zn(II)-gesättigten Peptides auf. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden zusätzlich UV/Vis-Analysen angeschlossen, bei denen das Peptid ebenfalls zunächst mit Zn(II) abgesättigt und im Anschluss mit As(III) titriert wurde. Die generierten Spektren zeigten dabei keinerlei Veränderung der Absorptionsintensität. Folglich scheint As(III) in den eingesetzten Konzentrationen und unter reduzierenden Bedingungen nicht in der Lage, den natürlichen Cofaktor Zn(II) aus seiner nativen Koordinationsumgebung zu verdrängen. Die bereits beschriebenen Analysen des rekombinanten Peptides bekräftigen diese Hypothese.

Weiterhin wurde untersucht, ob Zn(II) in einer Konkurrenzsituation in der Lage ist, gebundenes As(III) aus dem Ringfinger zu verdrängen und selbst zu binden. Dafür wurde das Peptid zunächst mit As(III) abgesättigt und anschließend mit Zn(II) im Überschuss behandelt. Die dabei generierten Spektren zeigten einen Kurvenverlauf, der dem des abgesättigten Zn(II)-Peptides ähnelte. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen sowie der geringen Änderungen der Sekundärstrukturelemente ist eine eindeutige Aussage über die kompetitiven Eigenschaften der Metallionen erschwert. In weiterführenden UV/Vis-Analysen wurde ein As(III)-gesättigtes Peptid mit Zn(II) rücktitiert. Die kontinuierliche Abnahme der charakteristischen LMCT-Bande der $S \rightarrow As$ -Bindung ließ folglich auf eine Bindung des natürlichen Cofaktors schließen. Somit konnte gezeigt werden, dass Zn(II) dazu befähigt ist, im Ringfinger gebundenes As(III) zu verdrängen, selbst eine Bindung einzugehen und eine Konformationsänderung hervorzurufen.

Demnach konnte in der hier vorliegenden Arbeit zwar die Verdrängung von As(III) durch den natürlichen Cofaktor Zn(II) identifiziert werden, umgekehrt war dies jedoch nicht der Fall. Folglich scheint Zn(II) eine höhere Bindungsaffinität im Vergleich zu As(III) gegenüber der in dieser Arbeit verwendeten BRCA1-Sequenzen aufzuweisen. Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass ein direkter Einfluss von Arsenit auf die biologische Funktion des gesamten, nativen BRCA1-Proteins aus den hier vorliegenden Analysen nicht abgeleitet werden kann.

Denkbar wäre lediglich eine indirekte Substitution des natürlichen Cofaktors durch den Arsenit-induzierten oxidativen Stress in zellulären Systemen, wobei eine direkte Beeinflussung des BRCA1-Ringfingers durch Arsenit in der vorliegenden Arbeit unwahrscheinlich erscheint. So ist bereits bekannt, dass für die Ausbildung des BRCA1/BARD1-Heterodimers ein intakter Ringfinger benötigt wird und dass die Interaktion mit BARD1 die Stabilität von BRCA1 maßgeblich bestimmt. Die beobachteten persistierenden Foci implizieren den fehlenden Abbau bzw. nukleären Export und suggerieren somit eine gewisse Stabilität von BRCA1. Zudem ist die Assoziation der beiden Proteine wichtig, um die NES (*nuclear export signal sequence*) zu verbergen und so die Proteine im Nukleus zu retardieren (CLARK *et al.*, 2012; FABBRO *et al.*, 2002).

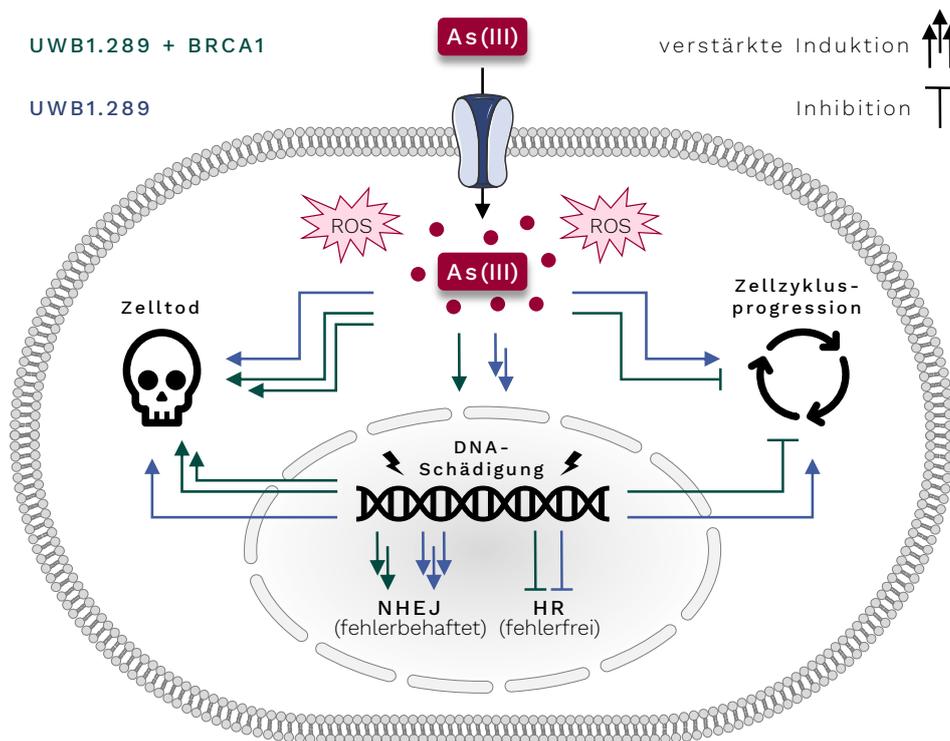


Abbildung 59: Zusammenfassende Darstellung des potentiellen Wirkmechanismus von Arsenit sowie die Beteiligung von BRCA1 an diesen Signalwegen.

Extrazelluläres Arsenit führte zu einer zellulären Akkumulation, wobei sowohl das Halbmetall selbst als auch die durch das Metalloid generierten ROS zu einer Schädigung der DNA führen können. Eine BRCA1-Defizienz verursachte eine erhöhte Anzahl an Doppelstrangbrüchen. Während funktionsfähiges BRCA1 zu einer kontrollierten Zellzyklusregulation beitrug und nach Arsenit-Behandlung einen G₂/M-Arrest auslöste, führte ein Fehlen des Proteins zu einer fortlaufenden Zellzyklusprogression. Zusammen mit dem inhibierten Reparaturmechanismus der nahezu fehlerfreien HR (Homologen Rekombination) und einer Verschiebung zum fehlerbehafteten NHEJ (Nicht Homologen *End-Joining*), schien sich eine BRCA1-Defizienz negativ auf die genomische Stabilität auszuwirken. Auch in BRCA1-profizienten Zellen führte das Metalloid zu einer beeinträchtigten HR, wobei hier nicht die ausbleibende Anlagerung, sondern eine aberrante Dissoziation der Proteine vermutlich zu einer unvollständigen Reparatur beitrugen. So scheint auch Arsenit eine Verlagerung der Reparaturmechanismen zu verursachen. Weiterhin erfolgte in beiden Zelllinien eine Induktion der Apoptose, wobei BRCA1 positive Effekte für einen kontrollierten Zelluntergang zu haben schien. Zusammenfassend implizieren die Ergebnisse eine nachteilige Wirkung von Arsenit auf die genomische Stabilität, wobei BRCA1 wesentlichen Einfluss auf protektive zelluläre Mechanismen ausübte.

Zusammenfassend führte die ionisierende Strahlung mit 1 Gy in den hier untersuchten BRCA1-defizienten sowie BRCA1-profizienten Zellen zu keinerlei Aktivierung der DDR, wohingegen die Arsenit-vermittelte Schädigung klare Antwortmechanismen der DDR in Gang setzte. Dabei beeinträchtigte das Fehlen von BRCA1 die Signalwege der DDR und somit die chromosomale Integrität. Diese negative Beeinflussung äußerte sich durch eine fehlende Zellzykluskontrolle, eine Verschiebung der Reparaturmechanismen von der fehlerfreien HR zum fehlerbehafteten NHEJ sowie durch eine verminderte Induktion der Apoptose. Demgegenüber führte Arsenit in Zellen mit einem funktionsfähigen BRCA1-Protein zu einem persistierenden G₂/M-Arrest sowie zu einer vermehrten Einleitung der Apoptose. Neben dem protektiven Mechanismus des programmierten Zelltods könnten die beobachteten Signalwege jedoch auch durch den

antagonistisch pleiotropen Mechanismus der zellulären Seneszenz begründet werden. Des Weiteren verursachte eine Arsenit-Behandlung eine Beeinflussung des nahezu fehlerfreien Reparaturmechanismus der HR, welche in einem vermehrten Auftreten des fehlerbehafteten NHEJ resultierte. Die beobachtete Arsenit-vermittelte Beeinträchtigung von BRCA1 konnte dabei jedoch nicht durch eine direkte Beeinflussung der RING-Domäne begründet werden. Somit wäre denkbar, dass indirekte Mechanismen von Arsenit Thiol-reiche Strukturen außerhalb des Ringfingers von BRCA1 angreifen und zu gestörten Protein-Interaktionen führen. In beiden Fällen implizieren die Ergebnisse eine nachteilige Wirkung von Arsenit, wobei ein intaktes BRCA1-Protein maßgeblich zur genomischen Stabilität beitrug (Abbildung 59).

7 LITERATURVERZEICHNIS

- AGILENT TECHNOLOGIES (2015): QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit. Instruction Manual.
- AHMAD, S.; Kitchin, K. T.; Cullen, W. R. (2000): Arsenic species that cause release of iron from ferritin and generation of activated oxygen. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 382 (2), S. 195–202.
- AHRABI, S.; Sarkar, S.; Pfister, S. X.; Pirovano, G.; Higgins, G. S.; Porter, A. C. G.; Humphrey, T. C. (2016): A role for human homologous recombination factors in suppressing microhomology-mediated end joining. *Nucleic Acids Research* 44 (12), S. 5743–5757.
- APRELIKOVA, O. N.; Fang, B. S.; Meissner, E. G.; Cotter, S.; Campbell, M.; Kuthiala, A.; Bessho, M.; Jensen, R. A.; Liu, E. T. (1999): BRCA1-associated growth arrest is RB-dependent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (21), S. 11866–11871.
- ARITA, A.; Costa, M. (2009): Epigenetics in metal carcinogenesis: nickel, arsenic, chromium and cadmium. *Metallomics : Integrated Biometal Science* 1 (3), S. 222–228.
- ARNIM, A. G. von; Deng, X. W. (1993): Ring finger motif of Arabidopsis thaliana COP1 defines a new class of zinc-binding domain. *Journal of Biological Chemistry* 268 (26), S. 19626–19631.
- ATCC AMERICAN TYPE CULTUR COLLECTION (Hg.) (2019A): UWB1.289 (ATCC® CRL-2945™).
- ATCC AMERICAN TYPE CULTUR COLLECTION (Hg.) (2019B): UWB1.289+BRCA1 (ATCC® CRL-2946™).
- AU, W. W. Y.; Henderson, B. R. (2005): The BRCA1 RING and BRCT domains cooperate in targeting BRCA1 to ionizing radiation-induced nuclear foci. *Journal of Biological Chemistry* 280 (8), S. 6993–7001.
- BELINSKY, M.; Jaiswal, A. K. (1993): NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (DT-diaphorase) expression in normal and tumor tissues. *Cancer and Metastasis Reviews* 12 (2), S. 103–117.
- BEROVA, N.; Nakanishi, K.; Woody, R. W. (Hg.) (2000): Circular dichroism. Principles and applications. 2. ed. New York, NY: Wiley-VCH.
- 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), S. 3413–3427.
- BEUTNER, E. H.; Holborow, E. J.; Johnson, G. D. (1965): A new fluorescent antibody method: Mixed antiglobulin immunofluorescence or labelled antigen indirect immunofluorescence staining. *Nature* 208 (5008), S. 353–355.
- BEYERSMANN, D.; Hartwig, A. (2008): Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Archives of Toxicology* 82 (8), S. 493–512.
- BFR (BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG) (2014): Arsenic in rice and rice products. BfR Opinion No. 018/2015 of 24 June 2014.
- BHATTACHARYYA, A.; Ear, U. S.; Koller, B. H.; Weichselbaum, R. R.; Bishop, D. K. (2000): The breast cancer susceptibility gene BRCA1 is required for subnuclear assembly of Rad51 and survival following treatment with the DNA cross-linking agent cisplatin. *Journal of Biological Chemistry* 275 (31), S. 23899–23903.
- BLAKE, M. S.; Johnston, K. H.; Russell-Jones, G. J.; Gotschlich, E. C. (1984): A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Analytical Biochemistry* 136 (1), S. 175–179.
- BOSSAK, K.; Goch, W.; Piątek, K.; Frączyk, T.; Poznański, J.; Bonna, A.; Keil, C.; Hartwig, A.; Bal, W. (2015): Unusual Zn(II) affinities of zinc fingers of poly(ADP-ribose)polymerase 1 (PARP-1) nuclear protein. *Chemical Research in Toxicology* 28 (2), S. 191–201.

- BROCATO, J.; Costa, M. (2013): Basic mechanics of DNA methylation and the unique landscape of the DNA methylome in metal-induced carcinogenesis. *Critical Reviews in Toxicology* 43 (6), S. 493–514.
- BROOKES, S.; Gagrica, S.; Sanij, E.; Rowe, J.; Gregory, F. J.; Hara, E.; Peters, G. (2015): Evidence for a CDK4-dependent checkpoint in a conditional model of cellular senescence. *Cell Cycle* 14 (8), S. 1164–1173.
- BRUENING, W.; Giasson, B.; Mushynski, W.; Durham, H. D. (1998): Activation of stress-activated MAP protein kinases up-regulates expression of transgenes driven by the cytomegalovirus immediate/early promoter. *Nucleic Acids Research* 26 (2), S. 486–489.
- BRZOVIC, P. S.; Lissounov, A.; Christensen, D. E.; Hoyt, D. W.; Klevit, R. E. (2006): A Ubch5/ubiquitin noncovalent complex is required for processive BRCA1-directed ubiquitination. *Molecular Cell* 21 (6), S. 873–880.
- BRZOVIC, P. S.; Meza, J.; King, M. C.; Klevit, R. E. (1998): The cancer-predisposing mutation C61G disrupts homodimer formation in the NH2-terminal BRCA1 RING finger domain. *Journal of Biological Chemistry* 273 (14), S. 7795–7799.
- BRZOVIC, P. S.; Rajagopal, P.; Hoyt, D. W.; King, M. C.; Klevit, R. E. (2001): Structure of a BRCA1-BARD1 heterodimeric RING-RING complex. *Nature Structural & Molecular Biology* 8 (10), S. 833–837.
- BUNTING, S. F.; Callen, E.; Kozak, M. L.; Kim, J.-M.; Wong, N.; Lopez-Contreras, A. J.; Ludwig, T.; Baer, R.; Faryabi, R. B.; Malhowski, A.; Chen, H.-T.; Fernandez-Capetillo, O.; D'Andrea, A.; Nussenzweig, A. (2012): BRCA1 functions independently of homologous recombination in DNA interstrand cross-link repair. *Molecular Cell* 46 (2), S. 125–135.
- BÜRCK, J.; Roth, S.; Windisch, D.; Wadhvani, P.; Moss, D.; Ulrich, A. S. (2015): UV-CD12: synchrotron radiation circular dichroism beamline at ANKA. *Journal of Synchrotron Radiation* 22 (3), S. 844–852.
- CAI, J.; Jiang, W. G.; Ahmed, A.; Boulton, M. (2006): Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell proliferation is regulated by interaction between VEGFR-2, SH-PTP1 and eNOS. *Microvascular Research* 71 (1), S. 20–31.
- CARSON, M.; Johnson, D. H.; McDonald, H.; Brouillette, C.; Delucas, L. J. (2007): His-tag impact on structure. *Acta Crystallographica Section D* 63 (Pt 3), S. 295–301.
- CASAMASSIMI, A.; Ciccodicola, A. (2019): Transcriptional regulation: molecules, involved mechanisms, and misregulation. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (6).
- CECCALDI, R.; Liu, J. C.; Amunugama, R.; Hajdu, I.; Primack, B.; Petalcorin, M. I. R.; O'Connor, K. W.; Konstantinopoulos, P. A.; Elledge, S. J.; Boulton, S. J.; Yusufzai, T.; D'Andrea, A. D. (2015): Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Pol θ -mediated repair. *Nature* 518 (7538), S. 258–262.
- CHASAPIS, C. T.; Loutsidou, A. K.; Orkoula, M. G.; Spyroulias, G. A. (2010): Zinc binding properties of engineered RING finger domain of Arkadia E3 ubiquitin ligase. *Bioinorganic Chemistry and Applications* (10), S. 1–7.
- CHATTERJEE, N.; Walker, G. C. (2017): Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 58 (5), S. 235–263.
- CHEN, L.; Nievera, C. J.; Lee, A. Y.-L.; Wu, X. (2008): Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. *Journal of Biological Chemistry* 283 (12), S. 7713–7720.
- CHOU, C. H. S. J.; Rosa, C. T. de (2003): Case studies--arsenic. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 206 (4-5), S. 381–386.

