

Einfluss von Mangan und Chromat auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen sowie auf ausgewählte zelluläre Mechanismen

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

Diplom-Lebensmittelchemikerin

Vivien Martha Magda Haberland

aus

Hoyerswerda

1. Referentin: Prof. Dr. Andrea Hartwig

2. Referent: Prof. Dr. Mirko Bunzel

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juli 2020

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 9. Juni 2020

Vivien Martha Magda Haberland

*„Wenn das Leben dir Limonade gibt, mach Zitronen draus!
Und das Leben so: Waaas?!“*

Philip Humphrey Dunphy

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	7
2.1	Bedeutung von DNA-Doppelstrangbrüchen	7
2.2	Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	8
2.2.1	Nicht-homologes <i>Endjoining</i> (NHEJ)	8
2.2.2	Homologe Rekombination (HR)	10
2.2.3	<i>Single Strand Annealing</i> (SSA)	12
2.2.4	<i>Micro-mediated Endjoining</i> (MMEJ)	14
2.3	Differenzierung der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur	16
2.4	Proteine der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur	18
2.4.1	BRCA1	18
2.4.2	Rad51	19
2.4.3	Rad54	21
2.4.4	DNA-Polymerase θ	22
2.5	Mangan	24
2.6	Chrom	26
3	Fragestellung	29
4	Material und Methoden	31
4.1	Zellkultivierung	31
4.2	Kryokonservierung und Inkulturnahme	32
4.3	Behandlung der Zellen	32
4.3.1	Inkubationen	32
4.3.2	Bestrahlung	33
4.4	Zytotoxizitätsuntersuchungen	33
4.4.1	Zellzahl	33
4.4.2	ATP-Gehalt	33
4.4.3	Koloniebildungsfähigkeit	34

4.5	Zelluläre Aufnahme mittels Graphitrohr-AAS	34
4.5.1	Zellaufschluss	35
4.5.2	Messung an der AAS	35
4.6	Pulsfeldgelelektrophorese	36
4.7	U2OS-Reporter-Assay	37
4.7.1	Transformation von <i>E.coli</i>	37
4.7.2	Plasmidpräparation	38
4.7.3	Transfektion	39
4.7.4	Messung am Durchflusszytometer	39
4.8	Immunfluoreszenz	41
4.9	Western Blot Analysen	42
4.9.1	Proteinbestimmung nach Bradford	43
4.9.2	SDS-PAGE	43
4.9.3	Western Blot	44
4.9.4	Immunodetektion	45
4.10	Genexpression	46
4.10.1	RNA-Isolierung	46
4.10.2	Reverse Transkription	47
4.10.3	Preamplifikation und Exonukleaseverdau	47
4.10.4	Primer- und Probenvorbereitung	48
4.10.5	96x96 <i>Dynamic Array IFC qPCR Analyse</i>	48
4.10.6	Datenanalyse und Auswertung	49
4.11	Zellzyklusverteilung und Apoptoseuntersuchungen	50
4.12	Primer-Etablierung	52
4.12.1	Primer-Design	52
4.12.2	Primer-Spezifität	53
4.12.3	Primer-Effizienz	54
4.13	<i>POLQ</i> Genexpression	54
4.14	Statistik	54
5	Ergebnisse und Diskussion	55
5.1	Mangan	55
5.1.1	Zytotoxizität von Mangan in HeLa S3-Zellen	55
5.1.2	Zelluläre Aufnahme von Mangan in HeLa S3-Zellen	59
5.1.3	Einfluss von Mangan auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	61
5.1.3.1	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	61

5.1.3.2	Reporter-Assay	65
5.1.3.3	Immunfluoreszenz (IF)	66
5.1.4	Einfluss von Mangan auf die Genexpression in HeLa S3-Zellen	71
5.1.5	Einfluss von Mangan auf die Zellzyklusphasenverteilung und Viabilität in HeLa S3-Zellen	86
5.2	Chromat	91
5.2.1	Zytotoxizität von Chromat auf HeLa S3-Zellen	91
5.2.2	Einfluss von Chromat auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	95
5.2.2.1	Reporter-Assay	95
5.2.2.2	Immunfluoreszenz (IF)	98
5.2.3	Einfluss von Chromat auf den Proteingehalt der Zellfraktionen in HeLa S3-Zellen	107
5.2.4	Einfluss von Chromat auf die Genexpression der <i>POLQ</i>	113
6	Zusammenfassende Diskussion	117
7	Literaturverzeichnis	129
8	Chemikalien und Instrumente	145
8.1	Chemikalien	145
8.2	Lösungen und Puffer	148
8.3	Verwendete Kits	149
8.4	Verwendete Antikörper	149
8.5	Verbrauchsmaterialien	150
8.6	Instrumente und Software	151
9	Anhang	155
9.1	Liste der untersuchten Gene	155
9.2	Designte Primer	156
9.3	Primer-Etablierung	156
9.4	Bestimmung der Nachweis-, Erfassungs-, und Bestimmungsgrenze	157
9.5	Verwendete Plasmide	158
9.6	Ergänzende Daten	160

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptions- spektrometrie	DNA-DSB	DNA-Doppelstrangbrüche
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ATP	Adenosintriphosphat	EMSA	elektrophoretische Mobilitäts-Shiftassay
AU	<i>alkaline unwinding</i>	ERCC1	<i>excision repair cross complementing 1</i>
BARD1	BRCA1-associated <i>RING</i> <i>Domain-1</i>	FACS	Durchflusszytometrie
BRCA1	<i>breast cancer 1</i>	FAR	<i>fraction of activity released</i>
BRCA2	<i>breast cancer 2</i>	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
BRCT	BRCA1 <i>carboxy terminus</i>	FKS	fetales Kälberserum
BSA	Bovines Serumalbumin	FSC	Vorwärtsstreulicht
CFA	Koloniebildungsfähigkeit	GF-AAS	Graphitrohr-Atomab- sorptionsspektrometrie
CtIP	<i>carboxyterminal binding protein interaction protein</i>	GFP	<i>green-fluorescent protein</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	HR	homologe Rekombination
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	HRP	<i>horseradish Peroxidase</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	HT RT-qPCR	Hochdurchsatz <i>real time-quantitative polymerase chain reaction</i>
DMT-1	<i>divalent metal transporter-1</i>	IF	Immunfluoreszenz

Abkürzungsverzeichnis

K₂Cr₂O₇	Kaliumdichromat	PVDF	Polyvinylidenfluorid
LB	<i>lysogeny broth</i>	RING	<i>really interesting new gene</i>
MMEJ	<i>micro-mediated Endjoining</i>	ROS	reaktiven Sauerstoffspezies
MnCl₂	Manganchlorid	RPA	<i>replication protein A</i>
MRN	Mre11-Rad50-Nbs1	SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
MS	Mikrosatelliten	SOD	Superoxiddismutase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	SSA	<i>Single Strand Annealing</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	SSC	Seitwärtsstreulicht
NHEJ	nicht-homologe <i>Endjoining</i>	STA	Preamplifikation
NMTS	<i>nuclear matrix targeting signal</i>	TAE	Tris-Acetat-EDTA
PALB2	<i>partner and localizer of BRCA2</i>	TBE	Tris-Borat-EDTA
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1	TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung	TfR	Transferrin Rezeptor
PBST	PBS mit Tween®20	XPF	<i>xeroderma pigmentosum F</i>
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese	XRCC4	<i>X-ray repair cross complementing 4</i>

1 Zusammenfassung

DNA ist als Träger unserer Erbinformationen essentiell für den Organismus. Sie kann täglich durch beispielsweise mechanischen Stress und unterschiedliche chemische Modifikationen geschädigt werden. Zu den schwerwiegendsten Fehlern zählen DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSB), wobei die Zelle zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität verschiedene Mechanismen der Reparatur bereithält. Das nicht-homologe *Endjoining* (NHEJ) und die homologe Rekombination (HR) sind dabei die Hauptreparatursysteme. Zudem können DNA-DSB über die *backup-pathways* *Single Strand Annealing* (SSA) und *micro-mediated Endjoining* (MMEJ) behoben werden. Die Reparaturwege NHEJ, SSA und MMEJ sind dabei fehlerbehaftet, während die HR die DNA nahezu fehlerfrei regenerieren kann. Können DNA-DSB nicht repariert beziehungsweise nicht fehlerfrei repariert werden, gehen Sequenzinformationen verloren, welche anschließend zu genetischen Mutationen führen können und somit zur Kanzerogenese beitragen. Eine solche Beeinträchtigung der DNA-Reparatur sowie deren mögliche Folge einer Kanzerogenese, konnte bereits für einige Metalle gezeigt werden. Vor allem beruflich exponierte Personen in der metallverarbeitenden Industrie sind einer erhöhten Exposition von Metallstäuben und somit einem gesteigerten Risiko einer Krebserkrankung ausgesetzt.

Um die adversen Veränderungen der DNA-Reparaturmechanismen nach einer Metallexposition für eine Risikobewertung der Metalle heranziehen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von wasserlöslichen Mangan- und Chromat-Verbindungen auf die Reparatur von DNA-DSB in zellbasierten Testverfahren untersucht. Dabei wurde das essentielle Spurenelement Mangan aufgrund der vielfältigen Funktionen im Körper und der Anwendung in der Industrie sowie der bereits bekannten neurotoxischen Wirkung bei chronischer Exposition betrachtet. Ebenfalls wurde in dieser Arbeit Chromat durch dessen vielseitige Verwendung in der Stahlindustrie sowie der Zementherstellung und dem bereits bekannten Risiko der Entstehung eines Lungenkarzinoms untersucht.

Zu Beginn wurde die Zytotoxizität von Manganchlorid (MnCl_2) in der Modellzelllinie HeLa S3 bestimmt, wobei eine konzentrationsabhängige Toxizität im mittleren mikromolaren Bereich nachgewiesen werden konnte. Zudem akkumulierte Mangan zeit- und dosisabhängig in HeLa S3-Zellen. Nach der Festlegung eines geeigneten Konzentrationsbereiches wurde der Einfluss von Mangan auf die Reparatur von DNA-DSB betrachtet. Dabei konnte mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

eine Induktion von DNA-DSB durch das Metall selbst und eine mögliche Inhibierung der Reparatur strahleninduzierter Schäden beobachtet werden. Ein möglicher Mechanismus der Induktion von DNA-DSB wäre die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Mangan und der damit verbundenen DNA-schädigenden Wirkung. Die erhöhte oxidative Stressantwort ausgelöst durch Mangan konnte bereits mehrfach gezeigt werden. Da die PFGE keine Differenzierung zwischen den Reparaturwegen zulässt, wurde im Anschluss die Reparatur von DNA-DSB mittels Reporter-Assay in U2OS-Zellen genauer betrachtet. Dieser Assay kann selektiv die Wege NHEJ, HR, SSA und MMEJ nachweisen, wobei eine funktionierende Reparatur über ein GFP-Signal gemessen wird. Unter Einfluss von Mangan konnte keine Beeinträchtigung der Reparaturwege NHEJ und MMEJ festgestellt werden, während die HR bereits bei geringen Konzentrationen von $100 \mu\text{M}$ und das SSA bei Konzentrationen ab $250 \mu\text{M}$ gehemmt wurde. Zur Untersuchung der möglichen inhibierenden Mechanismen wurden wichtige Proteine der HR mit der Methode der Immunfluoreszenz (IF) betrachtet. Dabei konnten keine eindeutigen Aussagen über eine Beeinträchtigung der Reparaturproteine Rad51 und Rad54 getroffen werden. Möglicherweise sind *Downstream*-Proteine durch Mangan beeinträchtigt, wobei DNA-Polymerasen potentielle Angriffspunkte von Mangan darstellen. Untersuchungen auf transkriptioneller Ebene zeigten, dass Mangan verschiedene Gene der DNA-Schadensantwort, der oxidativen Stressantwort sowie der Zellzyklusregulation und Apoptose beeinflusst. Dabei unterstützen die Ergebnisse der veränderten Transkriptmenge von Genen der DNA-Schadensantwort die Erkenntnisse der PFGE und IF über die Induktion von DNA-DSB. Zudem impliziert die erhöhte Expression der Gene der oxidativen Stressantwort die Induktion von ROS und unterstützt somit die Vermutungen der DNA-schädigenden Wirkung durch Mangan. Veränderungen in der Transkriptmenge von Genen der Zellzyklusregulation sowie der Apoptose wurden daraufhin auf zellulärer Ebene untersucht, wobei keine Veränderungen im Zellzyklus sowie der Induktion von Zelltodmechanismen beobachtet werden konnten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss von Chromat auf die Reparatur von DNA-DSB untersucht. Zunächst wurde ein geeigneter Konzentrationsbereich festgelegt, wobei Kaliumdichromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) eine konzentrationsabhängige Toxizität im Bereich von $1 \mu\text{M}$ bis $5 \mu\text{M}$ in HeLa S3-Zellen zeigte. Untersuchungen zur Reparatur mittels Reporter-Assay zeigten, dass Chromat die Reparaturwege NHEJ und SSA nicht beeinflusst, während die HR vollständig inhibiert wurde und das MMEJ durch Chromat verstärkt ablief. Daraufhin wurde Rad51 mit der Methode der IF betrachtet, wobei Rad51 Foci am DNA-DSB nachgewiesen werden konnten. Möglich wäre eine Beeinträchtigung weiterer an der HR beteiligten Proteine. Bei der Betrachtung von BRCA1 und Rad54 mit Hilfe der IF konnte eine verminderte Anlagerung der Proteine an den DNA-Strang

festgestellt werden. Möglicherweise könnten epigenetische Veränderungen in den Gensequenzen der Reparaturproteine zu einer verminderten Expression und somit zu einer fehlenden Anlagerung führen. Mit der Methode der IF konnte zusätzlich eine Induktion von DNA-DSB durch Chromat selbst festgestellt werden. Der postulierte Mechanismus ist die Bildung von ternären Chrom-DNA-Addukten mit Ascorbat, welche zum Blockieren der Replikationsgabel führen und dabei DNA-DSB induzieren können. Ebenfalls wird die Induktion von ROS und den damit verbundenen Schäden der DNA postuliert. Weiterhin scheinen die Proteingehalte im Zytoplasma und Zellkern von Rad51 und Rad54 nicht durch Chromat beeinflusst. Abschließend wurde der mRNA-Gehalt der *POLQ*, ein Schlüsselgen des MMEJ, betrachtet, um den verstärkten Ablauf dieser Reparatur genauer zu untersuchen. Dabei konnte keine transkriptionelle Veränderung durch Chromat festgestellt werden. Vermutlich wird die verstärkte Reparatur des MMEJ über einen anderen Mechanismus ausgelöst.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Dissertation eine Induktion von DNA-DSB durch die Metalle Mangan und Chromat festgestellt werden, wobei die postulierten Mechanismen vermutlich auf die Generierung von ROS und die Bildung von ternären Chrom-DNA-Addukten zurückzuführen sind. Zudem wurde eine Beeinträchtigung der HR durch beide Metalle beobachtet, jedoch konnten im Falle von Mangan keine endgültigen Aussagen über möglich beeinflusste Mechanismen getroffen werden. Im Gegensatz dazu konnten inhibierende Effekte auf BRCA1 und Rad54 durch Chromat festgestellt werden. Dies lässt möglicherweise auf epigenetische Veränderungen der Gensequenzen dieser Reparaturgene oder entsprechender Promotorregionen schließen. Zusätzlich verursachte Chromat einen *Shift* zum fehlerbehafteten MMEJ, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen der Verschiebung nicht abschließend geklärt werden konnten.

Abstract

DNA double strand breaks (DNA-DSB) are the most serious DNA damage induced by various endogenous and exogenous factors. Different mechanisms to repair DNA-DSB exist, including non-homologous endjoining (NHEJ), homologous recombination (HR), single strand annealing (SSA) and microhomology-mediated endjoining (MMEJ). The mechanisms NHEJ, SSA and MMEJ can be error-prone, while HR is a largely error-free process. If DNA-DSB cannot be repaired without errors, sequence information is lost, which can subsequently lead to mutations and thus contribute to carcinogenesis. Such an impairment of DNA repair and its possible consequence of carcinogenesis has already been shown for some metals. This exogenous impact may result in a higher risk of cancer for persons in the metal-processing industry.

The influence of water-soluble manganese and chromate on the repair of DNA-DSB was investigated in cell-based assays, to possibly use the results for risk assessment of the metals. As an essential trace element, manganese is indispensable for important functions and reactions in the human physiology. At higher doses manganese can become toxic, where the main concern is the neurotoxic potential. Chromate has a widespread application in steel industry and cement production and its potential to cause lung cancer is already known.

Within the scope of the *in vitro* investigations a concentration-dependent cytotoxicity of manganese chloride ($MnCl_2$) was observed in HeLa S3 cells. In addition, depending on time and dose manganese accumulated in HeLa S3 cells. The PFGE was used to investigate the influence of manganese on the repair of X-ray induced DNA-DSB. The results showed a persistence of DNA-DSB by manganese, indicating an induction of DNA-DSB and a possible inhibition of their repair. The induction of DNA-DSB by reactive oxygen species (ROS) is suggested. The increased oxidative stress response triggered by manganese has already been shown in a number of studies. To examine the impact of manganese on different DNA-DSB repair pathways a reporter assay was used. U2OS cells were transfected with an individual, inactive green-fluorescent protein (GFP) expression cassette, interrupted by a restriction site for endonuclease I-SceI. DNA-DSB were induced by I-SceI and the number of GFP positive cells indication DNA repair were measured in the absence and presence of manganese. While the repair mechanisms NHEJ and MMEJ were unaffected by manganese, a decrease in the number of GFP positive cells was observed for HR at low manganese concentrations and for SSA at higher concentrations. To investigate the possible mechanisms of inhibition, important proteins of HR were examined using the method of immunofluorescence (IF). The inhibition of proteins Rad51 and Rad54 could not be verified conclusively by the method applied but proteins downstream in the repair process may be affected by manganese. DNA-polymerases display another potential target for manganese which could explain the impaired HR measured by the reporter assay. Gene expression analysis further showed an influence of manganese on different

genes of the DNA damage response, oxidative stress response as well as cell cycle regulation and apoptosis. The observed altered gene expression of the DNA damage response support the results of the PFGE and IF for the induction of DNA-DSB. In addition, the increased expression of genes of the oxidative stress response indicates the induction of ROS and thus supports the hypothesis of the induction of DNA-DSB by ROS. Subsequently cell cycle regulation and apoptosis were further investigated on a cellular level, whereby no variations in cell cycle as well as the induction of cell death mechanisms were observed.