- CHOUCHANE, S.; Snow, E. T. (2001): In vitro effect of arsenical compounds on glutathione-related enzymes. *Chemical Research in Toxicology* 14 (5), S. 517–522.
- CHOUDHURY, A. D.; Xu, H.; Baer, R. (2004): Ubiquitination and proteasomal degradation of the BRCA1 tumor suppressor is regulated during cell cycle progression. *Journal of Biological Chemistry* 279 (32), S. 33909–33918.
- CHRISTMANN, M.; Kaina, B. (2013): Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation. *Nucleic Acids Research* 41 (18), S. 8403–8420.
- CHRISTMANN, M.; Kaina, B. (2017): Epigenetic regulation of DNA repair genes and implications for tumor therapy. *Mutation Research* 780, S. 15–28.
- CHUNG, Y.-P.; Chen, Y.-W.; Weng, T.-I.; Yang, R.-S.; Liu, S.-H. (2020): Arsenic induces human chondrocyte senescence and accelerates rat articular cartilage aging. *Archives of Toxicology* 94 (1), S. 89–101.
- CLARK, S. L.; Rodriguez, A. M.; Snyder, R. R.; Hankins, G. D. V.; Boehning, D. (2012): Structure-function of the tumor suppressor BRCA1. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 1 (1).
- COLLIN, G.; Huna, A.; Warnier, M.; Flaman, J.-M.; Bernard, D. (2018): Transcriptional repression of DNA repair genes is a hallmark and a cause of cellular senescence. *Cell Death & Disease* 9 (3), S. 259.
- CÓRDOVA, E. J.; Martínez-Hernández, A.; Uribe-Figueroa, L.; Centeno, F.; Morales-Marín, M.; Koneru, H.; Coleman, M. A.; Orozco, L. (2014): The NRF2-KEAP1 pathway is an early responsive gene network in arsenic exposed lymphoblastoid cells. *PLOS ONE* 9 (2), e88069.
- CORRÊA, D. H.; Ramos, C. H. (2009): The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *African Journal of Biochemistry Research* 3 (5), S. 164–273.
- CORY, S.; Adams, J. M. (2002): The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* 2 (9), S. 647–656.
- DALEY, J. M.; Sung, P. (2014): 53BP1, BRCA1, and the choice between recombination and end joining at DNA double-strand breaks. *Molecular and Cellular Biology* 34 (8), S. 1380–1388.
- DAMDINDORJ, L.; Karnan, S.; Ota, A.; Hossain, E.; Konishi, Y.; Hosokawa, Y.; Konishi, H. (2014): A comparative analysis of constitutive promoters located in adeno-associated viral vectors. *PLOS ONE* 9 (8), e106472.
- DAUGAARD, M.; Rohde, M.; Jäätelä, M. (2007): The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Letters* 581 (19), S. 3702–3710.
- DAVIS, A. J.; Chen, D. J. (2013): DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Translational Cancer Research* 2 (3), S. 130–143.
- DELORUSSO, C.; Welcsh, P. L.; Wang, W.; Garcia, R. L.; King, M.-C.; Swisher, E. M. (2007): Functional characterization of a novel BRCA1-null ovarian cancer cell line in response to ionizing radiation. *Molecular Cancer Research* 5 (1), S. 35–45.
- DENG, C.-X. (2006): BRCA1: Cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Research* 34 (5), S. 1416–1426.
- DFG DEUTSCHE FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT (Hg.) (2002): Arsen und anorganische Arsenverbindungen (mit Ausnahme von Arsenwasserstoff). The MAK-Collection for Occupational Health and Safety. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- DING, W.; Liu, W.; Cooper, K. L.; Qin, X.-J.; Souza Bergo, P. L. de; Hudson, L. G.; Liu, K. J. (2009): Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by arsenite interferes with repair of oxidative DNA damage. *Journal of Biological Chemistry* 284 (11), S. 6809–6817.

- DOPP, E.; Recklinghausen, U. von; Diaz-Bone, R.; Hirner, A. V.; Rettenmeier, A. W. (2010): Cellular uptake, subcellular distribution and toxicity of arsenic compounds in methylating and non-methylating cells. *Environmental Research* 110 (5), S. 435–442.
- DUTTO, I.; Tillhon, M.; Cazzalini, O.; Stivala, L. A.; Prospero, E. (2015): Biology of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A): molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. *Archives of Toxicology* 89 (2), S. 155–178.
- EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) (2009): Scientific opinion on arsenic in food. *EFSA Journal* 7 (10), S. 1351.
- ELLINSWORTH, D. C. (2015): Arsenic, reactive oxygen, and endothelial dysfunction. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 353 (3), S. 458–464.
- EMADI, A.; Gore, S. D. (2010): Arsenic trioxide - An old drug rediscovered. *Blood Reviews* 24 (4-5), S. 191–199.
- FABBRO, M.; Rodriguez, J. A.; Baer, R.; Henderson, B. R. (2002): BARD1 induces BRCA1 intranuclear foci formation by increasing RING-dependent BRCA1 nuclear import and inhibiting BRCA1 nuclear export. *Journal of Biological Chemistry* 277 (24), S. 21315–21324.
- FALNOGA, I.; Zelenik Pevec, A.; Šlejkovec, Z.; Žnidarič, M. T.; Zajc, I.; Mlakar, S. J.; Marc, J. (2012): Arsenic trioxide (ATO) influences the gene expression of metallothioneins in human glioblastoma cells. *Biological Trace Element Research* 149 (3), S. 331–339.
- FASMAN, G. D. (2013): Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. New York, NY: Springer (Language of Science).
- 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), S. 2745–2761.
- FONG, Y. W.; Cattoglio, C.; Tjian, R. (2013): The intertwined roles of transcription and repair proteins. *Molecular Cell* 52 (3), S. 291–302.
- FUNK, J. O. (2001): Cell Cycle Checkpoint Genes and Cancer. In: Encyclopedia of Life Sciences. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES AB (Hg.) (2016): PD-10 Desalting Column. Product Booklet Code: 52130800.
- GORODETSKA, I.; Kozeretska, I.; Dubrovska, A. (2019): BRCA genes: The role in genome stability, cancer stemness and therapy resistance. *Journal of Cancer* 10 (9), S. 2109–2127.
- GREENFIELD, N. J. (1996): Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Analytical Biochemistry* 235 (1), S. 1–10.
- GÜNTHER, V.; Lindert, U.; Schaffner, W. (2012): The taste of heavy metals: gene regulation by MTF-1. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823 (9), S. 1416–1425.
- HARTWIG, A. (2001): Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: differential effects on structure and function. *Antioxidants & Redox Signaling* 3 (4), S. 625–634.
- HARTWIG, A. (2013): Metal interaction with redox regulation: an integrating concept in metal carcinogenesis? *Free Radical Biology & Medicine* 55, S. 63–72.
- HARTWIG, A.; Arand, M.; Epe, B.; Guth, S.; Jahnke, G.; Lampen, A.; Martus, H.-J.; Monien, B.; Rietjens, I. M. C. M.; Schmitz-Spanke, S.; Schriever-Schwemmer, G.; Steinberg, P.; Eisenbrand, G. (2020): Mode of action-based risk assessment of genotoxic carcinogens. *Archives of Toxicology* 94 (6), S. 1787–1877.
- 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), S. 1–6.

- HETTICK, B. E.; Cañas-Carrell, J. E.; French, A. D.; Klein, D. M. (2015): Arsenic: A review of the element's toxicity, plant interactions, and potential methods of remediation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (32), S. 7097–7107.
- HO, S.-Y.; Chen, W.-C.; Chiu, H.-W.; Lai, C.-S.; Guo, H.-R.; Wang, Y.-J. (2009): Combination treatment with arsenic trioxide and irradiation enhances apoptotic effects in U937 cells through increased mitotic arrest and ROS generation. *Chemico-Biological Interactions* 179 (2-3), S. 304–313.
- HOEIJMAKERS, J. H. (2001): Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411 (6835), S. 366–374.
- HOFFMANN, S. V.; Fano, M.; van de Weert, M. (2016): Circular dichroism spectroscopy for structural characterization of proteins. In: Müllertz, A., Perrie, Y. und Rades, T. (Hg.): Analytical techniques in the pharmaceutical sciences. New York, NY, s.l.: Springer New York (Advances in Delivery Science and Technology), S. 223–251.
- HOLLEMAN, A. F.; WIBERG, N.; WIBERG, E. (2007): Lehrbuch der Anorganischen Chemie: Walter de Gruyter.
- HOSSEINI, M.-J.; Shaki, F.; Ghazi-Khansari, M.; Pourahmad, J. (2013): Toxicity of arsenic (III) on isolated liver mitochondria: A new mechanistic approach. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 12 (Suppl), S. 121–138.
- HOUTGRAAF, J. H.; Versmissen, J.; van der Giessen, W. J. (2006): A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovascular Revascularization Medicine* 7 (3), S. 165–172.
- HU, Y.; Li, J.; Lou, B.; Wu, R.; Wang, G.; Lu, C.; Wang, H.; Pi, J.; Xu, Y. (2020): The role of reactive oxygen species in arsenic toxicity. *Biomolecules* 10 (2).
- HUANG, C.; Ma, W. Y.; Li, J.; Dong, Z. (1999): Arsenic induces apoptosis through a c-Jun NH2-terminal kinase-dependent, p53-independent pathway. *Cancer Research* 59 (13), S. 3053–3058.
- HUANG, R. N.; Lee, T. C. (1996): Cellular uptake of trivalent arsenite and pentavalent arsenate in KB cells cultured in phosphate-free medium. *Toxicology and Applied Pharmacology* 136 (2), S. 243–249.
- HUBER, L. J.; Yang, T. W.; Sarkisian, C. J.; Master, S. R.; Deng, C. X.; Chodosh, L. A. (2001): Impaired DNA damage response in cells expressing an exon 11-deleted murine Brca1 variant that localizes to nuclear foci. *Molecular and Cellular Biology* 21 (12), S. 4005–4015.
- HUSTEDT, N.; Durocher, D. (2016): The control of DNA repair by the cell cycle. *Nature Cell Biology* 19 (1), S. 1–9.
- IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER) (2012): Arsenic, metals, fibres, and dusts. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 100 Bände. Lyon: IARC.
- ITO, C. Y.; Kazantsev, A. G.; Baldwin, A. S. (1994): Three NF-kappa B sites in the I kappa B-alpha promoter are required for induction of gene expression by TNF alpha. *Nucleic Acids Research* 22 (18), S. 3787–3792.
- JANSOHN, M.; ROTHÄMEL, S. (2012): Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 5. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- JHA, A. N.; Noditi, M.; Nilsson, R.; Natarajan, A. T. (1992): Genotoxic effects of sodium arsenite on human cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 284 (2), S. 215–221.
- JIANG, J.; Bellani, M.; Li, L.; Wang, P.; Seidman, M. M.; Wang, Y. (2017): Arsenite binds to the RING finger domain of FANCL E3 ubiquitin ligase and inhibits DNA interstrand crosslink repair. *ACS Chemical Biology* 12 (7), S. 1858–1866.

- 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), S. 891–902.
- KAPAHİ, P.; Takahashi, T.; Natoli, G.; Adams, S. R.; Chen, Y.; Tsien, R. Y.; Karin, M. (2000): Inhibition of NF- κ B activation by arsenite through reaction with a critical cysteine in the activation loop of I κ B kinase. *Journal of Biological Chemistry* 275 (46), S. 36062–36066.
- KELLY, S. M.; Jess, T. J.; Price, N. C. (2005): How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1751 (2), S. 119–139.
- KIM, E. H.; Yoon, M. J.; Kim, S. U.; Kwon, T. K.; Sohn, S.; Choi, K. S. (2008): Arsenic trioxide sensitizes human glioma cells, but not normal astrocytes, to TRAIL-induced apoptosis via CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein-dependent DR5 up-regulation. *Cancer Research* 68 (1), S. 266–275.
- KIM, Y.; Jeong, I. G.; You, D.; Song, S. H.; Suh, N.; Jang, S.-W.; Kim, S.; Hwang, J. J.; Kim, C.-S. (2014): Sodium meta-arsenite induces reactive oxygen species-dependent apoptosis, necrosis, and autophagy in both androgen-sensitive and androgen-insensitive prostate cancer cells. *Anti-Cancer Drugs* 25 (1), S. 53–62.
- KLIGERMAN, A. D.; Doerr, C. L.; Tennant, A. H.; Harrington-Brock, K.; Allen, J. W.; Winkfield, E.; Poorman-Allen, P.; Kundu, B.; Funasaka, K.; Roop, B. C.; Mass, M. J.; DeMarini, D. M. (2003): Methylated trivalent arsenicals as candidate ultimate genotoxic forms of arsenic: induction of chromosomal mutations but not gene mutations. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 42 (3), S. 192–205.
- KLUSKA, K.; Adamczyk, J.; Krężel, A. (2018): Metal binding properties, stability and reactivity of zinc fingers. *Coordination Chemistry Reviews* 367, S. 18–64.
- KOPERA, E.; Schwerdtle, T.; Hartwig, A.; Bal, W. (2004): Co(II) and Cd(II) substitute for Zn(II) in the zinc finger derived from the DNA repair protein XPA, demonstrating a variety of potential mechanisms of toxicity. *Chemical Research in Toxicology* 17 (11), S. 1452–1458.
- KRĘŻEL, A.; Maret, W. (2017): The functions of metamorphic metallothioneins in zinc and copper metabolism. *International Journal of Molecular Sciences* 18 (6).
- KUMAGAI, Y.; Sumi, D. (2007): Arsenic: signal transduction, transcription factor, and biotransformation involved in cellular response and toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 47, S. 243–262.
- LAI, Z.; Freedman, D. A.; Levine, A. J.; McLendon, G. L. (1998): Metal and RNA binding properties of the hdm2 RING finger domain. *Biochemistry* 37 (48), S. 7005–7015.
- LEE, S.; Kim, S. M.; Lee, R. T. (2013): Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxidants & Redox Signaling* 18 (10), S. 1165–1207.
- LI, M.; Yu, X. (2013): Function of BRCA1 in the DNA damage response is mediated by ADP-ribosylation. *Cancer Cell* 23 (5), S. 693–704.
- LIEBERMANN, D. A.; Hoffman, B. (2008): Gadd45 in stress signaling. *Journal of Molecular Signaling* 3, S. 15.
- LIVAK, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25 (4), S. 402–408.
- LOVERING, R.; Hanson, I. M.; Borden, K. L.; Martin, S.; O'Reilly, N. J.; Evan, G. I.; Rahman, D.; Pappin, D. J.; Trowsdale, J.; Freemont, P. S. (1993): Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (6), S. 2112–2116.

- MACLACHLAN, T. K.; Somasundaram, K.; Sgagias, M.; Shifman, Y.; Muschel, R. J.; Cowan, K. H.; El-Deiry, W. S. (2000): BRCA1 effects on the cell cycle and the DNA damage response are linked to altered gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 275 (4), S. 2777–2785.
- MAIER, P.; Hartmann, L.; Wenz, F.; Herskind, C. (2016): Cellular pathways in response to ionizing radiation and their targetability for tumor radiosensitization. *International Journal of Molecular Sciences* 17 (1), S. 102.
- MANDAL, B. K.; Suzuki, K. T. (2002): Arsenic round the world: a review. *Talanta* 58 (1), S. 201–235.
- MARTINEZ-OUTSCHOORN, U. E.; Balliet, R. M.; Lin, Z.; Whitaker-Menezes, D.; Howell, A.; Sotgja, F.; Lisanti, M. P. (2012): Hereditary ovarian cancer and two-compartment tumor metabolism: epithelial loss of BRCA1 induces hydrogen peroxide production, driving oxidative stress and NFκB activation in the tumor stroma. *Cell Cycle* 11 (22), S. 4152–4166.
- MAZIN, A. V.; Mazina, O. M.; Bugreev, D. V.; Rossi, M. J. (2010): Rad54, the motor of homologous recombination. *DNA Repair* 9 (3), S. 286–302.
- MEAKIN, C. J.; Martin, E. M.; Fry, R. C. (2017): Epigenetic mechanisms underlying arsenic-induced toxicity. *Current Opinion in Toxicology* 6, S. 1–9.
- MEZA, J. E.; Brzovic, P. S.; King, M. C.; Klevit, R. E. (1999): Mapping the functional domains of BRCA1. Interaction of the ring finger domains of BRCA1 and BARD1. *Journal of Biological Chemistry* 274 (9), S. 5659–5665.
- MICHALEK, J. L.; Besold, A. N.; Michel, S. L. J. (2011): Cysteine and histidine shuffling: mixing and matching cysteine and histidine residues in zinc finger proteins to afford different folds and function. *Dalton Transactions* 40 (47), S. 12619–12632.
- MICSONAI, A.; Wien, F.; Kernya, L.; Lee, Y.-H.; Goto, Y.; Réfrégiers, M.; Kardos, J. (2015): Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (24), E3095–103.
- MITSI, T.; Efthimiadou, A.; Bacopoulou, F.; Vlachakis, D.; Chrousos, G.; Eliopoulos, E. (2020): Transcription factors and evolution: An integral part of gene expression (Review). *World Academy of Sciences Journal*.
- 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), S. 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).
- MORSI, R. Z.; Hage-Sleiman, R.; Kobeissy, H.; Dbaibo, G. (2018): Noxa: Role in cancer pathogenesis and treatment. *Current Cancer Drug Targets* 18 (10), S. 914–928.
- MOYNAHAN, M. E.; Chiu, J. W.; Koller, B. H.; Jasin, M. (1999): Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Molecular Cell* 4 (4), S. 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), S. 4842–4850.
- MU, Y.-F.; Chen, Y.-H.; Chang, M.-M.; Chen, Y.-C.; Huang, B.-M. (2019): Arsenic compounds induce apoptosis through caspase pathway activation in MA-10 Leydig tumor cells. *Oncology Letters* 18 (1), S. 944–954.
- MULLAN, P. B.; Quinn, J. E.; Harkin, D. P. (2006): The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control. *Oncogene* 25 (43), S. 5854–5863.

- NINOMIYA, Y.; Cui, X.; Yasuda, T.; Wang, B.; Yu, D.; Sekine-Suzuki, E.; Neno, M. (2014): Arsenite induces premature senescence via p53/p21 pathway as a result of DNA damage in human malignant glioblastoma cells. *BMB Reports* 47 (10), S. 575–580.
- NJÄLSSON, R.; Norgren, S. (2005): Physiological and pathological aspects of GSH metabolism. *Acta Paediatrica* 94 (2), S. 132–137.
- NOVAGEN (2003): pET System Manual.
- OHNISHI, T.; Mori, E.; Takahashi, A. (2009): DNA double-strand breaks: their production, recognition, and repair in eukaryotes. *Mutation Research* 669 (1-2), S. 8–12.
- OHTA, T.; Sato, K.; Wu, W. (2011): The BRCA1 ubiquitin ligase and homologous recombination repair. *FEBS Letters* 585 (18), S. 2836–2844.
- OUTTEN, C. E.; O'Halloran, T. V. (2001): Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* 292 (5526), S. 2488–2492.
- 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* (48).
- PIATEK, K.; Schwerdtle, T.; Hartwig, A.; Bal, W. (2008): Monomethylarsonous acid destroys a tetrathiolate zinc finger much more efficiently than inorganic arsenite: mechanistic considerations and consequences for DNA repair inhibition. *Chemical Research in Toxicology* 21 (3), S. 600–606.
- PIETKIEWICZ, S.; Sohn, D.; Piekorz, R. P.; Grether-Beck, S.; Budach, W.; Sabapathy, K.; Jänicke, R. U. (2013): Oppositional regulation of Noxa by JNK1 and JNK2 during apoptosis induced by proteasomal inhibitors. *PLOS ONE* 8 (4), e61438.
- PIETRASIK, S.; Zajac, G.; Morawiec, J.; Soszynski, M.; Fila, M.; Blasiak, J. (2020): Interplay between BRCA1 and GADD45A and its potential for nucleotide excision repair in breast cancer pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (3).
- 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.
- PROMEGA CORPORATION (Hg.) (2015): CellTiter-Glo luminescent cell viability assay.
- PRONK, T. E.; van der Veen, J. W.; Vandebriel, R. J.; van Loveren, H.; Vink, E. P. de; Pennings, J. L. A. (2014): Comparison of the molecular topologies of stress-activated transcription factors HSF1, AP-1, NRF2, and NF- κ B in their induction kinetics of HMOX1. *Bio Systems* 124, S. 75–85.
- QUINN, J. E.; Kennedy, R. D.; Mullan, P. B.; Gilmore, P. M.; Carty, M.; Johnston, P. G.; Harkin, D. P. (2003): BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Research* 63 (19), S. 6221–6228.
- RAHMAN, M. T.; Ley, M. de (2017): Arsenic induction of metallothionein and metallothionein induction against arsenic cytotoxicity. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 240, S. 151–168.
- REICHARD, J. F.; Puga, A. (2010): Effects of arsenic exposure on DNA methylation and epigenetic gene regulation. *Epigenomics* 2 (1), S. 87–104.
- ROEHM, P. C.; Berg, J. M. (1997): Sequential metal binding by the RING finger domain of BRCA1. *Biochemistry* 36 (33), S. 10240–10245.
- ROUSSEL, R. R.; Barchowsky, A. (2000): Arsenic inhibits NF- κ B-mediated gene transcription by blocking κ B kinase activity and κ B α phosphorylation and degradation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 377 (1), S. 204–212.

- ROY, R.; Chun, J.; Powell, S. N. (2011): BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nature Reviews Cancer* 12 (1), S. 68–78.
- ROY, S.; Narzary, B.; Ray, A.; Bordoloi, M. (2016): Arsenic-induced instrumental genes of apoptotic signal amplification in death-survival interplay. *Cell Death Discovery* 2, S. 16078.
- RUDNER, J. (Hg.) (2013): Apoptosis: InTech.
- SANGER, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12), S. 5463–5467.
- SAVAGE, K. I.; Harkin, D. P. (2015): BRCA1, a 'complex' protein involved in the maintenance of genomic stability. *FEBS Journal* 282 (4), S. 630–646.
- SCHLEGEL, B. P.; Jodelka, F. M.; Nunez, R. (2006): BRCA1 promotes induction of ssDNA by ionizing radiation. *Cancer Research* 66 (10), S. 5181–5189.
- 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), S. 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), S. 967–974.
- SHELDON, L. A. (2017): Inhibition of E2F1 activity and cell cycle progression by arsenic via retinoblastoma protein. *Cell Cycle* 16 (21), S. 2058–2072.
- SHMULEVICH, R.; Krizhanovsky, V. (2021): Cell senescence, DNA damage, and metabolism. *Antioxidants & Redox Signaling* 34 (4), S. 324–334.
- SNOUWAERT, J. N.; Gowen, L. C.; Latour, A. M.; Mohn, A. R.; Xiao, A.; DiBiase, L.; Koller, B. H. (1999): BRCA1 deficient embryonic stem cells display a decreased homologous recombination frequency and an increased frequency of non-homologous recombination that is corrected by expression of a brca1 transgene. *Oncogene* 18 (55), S. 7900–7907.
- SOBH, A.; Loguinov, A.; Yazici, G. N.; Zeidan, R. S.; Tagmount, A.; Hejazi, N. S.; Hubbard, A. E.; Zhang, L.; Vulpe, C. D. (2019): Functional profiling identifies determinants of arsenic trioxide cellular toxicity. *Toxicological Sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 169 (1), S. 108–121.
- SPUCHES, A. M.; Kruszyna, H. G.; Rich, A. M.; Wilcox, D. E. (2005): Thermodynamics of the As(III)-thiol interaction: arsenite and monomethylarsenite complexes with glutathione, dihydrolipoic acid, and other thiol ligands. *Inorganic Chemistry* 44 (8), S. 2964–2972.
- SREERAMA, N.; Woody, R. W. (2004): Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. In: Brand, L. und Johnson, M. L. (Hg.): Numerical computer methods. Part D, Bd. 383. San Diego: Elsevier Academic Press (Methods in Enzymology, v. 383), S. 318–351.
- STANTON, R. C. (2012): Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life* 64 (5), S. 362–369.
- STEINBERG, T. H. (2009): Chapter 31 Protein gel staining methods. In: Guide to Protein Purification, 2nd Edition, Bd. 463: Elsevier (Methods in Enzymology), S. 541–563.
- STUDIER, F.; Moffatt, B. A. (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* 189 (1), S. 113–130.
- 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), S. 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), S. 7155–7160.
- TAKAOKA, M.; Miki, Y. (2018): BRCA1 gene. Function and deficiency. *International Journal of Clinical Oncology* 23 (1), S. 36–44.
- TAM, L. M.; Price, N. E.; Wang, Y. (2020): Molecular mechanisms of arsenic-induced disruption of DNA repair. *Chemical Research in Toxicology* 33 (3), S. 709–726.
- TEN, R. M.; Paya, C. V.; Israël, N.; Le Bail, O.; Mattei, M. G.; Virelizier, J. L.; Kourilsky, P.; Israël, A. (1992): The characterization of the promoter of the gene encoding the p50 subunit of NF-kappa B indicates that it participates in its own regulation. *The EMBO Journal* 11 (1), S. 195–203.
- THOMAS, D. J. (2009): Unraveling arsenic--glutathione connections. *Toxicological Sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 107 (2), S. 309–311.
- TONELLI, C.; Chio, I. I. C.; Tuveson, D. A. (2018): Transcriptional regulation by Nrf2. *Antioxidants & Redox Signaling* 29 (17), S. 1727–1745.
- USLU, R.; Sanli, U. A.; Sezgin, C.; Karabulut, B.; Terzioglu, E.; Omay, S. B.; Goker, E. (2000): Arsenic trioxide-mediated cytotoxicity and apoptosis in prostate and ovarian carcinoma cell lines. *Clinical Cancer Research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 6 (12), S. 4957–4964.
- VALLABHAPURAPU, S.; Karin, M. (2009): Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual Review of Immunology* 27, S. 693–733.
- WAJANT, H. (2019): Molecular mode of action of TRAIL receptor agonists--common principles and their translational exploitation. *Cancers* 11 (7).
- WANG, B. (2012): BRCA1 tumor suppressor network: focusing on its tail. *Cell & Bioscience* 2 (1), S. 6.
- WANG, B.; Elledge, S. J. (2007): Ubc13/Rnf8 ubiquitin ligases control foci formation of the Rap80/Abraxas/Brc1/Brcc36 complex in response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (52), S. 20759–20763.
- WANG, X.; Gao, P.; Long, M.; Lin, F.; Wei, J.-X.; Ren, J.-H.; Yan, L.; He, T.; Han, Y.; Zhang, H.-Z. (2011): Essential role of cell cycle regulatory genes p21 and p27 expression in inhibition of breast cancer cells by arsenic trioxide. *Medical oncology* 28 (4), S. 1225–1254.
- WATANABE, T.; Hirano, S. (2013): Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. *Archives of Toxicology* 87 (6), S. 969–979.
- WEDLER, N.; Matthäus, T.; Strauch, B.; Dilger, E.; Waterstraat, M.; Mangerich, A.; Hartwig, A. (2021): Impact of the cellular zinc status on PARP-1 activity and genomic stability in HeLa S3 cells. *Chemical Research in Toxicology* 34 (3), S. 839–848.
- WEINHOLD, B. (2006): Epigenetics: the science of change. *Environmental Health Perspectives* 114 (3), A160–7.
- WILLIAMSON, E. A.; Dadmanesh, F.; Koeffler, H. P. (2002): BRCA1 transactivates the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1). *Oncogene* 21 (20), S. 3199–3206.
- WOODY, R. W. (1995): [4] Circular dichroism. In: *Biochemical Spectroscopy*, Bd. 246: Elsevier (Methods in Enzymology), S. 34–71.
- WU, J.; Lu, L.-Y.; Yu, X. (2010): The role of BRCA1 in DNA damage response. *Protein & Cell* 1 (2), S. 117–123.
- XU, B.; Kim, S.; Kastan, M. B. (2001A): Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Molecular and Cellular Biology* 21 (10), S. 3445–3450.

- XU, X.; Qiao, W.; Linke, S. P.; Cao, L.; Li, W. M.; Furth, P. A.; Harris, C. C.; Deng, C. X. (2001b): Genetic interactions between tumor suppressors Brca1 and p53 in apoptosis, cell cycle and tumorigenesis. *Nature Genetics* 28 (3), S. 266–271.
- XU, X.; Weaver, Z.; Linke, S. P.; Li, C.; Gotay, J.; Wang, X. W.; Harris, C. C.; Ried, T.; Deng, C. X. (1999): Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Molecular Cell* 3 (3), S. 389–395.
- YARDEN, R. I.; Pardo-Reoyo, S.; Sgagias, M.; Cowan, K. H.; Brody, L. C. (2002): BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nature Genetics* 30 (3), S. 285–289.
- YEH, J.; Cheng, L.; Liang, Y.-C.; Ou, B. (2003): Modulation of the arsenic effects on cytotoxicity, viability, and cell cycle in porcine endothelial cells by selenium. *Endothelium : Journal of Endothelial Cell Research* 10 (3), S. 127–139.
- 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), S. 53–63.
- YING, S.; Myers, K.; Bottomley, S.; Helleday, T.; Bryant, H. E. (2009): BRCA2-dependent homologous recombination is required for repair of Arsenite-induced replication lesions in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 37 (15), S. 5105–5113.
- YOSHIDA, K.; Miki, Y. (2004): Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Science* 95 (11), S. 866–871.
- YU, X.; Robinson, J. F.; Gribble, E.; Hong, S. W.; Sidhu, J. S.; Faustman, E. M. (2008): Gene expression profiling analysis reveals arsenic-induced cell cycle arrest and apoptosis in p53-proficient and p53-deficient cells through differential gene pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology* 233 (3), S. 389–403.
- ZERBINI, L. F.; Wang, Y.; Czibere, A.; Correa, R. G.; Cho, J.-Y.; Ijiri, K.; Wei, W.; Joseph, M.; Gu, X.; Grall, F.; Goldring, M. B.; Zhou, J.-R.; Libermann, T. A.; Zhou, J.-R. (2004): NF-kappa B-mediated repression of growth arrest- and DNA-damage-inducible proteins 45alpha and gamma is essential for cancer cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (37), S. 13618–13623.
- 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), S. 12884–12887.
- ZHANG, R.; Niu, Y.; Du, H.; Cao, X.; Shi, D.; Hao, Q.; Zhou, Y. (2009): A stable and sensitive testing system for potential carcinogens based on DNA damage-induced gene expression in human HepG2 cell. *Toxicology in Vitro* 23 (1), S. 158–165.
- ZHOU, B. B.; Elledge, S. J. (2000): The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408 (6811), S. 433–439.
- ZHOU, X.; Sun, X.; Cooper, K. L.; Wang, F.; Liu, K. J.; Hudson, L. G. (2011): Arsenite interacts selectively with zinc finger proteins containing C3H1 or C4 motifs. *Journal of Biological Chemistry* 286 (26), S. 22855–22863.
- ZHOU, X.; Sun, X.; Mobarak, C.; Gandolfi, A. J.; Burchiel, S. W.; Hudson, L. G.; Liu, K. J. (2014): Differential binding of monomethylarsonous acid compared to arsenite and arsenic trioxide with zinc finger peptides and proteins. *Chemical Research in Toxicology* 27 (4), S. 690–698.