In the second part of this dissertation the impact of chromate on the repair of DNA-DSB was examined. A concentration-dependent cytotoxicity of potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) in the range of 1 μM to 5 μM was observed in HeLa S3 cells. To investigate the influence of chromate on the repair of DNA-DSB the reporter assay was used. The findings indicated no impact of chromate on the repair mechanisms NHEJ and SSA, while HR was completely inhibited and MMEJ was greatly enhanced. We were able to detect Rad51 foci at the site of DNA-DSB by using the IF method. Furthermore, chromate showed an induction of DNA-DSB as indicated by an increased number of Rad51 foci. Other proteins involved in HR may be affected by chromate. When considering the proteins BRCA1 and Rad54, a reduced foci formation was found. Chromate may induce epigenetic changes in the gene sequences of the repair proteins could lead to reduced expression and thus to an inhibited foci formation. The postulated mechanism for the induction of DNA-DSB is the formation of ternary chromium-DNA-adducts with ascorbate, which can block the replication fork and thereby induce DNA-DSB. The induction of ROS and the associated damage to the DNA is also postulated. In addition, the cellular contents of Rad51 and Rad54 in the fractions of the nucleus and cytoplasm were not affected by chromate. Finally, gene expression analysis of *POLQ* was examined. *POLQ* encodes for polymerase θ , which is an important protein in MMEJ. These considerations were investigated in order to examine in more detail the progress of this repair but no transcriptional change due to chromate was observed. The increased participation of MMEJ is probably triggered by another mechanism.

In summary, the present study demonstrates an induction of DNA-DSB by the metals manganese and chromate. The postulated mechanisms are presumably due to the generation of ROS and the formation of ternary chromium-DNA-adducts. In addition, an impairment of HR by both metals was observed. However, in case of manganese the exact underlying mechanisms was not conclusive. In contrast, inhibitory effects of chromate on BRCA1 and Rad54 could be shown. This suggests epigenetic changes in the gene sequences of these repair genes or their promoter regions. In addition, chromate caused a shift to the error-prone MMEJ, whereby the underlying mechanisms could not be finally clarified.

2 Einleitung

Der Träger unserer genetischen Informationen kann regelmäßig durch verschiedene exogene und endogene Faktoren geschädigt werden. Zu den exogenen Einflüssen zählen ionisierende Strahlung, Zytostatika und auch Metallverbindungen, während endogene Faktoren wie ROS, Replikationsfehler und Basenverluste die DNA schädigen können. Zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität stehen dem menschlichem Organismus komplexe DNA-Reparatursysteme zur Verfügung. Die Art des DNA-Schadens entscheidet über das anzuwendende Reparatursystem, wobei Basenfehlpaarungen in der DNA durch die *mismatch repair*, oxidative Schäden durch die Basenexzisionsreparatur und Helix-verzerrende Strukturen durch die Nukleotidexzisionsreparatur behoben werden (zusammengefasst in Christmann *et al.* 2003).

Zu den schwerwiegendsten Schäden gehören DNA-DSB, da sie meist für erhebliche Effekte, wie beispielsweise Austausch und Brüche in Chromosomen, und für den Zelltod verantwortlich sind. Eine funktionierende Reparatur dieser Schäden ist aufgrund dessen essentiell (zusammengefasst in Christmann *et al.* 2003 und Lieber 2010).

2.1 Bedeutung von DNA-Doppelstrangbrüchen

Durch das Ablufen von zellulären Mechanismen entstehen jeden Tag etwa 10 bis 50 DNA-DSB pro Zelle. Beispielsweise kann durch die Generierung von ROS, welche während der oxidativen Phosphorylierung entstehen, die DNA geschädigt werden. Dabei werden vor allem DNA-Einzelstrangbrüche induziert. Nicht-reparierte DNA-Einzelstrangbrüche können während der Replikation zu DNA-DSB umgesetzt werden. Zusätzlich können auch Replikationsstörungen an geschädigter DNA zu DNA-DSB führen. Außerdem können Fehlfunktionen in Kernproteinen, wie beispielsweise der Topoisomerase, zu DNA-DSB führen. Ein weiterer möglicher Mechanismus zur Schädigung der DNA, stellt ionisierende Strahlung als exogener Faktor dar. Des Weiteren kann mechanischer Stress an der DNA in DNA-DSB resultieren (Mori *et al.* 2018, zusammengefasst in Lieber 2010 und Mladenov und Iliakis 2011).

Diese schwerwiegenden Effekte können zur Genotoxizität beitragen, da bei einem DNA-DSB Sequenzinformationen verloren gehen können. Zudem könnte eine Reparatur durch eine räumliche Trennung der DNA-DSB-Enden erschwert werden. Die Folge sind Chromosomenbrüche und -austausch, wobei die Zelle den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten kann. Können

DNA-DSB nicht fehlerfrei repariert werden, führt dies zu genetischen Mutationen und trägt zur Kanzerogenese bei (zusammengefasst in van Gent *et al.* 2001, Lieber 2010).

2.2 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Die Hauptreparaturmechanismen von DNA-DSB sind das NHEJ sowie die HR. Als *backup-pathways* können zusätzlich das SSA bei einer HR-Defizienz und des MMEJ bei einer nicht funktionsfähigen NHEJ bzw. HR ablaufen (zusammengefasst in Lieber 2010).

2.2.1 Nicht-homologes *Endjoining* (NHEJ)

Der Großteil der entstehenden DNA-DSB wird durch das NHEJ repariert, da dieser Weg in jeder Zellzyklusphase ablaufen kann und keine Homologien zur Reparatur benötigt. Ein Nachteil des NHEJ stellt jedoch die Fehleranfälligkeit dar. Durch die Wiederverknüpfung der DNA-Enden ohne Vorlage sind Deletionen, Insertionen sowie Fehlverknüpfungen möglich, weshalb dieser Reparaturweg meist fehlerbehaftet ist (zusammengefasst in Christmann *et al.* 2003 und Lieber 2010).

In Abbildung 2.1 ist der schematische Ablauf des NHEJ dargestellt. Entsteht ein DNA-DSB durch exogene oder endogene Faktoren, wird die Proteinkinase *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) durch Autophosphorylierung aktiviert, wobei ATM für die Schadenserkenung und die Aktivierung von weiteren Proteinen unerlässlich ist. Anschließend wird der Ku70-Ku80-Komplex mobilisiert und an die Enden der DNA transportiert. Der Komplex Ku70-Ku80 schützt dabei die DNA-Enden vor dem Abbau durch Exonukleasen und rekrutiert weitere Proteine. Hierzu gehört die Proteinkinase DNA-PK, dessen katalytische Untereinheit (DNA-PK_{CS}) an den Komplex bindet und mit diesem ein Holoenzym bildet. Zusammen stabilisiert dieser Proteinkomplex die DNA-Enden bis zur Ligation. DNA-Enden mit Überhängen müssen vor der Verknüpfung prozessiert werden. Hierfür wird der Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN)-Komplex verwendet. Dieser setzt sich aus den drei Proteinen Mre11, Rad50 sowie Nbs1 zusammen. Mre11 besitzt eine Exonuklease-Aktivität, welche die DNA-Enden schneidet. Abschließend wird *X-ray repair cross complementing 4* (XRCC4) durch das Holoenzym (Ku70-Ku80 und DNA-PK_{CS}) aktiviert und bildet mit der Ligase(IV) (LigIV) einen Komplex zur Ligation der DNA-Enden (zusammengefasst in Christmann *et al.* 2003, Ohnishi *et al.* 2009 und Lieber 2010 sowie Chang *et al.* 2017).

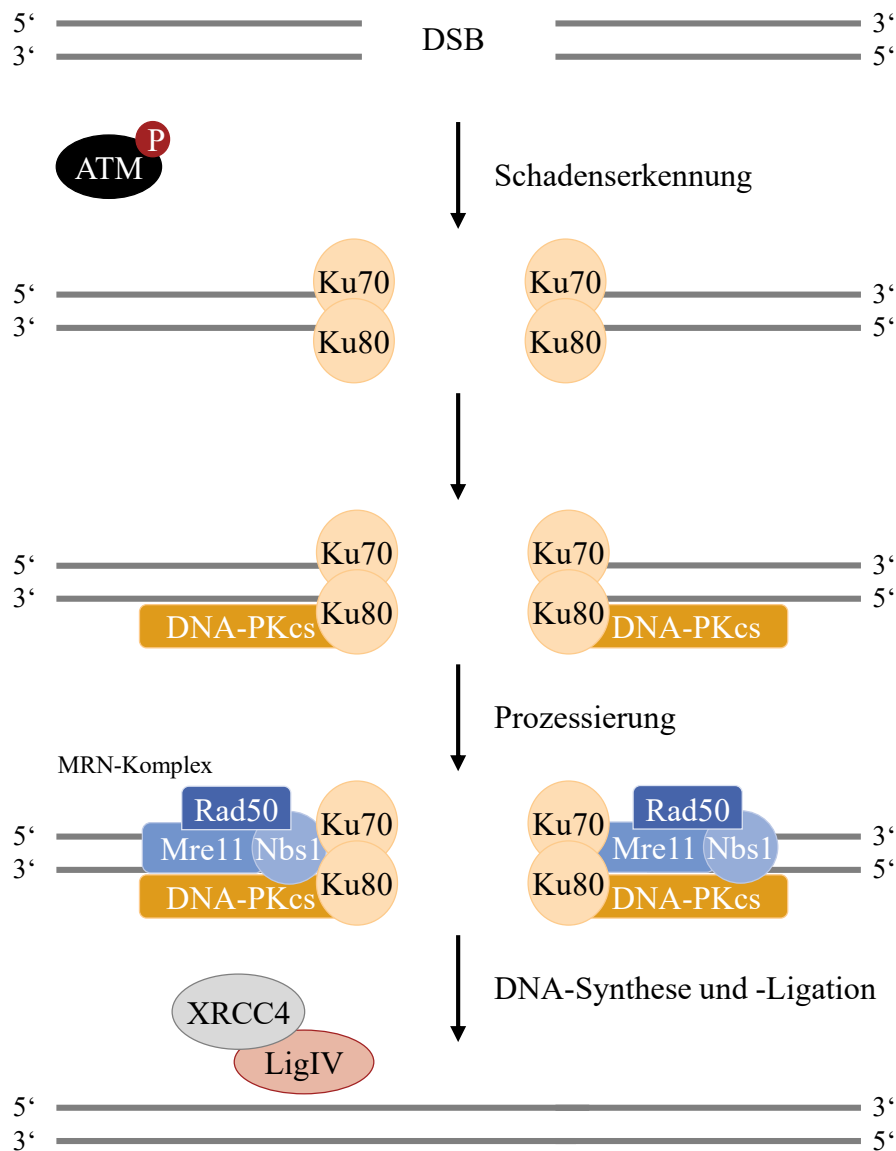


Abbildung 2.1: Schematischer Ablauf des nicht-homologen Endjoining (NHEJ). *Ataxia telangiectasia mutated* (ATM) wird autophosphoryliert und dadurch aktiviert. Der Komplex Ku70-Ku80 bindet an die Enden der DNA und rekrutiert weitere Proteine. Die katalytische Untereinheit der DNA-Proteinkinase (DNA-PK_{CS}) bindet an den Ku-Komplex und stabilisiert die DNA-Enden bis zur Ligation. Zur Vorbereitung auf die Ligation der DNA-Enden wird der Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN)-Komplex benötigt. Abschließend werden *X-ray repair cross complementing 4* (XRCC4) sowie die Ligase(IV) (LigIV) aktiviert und die DNA-Enden verknüpft (modifiziert nach Christmann *et al.* 2003).

2.2.2 Homologe Rekombination (HR)

Der Reparaturweg der HR stellt eine nahezu fehlerfreie Reparatur von DNA-DSB dar, da hierbei die homologen Sequenzen des Schwesterchromatids als Vorlage für den Einbau von Nukleotiden in den DNA-DSB dienen. Nachteilig an diesem Reparaturweg ist, dass dieser aufgrund des Schwesterchromatids nur in bestimmten Zellzyklusphasen stattfinden kann. Das Chromatid wird in der S-Phase des Zellzyklus synthetisiert und steht somit nur in der späten S- sowie G₂-Phase zur Verfügung. Zudem führt ein Fehler in der Homologie ebenfalls zu einer fehlerhaften Reparatur (zusammengefasst in Lieber 2010).

Abbildung 2.2 zeigt den schematischen Ablauf der HR. Die Autophosphorylierung von ATM sowie die Bindung des MRN-Komplex an die DNA-Enden initiieren die HR. Dabei ist die Prozessierung der DNA-Enden zur Entstehung von 3'-Überhängen erforderlich. Diese Überhänge werden durch einen Komplex, bestehend aus Rad52 und *carboxyterminal binding protein interaction protein* (CtIP), stabilisiert (Sartori *et al.* 2007, zusammengefasst in San Filippo *et al.* 2008). Anschließend wird *breast cancer 1* (BRCA1) durch ATM phosphoryliert und somit aktiviert. Das Protein interagiert mit *partner and localizer of BRCA2* (PALB2) und *breast cancer 2* (BRCA2) zu einem Komplex, welcher für die Beladung des 3'-Überhanges mit Rad51-Monomeren zuständig ist. Rad51 bildet am Überhang ein Nukleoproteinfilament mit Rad51-Paralogen (Rad51B, C, D, sowie XRCC2 und XRCC3) aus (Sy *et al.* 2009, zusammengefasst in Powell und Kachnic 2003). Dieses Filament dringt unter Zuhilfenahme von Rad54 in das Schwesterchromatid ein. Dabei ist das Protein Rad54 für die Suche nach der homologen Sequenz sowie der Stabilisation von Rad51 verantwortlich. Zusätzlich ist Rad54 durch seine Adenosintriphosphatase (ATPase)-Aktivität in der Lage, die DNA zu entwinden und eine sogenannte D-Loop-Formation auszubilden (zusammengefasst in Mazin *et al.* 2010). Abschließend wird durch die DNA-Polymerase δ der fehlende DNA-Strang neu synthetisiert und durch die DNA-Ligase verknüpft. Dabei bildet sich eine *Holliday-Junction*-Struktur aus, welche in ein *Crossing-Over*- beziehungsweise *Non-Crossing-Over*-Produkt aufgelöst wird. Das *Crossing-Over*-Produkt zeigt hierbei einen DNA-Sequenz-Austausch zwischen den Chromatiden, während das *Non-Crossing-Over*-Produkt keine Abschnitte tauscht. Durch eine erfolgreiche Reparatur von DNA-DSB durch die HR entstehen zwei identische DNA-Helices (Mazin *et al.* 2000, zusammengefasst in Jackson 2002, Christmann *et al.* 2003 und Ohnishi *et al.* 2009 sowie Prakash *et al.* 2015).

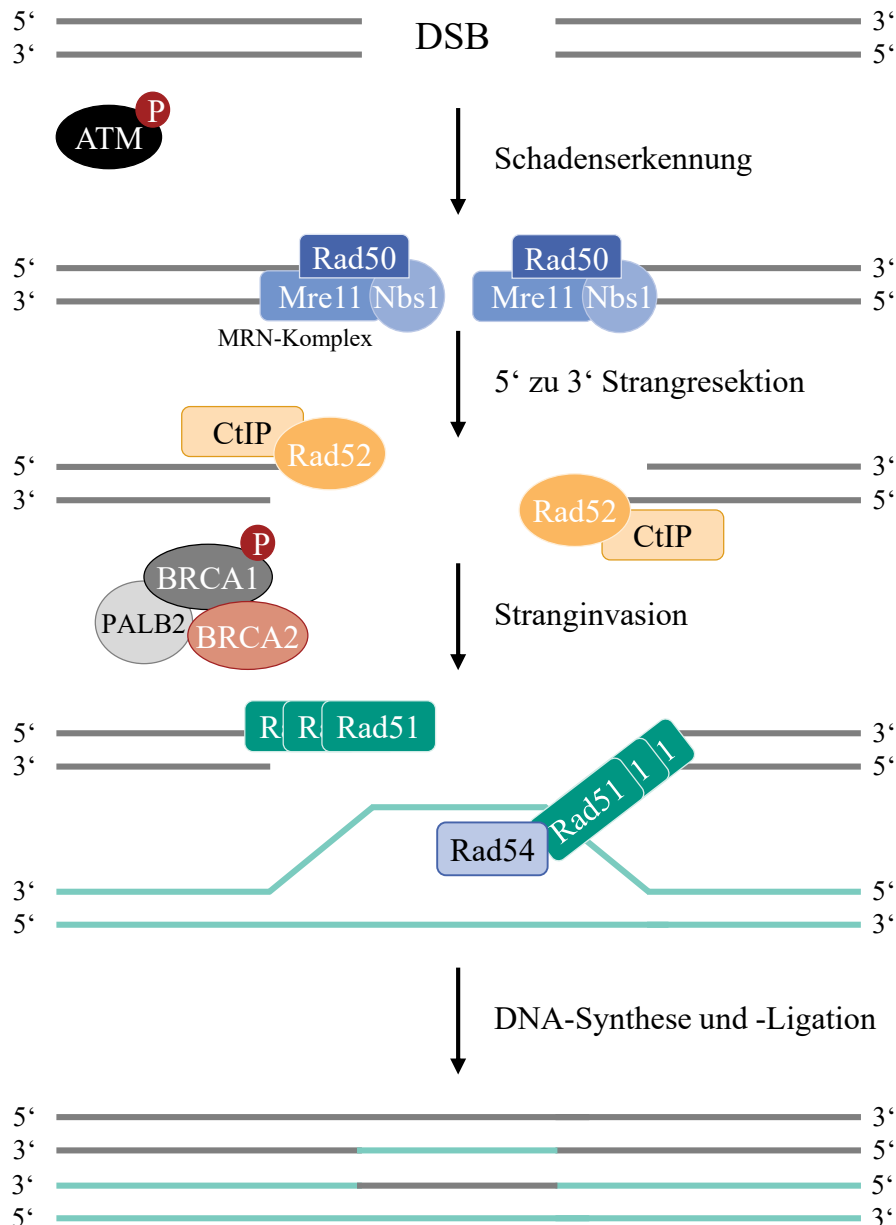


Abbildung 2.2: Schematischer Ablauf der homologen Rekombination (HR). Die initialen Schritte der HR sind die Bindung des Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN)-Komplexes an den DNA-Doppelstrangbruch (DNA-DSB) sowie die Autophosphorylierung von *ataxia telangiectasia mutated* (ATM). Die durch den MRN-Komplex gebildeten 3'-Überhänge werden von Rad52 sowie *carboxyterminal binding protein interaction protein* (CtIP) stabilisiert. ATM phosphoryliert *breast cancer 1* (BRCA1), welches im Komplex mit *breast cancer 2* (BRCA2) und *partner and localizer of BRCA2* (PALB2) die Monomere von Rad51 an den DNA-DSB rekrutiert. Das Rad51-Filament dringt unter Zuhilfenahme von Rad54 in die homologe Sequenz ein. Es folgt die DNA-Synthese und -Ligation, wobei zwei intakte DNA-Helices entstehen (modifiziert nach Christmann *et al.* 2003).