8 ANHANG

8.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

53BP1	<i>tumor protein P53 binding protein 1</i>
Abraxas	<i>BRCA1 a complex subunit</i>
ARE	<i>antioxidative response elements</i>
AS	Aminosäure
As(III)	Arsenit
As(V)	Arsenat
ATM	<i>ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ataxia-telangiectasia and RAD3-related</i>
BACH1	<i>BRCA1-associated C-terminal helicase</i>
BARD1	<i>BRCA1-associated RING domain protein 1</i>
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat
BER	Basen-Exzisionsreparatur (<i>base excision repair</i>)
BMDL	<i>Benchmark Dose Lower Confidence Limit</i>
BRCA1	<i>breast cancer type 1 susceptibility protein</i>
BRCT	<i>BRCA1 C-terminal</i>
Bs	<i>binding solution</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CAT	Katalase
CDC25	<i>cell division cycle 25</i>
CdCl ₂	Cadmiumchlorid
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CENP-F	Zentromerprotein F
CHK1/CHK2	<i>checkpoint kinase 1/2</i>
CoCl ₂	Cobaltchlorid
CP	Cytoplasma-Fraktion
Cq	<i>Cycle of quantification</i>
CtlP	<i>C-terminal binding protein 1</i>
Cys	Cystein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DDR	<i>DNA damage response</i> , DNA-Schadensantwort
D-Loop	<i>Displacement-Loop</i>
DMA	Dimethylarsinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängigen Proteinkinase
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSB	<i>double strand break</i> , Doppelstrangbruch
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDL	Elektrodenlose Entladungslampe
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ER- α	<i>estrogen receptor-α</i>
FKS	fetales Kälberserum
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
G-418	Geneticin
GF-AAS	Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie
GPX	Glutathion-Peroxidase
gRNA	genomische DNA
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetyltransferase
His	Histidin
HMT	Histonmethyltransferase
HR	Homologe Rekombination (<i>homologous recombination</i>)
HT RT-qPCR	<i>high-throughput reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IF	Immunfluoreszenz
IFC	<i>integrated fluidic circuit</i>
IKK	I κ B-Kinase
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
IR	<i>ionizing radiation</i> , ionisierende Strahlung
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
KEAP1	<i>kelch-like apichlorohydrin-associated protein 1</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LBP	Lysepuffer
LMCT	<i>ligand-to-metal charge transfer</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDC1	<i>mediator of DNA damage checkpoint 1</i>
Me	Moläquivalent
MEGM	<i>Mammary Epithelial Growth Medium</i>

MF	Membran-Fraktion
MMA	Monomethylarsonsäure
MMEJ	<i>Microhomology-mediated end-joining</i>
MMR	Mismatch-Reparatur (<i>mismatch repair</i>)
MRE	Mittlere molare Elliptizität, <i>mean residue molar ellipticity</i>
MRE11	<i>meiotic recombination protein 11</i>
mRNA	messenger-RNA
MT	Metallothionein
MTF-1	<i>metal-regulatory transcription factor 1</i>
NaAsO ₂	Natriumarsenit
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NBS1	<i>nijmegen breakage syndrome 1</i>
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur (<i>nucleotide excision repair</i>)
NES	<i>nuclear export signal sequence</i>
NF-κB	<i>nuclear factor-kappa B</i>
NHEJ	Nicht-Homologes <i>End-Joining</i> (<i>non-homologous end joining</i>)
Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NoRT	<i>no reverse transcription</i>
NOX	NADPH-Oxidasen
NRC	no reaction control
NRF2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
NTC	<i>no template control</i>
NTC-STA	<i>no template control - specific target amplification</i>
OD	optische Dichte
ON	<i>over night</i>
ORI	<i>origin of replication</i> , Replikationsursprung
PALB2	<i>partner and localizier of BRCA2</i>
PAR	Poly(ADP)-Ribose
PARP1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PB	Natriumphosphat-Puffer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PolQ	Polymerase θ
PPM	<i>parts per million</i>
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RB	Retinoblastom Protein

RING	<i>really interesting new gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNF8	Ringfingerprotein 8
RNS	reaktive Stickstoffspezies (<i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RPA	<i>replication protein A</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	ribosomale-RNA
RT	Raumtemperatur
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SCD	Serin-Cluster-Domäne
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sMAF	<i>small musculoaponeurotic fibrosarcoma</i>
SOD	Superoxiddismutase
SRCD	Synchrotron-Circulardichroismus
SSA	<i>single strand annealing</i>
SSB	<i>single strand break</i> , Einzelstrangbruch
SSBR	DNA-Einzelstrangbruchreparatur (<i>single strand break repair</i>)
ssDNA	einzelsträngige DNA
STA	<i>specific target amplification</i> , Präamplifikation
STS	Staurosporin
TDI	<i>tolerable daily intake</i>
TF	Transkriptionsfaktoren
tRNA	transfer-RNA
Ubc13	<i>Ubiquitin-conjugating enzym E2 13</i>
UV	Ultraviolette Strahlung
WB1	Waschpuffer 1
WB2	Waschpuffer 2
WHO	<i>World Health Organization</i>
XPA	<i>xeroderma pigmentosum group a-complementing protein</i>
XRCC4	<i>X-ray repair cross complementing 4</i>
ZnCl ₂	Zinkchlorid
ZT	Zelltrümmer-Fraktion

8.2 VERWENDETE MATERIALIEN

8.2.1 CHEMIKALIEN

Bezeichnung	Hersteller
20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco, USA)
2x Assay Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco, USA)
2x TaqMan [®] PreAmp Master Mix	Applied Biosystem (Foster City, USA)
AAS-Arsenstandard (1 g/L)	Perkin Elmer (Rodgau, DE)
AAS-Magnesium-Matrixmodifier	Perkin Elmer (Rodgau, DE)
AAS-Palladium-Matrixmodifier	Perkin Elmer (Rodgau, DE)
Aceton 100 %	VWR (Radnor, USA)
Acrylamid (Rotiphorese [®] Gel 37,5:1)	Roth (Karlsruhe, DE)
Agar	Roth (Karlsruhe, DE)
Ammoniumperoxodisulfat (APS, ≥98 %)	Roth (Karlsruhe, DE)
Ampicillin	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE)
Annexin V-FITC	BioLegend (San Diego, USA)
BCIP	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Benzamidin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Benzonase	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
CasyTon [®]	OMNI Life Science (Bremen, DE)
CellROX Green	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE)
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva Electrophoresis (Heidelberg, DE)
DAPI (CyStain [®] DNA/Protein)	Sigma Aldrich (Steinheim, DE)
Dimethylsulfoxid (DMSO) ≥99,9 %	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
di-Natriumhydrogenphosphat ≥99 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Diphenylcarbazyd ≥99 %	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
DNA Away	Roth (Karlsruhe, DE)
DNA-Suspensionspuffer	TEKnova (Hollister, USA)
EDTA ≥99 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Ethanol (reinst), 99,9 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Ethanol (vergällt), 96 %	BrüggemannAlcohol (Heilbronn, DE)
Exonuklease I, 20 U/μl	New England (Massachusetts, USA)
Exonuklease Reaktionspuffer	New England (Massachusetts, USA)
FACS Flow	BD (Heidelberg, DE)
FACS Rinse	BD (Heidelberg, DE)

Fötale Kälberserum	Gibco (Carlsbad, USA)
Fluoroshiled Mounting Medium with DAPI	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Formaldehyd 37 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Glycerin (Rotipuran®) 99,5 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Glycin ≥99,5 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Hefeextrakt (ultra pure)	VWR (Darmstadt)
HEPES ≥99,5 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
IFC Control Line Fluid	Fluidigm (San Francisco)
Imidazol	Roth (Karlsruhe, DE)
Immersionsöl	Zeiss (Oberkochen, DE)
IPTG	Roth (Karlsruhe, DE)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe, DE)
Magnesiumchlorid ≥98,5 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Manganchlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
MEGM (Mammary Epithelial Cell Growth Medium)	Cell Applications (San Diego, USA)
Methanol ≥99, 5%	Roth (Karlsruhe, DE)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumchlorid ≥99,5 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumdodecylsulfat (SDS) 10 %	PamReac AppliChem (Darmstadt, D)
Natriumhydroxid ≥99,5 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumlauroylsarcosin (NLS)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Natriumsulfat ≥99 %	Roth (Karlsruhe, DE)
NBT	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE)
PCR-zertifiziertes Wasser	TEKnova (Hollister, USA)
Pefabloc	Roth (Karlsruhe, DE)
Penicillin/Streptomycin-Lösung (Penicillin: 5.000 U/ml; Streptomycin: 5 mg/l)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Primer-Paare	Fluidigm (San Francisco, USA), Eurofins Scientific (Luxemburg)
Propidiumiodid (1 g/L)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Protease-Inhibitor-Cocktail (cOmplete Mini™)	Roche (Basel, CH)
RNase A	Roche (Basel, CH)
RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Salpetersäure 69 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Salzsäure 30 %	Roth (Karlsruhe, DE)
SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low ROX	BioRad (San Francisco, USA)

Staurosporin (1 mM)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
TCEP-HCl	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE)
TEMED	Roth (Karlsruhe, DE)
TE-Puffer	TEKnova (Kristiansand, NOR)
Tris $\geq 99,5$ %	Roth (Karlsruhe, DE)
Triton X-100 10 %	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Trypsin	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Trypton	VWR (Darmstadt, DE)
Vectashield Mounting Medium with DAPI	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE)
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck (Darmstadt, DE)

8.2.2 LÖSUNGEN UND PUFFER

Tabelle 14: Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

PBS	Zusammensetzung	Substanzname
1,0 L bidest. H ₂ O pH 7,4	5,844 g	NaCl (100 mM)
	0,335 g	KCl (4,5 mM)
	0,993 g	Na ₂ HPO ₄ (7 mM)
	0,408 g	KH ₂ PO ₄ (3 mM)

Tabelle 15: LB-Medium

LB-Medium	Zusammensetzung	Substanzname
1,0 L bidest. H ₂ O pH 7,0	5 g	Hefeextrakt
	10 g	Trypton
	10 g	NaCl

Tabelle 16: Binding Buffer für IMAC

Binding Buffer	Zusammensetzung	Substanzname
1,0 L bidest. H ₂ O pH 7,4	2,84 g	Na ₂ HPO ₄
	29,22 g	NaCl
	1,36 g	Imidazol

Tabelle 17: Elution Buffer für IMAC

Elution Buffer	Zusammensetzung	Substanzname
1,0 L bidest. H ₂ O pH 7,4	2,84 g	Na ₂ HPO ₄
	29,22 g	NaCl
	134,04 g	Imidazol

Tabelle 18: Trenngel (16 %)

Trenngel (2x)	Zusammensetzung	Substanzname
	5,2 mL	Acrylamid (30 %)
	3,3 mL	Tris-HCl-Puffer (pH 8,45)
	1,5 mL	Glycerin (100 %)
	600 µL	bidest. H ₂ O
	35 µL	APS (20 %)
	3,5 µL	TEMED

Tabelle 19: Tris-HCl-Puffer für Trenngel

Tris-HCl-Puffer	Zusammensetzung	Substanzname
100 mL bidest. H ₂ O pH 8,45	36,4 g	Tris
	0,3 g	SDS

Tabelle 20: Sammelgel (5 %)

Sammelgel (2x)	Zusammensetzung	Substanzname
	670 µL	Acrylamid (30 %)
	1,29 mL	4x Tris-HCl Puffer (pH 6,8)
	3,2 mL	bidest. H ₂ O
	30 µL	APS (20 %)
	2,5 µL	TEMED

Tabelle 21: 4x Tris-HCl-Puffer für Sammelgel

4x Tris-HCl-Puffer	Zusammensetzung	Substanzname
100 mL bidest. H ₂ O pH 6,8	6,05 g	Tris

Tabelle 22: Anodenpuffer für SDS-PAGE

Anodenpuffer	Zusammensetzung	Substanzname
1 L bidest. H ₂ O pH 8,9	24,22 g	Tris-HCl

Tabelle 23: Kathodenpuffer für SDS-PAGE

Kathodenpuffer	Zusammensetzung	Substanzname
1 L bidest. H ₂ O	12,11 g	Tris-HCl
	17,92 g	Tricin
	1 g	SDS

Tabelle 24: SDS-Probenpuffer (2x)

SDS-Probenpuffer (2x)	Zusammensetzung	Substanzname
10 mL bidest. H ₂ O	1,75 mL	Tris-HCl 1M pH 6,8
	1,5 mL	Glycerin
	0,5 g	SDS
	0,24 g	DTT
	1 Spatelspitze	Bromphenolblau

Tabelle 25: Fixierlösung zur Coomassie-Färbung

Fixierlösung	Zusammensetzung	Substanzname
1 L bidest. H ₂ O	100 mL	Essigsäure (98 %)
	500 mL	Ethanol

Tabelle 26: Färbelösung zur Coomassie-Färbung

Färbelösung	Zusammensetzung	Substanzname
1 L bidest. H ₂ O	1 g	Coomassie Blau G-250
	50 mL	Essigsäure (98 %)

Tabelle 27: Entfärbelösung zur Coomassie-Färbung

Entfärbelösung	Zusammensetzung	Substanzname
500 mL bidest. H ₂ O	50 mL	Essigsäure (98 %)
	250 mL	Ethanol

Tabelle 28: Anodenpuffer 1 für Western Blot

Anodenpuffer 1	Zusammensetzung	Substanzname
1 L bidest. H ₂ O pH 10,4	36,34 g	Tris-HCl
	200 mL	Methanol

Tabelle 29: Anodenpuffer 2 für Western Blot

Anodenpuffer 2	Zusammensetzung	Substanzname
1 L bidest. H ₂ O pH 10,4	3,03 g	Tris-HCl
	200 mL	Methanol

Tabelle 30: Kathodenpuffer für Western Blot

Kathodenpuffer	Zusammensetzung	Substanzname
1 L bidest. H ₂ O pH 7,6	5,24 g	Aminocaproat
	0,1 g	SDS

Tabelle 31: Puffer A zur Immunodetektion

Puffer A	Zusammensetzung	Substanzname
1 L bidest. H ₂ O pH 7,2	9,35 g	NaCl
	3,18 g	NaH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O
	13,71 g	Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O

Tabelle 32: Puffer B zur Immunodetektion

Puffer B	Zusammensetzung	Substanzname
1 L bidest. H ₂ O	100 mL	Puffer A
	500 µL	Tween 20

Tabelle 33: Puffer C zur Immunodetektion

Puffer C	Zusammensetzung	Substanzname
500 mL bidest. H ₂ O	6,06 g	Tris
	2,92 g	NaCl
	5,08 g	MgCl ₂ * 6 H ₂ O

Tabelle 34: Färbelösung zur Immunodetektion

Färbelösung	Zusammensetzung	Substanzname
10 mL Puffer C	33 µL	BCIP
	66 µL	NBT

Tabelle 35: Puffer des rekombinanten BRCA1-Peptides

10 mM PB + 10 mM SDS	Zusammensetzung	Substanzname
100 mL bidest. H ₂ O pH 7,0	10 mL	0,1 M PB (2,89 mL 1 M Na ₂ HPO ₄ + 2,23 mL 1 M NaH ₂ PO ₄)
	0,288 g	SDS

Tabelle 36: Puffer des synthetischen BRCA1-Peptides

10 mM HEPES + 1 mM TCEP	Zusammensetzung	Substanzname
100 mL bidest. H ₂ O pH 7,4	0,5 mL	2 M HEPES
	1 mL	100 mM TCEP-HCl

8.2.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Bezeichnung	Hersteller
12-Well Platten	TPP (Trasadingen, CH)
24-Well Platten	TPP (Trasadingen, CH)
6-Well Platten TPP	TPP (Trasadingen, CH)
96-Well Platten TPP	TPP (Trasadingen, CH)
96-Well-Platten, transparenter Boden Nunc™ MicroWell™	Thermo Scientific (Langenselbold, DE)
Aluminiumfolie	Roth (Karlsruhe, DE)
CASY®-Cups	Roche (Mannheim, DE)
Dynamic Array™ IFC	Fluidigm (San Francisco, USA)
Einmalspritzen	B. Braun (Melsungen, DE)
Eppendorf-Reaktionsgefäße, 1,5 mL und 2 mL	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Glasfilterfritte 0,7 cm	Whatman (Maidstone, UK)
Kanülen 1,2 x 40 mm	B. Braun (Melsungen, DE)
Kryoröhrchen mit Gewinde, 1,8 ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Küvetten, Polystyrol (#64-754)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Nitrocellulosemembran	Whatman
Objektträger	Marienfeld (Lauda-Königshofen, DE)
Parafilm	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Petri-Schalen	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Pipettenspitzen 10 µL	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Pipettenspitzen 100-1000 µL	Brandt (Wertheim, DE)
Pipettenspitzen 10-200 µL	Ratiolab (Deieck, DE)
Pipettenspitzen 5 mL	Eppendorf (Hamburg, DE)
Plastik-Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Plastik-Zentrifugenröhrchen, 15 mL und 50 mL	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Polyvinylidenfluorid (PVDF) -Membran	GE Healthcare (Buckinghamshire, GB)
qPCR 8er Deckelkette	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
qPCR 8er Streifen 0,2 ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Rollrandgläser mit Schnappdeckel (20 mL, 50 mL)	Roth (Karlsruhe, DE)
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman (Krefeld, DE)
Wägeschiffchen	Roth (Karlsruhe, DE)
Whatman-Papier, 3 mm	Whatman (Maidstone, UK)
Zellkulturschalen (ø 15 cm, ø 10 cm, ø 6 cm)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Zellschaber	VWR (Darmstadt, DE)

8.2.4 KITS

Bezeichnung	Hersteller
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega (Madison, USA)
i/qScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad (München, DE)
NucleoSpin® RNA Plus Kit	Macherey-Nagel (Düren, DE)
QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent (Santa Clara, USA)

8.2.5 INSTRUMENTE

Bezeichnung	Hersteller
Atomabsorptionsspektrometer PinAAcle 900 T	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Autoklav D-150	Systemec GmbH (Linden, DE)
Biomark	Fluidigm (San Francisco, USA)
Brutschrank Heracell 150i	Thermo Scientific (Langenselbold, DE)
CASY® TTC Cell Couter & Analyser System	Roche (Mannheim, DE)
Centrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg, DE)
Chromatographiesäule HisTrap HP	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
Colony Counter BZG-30	WTW (Weilheim, DE)
Cryo 1°C Cooler	VWR International (Darmstadt, DE)
Feinwaage BP 61 S	Sartorius (Göttingen, DE)
FPLC ÄKTApurifier	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
Glaspipetten 5, 10, 20 ml	Roth (Karlsruhe, DE)
Heißluftsterilisator	Memmert (Büchenbach, DE)
Heizschüttler Thermomixer C	Eppendorf (Hamburg, DE)
IFC Controller HX	Fluidigm (San Francisco, USA)
LAS-3000 Luminescent Image Analyzer	Fujifilm (Tokio, JPN)
Megafuge 1.0	Heraeus (Hanau, DE)
Mikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss AG (Feldbach, DE)
Multipipette 20 – 200 µL	Eppendorf (Hamburg, DE)
Multipipette RANIN Pipet Lite XLS® 0,5-10 µl	Mettler Toledo (Gießen, DE)
NanoQuant Platte	Tecan Group (Crailsheim, DE)
PCR Workstation Pro	Peqlab (Erlangen, DE)
pH-Meter 3210	WTW (Weilheim, DE)
Physica MCR 51 Modular Compact Rheometer	Anton Paar Group AG (Graz, AT)
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, D)
Pipette 1000-5000 µl	Eppendorf (Hamburg, DE)

Pipette 100-1000 µl	Eppendorf (Hamburg, DE)
Pipette 10-100 µl	Eppendorf (Hamburg, DE)
Pipette 2,5-10 µl	Eppendorf (Hamburg, DE)
Pipette 20-200 µl	Eppendorf (Hamburg, DE)
Software „AIDA Imaga Analyzer“	Raytest (Straubenhardt, DE)
SRCD-Anlage UV-CD12-Strahlröhre	KARA (Karlsruhe, DE)
Sterilwerkbank HERAsafeKS	Thermo Scientific (Langenselbold, DE)
T100 Thermal Cycler	BioRad (München, DE)
Tecan Infinite M200 PRO	Tecan Group (Crailsheim, DE)
Ultraschallbad Sonorex Super RK 255 H	Bandelin (Berlin, DE)
Vortex-Genie 2T	Scientific Industries (New York, USA)
Waage VWR 1502	Sartorius (Göttingen, DE)
Western Blot-Apparatur PerfectBlue Semi-Dry Electrobloetter	Bio-Rad (Hercules, USA)
Zentrifugen	
Avanti Centrifuge J-75	Beckman (Krefeld, DE)
Centrifuge 5415	Eppendorf (Hamburg, DE)
Ultrazentrifuge L8-M	Beckman (Krefeld, DE)

8.2.6 SOFTWARE

Bezeichnung	Hersteller
AA Winlab 322	Perkin Elmer (Waltham, USA)
ChemDraw Professional 16.0	Perkin Elmer (Rodgau, DE)
BD FACSDiva™	BD (Heidelberg, DE)
ExpASy	Swiss Institute of Bioinformatics (Lausanne, CH)
Fluidigm Real Time PCr Analysis	Fluidigm (San Francisco, USA)
GenEx	MultiD Analyses (Göteborg, SWE)
ProCD12	Selbstgeschriebenes Programm (Siegmar Roth, KIT, IBG2), angelehnt an CDTToolX
ProtParam	Swiss Institute of Bioinformatics (Lausanne, CH)
SnapGene	GSL Biotech LLC (San Diego, USA)
SPSS Statistics, Version 27“	IBM (New York, USA)
Steuerungssoftware CD	Selbstgeschriebenes Programm (Siegmar Roth, KIT, IBG2)
ZEN2 Pro	Zeiss (Oberkochen, DE)

8.3 UNTERSUCHTE GENE

In Tabelle 37 sind die Gene des verwendeten Gensets der HT RT-qPCR-Methode dargestellt. Die Primer-Sequenzen können Fischer *et al.* entnommen werden (FISCHER *et al.*, 2016).

Tabelle 37: Übersicht der untersuchten Gene und deren codierte Proteine.

Gen	Codiertes Protein
<i>ABCB1</i>	<i>multidrug resistance protein 1 (MDR1)</i>
<i>ABCC1</i>	<i>multidrug resistance associated protein 1 (MRR1)</i>
<i>ACTB</i>	<i>B-actin (ACTB)</i>
<i>ADH1B</i>	<i>alcohol dehydrogenase subunit beta (ADH)</i>
<i>ALDH1A1</i>	<i>aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1)</i>
<i>APAF1</i>	<i>apoptotic protease activating factor (APAF1)</i>
<i>APEX1</i>	<i>apurinic-apyrimidinic endonuclease 1 (APEX1/Ref-1)</i>
<i>ATM</i>	<i>ataxia telangiectasia mutated (ATM)</i>
<i>ATR</i>	<i>ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR)</i>
<i>AXIN2</i>	<i>axin 2 (AXIN2)</i>
<i>B2M</i>	<i>beta-2-microglobulin (B2M)</i>
<i>BAX</i>	<i>bcl2-associated x protein (BAX)</i>
<i>BBC3</i>	<i>p53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA)</i>
<i>BCL2</i>	<i>b-cell cll/lymphoma 2 (BCL-2)</i>
<i>BCL2L1</i>	<i>bcl2-like 1 (BCL-XL)</i>
<i>BRCA1</i>	<i>breast cancer 1, early onset (BRCA1)</i>
<i>BRCA2</i>	<i>breast cancer 2, early onset (BRCA2)</i>
<i>BTRC</i>	<i>transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase, beta (β-TrCP)</i>
<i>CAT</i>	<i>catalase (CAT)</i>
<i>CCND1</i>	<i>cyclin D1 (CCND1)</i>
<i>CDKN1A</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)</i>
<i>CDKN1B</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27)</i>
<i>CDKN2B</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15)</i>
<i>CYP1A1</i>	<i>cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 (CYP1A1)</i>
<i>DDB1</i>	<i>damage-specific DNA binding protein 1 (DDB1)</i>
<i>DDB2</i>	<i>damage-specific DNA binding protein 2 (DDB2)</i>
<i>DDIT3</i>	<i>growth arrest and DNA damage-inducible protein (GADD153)</i>
<i>E2F1</i>	<i>E2F transcription factor 1 (E2F1)</i>
<i>EGFR</i>	<i>epidermal growth factor receptor (EGFR)</i>
<i>EPHX1</i>	<i>epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic) (EPHX1)</i>
<i>ERCC1</i>	<i>excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1)</i>
<i>ERCC2</i>	<i>excision repair cross-complementation group 2 (XPD)</i>

<i>ERCC4</i>	<i>excision repair cross-complementation group 4 (XPF)</i>
<i>ERCC5</i>	<i>excision repair cross-complementation group 5 (XPG)</i>
<i>FTH1</i>	<i>ferritin, heavy polypeptide 1 (FTH1)</i>
<i>G6PD</i>	<i>glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)</i>
<i>GADD45A</i>	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (GADD45A)</i>
<i>GAPDH</i>	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)</i>
<i>GCLC</i>	<i>glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit (GCL)</i>
<i>GPX1</i>	<i>glutathione peroxidase 1 (GPX1)</i>
<i>GPX2</i>	<i>glutathione peroxidase 2 (GPX2)</i>
<i>GSR</i>	<i>glutathione reductase (GSR)</i>
<i>GSTP1</i>	<i>glutathione S-transferase pi 1 (GSTP1)</i>
<i>GUSB</i>	<i>glucuronidase, beta (GUSB)</i>
<i>HMOX1</i>	<i>heme oxygenase (decycling) 1 (hMO-1)</i>
<i>HPRT1</i>	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)</i>
<i>HSPA1A</i>	<i>heat shock 70kDa protein 1A (HSP70)</i>
<i>IL8</i>	<i>interleukin 8 (IL8)</i>
<i>JUN</i>	<i>jun proto-oncogene (c-JUN)</i>
<i>KEAP1</i>	<i>kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1)</i>
<i>LIG1</i>	<i>ligase I, DNA, ATP-dependent (LIG1)</i>
<i>LIG3</i>	<i>ligase III, DNA, ATP-dependent (LIG3)</i>
<i>MAP3K5</i>	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 (MAP3K5/ASK1)</i>
<i>MDM2</i>	<i>Mouse double minute 2 homolog proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase (MDM2)</i>
<i>MGMT</i>	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)</i>
<i>MLH1</i>	<i>mutL homolog 1 (MLH1)</i>
<i>MSH2</i>	<i>mutS homolog 2 (MSH2)</i>
<i>MT1X</i>	<i>metallothionein 1X (MT1X)</i>
<i>MT2A</i>	<i>metallothionein 2A (MT2A)</i>
<i>MYC</i>	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (c-MYC)</i>
<i>NAT1</i>	<i>N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase) (NAT1)</i>
<i>NFE2L2</i>	<i>nuclear factor, erythroid 2-like 2 (NRF2)</i>
<i>NFKB1</i>	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p50/p105)</i>
<i>NFKB2</i>	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)</i>
<i>NFKBIA</i>	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (IKBA)</i>
<i>NQO1</i>	<i>NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (NQO1)</i>
<i>OGG1</i>	<i>8-oxoguanine DNA glycosylase (hOGG1)</i>
<i>PARP1</i>	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1)</i>
<i>PCNA</i>	<i>proliferating cell nuclear antigen (PCNA)</i>

<i>PLK3</i>	<i>polo-like kinase 3 (PLK3)</i>
<i>PMAIP1</i>	<i>phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (NOXA)</i>
<i>POLB</i>	<i>polymerase (DNA directed), beta (POLB)</i>
<i>POLD1</i>	<i>polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit (POLD1)</i>
<i>PPM1D</i>	<i>protein phosphatase, mg²⁺/Mn²⁺ dependent, 1D (PPM1D)</i>
<i>PRDX1</i>	<i>peroxiredoxin 1 (PRX1)</i>
<i>RAD50</i>	<i>RAD50 homolog (S. cerevisiae) (RAD50)</i>
<i>RAD51</i>	<i>RAD51 recombinase (RAD51)</i>
<i>RRM2B</i>	<i>ribonucleotide reductase M2B (TP53 inducible) (p53R2)</i>
<i>SEPP1</i>	<i>selenoprotein P, plasma, 1 (SEPP1)</i>
<i>SIRT2</i>	<i>sirtuin 2 (SIRT2)</i>
<i>SLC30A1</i>	<i>solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1 (ZnT1)</i>
<i>SOD1</i>	<i>superoxide dismutase 1, soluble (SOD1)</i>
<i>SOD2</i>	<i>superoxide dismutase 2, mitochondrial (SOD2/MnSOD)</i>
<i>SULT1A1</i>	<i>sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1 (SULT1A1)</i>
<i>TFRC</i>	<i>transferrin receptor (TFR)</i>
<i>TNFRSF10B</i>	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b (DR5)</i>
<i>TP53</i>	<i>tumor protein p53 (p53)</i>
<i>TXN</i>	<i>thioredoxin (TXN)</i>
<i>TXNRD1</i>	<i>thioredoxin reductase 1 (TXNRD)</i>
<i>UGT1A1</i>	<i>UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1 (UGT1A1)</i>
<i>VEGFA</i>	<i>vascular endothelial growth factor A (VEGFA)</i>
<i>XIAP</i>	<i>X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)</i>
<i>XPA</i>	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group A (XPA)</i>
<i>XPC</i>	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group C (XPC)</i>
<i>XRCC5</i>	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (XRCC5)</i>

8.4 ERGÄNZENDE DATEN

8.4.1 EINFLUSS VON NaAsO₂ AUF DAS GENEXPRESSIONSPROFIL

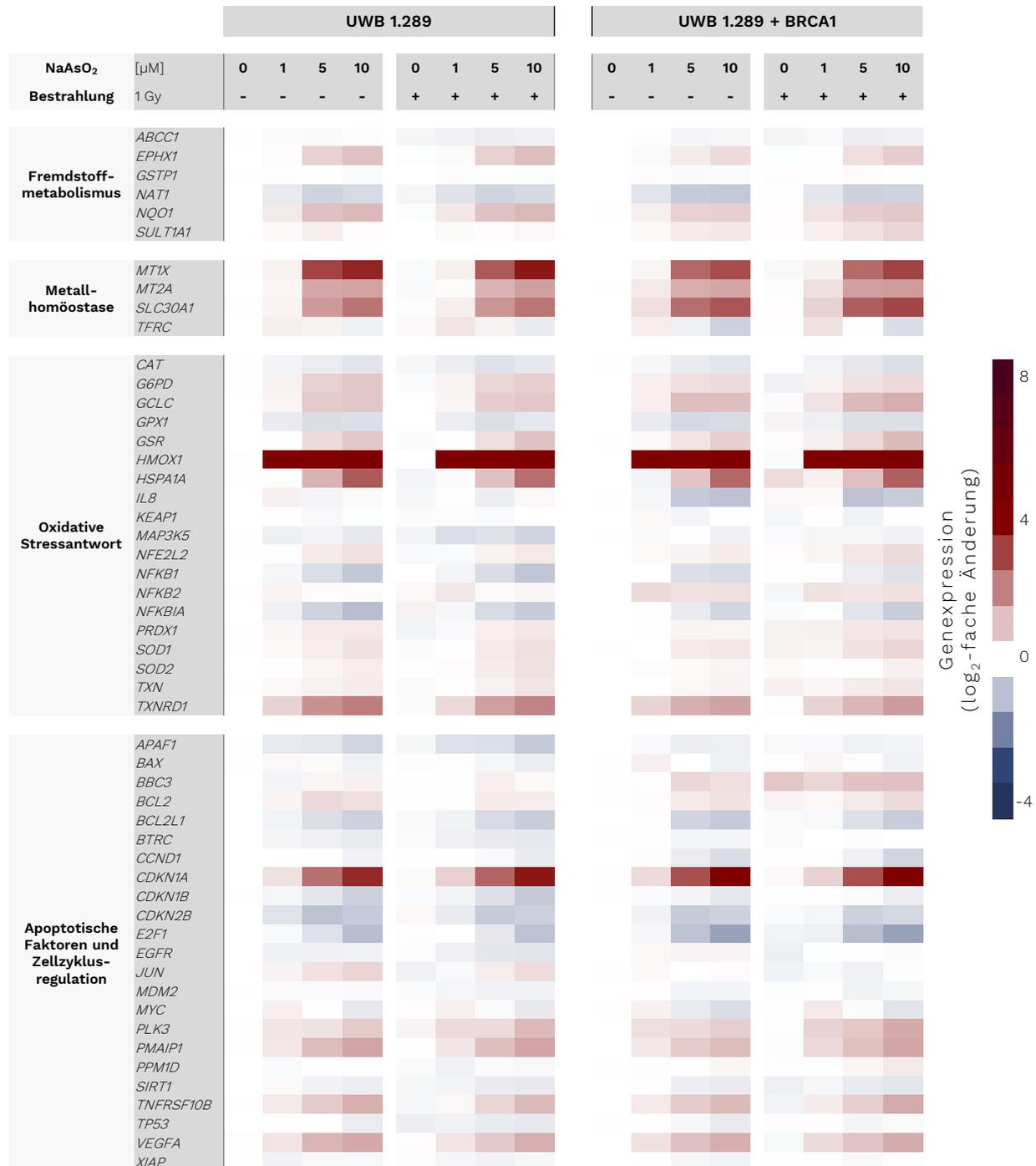


Abbildung 60: Vergleichende Expressionsprofile aller untersuchten Gene der Cluster des Fremdstoff-metabolismus, der Metallhomöostase, der oxidativen Stressantwort, der apoptotischen Faktoren sowie der Zellzyklusregulatoren nach Behandlung mit NaAsO₂.