2.2.3 *Single Strand Annealing (SSA)*

Ein weiterer homologer Reparaturweg für DNA-DSB stellt das SSA dar. Das SSA wird insbesondere bei der Inhibierung der HR initiiert, wodurch eine Funktion als *backup-pathway* vermutet wird. Nachteilig hierbei ist jedoch, dass dieser Reparaturweg im Vergleich zur HR fehlerbehaftet ist. Für die Reparatur eines DNA-DSB über das SSA werden, wie bei der HR, homologe Sequenzen benötigt, jedoch greift das SSA nicht auf das Schwesterchromatid als Vorlage zurück. Als repetitive Sequenzen werden mehr als 25 Basenpaare, welche sich vor und nach dem DNA-DSB befinden, verwendet. Die Abschnitte zwischen den Homologien und dem DNA-DSB gehen dabei verloren. Aufgrund dessen kann dieser Reparaturweg zu Deletionen von mehr als 100 Basenpaaren und somit zum Verlust an genetischen Informationen führen. Zudem zeigt das SSA, wie die HR, eine Zellzyklusphasen-abhängige Reparatur in der späten S- sowie G2-Phase, wobei dies ebenfalls für ein *backup* von einer nicht funktionsfähigen HR spricht (zusammengefasst in Morriscal 2015 und Mladenov *et al.* 2016 sowie Bhargava *et al.* 2016).

Abbildung 2.3 zeigt den schematischen Ablauf des SSA. Die initialen Schritte des SSA sind, wie bei der HR, die Autophosphorylierung von ATM sowie die Bindung des MRN-Komplex und die damit verbundene Resektion der DNA-Enden. Faktoren, die die Endresektion hemmen, unterdrücken gleichzeitig das SSA. Hierzu zählt 53BP1, welches die Reparatur mittels NHEJ fördert. Die entstandenen 3'-Überhänge werden anschließend mit *replication protein A* (RPA) beladen. Außerdem binden Rad52 und CtIP zur Unterstützung an die 3'-Überhänge. Unterschiede zur HR zeigen sich in der DNA-Synthese, wobei das SSA zunächst über Rad52 die homologen Sequenzen der DNA-Stränge verbindet. Hierfür gleiten die einzelsträngigen DNA-Bereiche aneinander vorbei, bis Homologien von mindestens 25 Nukleotiden auftreten, an welcher die Basenpaarung über Wasserstoffbrückenbildung stattfinden kann. Im Gegensatz zur HR ist das SSA nicht von Rad51 abhängig. Im Anschluss bildet *excision repair cross complementing 1* (ERCC1) zusammen mit der Endonuklease *xeroderma pigmentosum F* (XPF) einen Komplex, welcher für den Abbau der nicht-homologen 3'-Überhänge verantwortlich ist. XPF besitzt eine Nukleasedomäne, welche durch die Bindung von ERCC1 katalytisch aktiviert wird. Zusätzlich verstärkt Rad52 die Nuklease-Aktivität des Komplexes. Nach der Entfernung der 3'-Überhänge werden über eine DNA-Polymerase die fehlenden Basen eingesetzt und abschließend über die Ligase(I) (LigI) die DNA-Enden verknüpft (Marlis *et al.* 2009, zusammengefasst in Mladenov *et al.* 2016, Sallmyr und Tomkinson 2018).

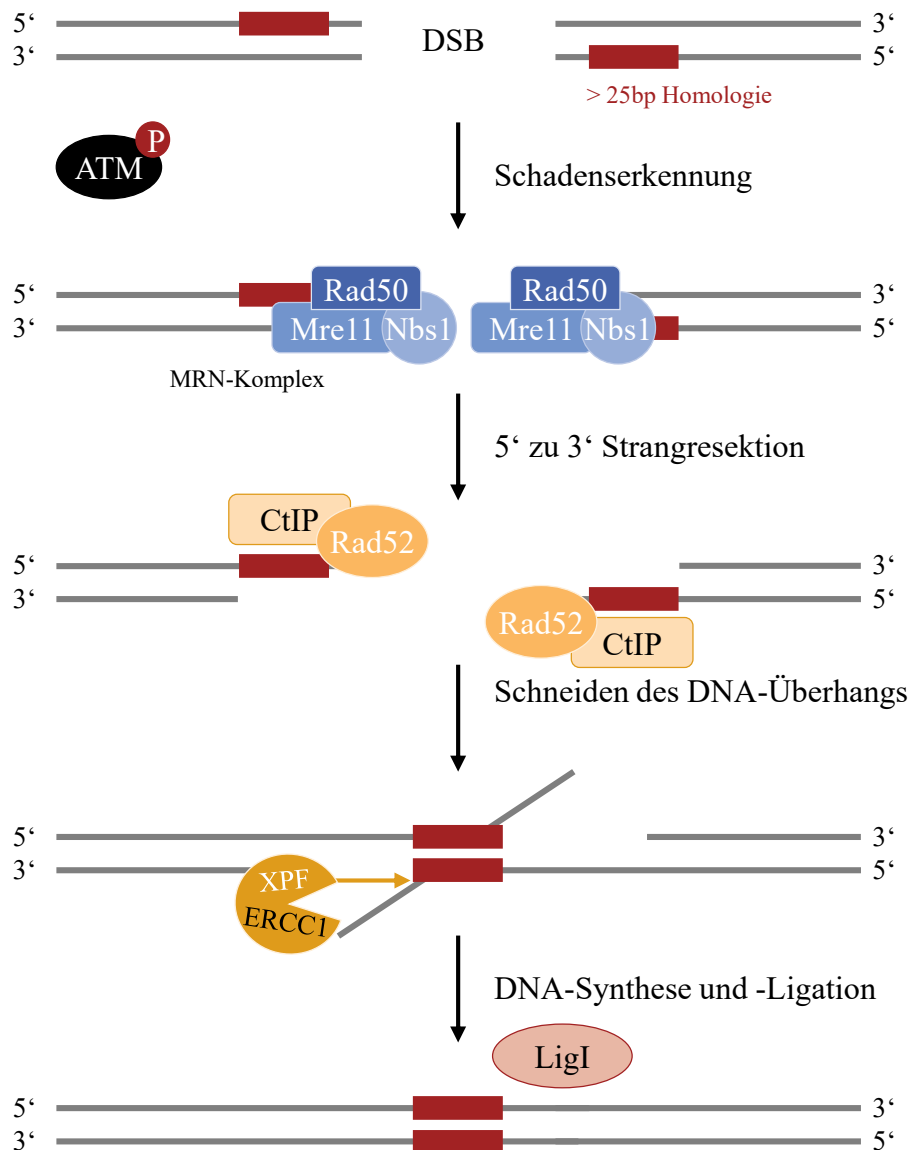


Abbildung 2.3: Schematischer Ablauf des Single Strand Annealing (SSA). Die initialen Schritte des SSA sind die Autophosphorylierung von *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) sowie die Resektion der DNA-Enden durch den Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN)-Komplex. Zur Stabilisation der entstandenen 3'-Überhänge bindet *carboxyterminal binding protein interaction protein* (CtIP) und Rad52 an die Überhänge. Rad52 verknüpft im Anschluss die homologen Sequenzen des DNA-Stranges. Das Protein *excision repair cross complementing 1* (ERCC1) schneidet im Komplex mit *xeroderma pigmentosum F* (XPF) die nicht-homologen Überhänge und die Ligase(I) (LigI) verknüpft anschließend die DNA-Enden (modifiziert nach Mladenov *et al.* 2016).

2.2.4 *Micro-mediated Endjoining* (MMEJ)

Ebenfalls für die Reparatur von DNA-DSB bekannt ist das MMEJ. Dabei nimmt das MMEJ im Normalzustand der Zelle eine geringe Reparaturkapazität ein. Es wird, wie das SSA, als *backup-pathway* bezeichnet, da das MMEJ beim Verlust der Funktionen des NHEJ bzw. der HR als robuster und effizienter Reparaturweg gilt. Ähnlich zum NHEJ und dem SSA, ist auch das MMEJ fehlerbehaftet. Dabei repariert das MMEJ deutlich langsamer als das klassische NHEJ. Analog zum SSA und der HR werden auch hier homologe Sequenzen des DNA-Stranges miteinander verknüpft, wobei beim MMEJ kürzere Homologien ausreichen. Während das MMEJ übereinstimmende DNA-Abschnitte von 2 bis 20 Basenpaaren benötigt, muss das SSA auf mehr als 25 Basenpaare zurückgreifen. Auch bei der Reparatur mittels MMEJ entsteht somit ein Verlust von Nukleotiden und genetischer Information. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass das MMEJ Zellzyklus-unabhängig agieren kann, jedoch wurde nur eine geringe Aktivität in der G₀/G₁-Phase nachgewiesen. Das MMEJ ist immer mit Deletionen assoziiert, weshalb eine starke Mutagenität von diesem Reparaturweg ausgeht (Xiong *et al.* 2015, zusammengefasst in Mladenov *et al.* 2016, Bhargava *et al.* 2016 und Seol *et al.* 2018 sowie Sallmyr und Tomkinson 2018).

Abbildung 2.4 zeigt den schematischen Ablauf des MMEJ. Das MMEJ wird durch die Bindung von Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) initiiert. Zeitgleich wird ATM autophosphoryliert und das Schadenssignal somit weitergeleitet. PARP-1 konkurriert dabei mit dem Ku70-Ku80-Komplex um die Bindung an die DNA-Enden, wobei allerdings bevorzugt der Ku70-Ku80-Komplex bindet. PARP-1 und ATM sind dabei die initialen Schritte des MMEJ und für die Rekrutierung weiterer Proteine verantwortlich. Die DNA-Endresektion erfolgt über den MRN-Komplex. Zur Unterstützung wird zusätzlich CtIP an die DNA-Enden rekrutiert, wobei 3'-Überhänge entstehen. Die ersten Schritte der Endresektion sind vergleichbar mit der Reparatur über die HR, wobei beim MMEJ eine begrenzte Prozessierung zum Freilegen der Mikrohomologien ausreicht. Das MMEJ richtet unter Verwendung mikrohomologer Sequenzen, von mindestens zwei Basenpaaren, die DNA-Enden vor dem Verbinden aus, verknüpft diese miteinander und baut anschließend die nicht-homologen Überhänge mit Hilfe des ERCC1-XPF-Komplexes ab. Abschließend werden über die Polymerase θ (Pol θ) die fehlenden Nukleotide eingesetzt und mit Hilfe von DNA-Ligasen die DNA-Enden verknüpft (zusammengefasst in Bhargava *et al.* 2016 und Seol *et al.* 2018).

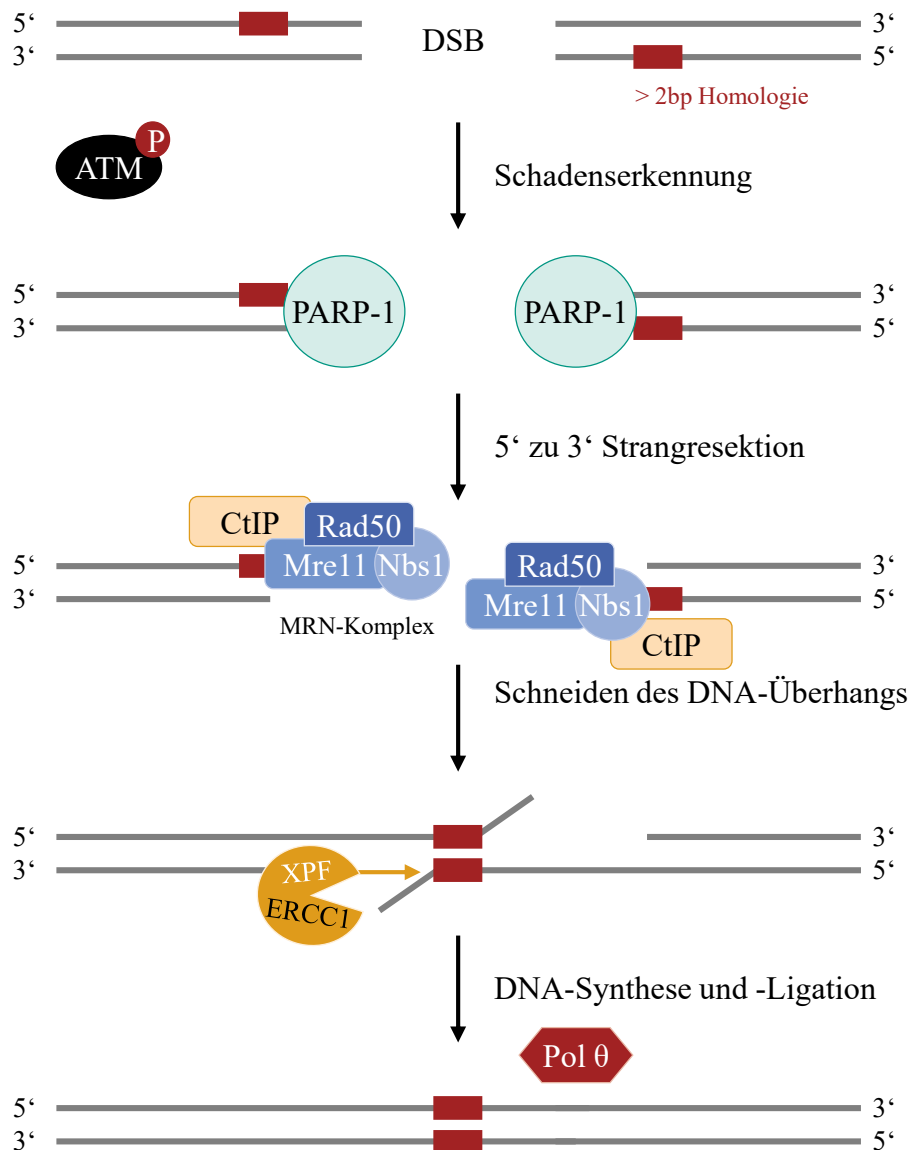


Abbildung 2.4: Schematischer Ablauf des *micro-mediated Endjoining* (MMEJ). Die initialen Schritte des MMEJ sind die Bindung von Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) sowie die Autophosphorylierung von *ataxia telangiectasia mutated* (ATM). Die DNA-Enden werden anschließend durch den Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN)-Komplex und das *carboxyterminal binding protein interaction protein* (CtIP) prozessiert. Daraufhin werden die Mikrohomologien von mindestens zwei Basenpaaren miteinander verknüpft, die Überhänge mit Hilfe von *excision repair cross complementing 1* (ERCC1) und *xeroderma pigmentosum F* (XPF) abgebaut und der DNA-Strang unter Verwendung der Polymerase θ (Pol θ) aufgefüllt (modifiziert nach Seol *et al.* 2018).

2.3 Differenzierung der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur

Mit Hilfe des U2OS-Reporter-Assays (Abbildung 2.5) kann die Funktionalität der verschiedenen DNA-DSB-Reparaturmechanismen HR, NHEJ, SSA und MMEJ überprüft werden. Hierzu sind unterschiedliche Plasmide mit *green-fluorescent protein* (GFP) gekoppelt und in U2OS-Zellen stabil transfiziert. Unter Einsatz des Restriktionsenzym I-SceI können DNA-DSB gezielt induziert und dadurch die verschiedenen Reparaturwege selektiv eingeleitet werden. Das dabei entstehende GFP-Signal kann mittels Durchflusszytometrie (FACS) gemessen werden. Eine Zelllinie des Reporter-Assays ist U2OS-DR-GFP, welche die HR widerspiegelt. Eine weitere Zelllinie stellt die sogenannte U2OS-EJ5-GFP dar, welche das NHEJ repräsentiert. Die Zelllinie U2OS-SA-GFP gibt die Funktion des SSA und die U2OS-EJ2-GFP des MMEJ an.

Für die Reparatur über die HR wurde ein Plasmid in die Zellen transfiziert, welches zwei inaktive GFP-Expressionskassetten enthält. Die vorangestellte GFP-Sequenz wird durch eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym I-SceI unterbrochen, während die nachgeschaltete GFP-Sequenz in 3'-Richtung unvollständig ist und als homologe Vorlage dient. Nach der Induktion des DNA-DSB durch das Restriktionsenzym sowie dem damit verbundenen Ablauf der HR entsteht aktives GFP (Pierce *et al.* 1999, Gunn und Stark 2012). Das Plasmid, welches das SSA repräsentiert, besitzt ebenfalls zwei inaktive GFP-Expressionskassetten. Die vorangestellte GFP-Sequenz ist in 5'-Richtung unvollständig, während die nachgeschaltete GFP-Sequenz in 3'-Richtung unvollständig ist und eine I-SceI Erkennungssequenz enthält. Nach der Induktion des DNA-DSB und der erfolgreichen Reparatur mittels SSA entsteht aktives GFP (Gunn und Stark 2012). Das Plasmid, welches das NHEJ widerspiegelt, enthält eine GFP-Sequenz, welche vom Promoter des Gens getrennt ist und somit die Entstehung von aktivem GFP verhindert. Der Promotor wird durch eine Antibiotika-Resistenz (Puromycin), umgeben von zwei I-SceI Erkennungssequenzen, von der GFP-Sequenz getrennt. Durch das Induzieren von zwei DNA-DSB kann die Puromycin-Sequenz herausgeschnitten und der Promotor an die GFP-Sequenz gebunden werden. Hieraus resultiert aktives GFP (Bennardo *et al.* 2008, Gunn und Stark 2012). Das MMEJ wird über ein Plasmid widerspiegelt, welches aus einer I-SceI Erkennungssequenz, einem Stopcodon und einer vollständigen GFP-Sequenz besteht. Die Erkennungssequenz und das Stopcodon sind von einer Mikrohomologie von 8 Nukleotiden umgeben. Wird durch das Restriktionsenzym ein DNA-DSB geschnitten, kann über die Mikrohomologie das MMEJ ablaufen, wobei das Stopcodon verloren geht. Nach der Reparatur über das MMEJ entsteht aktives GFP (Bennardo *et al.* 2008, Gunn und Stark 2012).