UWB1.289- und UWB1.289 + BRCA1-Zellen wurden für 18 h mit NaAsO₂ vorbehandelt, wo angezeigt mit 1 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Die log₂-fachen Änderungen der Genexpression wurden dabei auf die unbehandelte und nicht bestrahlte Kontrolle der UWB1.289-Zellen normiert. Eine Rotfärbung stellt eine Induktion der Expression dar, während eine Blaufärbung für eine reprimierte Genexpression steht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.



Abbildung 61: Vergleichende Expressionsprofile aller untersuchten Gene des Clusters der DNA-Schadensantwort nach Behandlung mit NaAsO₂.

UWB1.289- und UWB1.289 + BRCA1-Zellen wurden für 18 h mit NaAsO₂ vorbehandelt, wo angezeigt mit 1 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Die log₂-fachen Änderungen der Genexpression wurden dabei auf die unbehandelte und nicht bestrahlte Kontrolle der UWB1.289-Zellen normiert. Eine Rotfärbung stellt eine Induktion der Expression dar, während eine Blaufärbung für eine reprimierte Genexpression steht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

8.4.2 EINFLUSS VON NaAsO₂ AUF DAS GENEXPRESSIONSPROFIL NORMIERT AUF UWB1.289

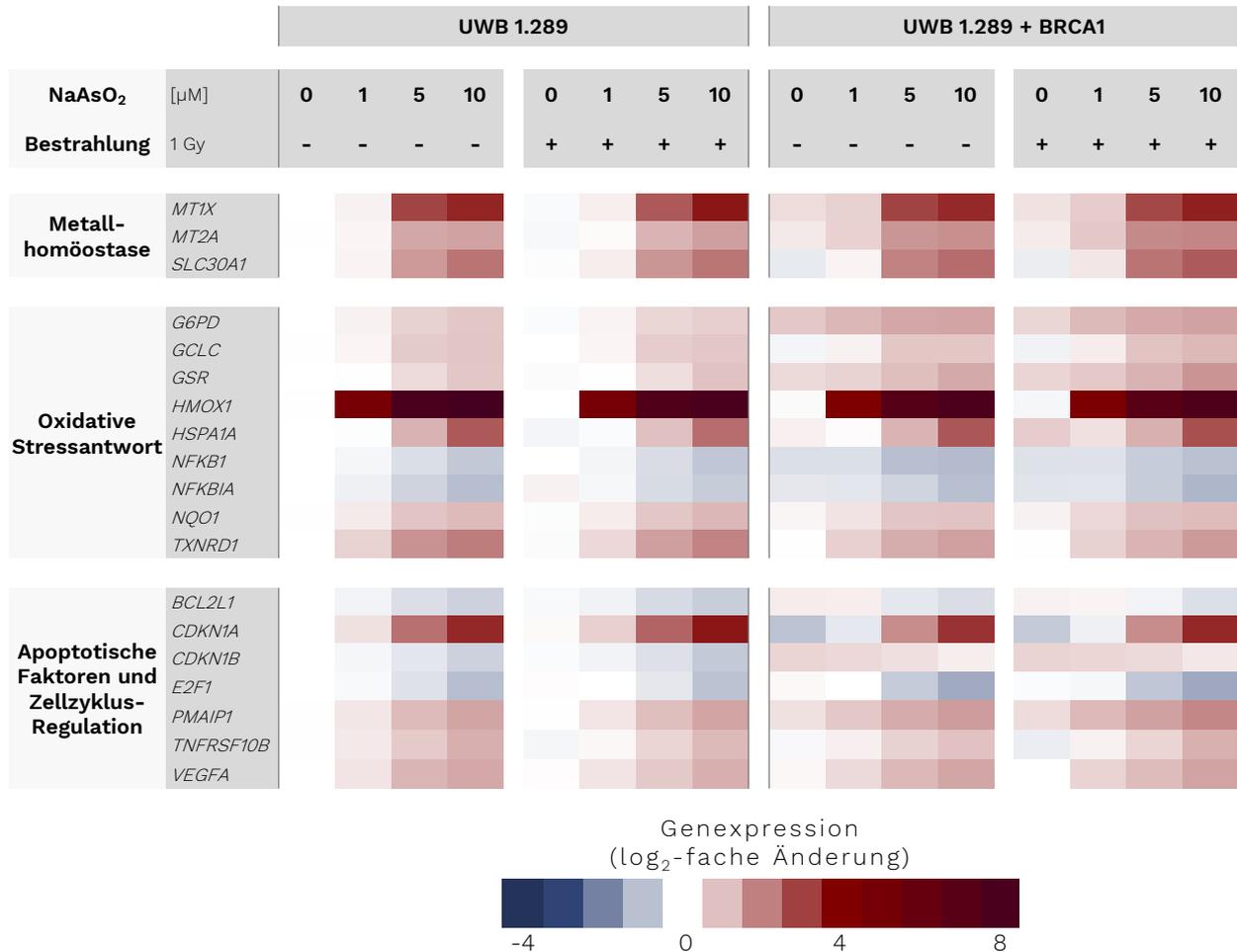


Abbildung 62: Vergleichende Expressionsprofile von ausgewählten Genen der Metallhomöostase, der oxidativen Stressantwort sowie apoptotischer Faktoren und Zellzyklusregulatoren nach Behandlung mit NaAsO₂.

UWB1.289- und UWB1.289 + BRCA1-Zellen wurden für 18 h mit NaAsO₂ vorbehandelt, wo angezeigt mit 1 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Die log₂-fachen Änderungen der Genexpression wurden dabei auf die unbehandelte und nicht bestrahlte Kontrolle der UWB1.289-Zellen normiert. Eine Rotfärbung stellt eine Induktion der Expression dar, während eine Blaufärbung für eine reprimierte Genexpression steht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

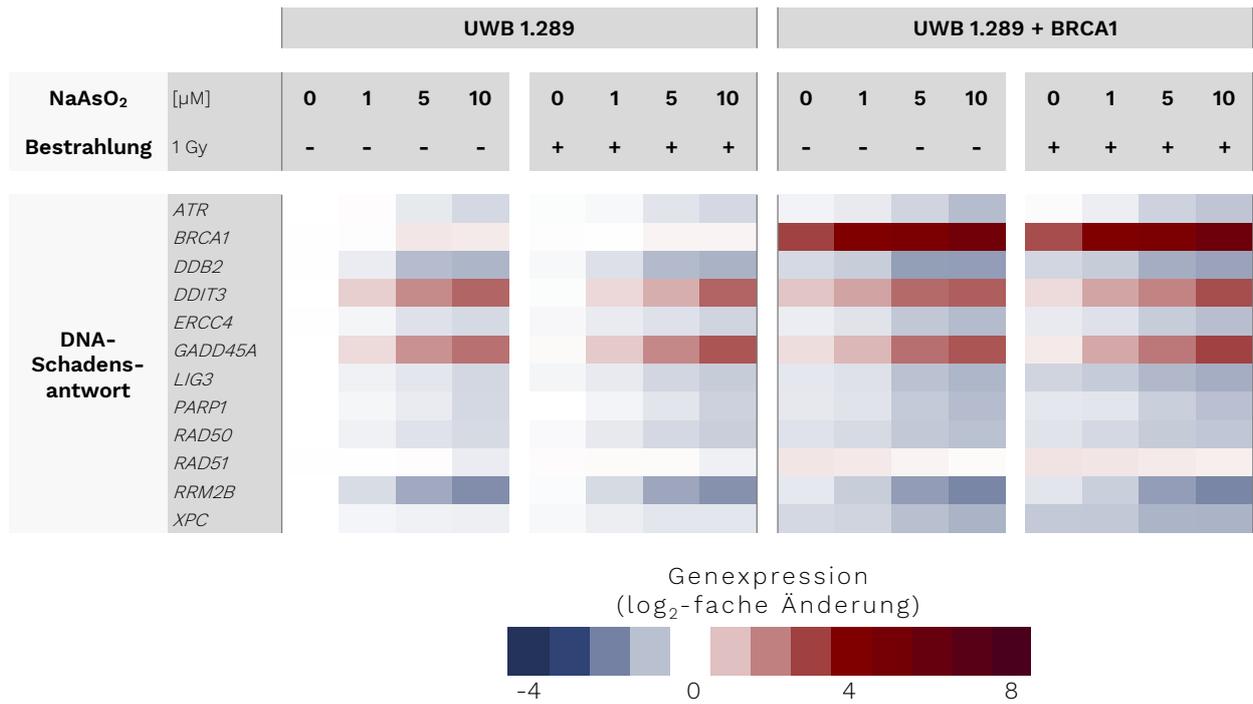


Abbildung 63: Vergleichende Expressionsprofile von ausgewählten Genen der DNA-Schadensantwort und -Reparatur nach Behandlung mit NaAsO₂.

UWB1.289- und UWB1.289 + BRCA1-Zellen wurden für 18 h mit NaAsO₂ vorbehandelt, wo angezeigt mit 1 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Die log₂-fachen Änderungen der Genexpression wurden dabei auf die unbehandelte und nicht bestrahlte Kontrolle der UWB1.289-Zellen normiert. Eine Rotfärbung stellt eine Induktion der Expression dar, während eine Blaufärbung für eine reprimierte Genexpression steht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

8.4.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTIONALITÄT VON p53

8.4.3.1 IMMUNFLUORIMETRISCHER NACHWEIS VON PHOSPHO-p53

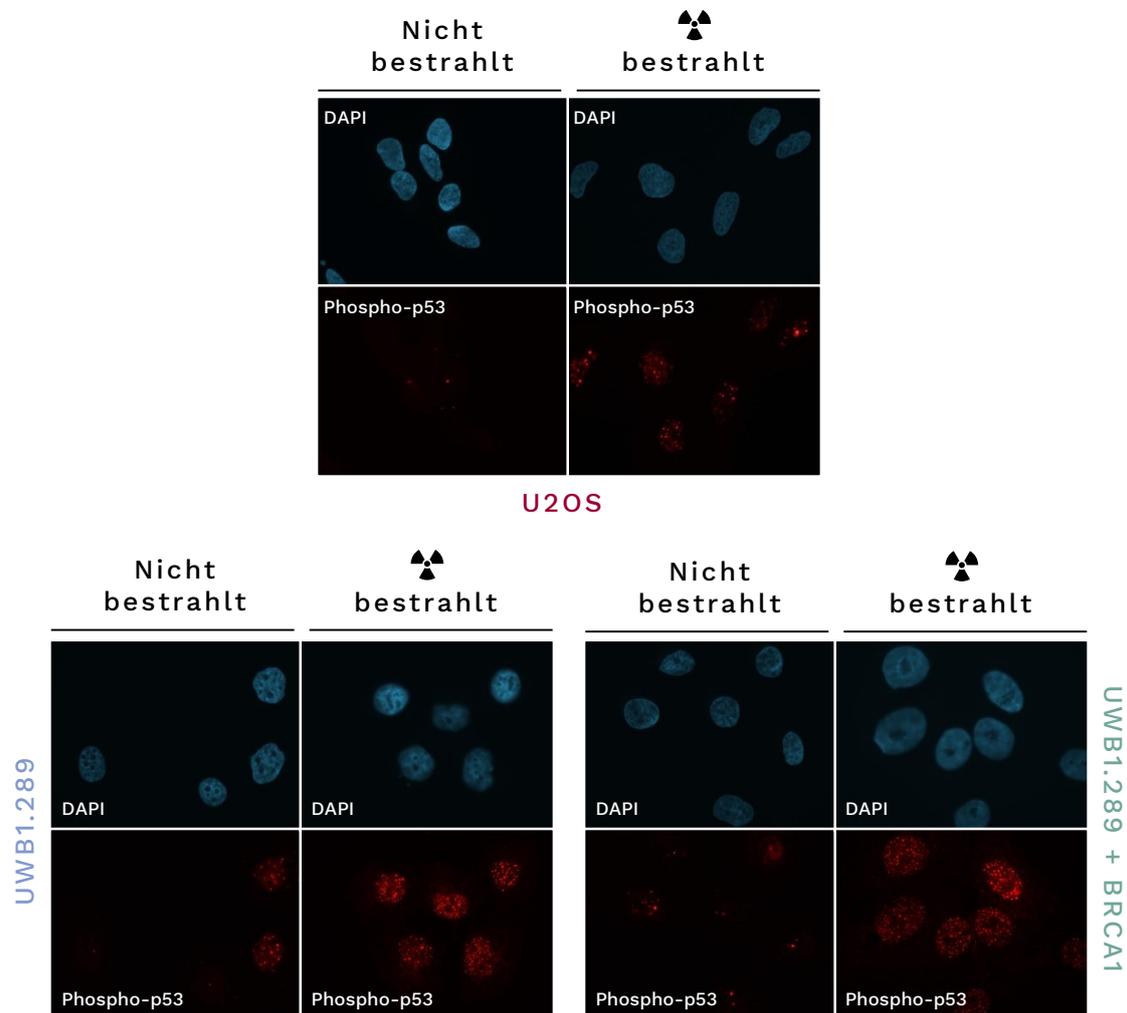


Abbildung 64: Vergleichende Darstellung der phospho-p53-Foci in U2OS-, UWB1.289- sowie UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach Bestrahlung.

Alle Zelllinien wurden mit 1 Gy bestrahlt und für 2 h nachinkubiert. Die U2OS-Zelllinie wurde als p53-profiziente Kontrollzelllinie mitgeführt. Der eingesetzte Antikörper bindet dabei spezifisch an phosphoryliertes Ser15 im p53-Protein. Dargestellt sind beispielhafte Immunfluoreszenzbilder, wobei zwei unabhängige Versuche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden.

8.4.3.2 IMMUNFLUORIMETRISCHER NACHWEIS VON p21

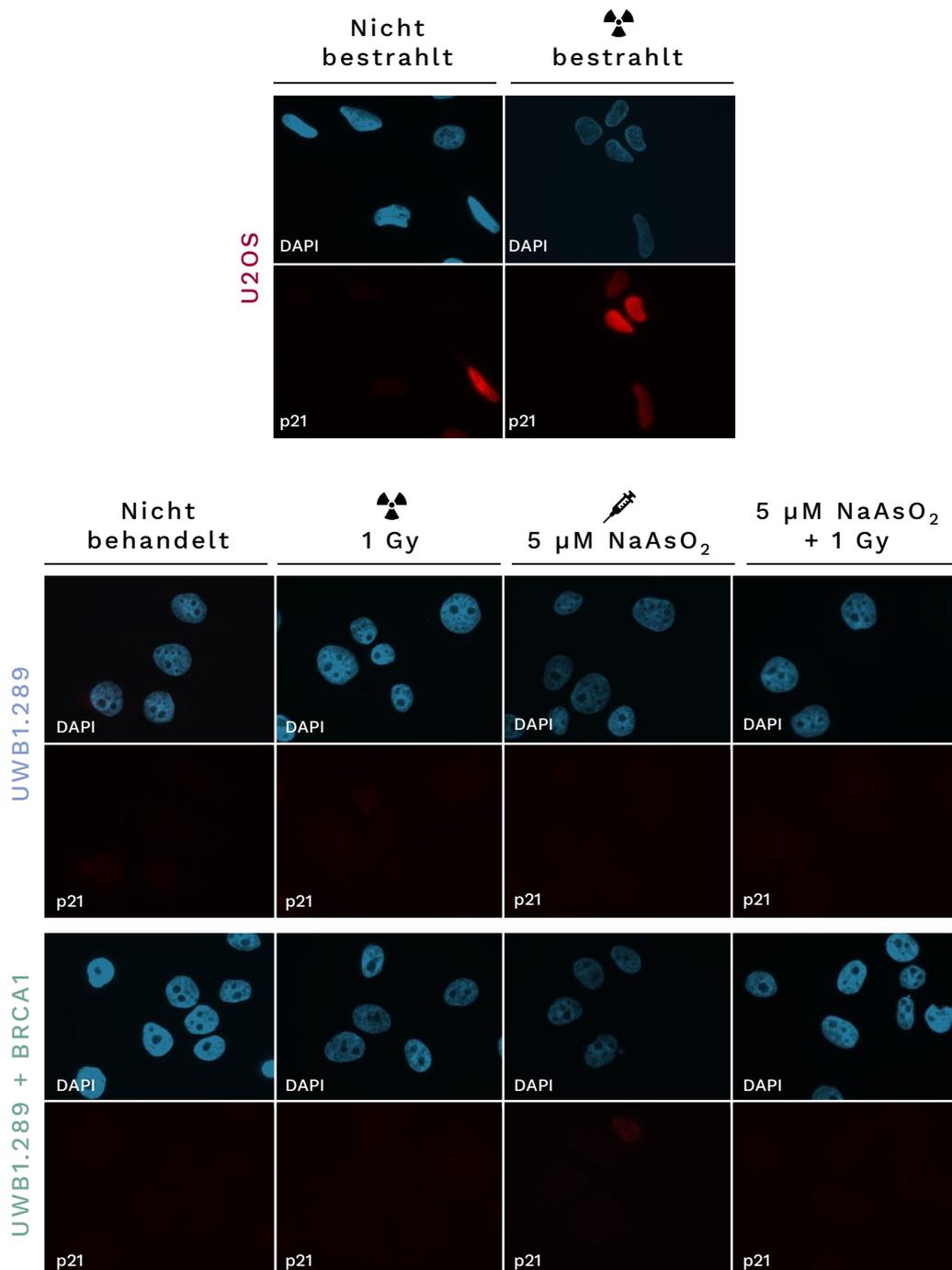


Abbildung 65: Vergleichende Darstellung der p21-Fluoreszenz in U2OS-, UWB1.289- sowie UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach Bestrahlung, NaAsO₂-Inkubation sowie der Co-Exposition. Alle Zelllinien wurden wo angezeigt für 18 h mit 5 µM NaAsO₂ inkubiert, gegebenenfalls mit 1 Gy bestrahlt und für 6 h nachinkubiert. Die U2O2-Zelllinie wurde dabei als p53-profiziente Kontrollzelllinie mitgeführt. Dargestellt sind beispielhafte Immunfluoreszenzbilder, wobei zwei unabhängige Versuche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden.

8.4.4 EINFLUSS AUF DIE EXPRESSION DES GENES *POLQ*

Um die Auswirkungen einer BRCA1-Defizienz unter Einfluss von NaAsO₂ auf die Transkriptmenge des MMEJ-assoziierten Gens *PolQ* zu untersuchen und einen möglichen Zusammenhang mit anderen Reparaturmechanismen aufzuklären, wurde eine konventionelle qPCR durchgeführt.

Hierzu wurden die Zellen wie in Abschnitt 4.1.1.4 beschrieben behandelt und das Temperaturprogramm aus Tabelle 6 für die qPCR verwendet. Die C_q-Werte der Zielamplifikate wurden unter Verwendung des Fluoreszenz-Farbstoffes *EvaGreen*® ermittelt. Als Referenz wurden die Gene *GAPDH* oder *ACTB* eingesetzt und die Formeln aus Abschnitt 4.1.4.6 zur Auswertung der $\Delta\Delta C_q$ -Methode herangezogen.

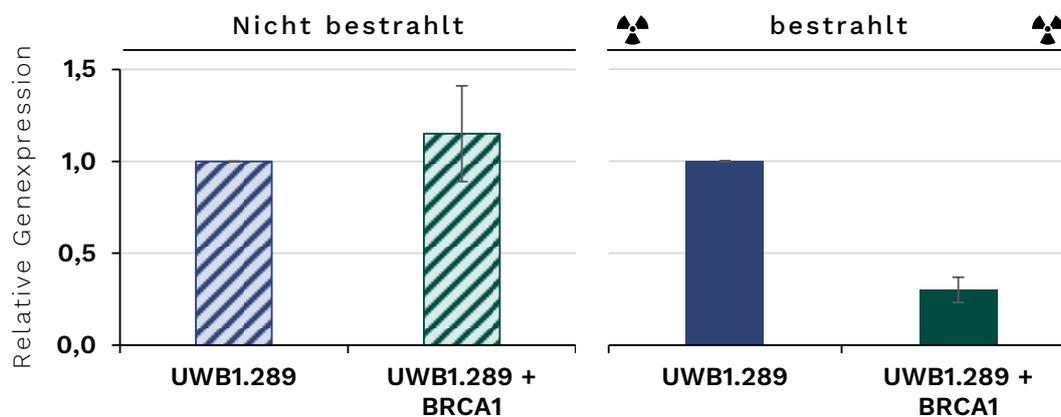


Abbildung 66: Vergleichende Darstellung der basalen sowie Schadens-induzierten Expression des *PolQ*-Gens in UWB1.289- und UWB1.289 + BRCA1-Zellen.

Die linke Abbildung zeigt die basale Expression des *PolQ*-Gens, wobei die relative Änderung auf die Wildtyp-Zelllinie UWB1.289 normiert wurde. Rechts ist die relative Expression des *PolQ*-Gens nach 1 Gy Bestrahlung dargestellt, wobei auch hier auf die Wildtyp-Zelllinie UWB1.289 normiert wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

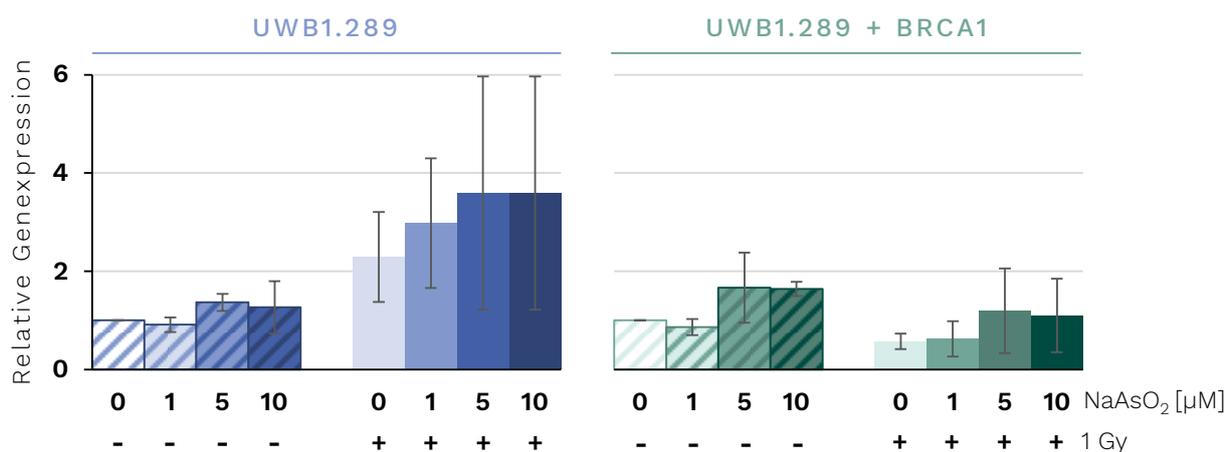


Abbildung 67: Vergleichende Expression des *PolQ*-Gens in UWB1.289- sowie UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach Behandlung mit NaAsO₂.

Die Zellen wurden für 18 h mit NaAsO₂ vorbehandelt, wo angezeigt mit 1 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Die relativen Änderungen der Genexpression wurden dabei auf die unbehandelte und nicht bestrahlte Kontrolle der jeweiligen Zelllinie normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

8.4.5 STRUKTURUNTERSUCHUNGEN MITTELS CIRCULARDICHROISMUS-SPEKTROSKOPIE

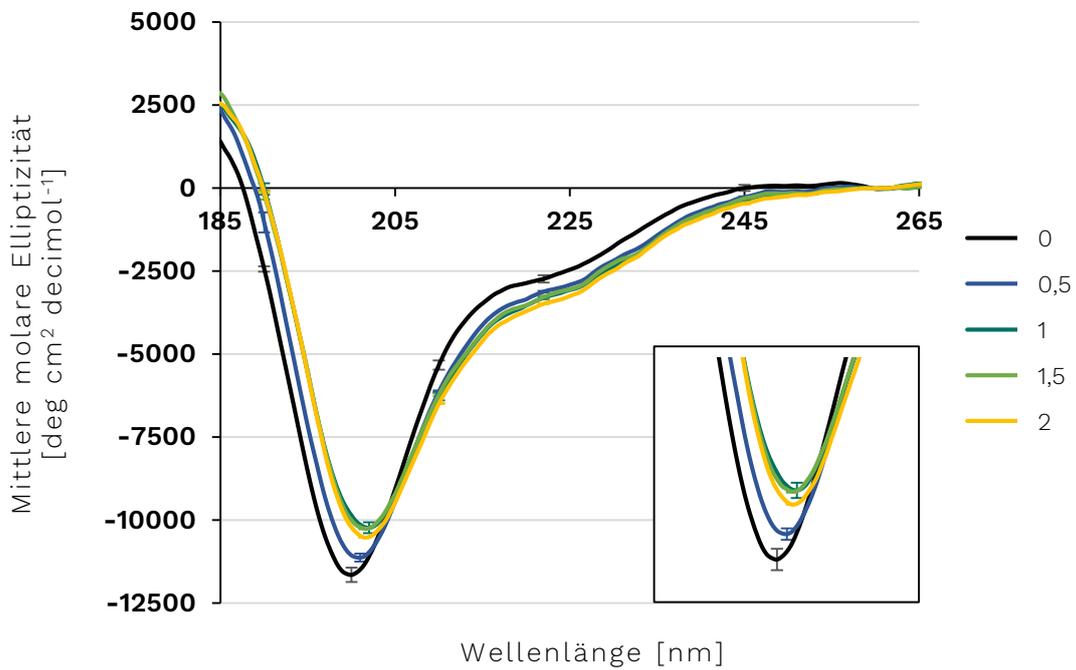


Abbildung 68: SRCD-Spektren des synthetischen BRCA1-Peptides nach Behandlung mit unterschiedlichen molaren Äquivalenten (me) an CoCl₂.

Dargestellt sind neben dem Spektrum des Apopeptides (0 me) (schwarz) auch die Spektren nach Inkubation mit 0,5 me (blau), 1 me (dunkelgrün), 1,5 me (hellgrün) sowie 2 me (gelb) CoCl₂. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen bzw. Range/2 aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

8.4.6 METALLBINDUNGSUNTERSUCHUNGEN MITTELS UV/VIS-SPEKTROSKOPIE

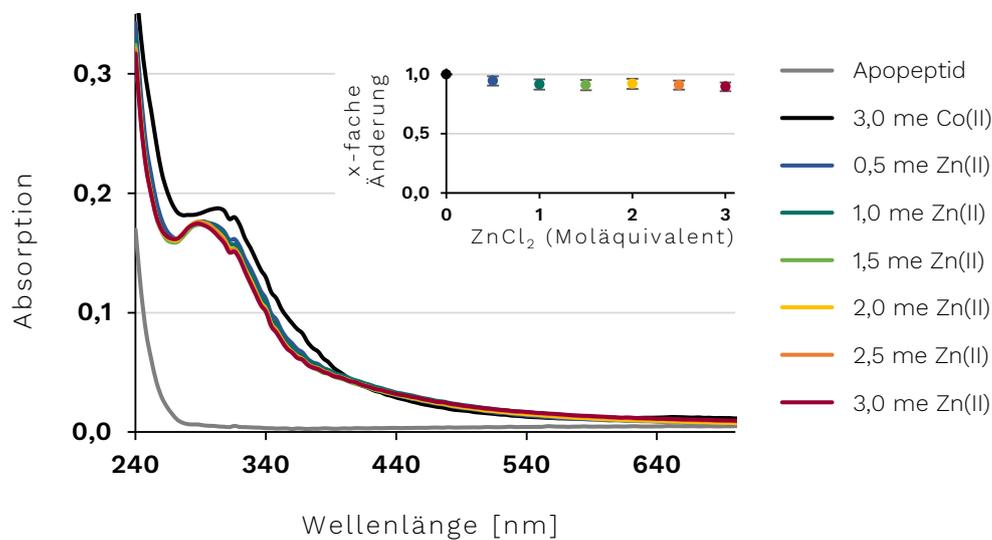


Abbildung 69: UV/Vis-Spektren des synthetischen BRCA1-Peptides nach Absättigung mit CoCl_2 und anschließender Rücktitration mit ZnCl_2 .

Dargestellt sind exemplarische UV/Vis-Spektren der Metallbindungsuntersuchungen. Neben dem Apopeptid (grau) sind auch die Absättigung mit 3 Moläquivalenten (me) Co(II) (schwarz) sowie die Rücktitration mit Zn(II) mit 0,5 me (blau), 1 me (grün), 1,5 me (hellgrün), 2 me (gelb), 2,5 me (orange) sowie 3 me (rot) aufgezeigt. Das Inset zeigt die x-fache Änderung der $\text{S}^- \rightarrow \text{Co(II)}$ LMCT-Bande (308 nm), aufgetragen gegen die entsprechenden molaren Äquivalente von Zn(II) . Die x-fache Änderung wurde dabei auf das Co(II) -abgesättigte Peptid normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

8.5 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Signalweiterleitung in der DNA-Schadensantwort (DDR).	5
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der funktionellen Domänen von BRCA1 sowie die 3D-Darstellung des BRCA1/BARD1-Heterodimers.	8
Abbildung 3:	Struktureller Aufbau der unterschiedlichen BRCA1-Komplexe.	10
Abbildung 4:	BRCA1 im Mechanismus der Homologen Rekombination (HR).	14
Abbildung 5:	BRCA1 im Mechanismus des Nicht-Homologen <i>End-Joinings</i> (NHEJ).	16
Abbildung 6:	Schematische Darstellung des Zellzyklus sowie dessen Regulation.	18
Abbildung 7:	Modell zur Veranschaulichung der BRCA1-Funktionen in der Regulation des Zellzyklus.	20
Abbildung 8:	Funktionelle Rolle von BRCA1 in der transkriptionellen Regulation.	22
Abbildung 9:	Schematische Darstellung des vorgeschlagenen Arsenmetabolismus beim Menschen.	26
Abbildung 10:	Toxikologisches Wirkprofil von dreiwertigen anorganischem Arsen (As(III)).	28
Abbildung 11:	Schematischer Aufbau eines Fluidigm 96 x 96 <i>Dynamic arrays IFC (integrated fluidic circuit)</i> .	43
Abbildung 12:	Exemplarisches Histogramm einer <i>Gating</i> -Strategie zur Ermittlung der Zellzyklusphasen-Verteilung nach Messung am BD LSRFortessa.	46
Abbildung 13:	Exemplarisches Histogramm einer <i>Gating</i> -Strategie zur Ermittlung der Zelltodmechanismen nach Messung am BD LSRFortessa.	47
Abbildung 14:	Aufbau des eingesetzten Plasmidvektors BRCA1 (1-304) (Addgene #12645).	51
Abbildung 15:	Prinzip des Circular dichroismus (CD).	59
Abbildung 16:	Fern-UV Circular dichroismus (CD) -Spektren der verschiedenen Sekundärstrukturen.	61
Abbildung 17:	Lebendzellzahl der UWB1.289- und UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach Behandlung mit NaAsO ₂ .	67
Abbildung 18:	ATP-Gehalt der UWB1.289- und UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach Behandlung mit NaAsO ₂ .	68
Abbildung 19:	Zelluläre Aufnahme von Arsen nach Behandlung mit NaAsO ₂ .	70
Abbildung 20:	Vergleichende Darstellung der transkriptionellen (log ₂ -fachen) Änderung des <i>BRCA1</i> -Gens.	71
Abbildung 21:	Vergleichende Expressionsprofile von Genen der Metallhomöostase, der oxidativen Stressantwort sowie apoptotischer Faktoren und Zellzyklusregulatoren nach Behandlung mit NaAsO ₂ .	73
Abbildung 22:	Vergleichende Expressionsprofile von Genen der DNA-Schadensantwort und -Reparatur nach Behandlung mit NaAsO ₂ .	79
Abbildung 23:	Postulierter Einfluss von Arsenit auf das Genexpressionsprofil.	84