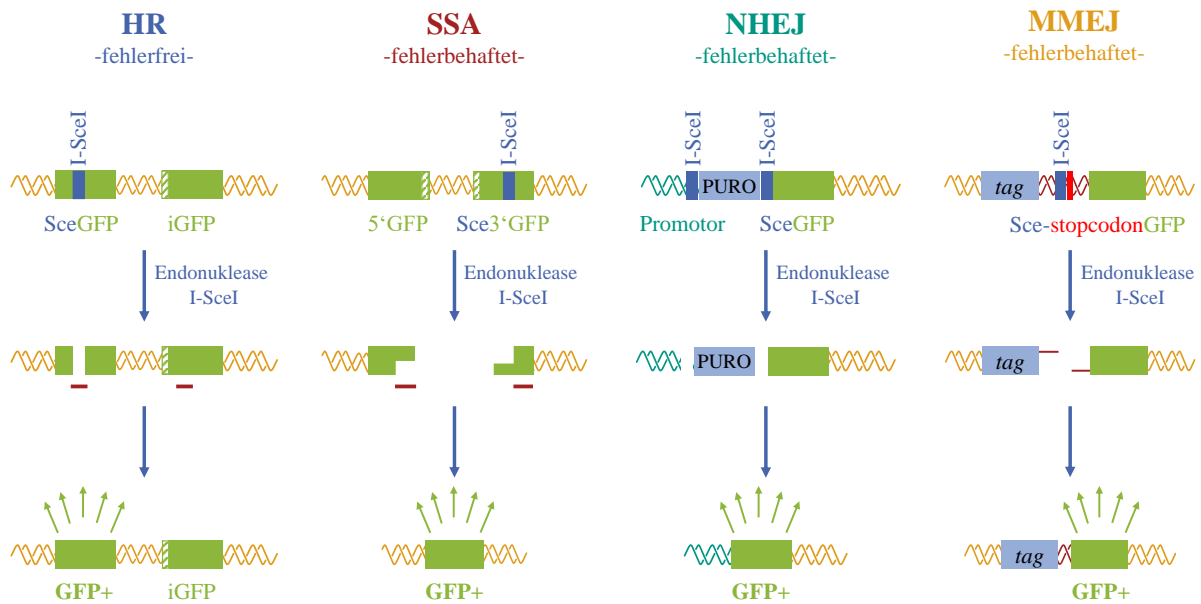


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der vier Reporter-Kassetten. Gezeigt sind die in U2OS stabil transfizierten Plasmide sowie ihr dazugehöriger Reparaturweg. Für die fehlerfreie homologe Rekombination (HR) (links, blau) wurde ein Plasmid, mit einer vom Restriktionsenzym I-SceI unterbrochenen *green-fluorescent protein* (GFP)-Sequenz (SceGFP) und einer in 3'-Richtung unvollständigen GFP-Sequenz (iGFP), generiert. Für das fehlerbehaftete *Single Strand Annealing* (SSA) (mitte links, rot) wurde ein Plasmid, welches eine unvollständige GFP-Sequenz in 5'-Richtung (5'GFP) sowie eine in 3'-Richtung unvollständige und durch I-SceI unterbrochene GFP-Sequenz (Sce3'GFP) beinhaltet, transfiziert. Das fehlerbehaftete nicht-homologe *Endjoining* (NHEJ) (mitte rechts, türkis) zeigt ein Plasmid, bei welchem die GFP-Sequenz vom Promotor durch zwei I-SceI Schnittstellen getrennt ist. Zusätzlich trägt dieses Plasmid zwischen den I-SceI-Sequenzen eine Antibiotika-Resistenz für Puromycin (PURO). Für das ebenfalls fehlerbehaftete *micro-mediated Endjoining* (MMEJ) (rechts, gelb) wurde ein Plasmid mit einer I-SceI Schnittstelle und einem Stopcodon vor der GFP-Sequenz (Sce-stopcodonGFP) entwickelt. Zusätzlich enthält das Plasmid einen Protein-Tag (*tag*). Durch eine transiente Transfektion von I-SceI wird ein DNA-Doppelstrangbruch (DNA-DSB) erzeugt. Kann der, für das entsprechende Plasmid benötigte Reparaturweg erfolgen, entsteht aktives GFP (GFP+), welches mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) gemessen werden kann.

2.4 Proteine der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur

2.4.1 BRCA1

Das Tumorsuppressorgen *BRCA1*, welches auf dem Chromosom 17 lokalisiert ist, codiert für ein gleichnamiges Protein mit einem Molekulargewicht von 220 kDa und 1.863 Aminosäuren. BRCA1 ist an vielen wichtigen zellulären Prozessen zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität beteiligt. Dabei wird das Protein bei der DNA-DSB-Reparatur, der DNA-Replikation, der Chromatinremodellierung und der Ubiquitinierung von Proteinen eingesetzt. Zudem besitzt es als Co-Aktivatoren bzw. Co-Repressor bei der Transkription, bei der Zellzykluskontrolle sowie der Einleitung der Apoptose eine regulierende Funktion. Mutationen im *BRCA1*-Gen sind dabei zu 40 bis 45 % an Tumoren in Brust und Ovarien beteiligt (Miki *et al.* 1994, Mark *et al.* 2005).

In Abbildung 2.6 ist der schematische Aufbau von BRCA1 gezeigt. Das Protein BRCA1 lässt sich in drei Bereiche einteilen. Das N-terminale Ende weist dabei eine *really interesting new gene* (RING)-Domäne auf, bei der zwei Zinkionen über sieben Cysteine und einem Histidin komplexiert werden. Dabei kann diese Domäne mit anderen Ringfingerproteinen interagieren und ein Heterodimer bilden. Das Heterodimer mit dem struktur-ähnlichen Protein *BRCA1-associated RING Domain-1* (BARD1) beispielsweise besitzt eine Ubiquitinligase-Aktivität. Proteine mit diesen Aktivitäten können andere Proteine ubiquitinieren und somit zum Beispiel den Abbau von dem Zellzyklus-Protein Cyclin B signalisieren. Eine Mono-Ubiquitinierung vom Histon H2 kann während der DNA-Reparatur stabilisierend wirken (Miki *et al.* 1994, zusammengefasst in Irminger-Finger *et al.* 2016). Der zentrale Bereich des Proteins stellt eine indirekte DNA-Bindungsstelle dar. Die Domäne ist für eine Interaktion mit Proteinen wie PALB2 und BRCA2 zuständig. Dabei bildet PALB2 mit den Proteinen BRCA1 und BRCA2 einen Komplex, welcher wiederum für die Rekrutierung von Rad51 an den DNA-DSB verantwortlich ist. Zudem wird BRCA1 im zentralen Bereich durch ATM phosphoryliert und somit aktiviert. Ebenfalls in der zentralen Domäne sind *nuclear localization signal*- sowie *coiled-coil*-Bereiche, welche für den Kerntransport und die Bindung weiterer Proteine wichtig sind (zusammengefasst in Powell und Kachnic 2003 und Prakash *et al.* 2015 sowie Jiang und Greenberg 2015). Am C-terminalen Ende des Proteins befinden sich zwei tandem-förmige *BRCA1 carboxy terminus* (BRCT)-Domänen, welche vor allem als Protein-Protein-Interaktionen sowie als indirekte DNA-Bindungsstelle fungieren (Mark *et al.* 2005, zusammengefasst in Powell und Kachnic 2003, Yu *et al.* 2003 und Rosen 2013 sowie Jiang und Greenberg 2015).

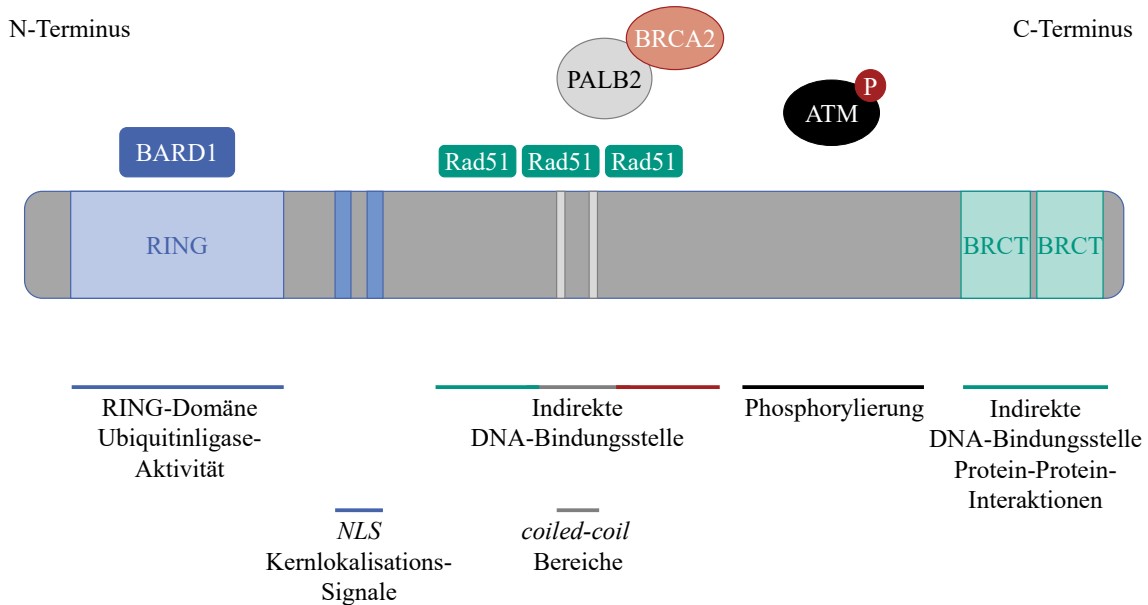


Abbildung 2.6: Schematischer Aufbau von *breast cancer 1* (BRCA1). Der N-terminalen Bereich weist eine *really interesting new gene* (RING)-Domäne auf. Sie kann mit anderen Ringfingerproteinen, wie *BRCA1-associated RING Domain-1* (BARD1) interagieren, wobei Heterodimere mit Ubiquitinligase-Aktivität entstehen. Im zentralen Bereich sind zwei Kernlokalisations-Signale (NLS - *nuclear localization signal*) sowie indirekte DNA-Bindungsstellen über Proteine der DNA-Schadensantwort und *coiled-coil*-Bereiche zu finden. Auch die Aktivierung des Proteins über Phosphorylierung durch *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) erfolgt in diesem Bereich. Im C-terminalen Bereich sind die *BRCA1 carboxy terminus* (BRCT)-Domänen für Protein-Protein-Interaktionen vorhanden (modifiziert nach Rosen 2013).

2.4.2 Rad51

Das Gen *Rad51*, welches auf dem Chromosom 15 lokalisiert ist, codiert für ein gleichnamiges Protein mit einem Molekulargewicht von 39 kDa und 339 Aminosäuren. Dabei zeigt Rad51 wichtige Funktionen in der Zellproliferation und der homologen Rekombination. In der HR baut es am 3'-Überhang ein Nukleoproteinfilament auf, welches zur Stabilisation des Überhangs beiträgt und später in das Schwesterchromatid eindringt. Mutationen im *Rad51*-Gen werden häufig mit Brusttumoren in Verbindung gebracht (Aihara *et al.* 1999).

In Abbildung 2.7 ist der schematische Aufbau des Rad51-Proteins dargestellt. Der N-terminale Bereich des Proteins stellt eine indirekte DNA-Bindungsstelle für das Protein BRCA2 dar. Dabei ist BRCA2 für die Rekrutierung von Rad51-Monomeren an den 3'-Überhang erforderlich und unter-

stützt somit die Ausbildung des Nukleoproteinfilaments. Das Filament wird durch fünf Thiolgruppen gebildet, welche aus den Aminosäuren der Cysteine im Proteinrückgrat stammen (Baumann *et al.* 1996, Aihara *et al.* 1999). Im zentralen Bereich des Proteins befindet sich ein Walker A- sowie ein Walker B-Motiv. Diese Motive sind für die Bindung von Phosphat verantwortlich und besitzen ATPase-Aktivität. Sie unterstützen unter Energieaufwand die Ausbildung des helikalen Nukleoproteinfilaments mit Rad51-Paralogen (Rad51B, C, D, sowie XRCC2 und XRCC3) (Wiese *et al.* 2006). Der C-terminale Bereich zeichnet sich durch eine *nuclear matrix targeting signal* (NMTS)-Region aus, welche für den Transport in den Kern zuständig ist. Zusätzlich sind diese Regionen direkte DNA-Bindungsstellen (Modesti *et al.* 2007, Mladenov *et al.* 2009, Hilario *et al.* 2009).

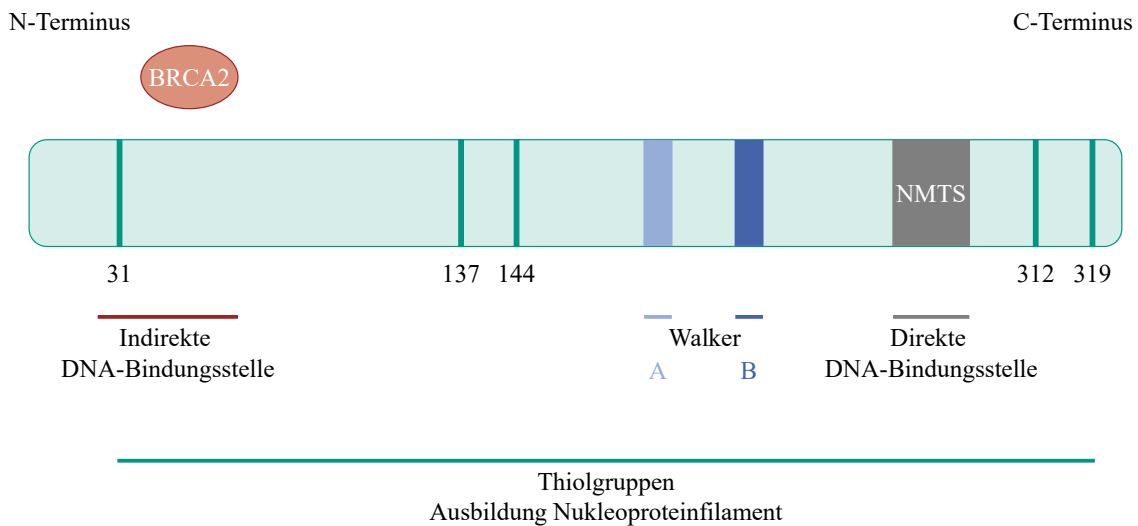


Abbildung 2.7: Schematischer Aufbau von Rad51. Der N-terminale Bereich stellt eine indirekte DNA-Bindungsstelle über *breast cancer 2* (BRCA2) dar. Dabei ist BRCA2 für die Rekrutierung von Rad51 an den DNA-Doppelstrangbruch (DNA-DSB) verantwortlich. Im zentralen Bereich befindet sich eine Walker-A- sowie Walker-B-Region, welche über Adenosintri-phosphatase (ATPase)-Aktivität verfügen und Rad51-Paraloge an den DNA-DSB lagern. Im C-terminalen Bereich befindet sich eine *nuclear matrix targeting signal* (NMTS)-Region, welche für den Kerntransport zuständig ist und als direkte DNA-Bindungsstelle dient. Im gesamten Protein verteilt sind weiterhin fünf Cysteine mit zugänglichen Thiolgruppen, wobei diese zur Ausbildung des Nukleoproteinfilaments beitragen (modifiziert nach Modesti *et al.* 2007, Mladenov *et al.* 2009).

2.4.3 Rad54

Das *Rad54*-Gen, welches auf dem Chromosom 1 lokalisiert ist, codiert für ein gleichnamiges Protein mit einem Molekulargewicht von 84 kDa und 747 Aminosäuren. Rad54 ist an wichtigen Prozessen in der Reparatur von DNA-DSB sowie in der DNA-Replikation beteiligt. Mutationen in *Rad54* können zu Tumoren führen, wobei vor allem die Brust, die Prostata und das Lymphgewebe betroffen sind (Rasio *et al.* 1997, zusammengefasst in Mazin *et al.* 2010).

Abbildung 2.8 zeigt den schematischen Aufbau von Rad54. Rad54 gehört zu den Helikasen der *super family 2*, welche unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) für die Entwindung der DNA zuständig sind. Dabei weist Rad54 sieben Bereiche mit den für diese Helikasen klassischen Strukturen auf, welche für Konformationsänderungen innerhalb des Proteins und somit für die mechanische Bewegung von Rad54 verantwortlich sind. Durch diese Domänen wird die Fortbewegung von Rad54 am DNA-Strang gewährleistet, wobei je Minute und Rad54 Protein in etwa 1.000 ATP Moleküle verbraucht werden. Typische DNA-Helikasen weisen an einzelsträngiger DNA verstärkte ATPase-Aktivität auf, während Helikasen der *super family 2* dies vor allem an doppelsträngiger DNA zeigen. Im zentralen Bereich des Proteins befinden sich zwei helikale Domänen, die zur Trennung der DNA-Stränge sowie für die Rückbildung der Chromatinstruktur zuständig sind. Die Funktionen von Rad54 sind essentiell für die Reparatur von DNA-DSB mittels HR. Hierbei bietet der zentrale Bereich des Proteins die Möglichkeit, die homologe Sequenz im Schwesterchromatid zu erkennen und die DNA in diesem Bereich zu entwinden. Anschließend dringt das aus Rad51-Monomeren bestehende Nukleoproteinfilament in diese DNA-Sequenz ein, wodurch die für die HR wichtigen D-Loop-Strukturen durch Rad54 ausgebildet werden können (Thoma *et al.* 2005, Agarwal *et al.* 2011, Deakyne *et al.* 2013). Rad54 stabilisiert während des gesamten Vorganges das ausgebildete Nukleoproteinfilament und baut es im Anschluss an die Stranginvasion wieder ab. Eine bedeutende Rolle spielt hierbei insbesondere das N-terminale Ende von Rad54, da es für die Bindung von Rad51 verantwortlich ist (Mason *et al.* 2015, zusammengefasst in Heyer *et al.* 2006 und Mazin *et al.* 2010). Das C-terminale Ende von Rad54 weist eine Zink-bindende Struktur auf, welcher Zink über zwei Histidine und zwei Cysteine komplexiert. Diese Region ist für die Stabilisierung des gesamten Rad54 Proteins verantwortlich (zusammengefasst in Mazin *et al.* 2010).

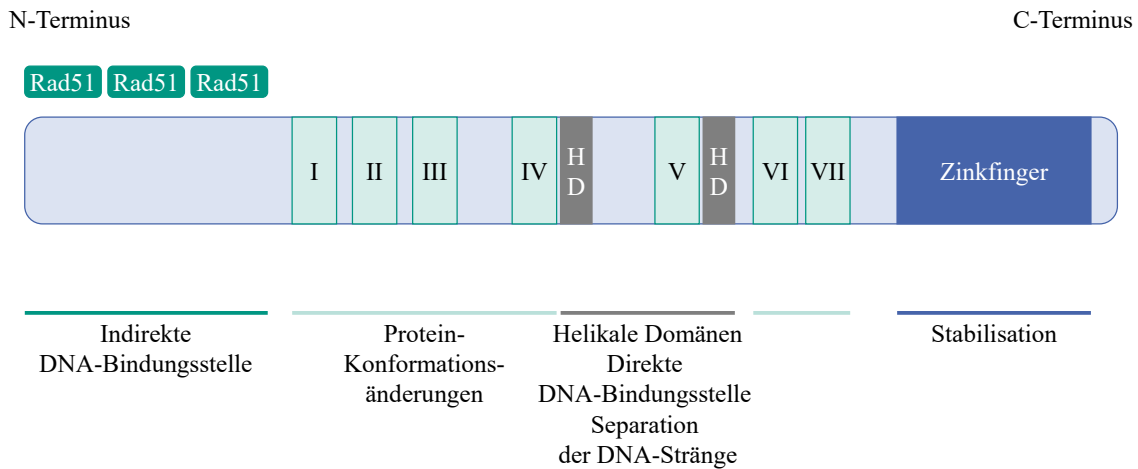


Abbildung 2.8: Schematischer Aufbau von Rad54. Rad54 gehört zu den *super family 2* (SF2)-Helikasen, welche unter Energieverbrauch die DNA entwinden. Das N-terminale Ende ist für die Bindung von Rad51 zuständig. Im zentralen Bereich befinden sich sieben für Helikasen klassische Strukturen, welche für die Entwindung der DNA verantwortlich sind. Zusätzlich sind zwei helikale Domänen (HD) vorhanden, welche zur Trennung der DNA-Stränge während der HR benötigt werden. Am C-terminalen Ende befindet sich eine Zinkfinger-Struktur zur Stabilisation des gesamten Proteins (modifiziert nach Mazin *et al.* 2010).

2.4.4 DNA-Polymerase θ

Das Gen *POLQ*, welches auf dem Chromosom 3 lokalisiert ist, codiert für die DNA-Polymerase θ , die ein Molekulargewicht von 290 kDa und 2.590 Aminosäuren aufweist. Die Polymerase θ ist vor allem an der DNA-Reparatur beteiligt, wobei ihre Funktion in der Verknüpfung der DNA-Enden über Mikrohomologien beim Reparaturweg des MMEJ liegt. Dabei zählt die Polymerase θ zu den *error-prone* Polymerasen, welche eine geringe Genauigkeit bei der DNA-Verknüpfung aufzeigen. Es konnte bereits in einigen Studien gezeigt werden, dass die Mutationsrate durch eine Überexpression der Polymerase θ steigt. Zudem zeigt eine HR-Defizienz in Tumorzellen eine erhöhte Expression der *POLQ*. Dies lässt vermuten, dass die genomische Stabilität durch ein verstärkt ablaufendes MMEJ mit dieser fehlerbehafteten Polymerase beeinträchtigt ist. Zudem führten Mutationen im *POLQ*-Gen zu Tumorbildungen in der Brust (Ceccaldi *et al.* 2015, Black *et al.* 2019, zusammengefasst in Wood und Doublet 2016 und Beagan und Mcvey 2016).

Abbildung 2.9 zeigt den schematischen Aufbau der Polymerase θ . Die Struktur der Polymerase θ ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. Das N-terminale Ende der Polymerase besitzt eine Helikase Domäne mit Walker A- und Walker B-Motiven, welche ATP-Bindungsstellen darstellen. Dieser Bereich ist für die Entwindung der DNA unter Energieverbrauch zuständig. Ebenfalls im N-terminalen sowie im zentralen Bereich der Polymerase sind drei Rad51-Bindungsstellen zu finden, wobei über die Bindung von Rad51 die HR inhibiert werden kann. Ein erhöhtes Aufkommen der Polymerase θ führte zu einer verstärkten Bindung von Rad51 an die Polymerase, wodurch ein Aufbau des Nukleoproteinfilaments am DNA-Strang verhindert wurde (Ceccaldi *et al.* 2016). Es scheint eine inverse Korrelation zwischen dem Ablauf der HR und der Reparatur mit Hilfe des MMEJ vorzuliegen. Dabei ist dieser Zusammenhang möglicherweise auf die zuvor beschriebene Interaktionen der Polymerase θ mit Rad51 zurückzuführen (Ceccaldi *et al.* 2016). Der zentrale Bereich der Polymerase hingegen ist unstrukturiert und wenig erforscht. Der C-terminale Bereich besteht aus der Polymerase Domäne, welche für den Einbau der Nukleotide und die DNA-Verknüpfung zuständig ist. Dabei wird die DNA in 5'-3'-Richtung synthetisiert. Zudem ist eine inaktive 5'-3'-Exonuklease-Funktion in einer separaten Domäne enthalten (Black *et al.* 2019, zusammengefasst in Wood und Double 2016 und Beagan und Mcvey 2016).

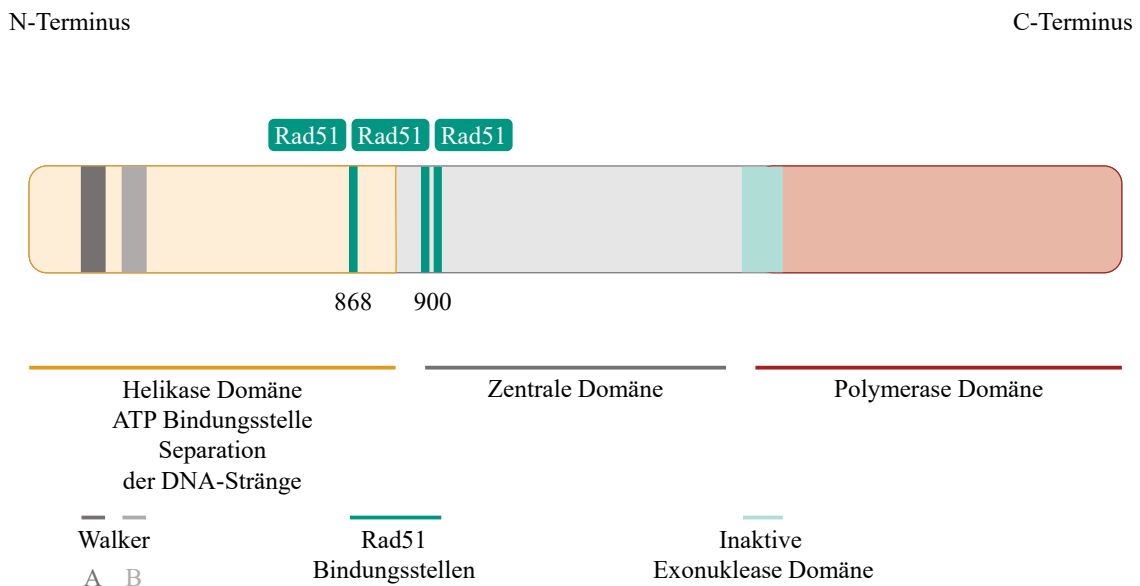


Abbildung 2.9: Schematischer Aufbau der Polymerase θ . Das N-terminale Ende zeigt eine Helikase Domäne mit Walker-A- und Walker-B-Regionen, welche Adenosintriphosphat (ATP)-Bindungsstellen aufweisen und unter Verbrauch von ATP die DNA entwinden können. Zudem sind im N-terminalen und zentralen Bereich Rad51-Bindungsstellen vorhanden. Der zentrale Bereich ist unstrukturiert und wenig erforscht. Der C-terminale Bereich besteht aus der Polymerase Domäne, welche zur DNA-Synthese benötigt wird. Zudem ist eine inaktive Exonuklease Domäne im C-terminalen Bereich vorhanden (modifiziert nach Black *et al.* 2019).

2.5 Mangan

Mangan ist ein essentielles Spurenelement, welches ubiquitär in elf verschiedenen Oxidationsstufen (-III bis +VII) vorkommt. Mangan ist dabei in Verbindung mit anderen Elementen vorzufinden, wobei Sauerstoff, Schwefel und Chlor die Hauptbindungspartner darstellen. Das Metall ist das zehnt-häufigste Element in der Erdkruste, die im Durchschnitt einen Gehalt von 0,1 % Mangan besitzt. Der Einsatz des Metalls erstreckt sich von der Stahlindustrie über die Herstellung von Batterien bis hin zum Einsatz als Antiklopfmittel in Kraftstoffen. Zudem ist Mangan als Bestandteil in Herbiziden und Fungiziden wie Mancozeb enthalten (Bader *et al.* 1999, Cowan *et al.* 2009, zusammengefasst in Yokel 2009). Beruflich exponierte Menschen in der Stahlindustrie nehmen Mangan vor allem als Metallstaub über die Lunge auf, während der Großteil der Allgemeinbevölkerung das Spurenelement über die Nahrung aufnimmt. Hierbei sind hohe Gehalte von Mangan in Getreide, Nüssen, Reis und vor allem in Teeblättern vorzufinden. Die über die Nahrung aufgenommene Menge wird im Verdauungstrakt zu etwa 3 bis 8 % resorbiert. In einem normalen zellulären Zustand unterliegt Mangan einer homöostatischen Regulation, welche ein funktionierendes Gleichgewichtssystem zwischen der Aufnahme und Ausscheidung im Körper darstellt. Diese Regulation kann durch erhöhte Exposition des Spurenelements sowie durch andere Elemente wie Eisen gestört werden. Aufgrund der ähnlichen chemischen Eigenschaften von Mangan und Eisen nutzen die beiden Metalle denselben Resorptionsweg. Die Aufnahme in die Zelle wird über den *divalent metal transporter-1* (DMT-1) im Darm gesteuert, während die anschließende Verteilung im Körper über Transferrin erfolgt. Demzufolge besteht eine inverse Korrelation zwischen der Aufnahme von Eisen und Mangan (zusammengefasst in Garrick *et al.* 2006, Fitsanakis *et al.* 2010 und Chen *et al.* 2018 sowie Bjørklund *et al.* 2020).

Das essentielle Spurenelement Mangan ist an vielen zellulären Reaktionen des menschlichen Organismus beteiligt. Dabei sind insbesondere die Oxidationsstufen +II und +III von Bedeutung, wobei dreiwertiges Mangan vor der Aufnahme zu zweiwertigem Mangan reduziert wird. Mangan wird vor allem in Prozessen des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels sowie beim Knochenaufbau benötigt. Zudem ist es für das Immunsystem und der Regulation des Blutzuckers von Bedeutung; zusammen mit Vitamin K fördert es die Blutgerinnung. In einigen Enzymen, wie beispielsweise der Superoxiddismutase (SOD), fungiert Mangan als Cofaktor. Diese dient als Abwehrsystem für ROS und setzt Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid um. Dabei ist die SOD überwiegend in den Mitochondrien zu finden. Zudem wird Mangan auch im Zellkern für die Aktivierung von ATM und somit als initialer Schritt bei der Reparatur von DNA-DSB benötigt. Des Weiteren ist der in der DNA-DSB-Reparatur vorkommende MRN-Komplex Mangan-abhängig. Das Spurenelement ist außerdem als Cofaktor in der Acetylcholinesterase, welche die Spaltung des Neurotransmitters

Acetylcholin fördert, vorzufinden. Zusätzlich zeigt Mangan auch Funktionen als Cofaktor in der Glutaminsynthetase, welche zur Bildung von Glutamin benötigt wird, sowie in der Arginase, welche im Harnstoffzyklus eine wichtige Rolle spielt (Paull und Gellert 1998, zusammengefasst in Aschner und Aschner 2005 und Santamaria 2008 sowie Zoroddu *et al.* 2019).

Die zulässige Tagesdosis von Mangan liegt bei 1,8 mg für Frauen und 2,3 mg für Männer, wobei dies nur Schätzwerte und keine empfohlenen Aufnahmemengen sind. Die tägliche Aufnahmemenge von Mangan liegt dabei in Deutschland bei 2,4 mg für erwachsene Frauen und 2,7 mg für erwachsene Männer. Eine Unterversorgung von Mangan mit Auswirkungen auf Wachstum, Knochenaufbau und Fertilitätsstörungen wird selten beobachtet. Eine erhöhte Aufnahme tritt meist bei chronischer beruflicher Exposition von Manganstaub auf (zusammengefasst in Aschner und Aschner 2005). Zum Schutz beruflich exponierter Menschen legte die MAK-Kommission (maximale Arbeitsplatzkonzentration) Grenzwerte auf 0,2 mg Mangan/m³ für Stäube und 0,02 mg Mangan/m³ für alveolengängige Stäube fest (Hartwig 2011). Trotz essentieller Funktionen von Mangan können bei einer vermehrten Akkumulation des Metalls erhebliche toxische Effekte auftreten. Vor allem neurodegenerative Erkrankungen werden mit einer langjährigen Mangan-Exposition in Verbindung gebracht. Beim sogenannten Manganismus wird Mangan in den Basalganglien des Gehirns angereichert und akkumuliert in den Mitochondrien (Gavin *et al.* 1990, Morello *et al.* 2008). Dabei wird vermutet, dass Mangan vor allem in den Mitochondrien anzutreffen ist, da die SOD auf Mangan als Cofaktor angewiesen ist. Zudem ist der Efflux von Mangan im Gegensatz zur Aufnahme wesentlich langsamer, weshalb die Toxizität des Metalls zusätzlich erhöht wird. Für die neurotoxischen Wirkungen werden mehrere Mechanismen postuliert, welche möglicherweise simultan ablaufen. Der am häufigsten diskutierte Mechanismus ist die Beeinträchtigung der Atmungskette in den Mitochondrien und der damit einhergehenden Generierung von ROS sowie dem Einleiten der Apoptose. Das vermehrte Sterben der Neuronen führt dabei zu motorischen Defiziten, akuten Verhaltensauffälligkeiten, Halluzinationen und Psychosen (zusammengefasst in Aschner und Aschner 1991 und Bowman *et al.* 2011 sowie Farina *et al.* 2013). Zudem ist bereits bekannt, dass Mangan auf zellulärer Ebene die DNA-Einzelstrangbruch-Reparatur durch die Inhibierung der PARP-1 beeinflusst und selbst auch DNA-Strangbrüche verursacht. Die postulierten Mechanismen für die Beeinträchtigung der Reparatur der DNA-Einzelstrangbrüche sind die Interaktion von Mangan mit den Zink-bindenden Motiven von PARP-1 sowie ebenfalls die Induktion von ROS durch Mangan (Bornhorst *et al.* 2010). Außerdem konnten verschiedene Studien bereits zeigen, dass Mangan mit dem essentiellen Element Magnesium interagieren kann und dieses beispielsweise in DNA-Polymerasen ersetzt, wobei die Genauigkeit der Polymerase negativ beeinflusst wird (zusammengefasst in Vashishtha *et al.* 2016). Aufgrund dieser zellulären Effekte könnte die genomische Stabilität durch Mangan beeinträchtigt werden.

2.6 Chrom

Chrom ist ein ubiquitär vorkommendes Übergangsmetall. Dabei kann es in Oxidationsstufen von -II bis +VI vorliegen, wobei die Oxidationsstufen 0, +II, +III sowie +VI am häufigsten anzutreffen sind. Chrom ist das zwanzig-häufigste Element der Erdkruste und vor allem in Verbindungen wie Krokoit (PbCrO_4) und Chromit (FeCr_2O_4) vorzufinden. Die Einsatzgebiete von Chrom sind vielfältig, so wird das Metall in der Stahlindustrie zum Schutz vor Korrosion sowie zur Erhöhung des Härtegrades vor allem in der Edelstahlherstellung eingesetzt. Zudem werden Chrom(III)-Verbindungen in der Ledergerbung zur Verbesserung der Stabilität der Kollagenfasern und der Widerstandsfähigkeit verwendet. Bei diesen Prozessen treten häufig Rückstände und Verunreinigungen durch Chrom(VI) auf. Des Weiteren kommen Chrom-Verbindungen als Pigmente in Farbstoffen zum Einsatz. Ebenfalls betroffen sind Arbeiter in der Zementindustrie, da Chrom in den Ausgangsstoffen zur Herstellung von Zement vorkommt (zusammengefasst in Barceloux 1999).

Beruflich exponierte Menschen nehmen Chrom vor allem inhalativ auf, während die Allgemeinbevölkerung das Metall oral über die Nahrung aufnimmt. In Lebensmitteln sind hohe Chromgehalte in Fleischprodukten, Fetten und Ölen zu finden, während Brot, Nüsse und Früchte geringere Mengen aufweisen (zusammengefasst in Domke *et al.* 2004). Die Resorptionsrate im Darm liegt durchschnittlich bei 0,5 bis 2 %, wobei vor allem Chrom(III)-Verbindungen in Lebensmitteln vorkommen (Lim *et al.* 1983, zusammengefasst in Ducros 1992 und Pechova und Pavlata 2007).

Die essentielle Rolle von Chrom für den menschlichen Organismus ist bis heute umstritten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die intravenöse Gabe von Chrom(III) Symptome von Diabetes lindert (Brown *et al.* 1986). Dabei konnte ein Chrom-bindendes Oligopeptid (Chromodulin), welches die Insulinaktivität beeinflusst, entdeckt und aus verschiedenen Tierarten isoliert werden. Chromodulin besteht aus den Aminosäuren Glycin, Cystein, Glutamat und Aspartat, welche zusammen vier Chromionen koordinieren. Dabei scheint durch Chromodulin zusätzlich die Sensitivität des Insulinrezeptors verstärkt zu werden (zusammengefasst in Pechova und Pavlata 2007). Zudem wird vermutet, dass auch der Lipidstoffwechsel durch Chrom beeinflusst werden kann. Die Mechanismen hierzu sind bisher unbekannt, jedoch konnte ein Absinken des Cholesterinspiegels nach Chrom(III)-Supplementierung festgestellt werden (zusammengefasst in Vincent 2000, Pechova und Pavlata 2007 sowie Lewicki *et al.* 2014).