Abbildung 24: Vergleichende Zellzyklusphasenverteilung der UWB1.289- sowie UWB1.289 + BRCA1-Zellen. _____	85
Abbildung 25: Vergleichende Darstellung der zeitabhängigen Zellzyklusphasenverteilung nach Inkubation mit 5 μM NaAsO ₂ . _____	87
Abbildung 26: Vergleichende Darstellung der zeitabhängigen Zellzyklusphasenverteilung nach Bestrahlung mit 1 Gy. _____	88
Abbildung 27: Vergleichende Darstellung der zeitabhängigen Zellzyklusphasenverteilung nach Co-Exposition von 5 μM NaAsO ₂ sowie 1 Gy-Bestrahlung. _____	90
Abbildung 28: Vergleichende Darstellung der Anzahl an 53BP1-Foci in UWB1.289 sowie UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach Behandlung mit NaAsO ₂ , in Co-Exposition mit Röntgenstrahlung. _____	95
Abbildung 29: Vergleichende Darstellung der Anzahl an BRCA1-Foci in UWB1.289 und UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach Behandlung mit NaAsO ₂ , in Co-Exposition mit Röntgenstrahlung. _____	97
Abbildung 30: Vergleichende Darstellung der Anzahl an Rad51-Foci in UWB1.289 und UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach Behandlung mit NaAsO ₂ , in Co-Exposition mit Röntgenstrahlung. _____	99
Abbildung 31: Vergleichende Darstellung der Anzahl an Rad54-Foci in UWB1.289 und UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach Behandlung mit NaAsO ₂ , in Co-Exposition mit Röntgenstrahlung. _____	100
Abbildung 32: Vergleichende Darstellung der Anzahl an DNA-PK _{cs} -Foci in UWB1.289 und UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach Behandlung mit NaAsO ₂ , in Co-Exposition mit Röntgenstrahlung. _____	106
Abbildung 33: Vergleichende Darstellung der unterschiedlichen Zelltodmechanismen in UWB1.289- sowie UWB1.289 + BRCA1-Zellen. _____	109
Abbildung 34: Schematische Darstellung des verwendeten pET Vektor Expressionssystems. _____	113
Abbildung 35: Testexpression des BRCA1-Konstruktes im Gesamtlysat. _____	114
Abbildung 36: Vergleich der mittels Nickelaffinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigten Fraktionen. _____	115
Abbildung 37: SRCD-Spektren des rekombinanten BRCA1-Peptides nach Behandlung mit verschiedenen Metalllösungen. _____	116
Abbildung 38: SRCD-Spektren einer thermischen Denaturierung des rekombinanten BRCA1-Peptides vor und nach Behandlung mit CoCl ₂ . _____	119
Abbildung 39: Schmelzkurven des rekombinanten BRCA1-Peptides vor und nach Behandlung mit CoCl ₂ . _____	120
Abbildung 40: SRCD-Spektren des synthetischen BRCA1-Peptides nach Behandlung mit unterschiedlichen molaren Äquivalenten (me) an ZnCl ₂ . _____	122
Abbildung 41: Sättigungskurve des mit ZnCl ₂ -behandelten synthetischen BRCA1-Peptides. _____	123
Abbildung 42: SRCD-Spektren des synthetischen BRCA1-Peptides nach Behandlung mit unterschiedlichen molaren Äquivalenten (me) an NaAsO ₂ . _____	125

Abbildung 43: Sättigungskurve des mit NaAsO ₂ -behandelten synthetischen BRCA1-Peptides. _____	126
Abbildung 44: SRCD-Spektren des synthetischen BRCA1-Peptides nach Behandlung mit unterschiedlichen molaren Äquivalenten (me) an ZnCl ₂ sowie NaAsO ₂ . _____	127
Abbildung 45: SRCD-Spektren des synthetischen BRCA1-Peptides nach kompetitiver Behandlung mit unterschiedlichen molaren Äquivalenten (me) an ZnCl ₂ sowie NaAsO ₂ . _____	130
Abbildung 46: SRCD-Spektren des synthetischen BRCA1-Peptides nach kompetitiver Behandlung mit unterschiedlichen molaren Äquivalenten (me) an NaAsO ₂ sowie ZnCl ₂ . _____	131
Abbildung 47: Schematische Darstellung der ersten 110 AS der BRCA1-Sequenz sowie ihre verschiedenen Sekundärstrukturanteile. _____	133
Abbildung 48: UV/Vis-Spektren des synthetischen BRCA1-Peptides nach Titration mit NaAsO ₂ . _____	138
Abbildung 49: UV/Vis-Spektren des synthetischen BRCA1-Peptides nach Absättigung mit NaAsO ₂ und anschließender Rücktitration mit ZnCl ₂ . _____	139
Abbildung 50: UV/Vis-Spektren des synthetischen BRCA1-Peptides nach Absättigung mit ZnCl ₂ und anschließender Rücktitration mit NaAsO ₂ . _____	140
Abbildung 51: BRCA1-vermittelte Regulation des G ₁ /S- <i>Checkpoints</i> . _____	147
Abbildung 52: Vergleichende Zellzyklusprogression der UWB1.289- sowie UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach Arsenit-Behandlung. _____	148
Abbildung 53: Postulierte Mechanismen zur Arsenit-beeinträchtigten Zellzyklusprogression. _____	149
Abbildung 54: Postulierte Signalkaskade der Arsenit-vermittelten Seneszenz. _____	150
Abbildung 55: Vergleich der Doppelstrangbruchreparaturmechanismen im Falle einer BRCA1-Defizienz. _____	153
Abbildung 56: Vergleich der Doppelstrangbruchreparaturmechanismen unter NaAsO ₂ -Einfluss. _____	154
Abbildung 57: Postulierter Mechanismus der Arsenit-vermittelten Apoptose. _____	156
Abbildung 58: Schematische Darstellung der postulierten sequentiellen Bindung von Zn ²⁺ und As ³⁺ an den unbesetzten Ringfinger von BRCA1 (AS 22 – 77). _____	159
Abbildung 59: Zusammenfassende Darstellung des potentiellen Wirkmechanismus von Arsenit sowie die Beteiligung von BRCA1 an diesen Signalwegen. _____	161
Abbildung 60: Vergleichende Expressionsprofile aller untersuchten Gene der Cluster des Fremdstoff-metabolismus, der Metallhomöostase, der oxidativen Stressantwort, der apoptotischen Faktoren sowie der Zellzyklusregulatoren nach Behandlung mit NaAsO ₂ . _____	191
Abbildung 61: Vergleichende Expressionsprofile aller untersuchten Gene des Clusters der DNA-Schadens-antwort nach Behandlung mit NaAsO ₂ . _____	192
Abbildung 62: Vergleichende Expressionsprofile von ausgewählten Genen der Metallhomöostase, der oxidativen Stressantwort sowie apoptotischer Faktoren und Zellzyklusregulatoren nach Behandlung mit NaAsO ₂ . _____	193

Abbildung 63: Vergleichende Expressionsprofile von ausgewählten Genen der DNA-Schadensantwort und -Reparatur nach Behandlung mit NaAsO ₂ .	194
Abbildung 64: Vergleichende Darstellung der phospho-p53-Foci in U2OS-, UWB1.289- sowie UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach Bestrahlung.	195
Abbildung 65: Vergleichende Darstellung der p21-Fluoreszenz in U2OS-, UWB1.289- sowie UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach Bestrahlung, NaAsO ₂ -Inkubation sowie der Co-Exposition.	196
Abbildung 66: Vergleichende Darstellung der basalen sowie Schadens-induzierten Expression des <i>PolQ</i> -Gens in UWB1.289- und UWB1.289 + BRCA1-Zellen.	197
Abbildung 67: Vergleichende Expression des <i>PolQ</i> -Gens in UWB1.289- sowie UWB1.289 + BRCA1-Zellen nach Behandlung mit NaAsO ₂ .	197
Abbildung 68: SRCD-Spektren des synthetischen BRCA1-Peptides nach Behandlung mit unterschiedlichen molaren Äquivalenten (me) an CoCl ₂ .	198
Abbildung 69: UV/Vis-Spektren des synthetischen BRCA1-Peptides nach Absättigung mit CoCl ₂ und anschließender Rücktitration mit ZnCl ₂ .	199

8.6 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Temperaturprogramm der GF-AAS zur Arsenbestimmung.	39
Tabelle 2: Temperaturprogramm der cDNA-Synthese.	41
Tabelle 3: Reaktionsansatz der Präamplifikation.	42
Tabelle 4: Temperaturprogramm der Präamplifikation.	42
Tabelle 5: Temperaturprogramm des Exonuklease I Verdaus.	42
Tabelle 6: Temperaturprogramm der qPCR und der Schmelzkurvenanalyse.	44
Tabelle 7: Übersicht der Primär- und Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz-Färbung.	49
Tabelle 8: Temperaturprogramm der PCR zur Mutagenese.	53
Tabelle 9: Aminosäuresequenzen der zwei untersuchten BRCA1-Peptide.	62
Tabelle 10: Prozentuale Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturelemente von rekombinanten BRCA1-Peptiden.	117
Tabelle 11: Prozentuale Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturelemente nach ZnCl ₂ -Behandlung.	124
Tabelle 12: Prozentuale Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturelemente nach NaAsO ₂ -Behandlung.	126
Tabelle 13: Vergleich der prozentualen Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturelemente nach ZnCl ₂ - und NaAsO ₂ -Behandlung sowie der Literatur von BRZOVIC <i>et al.</i> , 2001.	128
Tabelle 14: Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	180

Tabelle 15:	LB-Medium _____	180
Tabelle 16:	Binding Buffer für IMAC _____	180
Tabelle 17:	Elution Buffer für IMAC _____	181
Tabelle 18:	Trenngel (16 %) _____	181
Tabelle 19:	Tris-HCl-Puffer für Trenngel _____	181
Tabelle 20:	Sammelgel (5 %) _____	181
Tabelle 21:	4x Tris-HCl-Puffer für Sammelgel _____	181
Tabelle 22:	Anodenpuffer für SDS-PAGE _____	182
Tabelle 23:	Kathodenpuffer für SDS-PAGE _____	182
Tabelle 24:	SDS-Probenpuffer (2x) _____	182
Tabelle 25:	Fixierlösung zur Coomassie-Färbung _____	182
Tabelle 26:	Färbelösung zur Coomassie-Färbung _____	182
Tabelle 27:	Entfärbelösung zur Coomassie-Färbung _____	183
Tabelle 28:	Anodenpuffer 1 für Western Blot _____	183
Tabelle 29:	Anodenpuffer 2 für Western Blot _____	183
Tabelle 30:	Kathodenpuffer für Western Blot _____	183
Tabelle 31:	Puffer A zur Immunodetektion _____	183
Tabelle 32:	Puffer B zur Immunodetektion _____	184
Tabelle 33:	Puffer C zur Immunodetektion _____	184
Tabelle 34:	Färbelösung zur Immunodetektion _____	184
Tabelle 35:	Puffer des rekombinanten BRCA1-Peptides _____	184
Tabelle 36:	Puffer des synthetischen BRCA1-Peptides _____	184
Tabelle 37:	Übersicht der untersuchten Gene und deren codierte Proteine. _____	188

9 PUBLIKATIONSLISTE

PUBLIKATIONEN IN FACHZEITSCHRIFTEN

Wedler, Nadin; **Matthäus, Tizia**; Strauch, Bettina; Dilger, Elena; Waterstraat, Martin; Mangerich, Aswin; Hartwig, Andrea (2021): Impact of the cellular zinc status on PARP-1 activity and genomic stability in HeLa S3 cells. In: Chemical Research in Toxicology 34 (3), S. 839-848.

DOI: 10.1021/acs.chemrestox.0c00452

PUBLIKATIONEN IN VORBEREITUNG

Matthäus, Tizia; Bürck, Jochen; Hartwig, Andrea:

„Metal binding properties of the BRCA1 RING finger domain.”

Matthäus, Tizia; Hartwig, Andrea:

„Gene expression studies in BRCA1-deficient and BRCA1-proficient cells after exposure to arsenic.”

Matthäus, Tizia; Hartwig, Andrea:

„Impaired DNA damage response in BRCA1-deficient cells after exposure to arsenic.”

10 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich von Herzen all denjenigen danken, die mir auf unterschiedliche Art und Weise in den letzten Jahren zur Seite standen und mich begleitet haben.

Allen voran gilt ein besonderer Dank meiner Doktormutter Prof. Dr. Andrea Hartwig für die Möglichkeit meine Arbeit unter ihrer Anleitung anzufertigen. Du hast mir durch dein Vertrauen wissenschaftlichen Freiraum gelassen und mir gleichzeitig die notwendige Unterstützung gegeben. Vielen Dank für die letzten Jahre.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Mirko Bunzel für die Übernahme des Korreferenten-Amtes und die Durchsicht meiner Arbeit bedanken.

Ein besonderer Dank gilt außerdem den Kolleginnen und Kollegen im Arbeitskreis von Prof. Dr. Anne Ulrich. Hierbei möchte ich mich bei Dr. Lena Steger und Stefanie Vollmer bedanken, die mich in die Welt der rekombinanten Proteinexpression und allem was dazu gehört herangeführt haben. Weiterhin danke ich den Campus Nord ansässigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Arbeitskreises. Dr. Jochen Bürck danke ich für den fachlichen Rat, die tatkräftige Unterstützung und die hilfreichen Korrekturen. Weiterhin möchte ich mich bei Bianca Posselt und Siegmur Roth für die Hilfe an der Beamline und im CD-Labor bedanken. Vielen Dank, dass ihr euch stets Zeit eingeräumt habt, um Fragestellungen zu klären und Messungen zu realisieren. Außerdem möchte ich mich beim Team der Synchrotron-Strahlungsquelle KARA des IBPT am Campus Nord für die Möglichkeit der Aufnahme von SRCD-Spektren am UV-CD12-Strahlrohr bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei Dr. Nadin Wedler und Dr. Bettina Strauch bedanken, die mich während meiner Masterarbeit ermutigt haben den Weg einer Promotion einzuschlagen.

Ein weiteres großes Dankeschön gebührt PD Dr. Beate Köberle und Dr. Paul Schumacher, die das gesamte Manuskript dieser Dissertation kritisch betrachtet und korrigiert haben. Vielen Dank für eure Zeit und die wertvollen Ratschläge. Auch möchte ich mich bei Dr. Vivien Haberland und Dr. Sabine Gajewski für die hilfreichen Anmerkungen und Korrekturen bedanken.

Außerdem danke ich meinen zwei Masterandinnen Yasemin und Sandra für ihre Mühe und ihren Fleiß, mit der sie während ihrer Abschlussarbeiten sowie der nachfolgenden Zeit als Hilfwissenschaftlerinnen gearbeitet haben. Auch bei meiner Hiwine Tatjana möchte ich mich für die Unterstützung im Labor bedanken.

Ein besonders großes Dankeschön geht an Paul, der sich stets Zeit genommen hat Ergebnisse, Ideen und sicher auch Unmögliches mit mir zu diskutieren. Danke Paul für die unendliche Geduld sowie die motivierenden Worte, insbesondere in der finalen Phase. Diese vielen Gespräche, sei es fachlich oder auch privat, waren unglaublich wichtig für mich.

Weiterhin möchte ich mich bei dem ganzen AK Hartwig sowie den ehemaligen Kolleginnen und Kollegen aus meiner Zeit für die tolle Zusammenarbeit und die große Hilfsbereitschaft bedanken. Auch allen Angehörigen des AK Bunzel und AK Scherf danke ich für die herzliche Aufnahme und die Kollegialität. Vielen Dank für die unterhaltsamen Stunden im Labor und die zahlreichen gemeinsamen Feierabende.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen ehemaligen Kommilitoninnen und langjährigen Freundinnen Lisa, Lea, Antje und Sabine. Vielen Dank für eure Unterstützung und die vielen schönen gemeinsamen Erlebnisse. Auch meiner ehemaligen Bürokollegin Vivi und meiner Coffee-Gang Paul und Matze danke ich für die lustigen Stunden, den täglich guten Kaffee und das stets offene Ohr. Zudem möchte ich auch Wera und Jan für die vielen amüsanten Geschichten in Zeiten unseres 8-köpfigen Vesperclubs danken.

Darüber hinaus geht ein großes Dankeschön auch an meine beste Freundin Thea, die mich bei jedem Besuch aufgebaut und mit Köstlichkeiten versorgt hat. Auch all meinen weiteren Freunden, die Karlsruhe in den letzten 10 Jahren zu meiner Heimat gemacht haben, möchte ich an dieser Stelle danken. Meine lieben Süßen-Mädels, ihr habt die Zeit in Karlsruhe zu einem unvergesslichen Lebensabschnitt gemacht. Ebenso danke ich meinen Kindheitsfreundinnen aus der Heimat, die mich außerhalb meines Laboralltags stets auf andere Gedanken gebracht haben. Ein besonderer Dank gilt hierbei meiner langjährigen Freundin Sina, die mich in den letzten Jahren auch in schwierigen Phasen mit ihren ehrlichen Worten stets unterstützt und gestützt hat.

Meinem Freund Tobias danke ich von Herzen für seine Ruhe und Gelassenheit in Zeiten der größten Verzweiflung. Danke, dass du immer für mich da bist, mir all die Jahre den Rücken freigehalten hast und mich auf jedem Weg begleitest.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Schwester Laura und meinen Eltern für ihre moralische Unterstützung und die unendliche Geduld bedanken. Ihr habt mir stets den Rücken gestärkt und mich mit grenzenlosem Verständnis, Zuversicht und Liebe in allem unterstützt. In all den Jahren habt ihr mir immer ein Zuhause geboten und mich jederzeit mit offenen Armen begrüßt. Danke, dass ihr immer an mich glaubt und für mich da seid. Ohne euch wäre ich heute nicht hier.