Die Toxizität von Chrom-Verbindungen hingegen ist gut erforscht, wobei diese abhängig von der Oxidationsstufe und dem Expositionsweg ist. Chrom(VI)-Verbindungen können, aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Phosphaten und Sulfaten, über Anionentransporter schnell in die

Zelle aufgenommen werden. Diese Verbindungen weisen eine hohe Toxizität auf. Im Gegensatz dazu können Chrom(III)-Verbindungen nicht in die Zelle aufgenommen werden, weshalb diese Verbindungen weitestgehend als nicht toxisch gelten. Chrom(VI) wird nach der Aufnahme über Ein- und Zweielektronensysteme zu Chrom(III) reduziert, wobei diese Reaktionen unter Beteiligung der Reduktionsmittel Ascorbat und Glutathion durchgeführt werden. Die entstandenen Chrom-Intermediate (Chrom(V), Chrom(IV), Chrom(III)) sind in der Lage, mit der DNA Addukte zu bilden und diese dadurch zu schädigen. Hierbei zeigt Chrom(III) eine hohe Affinität zur DNA, wobei zusätzlich Querverbindungen mit Molekülen wie Ascorbat, Glutathion, Histidin und Cystein entstehen können. Dabei zeigen die ternären Chrom-DNA-Addukte mit Ascorbat ein hohes mutagenes Potential. Chrom(III) bindet dabei hauptsächlich an das Phosphatrückgrat der DNA, wobei ebenfalls Verbindungen über N7-Guanin bekannt sind (zusammengefasst in Eastmond *et al.* 2008 sowie Wise und Wise 2012). Die ternären DNA-Addukte führen während der Replikation zu verstärkten Basenfehlpaarungen, wobei die Proteinkomplexe der *mismatch repair* zur Reparatur an diese DNA-Addukte binden, die Replikationsgabel blockieren und ein DNA-DSB generiert wird. Es konnte bereits festgestellt werden, dass *mismatch repair*-profiziente Zellen zu einer erhöhten Induktion von DNA-DSB beitragen, während *mismatch repair*-defiziente Zellen keine DNA-DSB unter Einfluss von Chromat generieren (Reynolds *et al.* 2007, zusammengefasst in Zhitkovich *et al.* 2005, Salnikow und Zhitkovich 2008 sowie Wise und Wise 2012). Bei der Reduktion von Chrom(VI) zu dessen Intermediaten werden zudem ROS generiert, welche die Zelle schädigen können (zusammengefasst in Zhitkovich 2005). Die entstandenen DNA-DSB können über die Reparaturwege NHEJ, HR, SSA und MMEJ behoben werden, wobei es bereits Hinweise auf inhibierende Effekte von Chrom(VI) auf die nahezu fehlerfreie HR gibt, wodurch die genomische Stabilität gefährdet sein könnte (Browning *et al.* 2016). Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass eine chronische Exposition von Chrom(VI)-Verbindungen zu einer Hypermethylierung von Reparaturgenen, wie beispielsweise des Gens *hMLH1* der *mismatch repair*, führt und somit deren Expression inhibiert (Takahashi *et al.* 2005, Hu *et al.* 2018). Die *mismatch repair*-Defizienz führt zur sogenannten Mikrosatelliten (MS)-Instabilität. MS sind sich oft wiederholende DNA-Abschnitte von ungefähr 6 Basenpaaren, wobei Instabilität durch Fehlpaarungen sowie einem Defekt in der *mismatch repair* ausgelöst wird. Die Folgen sind das vermehrte Auftreten von Mutationen und dem damit verbundenen erhöhten Risiko einer Tumorentstehung (Hirose *et al.* 2002, Takahashi *et al.* 2005, zusammengefasst in Karran 1996 sowie Wise und Wise 2012). Außerdem wurde durch Chrom(VI) die Entstehung von Chromosomenaberrationen und Mikronuklei mit ganzen Chromosomen sowie mit Fragmenten beobachtet. Chrom(VI)-Verbindungen können somit als aneugen und klastogen betrachtet werden (Benova *et al.* 2002, zusammengefasst in Salnikow und Zhitkovich 2008). Neben den genotoxischen und mutagenen Wirkungen konnten auch reproduktionstoxische

und kanzerogene Mechanismen von Chrom(VI) festgestellt werden. Vor allem beruflich exponierte Menschen sind Chrom-Verbindungen ausgesetzt, wobei Chrom(VI) eine verminderte Fertilität bei Arbeitern in der Stahlindustrie hervorrief (Hjollund *et al.* 2000). Zudem wurde ein verstärktes Auftreten von Lungenkarzinomen sowie Tumoren des Nasenepithel und der Nasennebenhöhlen durch Chrom(VI) beobachtet (zusammengefasst in Zhitkovich 2005 und Eastmond *et al.* 2008). Aufgrund dieser Erkenntnisse stufte die *International Agency of Research on Cancer* (IARC) Chrom(VI) als krebserzeugend beim Menschen in Gruppe 1 ein (IARC 1990).

Neben den genannten toxischen Wirkungen von Chrom konnten ebenfalls Kontaktekzeme beobachtet werden. Aufgrund der vielseitigen Anwendung des Metalls stellt die Haut einen weiteren Resorptionsweg von Chrom-Verbindungen dar. Die Allgemeinbevölkerung ist hierbei durch das Tragen von Lederprodukten betroffen, während beruflich exponierte Personen vor allem in der Zementindustrie mit Chrom in Kontakt kommen. Dabei konnte festgestellt werden, dass Chrom bei langfristiger Exposition allergische Reaktionen hervorruft. Die sogenannte Chromallergie ist schwer behandelbar und wird bevorzugt durch Chrom(VI) ausgelöst, wobei dies auf die bessere Resorptionsrate von hexavalentem Chrom zurückgeführt werden kann (Bregnbak *et al.* 2014, Shigematsu *et al.* 2014). Aufgrund dieser Erkenntnisse spielen insbesondere sechswertige Chrom-Verbindungen eine auslösende Rolle bei der genomischen Instabilität sowie bei epigenetischen Veränderungen.

3 Fragestellung

Die DNA wird täglich durch exogene und endogene Faktoren geschädigt, wobei DNA-DSB die schwerwiegendsten Schäden darstellen. Zur Reparatur von DNA-DSB stehen dem menschlichen Organismus die Hauptreparaturwege NHEJ und HR sowie die *backup-pathways* SSA und MMEJ zur Verfügung. Die HR ist dabei einer der wichtigsten Reparaturwege, damit DNA-DSB fehlerfrei behoben werden können. Kann ein DNA-DSB nicht fehlerfrei repariert werden, führt dies zu Mutationen und trägt zur Kanzerogenese bei. Durch verschiedene Faktoren, wie beispielsweise Metallexpositionen, kann die Reparatur von DNA-DSB beeinträchtigt werden, wobei vor allem beruflich exponierte Personen in der metallverarbeitenden Industrie einem erhöhtem Risiko einer Krebserkrankung ausgesetzt sind (zusammengefasst in Lieber 2010 und Dueva und Iliakis 2013 sowie Seol *et al.* 2018).

Zur Risikobewertung auf Basis der Aufklärung von molekularen Zellmechanismen befasst sich die vorliegende Arbeit mit dem Einfluss von Metallen auf die Reparatur von DNA-DSB. Dabei werden die Metalle Mangan und Chrom in Form von wasserlöslichen Verbindungen aufgrund der essentiellen Funktionen von Mangan und der vielfältigen Verwendung in der Industrie beider Metalle bezüglich ihrer Wirkung auf die Reparatursysteme NHEJ, HR, SSA und MMEJ mit verschiedenen zellbasierten Methoden untersucht.

Zur Festlegung eines geeigneten Konzentrationsbereichs für darauffolgende Experimente wird zunächst die zytotoxische Wirkung von $MnCl_2$, in der Modellzelllinie HeLa S3 durch Bestimmung der Lebendzellzahl, der Koloniebildungsfähigkeit (CFA) und des zellulären ATP-Gehaltes betrachtet und anschließend die zelluläre Aufnahme von Mangan mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) bestimmt. Zur Untersuchung des Einflusses von Mangan auf die Reparatur von DNA-DSB soll zunächst die PFGE, als direkter Nachweis von DNA-DSB, erste Hinweise über die Induktion von DNA-DSB durch das Metall selbst und mögliche inhibitorische Effekte auf das Reparatursystem von strahleninduzierten Schäden geben. Anschließend wird der Reporter-Assay in U2OS-Zellen angewandt, da dieser Assay die separate Betrachtung der Reparaturwege NHEJ, HR, SSA und MMEJ ermöglicht. Zur Untersuchung der an der HR beteiligten Proteine soll die Methode der IF, als indirekter Nachweis von DNA-DSB, herangezogen werden. Hierbei werden Rad51 und Rad54 als spezifischen Markerproteine der HR untersucht. Zudem sollen Genexpressions-Analysen mit der

in unserer Arbeitsgruppe etablierten Methode der Hochdurchsatz *real time-quantitative polymerase chain reaction* (HT RT-qPCR) durchgeführt werden. Die Ergebnisse sollen Aufschluss über mögliche zugrundeliegende zelluläre Wirkmechanismen geben. Abschließend werden ausgewählte Effekte, welche auf Genexpressions-Ebene beobachtet werden, auf zellulärer Ebene überprüft.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von Chromat auf die Reparatur von DNA-DSB. Zunächst werden ebenfalls die zytotoxischen Wirkungen, mit den selben Methoden, wie bereits für Mangan beschrieben, von $K_2Cr_2O_7$ in HeLa S3-Zellen untersucht, um anschließend in einem geeigneten Konzentrationsbereich mögliche Effekte auf die Reparaturwege der DNA-DSB mit Hilfe des Reporter-Assays zu betrachten. Mit Hilfe spezifischer Fluoreszenz-markierter Antikörper werden daraufhin Proteine der HR unter Einfluss von Chromat untersucht. Eine inhibierte Rekrutierung von Rad51 nach einer Behandlung mit Chromat-Partikeln wurde im zellulären Testsystem bereits gezeigt, dabei wurde ein fehlender Transportmechanismus von Rad51 in den Kern postuliert (Browning *et al.* 2016). Im Rahmen dieser Arbeit soll basierend auf diesen Ergebnissen der Einfluss der löslichen Chromat-Verbindung auf Rad51 und weitere involvierte Proteine wie BRCA1 und Rad54 untersucht werden. Zudem soll die Bestimmung des Proteingehaltes von Rad51 und Rad54 der Zellfraktionen Aufschluss über mögliche Veränderungen im Zytoplasma und Zellkern geben. Ein veränderter Gehalt an Rad51 bzw. Rad54 in den entsprechenden Fraktionen könnte in diesem Zusammenhang zu einer fehlerhaften Reparatur führen. Abschließend wird über Genexpressions-Untersuchungen der *POLQ* das MMEJ in HeLa S3-Zellen genauer betrachtet. Die erhöhte bzw. verminderte Expression der Polymerase kann Aufschluss über eine mögliche anteilige Verschiebung der Reparaturwege geben.

4 Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden die für diese Dissertation verwendeten Materialien und durchgeführte Versuche aufgeführt. Des Weiteren sind Verbrauchsmaterialien, Chemikalien sowie hergestellte Puffer und Lösungen, benötigte Kits und ergänzende Versuche im Anhang beschrieben (siehe Kapitel 8 sowie Kapitel 9). Verwendete Materialien sowie Chemikalien, Lösungen und Puffer wurden vor Gebrauch sterilfiltriert, hitzeautoklaviert oder heißluftsterilisiert und anschließend unter einer Sicherheitswerkbank der Stufe 2 verwendet. Für Versuche, welche mit *Escherichia coli* (*E. coli*) durchgeführt wurden, wurden verwendete Medien zuvor autoklaviert und Antibiotika-Lösungen sterilfiltriert.

4.1 Zellkultivierung

Nachfolgende Versuche wurden in der humanen Gebärmutterhalskrebs-Zelllinie HeLa S3 durchgeführt. Lediglich der Reporter-Assay wurde aufgrund der gesteigerten Transfektionseffizienz in der Osteosarkom-Zelllinie U2OS angewandt. Die Methode des Reporter-Assays sowie die dazugehörigen Zelllinien wurden von Jeremy Stark entwickelt (Gunn und Stark 2012). Zur Verfügung gestellt wurden die stabil transfizierte U2OS-Zellen von Prof. Dr. George Iliakis (Universitätsklinikum Essen, Institut für medizinische Strahlenbiologie).

Zur Kultivierung der Zelllinien wurde *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) verwendet, welches 10 %iges fetales Kälberserum (FKS) und 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin enthält. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage passagiert, wobei die hierfür verwendeten Lösungen vor Gebrauch auf 37°C im Wasserbad temperiert wurden. Nach Absaugen des Mediums folgte phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) zum Waschen der Zellen sowie die Behandlung mit 0,25 %iger Trypsinlösung für 30 Sekunden und anschließendem Aufbewahren für 3 Minuten im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen in Zellkulturmedium aufgenommen und resuspendiert. Im Brutschrank herrschen 37°C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit.

Nach Aufnahme der Zellen im Medium konnte die Zellzahl am *Casy®CellCounter* der Firma Roche bestimmt werden. Anschließend wurde eine definierte Anzahl an Zellen zur Subkultivierung in frischem Medium in eine neue Zellkulturschale weitergesetzt. Nach etwa 20 Passagen wurden die Zellen verworfen und frisch aufgetaut (siehe Kapitel 4.2).

4.2 Kryokonservierung und Inkulturnahme

Die Kryokonservierung von Zellen dient zur Langzeitaufbewahrung in Flüssigstickstoff. Hierfür wurden die Zellen, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, abgelöst und gezählt. Die Zellen wurden bei 4°C, 1.300 rpm für 3 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in Einfriermedium aufgenommen. Das Einfriermedium bestand aus 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in FKS. Es wurden 1,5 bis $2 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter in Kryoröhrchen aliquotiert. Anschließend wurden die Zellen in einer Isopropanolaufbewahrung (*Mr. Frosty*) aufbewahrt, wobei eine konstante Abkühlung von -1°C je Stunde stattfand. Danach erfolgte die Überführung in den Stickstofftank.

Zum Auftauen der Zellen wurde 37°C temperiertes DMEM in ein 15 ml Röhrchen vorgelegt, die Zellen im Wasserbad angetaut und in das Röhrchen überführt. Anschließend wurde bei 4°C, 1.300 rpm für 3 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in eine Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank aufbewahrt. Nach dem Anwachsen der Zellen (ca. 24 h) wurde frisches Medium auf die Zellen gegeben. Nach 2-3 Passagen konnten die Zellen für Versuche verwendet werden.

4.3 Behandlung der Zellen

4.3.1 Inkubationen

Für die nachfolgend aufgeführten Experimente wurden die Zellen mit verschiedenen Metalllösungen behandelt. Die Inkubation erfolgte jeweils in der logarithmischen Wachstumsphase der Zellen. Zunächst wurden Stammlösungen von MnCl_2 (10 mM, 100 mM) sowie von $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (0,2 mM, 2 mM, 20 mM) in bidestilliertem Wasser hergestellt und sterilfiltriert. Für die Behandlung wurde das jeweilige Volumen der Stammlösungen berechnet und direkt in das Medium pipettiert.

4.3.2 Bestrahlung

Zur Induktion von DNA-DSB wurden die HeLa S3-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h bzw. 64 h mit 1 oder 80 Gy bestrahlt. Hierfür wurde die Röntgenröhre Cell-Rad der Firma Faxitron (140 kV, 4,5 mA) verwendet. Röntgenstrahlung wird dabei der ionisierenden Strahlung zugeordnet.

4.4 Zytotoxizitätsuntersuchungen

Zur Untersuchung der Zytotoxizität der Metallverbindungen wurde die Zellzahl, die CFA und der ATP-Gehalt bestimmt. Dabei gibt die Zellzahl die akute und die CFA die langfristige Zytotoxizität an. Der ATP-Gehalt gibt Auskunft über die metabolische Aktivität der Zellen. Experimente zur Untersuchung der Zytotoxizität von Mangan wurden in Zusammenarbeit mit Frau Yvonne Gil Pascual und Frau Ann-Kathrin Kull im Rahmen ihrer Masterarbeiten durchgeführt.

4.4.1 Zellzahl

Zunächst wurden $0,5 \cdot 10^6$ Zellen in einer 6 cm Zellkulturschale in Doppelbestimmung ausgestreut, in der logarithmischen Wachstumsphase mit der Testsubstanz für 32 h inkubiert oder für 24 h vorinkubiert, bestrahlt und 8 h nachinkubiert. Zusätzlich wurde die subchronische Zytotoxizität bestimmt. Hierfür betrug die Zellzahl bei der Aussaat $0,25 \cdot 10^6$ und die Inkubationszeit 72 h. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen, wie in Abschnitt 4.1 beschrieben, abgelöst und mit Hilfe des Zellzählgerätes *Casy*® gezählt.

4.4.2 ATP-Gehalt

Das Prinzip des ATP-Assays beruht auf der Umsetzung von Luziferin in Gegenwart von ATP, O_2 sowie Mg^{2+} zu Oxyluziferin durch das Enzym Luziferase. Bei dieser Reaktion werden Photonen proportional zum ATP-Gehalt der Probe freigesetzt. Der ATP-Gehalt gibt Aufschluss über die

metabolische Aktivität von Zellen. Zur Bestimmung des ATP-Gehaltes wurden nach der Zellzahlbestimmung 50.000 Zellen in 100 μl Zellsuspension pro Kavität in eine 96-well NUNC™-Platte pipettiert. Zusätzlich wurde reines Zellkulturmedium als Blindwert mitgeführt. Die Platte wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur äquilibriert, ebenfalls wurde der *ATP-Assay-Mix* des *CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay Kit* langsam aufgetaut und nach Herstellerangaben angesetzt. Zu den 100 μl Zellsuspension wurden 100 μl *ATP-Assay-Mix* hinzugegeben. Der ATP-Gehalt wurde in Dreifachbestimmung mittels *Tecan Infinite®* über Lumineszenz gemessen.

4.4.3 Koloniebildungsfähigkeit

Die CFA wurde im Anschluss an die Zellzahlbestimmung ermittelt. Hierfür wurden 300 Zellen pro 6 cm Zellkulturschale in Dreifachbestimmung weitergesetzt und für 8 Tage im Brutschrank belassen. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Kolonien mit PBS gewaschen und mit 96 %igem Ethanol fixiert. Danach erfolgte die Färbung der Kolonien mittels Giemsa®-Lösung für 2 h. Nach dem Waschen der Schalen mit destilliertem Wasser, wurden diese über Nacht getrocknet. Die Kolonien konnten anschließend mit Hilfe des Koloniezählgerätes *Colony Counter BZG-30* ausgezählt werden.

4.5 Zelluläre Aufnahme mittels Graphitrohr-AAS

Um die zelluläre Aufnahme von Mangan zu bestimmen, wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen in 10 cm Zellkulturschalen ausgestreut und, wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben, inkubiert. Dabei wurden Inkubationszeiten von 1 h bis 32 h gewählt, um eine Zeitreihe der zellulären Manganaufnahme betrachten zu können. Die Versuche wurden in Doppelbestimmung durchgeführt sowie eine Kontrolle mitgeführt. Durch Absaugen des Mediums wurde der Versuch abgebrochen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Die Aufnahme der Zellen erfolgte in 5 ml 10 %igem FKS in PBS. Die nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Suspension wurde in 15 ml Röhrchen überführt, zentrifugiert (1.250 rpm, 4 Minuten, 4°C), der Überstand abgenommen und die Zellpellets mit 5 ml PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurden die Zellpellets in 5 ml PBS aufgenommen und die Zellzahl sowie das mittlere Zellvolumen mittels *Casy®* bestimmt. Anschließend erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (1.250 rpm, 4 Minuten, 4°C). Der Überstand wurde abgesaugt und die Pellets in 1 ml PBS aufgenommen und in 1,5 ml

Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5.000 rpm, 5 Minuten, 4°C), wurde der Überstand abgenommen und die Zellpellets bei -21°C aufbewahrt.

4.5.1 Zellaufschluss

Zur Messung des zellulären Mangangehaltes mittels AAS wurden die Zellpellets mit 500 μl einer 1:1 Mischung aus 30 %iger H_2O_2 sowie 69 %iger HNO_3 aufgeschlossen. Nach vorsichtigem Durchmischen der Suspension wurde diese schrittweise eingedampft. Die Starttemperatur betrug 65°C und wurde stündlich um je 10°C bis 95°C erhöht und anschließend 9 h bei 95°C gehalten. Der Rückstand wurde in 1 ml 0,2 %iger HNO_3 aufgenommen und nach gründlichem Vortexen mittels Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie (GF-AAS) analysiert. Zusätzlich wurde ein Aufschluss-Blindwert mitgeführt, um mögliche Kontaminationen in der Aufschlusslösung auszuschließen bzw. zu berücksichtigen.

4.5.2 Messung an der AAS

Nach erfolgtem Aufschluss der Zellen konnte der Mangangehalt an der GF-AAS gemessen werden. Hierfür wurde das in Tabelle 4.1 angegebene Temperaturprogramm verwendet und 5 μl vom Matrixmodifier bestehend aus $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ und $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ jeder Probe hinzugefügt. Die Messung wurde bei einer Wellenlänge von 279,48 nm durchgeführt, wobei die Stromstärke der verwendeten Hohlkathodenlampe 20 mA betrug.

Tabelle 4.1: Temperaturprogramm der Manganbestimmung mittels Graphitrohr-AAS.

Schritt	Temperatur [°C]	Aufheizzeit [sec]	Haltezeit [sec]	Argonfluss [ml/min]
Trocknung 1	110	30	30	250
Trocknung 2	130	1	30	250
Pyrolyse	1100	15	20	250
Atomisierung	2100	0	5	0
Ausheizen	2450	1	3	250

Zu Beginn jeder Messung wurde eine Kalibrierung mit einem Manganstandard im Bereich von 0 bis 10 $\mu\text{g/l}$ durchgeführt. Zur Überprüfung der Methode wurden zusätzlich externe und interne Standards sowie Blindwerte gemessen. Die Empfindlichkeit der Methode wurde nach DIN 32645 mittels Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze berechnet (siehe Anhang 9.4).

Experimente zur Untersuchung der zellulären Aufnahme von Mangan mittels Graphitrohr-AAS wurden in Zusammenarbeit mit Yvonne Gil Pascual im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

4.6 Pulsfeldgelelektrophorese

Die PFGE dient dem direkten Nachweis von DNA-DSB. Zusätzlich können über diese Methode Rückschlüsse auf einen möglichen Einfluss auf die DNA-DSB-Reparatur gezogen werden. Hierzu wurden $2 \cdot 10^6$ Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale in Doppelbestimmung ausgestreut. Die Behandlung der Zellen erfolgte, wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben, für 24 h. Anschließend wurden die Zellen mit 80 Gy bestrahlt (siehe Abschnitt 4.3.2) und direkt nach der Bestrahlung bzw. 8 h später abtrypsiniert. Zusätzlich wurden alle Behandlungen ohne Bestrahlung mitgeführt. Die Zellen wurden, wie in Abschnitt 4.1 aufgeführt, abgelöst und in PBS mit 10 % FKS aufgenommen. Die Zellzahlbestimmung erfolgte ebenfalls wie in diesem Abschnitt beschrieben. Die nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Es wurden $5 \cdot 10^6$ Zellen in ein 15 ml Röhrchen überführt, zentrifugiert (1.300 rpm, 3 Minuten, 4°C) und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in kaltem PBS aufgenommen und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (1.300 rpm, 3 Minuten, 4°C), der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet bei -80°C aufbewahrt.

Das Zellpellet wurde mit dem *CGEF Mammalian Genomic DNA Plug Kit* aufgearbeitet. Dabei wurde zunächst die enthaltene 2 %ige *CleanCut* Agarose geschmolzen und auf 50°C äquilibriert. Zu dem Zellpellet wurde Zellsuspensionspuffer pipettiert und anschließend resuspendiert. Die 50°C warme Agarose wurde der Zellsuspension hinzugefügt und die Probe durchmischt. Es folgte eine zügige Überführung in den Blöckchenformer, welcher anschließend zur Verfestigung der Suspension für 15 Minuten bei -20°C verblieb. Die stabilen Blöckchen wurden aus dem Former herausgelöst und in Eppendorf Reaktionsgefäße gegeben. Hierzu wurde eine Extraktionslösung bestehend aus Proteinase K Stock und Proteinase K Reaktionspuffer pipettiert, welche der Lyse der Membranen sowie dem Proteinverdau dient. Die Blöckchen wurden über Nacht bei 50°C mit Extraktionslösung inkubiert.

Nach erfolgreicher Extraktion sind klare Blöckchen erkennbar. Diese wurden dreimal mit Waschpuffer für 1 h gewaschen und anschließend in 0,8 %iger *Pulsed-field*-Agarose (in 0,5-fachem Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer) gegeben. Zur Detektion der DNA wurde *GelRed* (1:10.000) hinzugefügt. Nach Erkalten des Gels wurde dieses in die vorgekühlte CHEF-DR III-PFGE Apparatur mit 0,5-fachem TBE-Puffer als Laufmittel gelegt und das Experiment nach 30 Minuten Äquilibration gestartet. Die PFGE hatte eine Laufzeit von 92 h, einen Feldwinkel von 120° mit einer elektrischen Feldstärke von 1,5 V/cm und Pulszeiten von 5-5.000 Sekunden. Die Temperatur betrug 14°C während der kompletten Laufzeit. Die Auswertung des Gels erfolgte am LAS-3000 *Imaging System* von Fuji mit der Software *AIDA Image Analyzer* v.3.27 über die Grauwerte.

4.7 U2OS-Reporter-Assay

Mit Hilfe des Reporter-Assays (Abbildung 2.5) kann die Funktionalität der verschiedenen Reparaturmechanismen HR, NHEJ, SSA und MMEJ überprüft werden. Hierzu sind unterschiedliche Plasmide mit GFP gekoppelt und in U2OS stabil transfiziert. Unter Einsatz des Restriktionsenzym I-SceI können die verschiedenen Reparaturwege durch eine gezielte Induktion von DNA-DSB selektiv eingeleitet werden. Das dabei entstehende GFP-Signal kann mittels FACS gemessen werden.

Die Zelllinie U2OS-DR-GFP spiegelt die Funktion der HR wider, während U2OS-EJ5-GFP Zellen mit einem Plasmid transfiziert sind, welches das NHEJ repräsentiert. Die Zelllinie U2OS-SA-GFP gibt die Funktion des SSA und U2OS-EJ2-GFP des MMEJ an. Die für diesen Versuch verwendeten Plasmide sowie für deren Präparation gebrauchten Materialien, Kits, Lösungen, Antibiotika und Medien sind im Anhang 8 und 9.5 aufgeführt. Als Klonierungsstamm wurden die Bakterien *E. coli* DH5 α verwendet.

4.7.1 Transformation von *E.coli*

Zur Vervielfältigung der Plasmide I-SceI (Restriktionsenzym) und pEGFP-N1 (Effizienz-Kontrolle) wurde zunächst 2 μ l der *E. coli* DH5 α Zellen mit 0,1 μ g Plasmid versetzt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Öffnung der Membranporen wurde die Hitzeschock-Methode angewandt, bei der die Zellen für 30 Sekunden bei 42°C behandelt werden. Anschließend wurde erneut auf Eis für 5 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 200 μ l *lysogeny broth* (LB)-Medium wurde die

Lösung auf eine Agarplatte gegeben und gleichmäßig ausgestrichen. Sowohl das LB-Medium sowie die Agarplatten enthielten Antibiotika entsprechend der Resistenz des jeweiligen Stammes. Für I-SceI wurde Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und für pEGFP-N1 Kanamycin (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) verwendet. Die ausgestrichene Agarplatte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.7.2 Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation wurde mittels *NucleoBond Xtra Midi* Kit von Macherey-Nagel durchgeführt. Zunächst erfolgte die Plasmidisolierung durch selektive Auswahl einzelner Kolonien von der Agarplatte in Kulturkolben nach Fernbach mit 200 ml LB-Medium und Antibiotikum. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (4.000 g, 10 Minuten, Raumtemperatur) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 8 ml Resuspensionspuffer (*Buffer RES*), mit RNase versetzt, aufgenommen und resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zellyse unter alkalischen Bedingungen mit 8 ml *Buffer LYS* durchgeführt, die Suspension invertiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde mit 8 ml *Buffer NEU* neutralisiert. Anschließend wurde das Lysat über eine, mit *Buffer EQU* äquilibrierte, Anionenaustauscher-Säule gegeben. Die Säule wurde mit 8 ml *Buffer Wash* gewaschen und nachfolgend die Plasmid-DNA mit 3 ml *Buffer ELU* eluiert. Die Plasmid-DNA wurde zur Präzipitation mit 1,75 ml Isopropanol ausgefällt und zentrifugiert (15.000 g, 30 Minuten, 4°C), der Überstand abgenommen und das DNA-Pellet mit 1 ml Ethanol (70 %) gewaschen. Es wurde erneut zentrifugiert (15.000 g, 5 Minuten, Raumtemperatur) und der Überstand vorsichtig abgenommen. Anschließend wurde das DNA-Pellet an der Luft für 10 Minuten getrocknet und die Plasmid-DNA in 0,5 ml sterilem Wasser aufgenommen.

Im Anschluss wurde die Reinheit und der Gehalt der Plasmid-DNA photometrisch bestimmt. Hierfür wurde am *Tecan Infinite*[®] mittels *NanoDrop* die Proben in Doppelbestimmung aufgetragen und die Absorption bei 260 und 280 nm sowie bei 260 und 230 nm bestimmt. Das Verhältnis aus 260/280 beziehungsweise aus 260/230 gibt Aufschluss über die Reinheit der Plasmid-DNA. Werte zwischen 1,8 und 2,0 (260/280) sowie größer 2,0 (260/230) weisen auf eine sehr gute Reinheit und auf nur geringe Mengen an Phenolen, Zucker, Proteinen und Salzen hin.

4.7.3 Transfektion

Zunächst wurden $7,5 \cdot 10^4$ Zellen pro Well in einer 12-well Platte ausgestreut. Die Versuche wurden in Doppelbestimmung angesetzt, wobei zusätzlich eine nicht transfizierte Kontrolle sowie eine Transfektionseffizienz-Kontrolle mitgeführt wurde. In der logarithmischen Wachstumsphase (24 h nach Aussaat) wurden die Zellen mit dem oben beschriebenen Plasmid, welches für das Restriktionsenzym I-SceI codiert, transient transfiziert. Die Effizienz-Kontrolle hingegen wurde mit dem Plasmid pEGFP-N1 transfiziert. Für die Transfektionen wurde das *Effectene Transfection Reagent* Kit von Qiagen verwendet. Dabei wurde $1 \mu\text{g}$ Plasmid DNA in $75 \mu\text{l}$ *Buffer EC* aufgenommen und $2,4 \mu\text{l}$ *Enhancer* hinzugefügt. Die Lösung wurde in Eppendorf Reaktionsgefäßen eine Sekunde gevortext und anschließend das Gemisch zur DNA-Kondensation 5 Minuten bei Raumtemperatur aufbewahrt. Es folgte die Zugabe von $6 \mu\text{l}$ *Effectene* sowie 10 Sekunden Durchmischen auf dem Vortex-Schüttler. Zur Bildung der *Effectene*-DNA-Addukte wurde die Suspension 10 Minuten bei Raumtemperatur äquilibriert und anschließend $400 \mu\text{l}$ Medium hinzugefügt. Die gesamte Lösung wurde zu den Zellen in der 12-well Platte hinzu pipettiert und für 6 h im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 1 ml warmen PBS gewaschen. Nach der Transfektion wurden die Zellen mit den entsprechenden Metalllösungen für 66 h inkubiert (siehe Abschnitt 4.3.1). Der Versuch wurde durch Absaugen des Mediums abgebrochen. Es folgte die Bestimmung der Zellzahl (siehe Abschnitt 4.1) und das Überführen in Rundboden-Röhrchen.

4.7.4 Messung am Durchflusszytometer

Die Rundboden-Röhrchen wurden nach dem Ablösen der Zellen auf Eis gelagert, $1,25 \mu\text{l}$ einer 1:20 verdünnten Propidiumiodid-Lösung (1 mg/ml) hinzugefügt und diese 30 Minuten auf Eis inkubiert. Propidiumiodid interkaliert mit der DNA, kann jedoch nicht die Zellmembran lebender Zellen passieren, wodurch eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen möglich ist. Anschließend folgte die Messung des Propidiumiodid- sowie des GFP-Signals am FACS. Propidiumiodid wird bei 488 nm angeregt und emittiert Strahlung bei einer Wellenlänge von 620 nm , während GFP ebenfalls bei 488 nm angeregt wird, jedoch bei 510 nm emittiert. Es wurden 50.000 *Events* pro Probe gemessen. In der folgenden Abbildung 4.1 sind die GFP-Signale einer mit I-SceI transfizierten Kontrolle (links) sowie die Transfektionseffizienzkontrolle pEGFP-N1 (rechts) dargestellt.

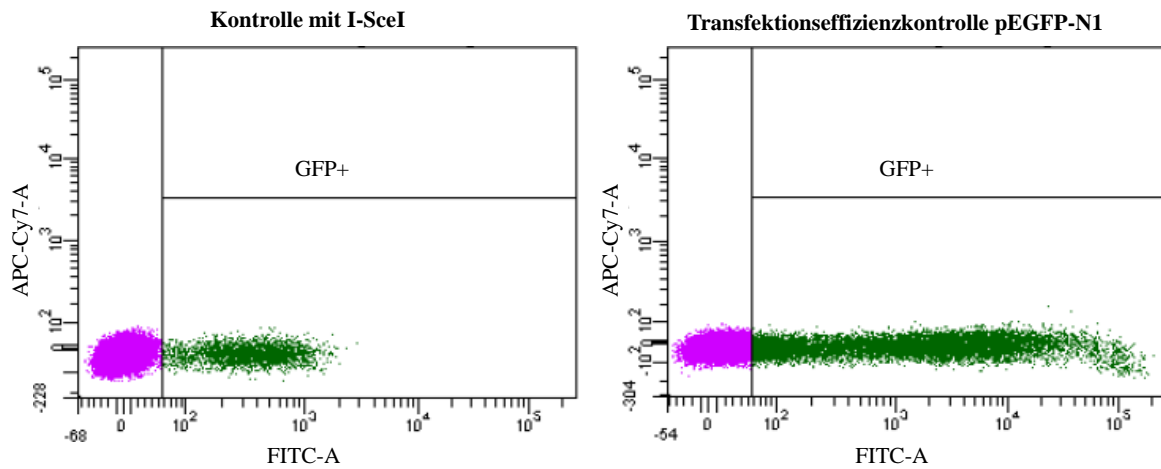


Abbildung 4.1: Exemplarische Darstellung der GFP-Signale nach Transfektion mit I-SceI (links) und pEGFP-N1 (rechts). Die Abbildung zeigt zwei *Dot Plots*, welche das GFP-Signal einer mit I-SceI transfizierten Kontrolle (links) sowie die Transfektionseffizienzkontrolle pEGFP-N1 (rechts) widerspiegeln. Hierbei wurde die Zelllinie (U2OS DR-GFP) verwendet, welche zur Untersuchung der homologen Rekombination (HR) herangezogen wurde. Dabei wird das Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Signal gegen Allophycocyanin (APC-Cy7) aufgetragen und GFP positive (GFP+) Zellen markiert.

Zunächst wurde in einem *Dot-Plot* das Signal des Vorwärtsstreulicht (FSC) gegen das Signal des Seitwärtsstreulicht (SSC) aufgetragen, um die Zellpopulation zu bestimmen. Aus diesem konnten Einzelzellen (Singlets) von Dubletten unterschieden werden. Im Anschluss wurde das Propidiumiodid-Signal der ausgewählten Singlets gemessen und die lebenden Zellen markiert. Anschließend wurde das GFP-Signal der lebenden Zellen gemessen und auf die transfizierte Kontrolle bezogen.

4.8 Immunfluoreszenz

Die Methode der IF stellt einen indirekten Nachweis von DNA-DSB dar. Mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Antikörpern können spezifische Proteine der DNA-Reparaturwege angefärbt und mikroskopisch abgebildet werden. Durch die Färbung kann die Assoziation sowie die Dissoziation von Proteinen an den DNA-Strang betrachtet werden.

Hierfür wurden zunächst $1,5 \cdot 10^5$ Zellen auf Deckgläschen (\varnothing 1,2 cm) in 3,5 cm Zellkulturschalen in Doppelbestimmung ausgestreut. Nach dem Anwachsen wurde in der logarithmischen Wachstumsphase für 24 h inkubiert (siehe Abschnitt 4.3.1). Für Experimente mit 64 h Inkubationszeit wurden hingegen nur $7,5 \cdot 10^4$ Zellen ausgestreut. Nach 24 h bzw. 64 h wurden die Zellen, wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben, teilweise mit 1 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert.

Der Versuch wurde durch das Absaugen des Mediums abgebrochen. Durch die Zugabe von 3,7 %igem Formaldehyd in PBS wurden die Zellen auf den Deckgläschen fixiert. Nach 10 minütiger Fixierung bei Raumtemperatur wurde der Formaldehyd abgenommen und die Zellen dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurde 0,2 %iges Triton X-100 in PBS hinzugegeben und für 5 Minuten im Kühlschrank belassen. Nachfolgend wurde das Triton abgesaugt und die Zellen erneut dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend folgte die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen über Nacht bei 4°C. Hierzu wurde 2 %iges Bovines Serumalbumin (BSA) in PBS verwendet.

Für die IF-Färbung wurden spezifische Antikörper von Proteinen der DNA-DSB-Reparatur sowie das Zentromerprotein F (CENP-F) zur Markierung der Zellzyklusphase verwendet. Die Primärantikörper wurden zunächst in 2 % BSA in PBS verdünnt. Angaben zu Herstellern der verwendeten Antikörper befinden sich im Anhang 8.4. Hierbei wurden *anti*-BRCA1 (Maus, 1:1.000) und *anti*-CENP-F (Kaninchen, 1:500), *anti*-Rad51 (Kaninchen, 1:5.000) und *anti*-CENP-F (Maus, 1:500) sowie *anti*-Rad54 (Maus, 1:1.000) und *anti*-CENP-F (Kaninchen, 1:500) jeweils in einem Eppendorf Reaktionsgefäß gemischt. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Deckgläschen dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Im Anschluss fand die Inkubation mit den Sekundärantikörpern, welche mit Fluoreszenzmarkern gekoppelt sind, statt. Verwendet wurden *anti*-mouse Alexa Fluor®488-conjugated (Ziege, 1:500) und *anti*-rabbit Cy3-conjugated (Ziege, 1:500) Antikörper. Die Inkubation der Sekundärantikörper erfolgte ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Es wurde erneut dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen und die Deckgläschen auf einem Objektträger (7,6*2,6 cm)

mit *Vectashield Mounting Medium with 4',6-Diamidin-2-phenylindol* (DAPI) fixiert und luftdicht versiegelt. Dabei ist DAPI ein DNA-interkalierender Farbstoff, welcher den Zellkern markiert.

Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Objektiv 63x). Hierfür wurden je Deckgläschen die Foci von 40 Zellen, die sich in der G2-Phase befanden, blind ausgezählt. Die Werte wurden gemittelt und bestrahlte sowie nicht bestrahlte Proben separat dargestellt.

4.9 Western Blot Analysen

Um den Gehalt ausgewählter Proteine im Zytoplasma und Kern der Zellen zu bestimmen, wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Zur Gewinnung der Zellfraktionen wurde das *Nuclear Extract Kit* von Active Motif verwendet. Zu Beginn wurden $2 \cdot 10^6$ Zellen in 15 cm Zellkulturschalen ausgestreut und in der logarithmischen Wachstumsphase für 32 h bzw. 72 h mit der Testsubstanz inkubiert (siehe Abschnitt 4.3.1). Für 72 h Versuche wurden lediglich $1 \cdot 10^6$ Zellen ausgestreut. Die Experimente wurden in Einzelbestimmung durchgeführt und jeweils eine nicht behandelte Kontrolle mitgeführt. Nach Ende der Inkubationszeit wurde durch Absaugen des Mediums der Versuch abgebrochen und die Zellen mit 15 ml Phosphataseinhibitor in PBS gewaschen. Nach dem Trypsinieren wurden die Zellen in 16 ml 10 %igem FKS in PBS aufgenommen und in 50 ml Röhrchen überführt. Anschließend wurde die Zellzahl mittels *Casy*[®] bestimmt, die Zellsuspension zentrifugiert (200 g, 5 Minuten, 4°C) und der Überstand abgesaugt. Die Zellpellets wurden bei -80°C gelagert.

Zur Gewinnung der Zytoplasmafraktion wurde das Zellpellet in 1 ml 1x *Hypotonic Buffer* aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von 50 µl Detergens zur Lyse der Zellmembran und das Durchmischen auf dem Vortex-Schüttler für 10 Sekunden. Im Anschluss wurde die Zellsuspension zentrifugiert (14.000 g, 30 Sekunden, 4°C) und der Überstand, in welchem sich das zytoplasmatische Extrakt befand, bei -21°C aufbewahrt.

Die verbliebenen Zellpellets wurden zur Gewinnung der Kernextraktion verwendet. Hierfür wurden diese mit 100 µl *Complete Lysis Buffer* versetzt und 10 Sekunden auf dem Vortex-Schüttler durchmischt. Zur vollständigen Lyse der Kernmembran wurde die Suspension bei 150 rpm für

30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneutem Vortexen für 30 Sekunden wurde zentrifugiert (14.000 g, 10 Minuten, 4°C) und der Überstand (Kernfraktion) bei -21°C gelagert.

4.9.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die photometrische Proteinbestimmung nach Bradford am *Tecan Infinite*[®] folgte, um eine gleichmäßige Auftragung der Proteinmenge auf dem Gel zu gewährleisten. Hierfür wurde eine Stammlösung aus BSA und bidestilliertem Wasser hergestellt und im Bereich von 0,01 mg/ml bis 0,075 mg/ml kalibriert. Es wurden je 20 μ l der Kalibrierlösungen und Proben in die Kavitäten einer 96-well Platte in Doppelbestimmung pipettiert. Zusätzlich wurden 180 μ l Reaktionsgemisch, bestehend aus 140 μ l Wasser und 40 μ l Bradford-Reagenz, hinzugefügt. Die Absorption der Proben und Kalibrierlösungen wurde bei 595 nm gemessen und der Proteingehalt mit Hilfe der Kalibriergeraden bestimmt. Anschließend wurden 50 μ g je 20 μ l Probe für die Gelelektrophorese verwendet.

4.9.2 SDS-PAGE

Mittels SDS-PAGE können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Hierbei schirmt SDS die Eigenladung der Proteine ab, sodass eine Auftrennung nach Molekulargewicht und nicht nach Ladung der Proteine stattfindet. Zu den 50 μ g Protein in 20 μ l Probe wurden 5 μ l Ladepuffer gegeben und die Proben bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Anschließend wurde das Gel mit 25 μ l Probe je Tasche beladen. Zusätzlich wurden 5 μ l eines Proteinleiters als Molekulargewichtsmarker in eine gesonderte Geltasche pipettiert. Die nachfolgende Tabelle 4.2 zeigt die Zusammensetzung des Gels, wobei ein 12 %iges Trenngel sowie ein 4 %iges Sammelgel verwendet wurde. Die Trennung wurde vorerst für 5 Minuten bei 50 V und anschließend für 60 Minuten bei 180 V in Tris-Glycin Puffer durchgeführt.

Tabelle 4.2: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels.

Gel	Zusammensetzung
Trenngel (12 %)	1995 μl H ₂ O
	1250 μl Tris (1,5 M, pH 8,8)
	50 μl SDS (10 %)
	50 μl Glycerin
	100 μl EDTA (0,1 M)
	1500 μl Acrylamid
	50 μl APS (10 %)
	5 μl TEMED
Sammelgel (4 %)	2930 μl H ₂ O
	500 μl Tris (1,5 M, pH 6,4)
	40 μl SDS (10 %)
	80 μl EDTA (0,1 M)
	400 μl Acrylamid
	40 μl APS (10 %)
	10 μl TEMED

4.9.3 Western Blot

Nach der Auftrennung der Proteine im Gel folgte der Transfer auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran mittels Western Blot. Hierfür wurde zunächst die PVDF-Membran 10 Sekunden in Methanol äquilibriert und anschließend mit *Whatman-Paper* und Glasfaservlies im zuvor gekühlten Transferpuffer 10 Minuten vorkonditioniert. Das Sammelgel wurde vom Trenngel entfernt und verworfen. Anschließend wurde das Trenngel ebenfalls im Transferpuffer vorkonditioniert. Zur Übertragung der Proteine auf die Membran wurde ein Tank-Blot-System verwendet, welches nach der folgenden Abbildung 4.2 zusammgebaut und mit Transferpuffer befüllt wurde. Der Proteintransfer erfolgte über Nacht bei 4°C und 30 V. Im Anschluss wurde zum Waschen der Membran PBS mit Tween®20 (PBST) eingesetzt. Um die Übertragung der Proteine zu überprüfen, wurden die Proteinbanden zunächst mit dem Farbstoff Ponceau-S markiert.

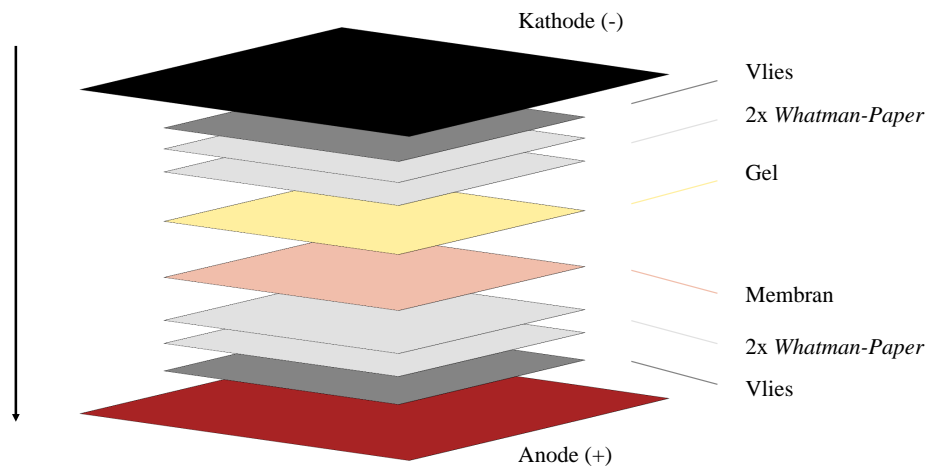


Abbildung 4.2: Aufbau eines Tank-Blot-Systems. Die Abbildung zeigt den Aufbau eines Tank-Blot-Systems, bei dem der Proteintransfer von Kathode zu Anode stattfindet. Auf die Kathode folgt ein Vlies, zwei *Whatman-Paper*, das Gel sowie die Membran, erneut zwei *Whatman-Paper* und Vlies.

4.9.4 Immunodetektion

Zunächst wurde die Ponceau-S-Lösung mit bidestilliertem Wasser abgespült, um anschließend die unspezifischen Bindungsstellen der Membran zu blockieren. Die Membran wurde dafür 1 h in 5 %iger Blocking-Lösung (2,5 g Milchpulver/50 ml PBST) geschwenkt. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C. Hierbei wurden *anti-Rad51* (Kaninchen, 1:500) und *anti-Rad54* (Maus, 1:500) verwendet. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in PBST gewaschen und mit dem Sekundärantikörper für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die verwendeten Sekundärantikörper *mouse anti-rabbit* (1:1.000) und *donkey anti-mouse* (1:1.000) sind *horseradish* Peroxidase (HRP) gekoppelt. Die Membran wurde erneut dreimal für 10 Minuten mit PBST gewaschen. Zusätzlich wurden Ladekontrollen nach dem selben Schema angefärbt, um eine gleichmäßige Proteinauftragung sowie eine erfolgreiche Fraktionierung zu überprüfen und eine semiquantitative Auswertung treffen zu können. Als Ladekontrollen wurde für die zytoplasmatische Fraktion *anti- α -Tubulin* (Maus, 1:500) und für die Kernfraktion *anti-H3* (Kaninchen, 1:500) sowie die oben beschriebenen Sekundärantikörper verwendet. Weitere Angaben zu den Herstellern der Antikörper sind im Anhang 8.4 aufgeführt.

Die Chemilumineszenz der HRP gekoppelten Antikörper wurde mittels *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent Kit* gemessen. Hierfür wurde Reagenz 1 zu gleichen Teilen mit Reagenz 2 gemixt und 1 ml für 1 Minute auf die Membran gegeben. Anschließend wurde die Membran am *LAS-3000 Imaging System* von Fuji gemessen.

Zur Auswertung der Proteinbanden wurde das Programm *Aida Image Analyzer v.3.27* verwendet. Hierfür wurden die Peakflächen der einzelnen Proteinbanden bestimmt und auf die Ladekontrolle normiert. Anschließend wurden die behandelten Proben auf die nicht behandelte Kontrolle bezogen.

4.10 Genexpression

Mit Hilfe der HT RT-qPCR ist die gleichzeitige Untersuchung der Genexpression von 95 Genen in 96 Proben möglich. Die Methode erlaubt die Untersuchung ausgewählter Gene der DNA-Schadensantwort, Apoptose und Zellzyklusregulation, Metallhomöostase, des Fremdstoffmetabolismus sowie der oxidativen Stressantwort auf transkriptioneller Ebene (Fischer *et al.* 2016). Eine detaillierte Einteilung der Gencluster ist in Anhang 9.1 aufgeführt.

Hierfür wurden zunächst $0,5 \cdot 10^6$ Zellen in 6 cm Zellkulturschalen ausgestreut und in der logarithmischen Wachstumsphase inkubiert. Die Versuche wurden in Doppelbestimmung durchgeführt und teilweise bestrahlt. Nachfolgende Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Nach einer Gesamtkubationszeit von 32 h wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit Trypsin behandelt und in 3 ml 10 %igem FKS in PBS aufgenommen. Anschließend wurde die Suspension in ein 15 ml Röhrchen überführt und zentrifugiert (1.300 rpm, 3 Minuten, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen, die Suspension erneut zentrifugiert (1.300 rpm, 3 Minuten, 4°C) und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde bei -21°C gelagert.

4.10.1 RNA-Isolierung

Nach dem Pelletieren wurde die RNA der Zellen isoliert. Hierfür wurde das *NucleoSpin® RNA Plus Kit* verwendet. Die Isolation wurde auf Eis durchgeführt und alle Arbeitsflächen vorher mit 70 %igem Ethanol gereinigt. Die Zellpellets wurden in 350 μ l Lysepuffer (LBP) resuspendiert,

gevoertext und anschließend die Suspension auf eine DNA-bindende Säule gegeben und zentrifugiert (11.000 rpm, 30 Sekunden, 4°C). Die Säule wurde verworfen und dem Eluat 100 μl *Binding Solution* zugegeben. Die Lösung wurde im Anschluss auf eine RNA-bindende Säule gegeben und erneut zentrifugiert (11.000 rpm, 20 Sekunden, 4°C), um störende Proteine und Salze zu entfernen. Nachfolgend wurde das Eluat verworfen und die Säule mit 200 μl Waschpuffer 1 (WB1) gewaschen und zentrifugiert (11.000 rpm, 20 Sekunden, 4°C). Dieser Schritt wiederholte sich zweimal mit 600 μl und 250 μl Waschpuffer 2 (WB2), wobei der Durchgang jedes Mal verworfen wurde. Die Elution der RNA wurde nachfolgend mit 30 μl RNase-freiem Wasser mittels Zentrifugation (11.000 rpm, 1 Minute, 4°C) durchgeführt. Das Eluat wurde zur Erhöhung der Ausbeute erneut auf die Säule gegeben und anschließend zentrifugiert (11.000 rpm, 1 Minute, 4°C). Im Anschluss wurde sowohl der RNA-Gehalt als auch die Reinheit der RNA am *Tecan Infinite*[®] photometrisch gemessen. Hierfür wurde das Verhältnis 260 nm zu 280 nm bestimmt und Werte größer 2,0 als akzeptabel angesehen. Die isolierte RNA wurde bei -21°C gelagert.

4.10.2 Reverse Transkription

Nach erfolgter Isolierung der RNA wurde diese mit Hilfe des *qScript*[™] *cDNA Synthesis Kits* in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde 1 μg RNA mit 5 μl Mastermix, bestehend aus 1 μl *iScript Reverse Transkriptase* und 4 μl 5-fachem *Reaction Mix*, gemischt und auf 20 μl mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt. Nach dem Resuspendieren und Zentrifugieren erfolgte die cDNA-Synthese im Thermocycler mit folgendem Temperaturprogramm: 25°C für 5 Minuten, 42°C für 30 Minuten, 85°C für 5 Minuten und 4°C Endtemperatur. Die cDNA wurde bei -21°C für maximal 2 Wochen gelagert.

4.10.3 Preamplifikation und Exonukleaseverdau

Durch die Preamplifikation (STA) (*Specific Target Amplification*) wird gewährleistet, dass ausreichend *template*-Menge der Zielgene vorhanden ist. Hierfür wurden zunächst die 95 Primer-Paare gepoolt und mit DNA-Suspensionspuffer versetzt. Die Endkonzentration des *Pooled Primer Mix* betrug 500 nM und wurde bei -21°C aufbewahrt. Hiervon wurden 0,5 μl je Probe für den Pre-Mix verwendet, welche mit 2,5 μl 2-fach *TaqMan*[®] *PreAmp Master Mix* und 0,75 μl PCR-zertifiziertes Wasser gemischt wurden. Dieser Pre-Mix wiederum wurde mit 1,25 μl cDNA der Proben versetzt.

Zusätzlich zu den Proben wurde eine Wasser-Kontrolle ohne *template* (NTC-STA) und eine RNA-Kontrolle (noRT) mitgeführt. Nach dem Durchmischen und Zentrifugieren wurde die STA im Thermocycler durchgeführt. Dabei wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet: 95°C für 10 Minuten, 12 Zyklen 95°C für 15 Sekunden sowie 60°C für 4 Minuten, 4°C Endtemperatur.

Im Anschluss an die STA wurde zum Entfernen der ungebundenen Primer ein Exonukleaseverdau durchgeführt. Hierfür wurde zunächst eine Exonukleaselösung, bestehend aus 1,4 μl PCR-zertifiziertem Wasser, 0,2 μl Exonuklease-Reaktionspuffer sowie 0,4 μl Exonuklease, hergestellt und zu den Proben pipettiert. Die Proben wurden erneut durchmischt und zentrifugiert. Im Anschluss wurde im Thermocycler der Exonukleaseverdau nach folgendem Temperaturprogramm gestartet: 37°C für 40 Minuten, 80°C für 15 Minuten, 4°C Endtemperatur. Nach dem Verdau wurden die Proben 5-fach mit TE-Puffer verdünnt, durchmischt, zentrifugiert und anschließend bei -21°C gelagert.

4.10.4 Primer- und Probenvorbereitung

Zunächst wurden die *forward* und *reverse* Primer von 100 μM auf 5 μM verdünnt, indem 2,5 μl Primer-Paar mit 25 μl 2-fach *Assay Loading Reagent* und 22,5 μl DNA-Suspensionspuffer versetzt wurden. Dieser Reaktionsmix wurde bei -21°C aufbewahrt. Zusätzlich wurde eine *No Reaction Control* (NRC) mit PCR-zertifiziertem Wasser anstelle des Primer-Paares mitgeführt.

Es wurden 2,25 μl der STA und Exonukleaseverdau behandelten Proben mit 2,5 μl 2-fach *SsoFast™ EvaGreen® Supermix with low ROX* und 0,25 μl 20-fachem *DNA Binding Dye Sample Loading Reagent* versetzt. Zudem wurde eine Wasser-Kontrolle (NTC) mitgeführt.

4.10.5 96x96 Dynamic Array IFC qPCR Analyse

Nachdem die Primer und Proben vorbereitet wurden, erfolgte die Beladung des *dynamic array IFC (integrated fluidic circuit)*. Hierfür wurden die beiden Akkumulatoren des *dynamic array* mit dem *Control Line Fluid* befüllt und die Schutzfolie entfernt. Anschließend wurde der Chip mittels Prime (136x) Programm im *IFC Controller HX* vorbereitet, indem das Fluid in alle Kanäle des Chips geleitet wurde. Daraufhin wurden je 5 μl der Proben sowie Primer in die Kavitäten des

Chips gegeben und erneut in den *IFC Controller HX* mit dem Load Mix (136x) Programm zur Vermischung der Proben und Primer gegeben. Im Anschluss wurde der Chip in das BioMark™ HD System gestellt und die qPCR durchgeführt. Hierfür wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet: 70°C für 40 Minuten, 60°C für 30 Sekunden, 95°C für 60 Sekunden, 30 Zyklen 96°C für 5 Sekunden und 60°C für 20 Sekunden.

4.10.6 Datenanalyse und Auswertung

Zur Datenanalyse und Auswertung wurden die Programme *Fluidigm Real-Time PCR Analysis* und *GenEx* verwendet. Die *Fluidigm Real-Time PCR Analysis* Software wurde verwendet, um eine gleichmäßige Beladung des Chips unter zu Hilfenahme des Referenz-Farbstoffes ROX zu überprüfen. Die C_q -Werte der Zielamplifikate wurden unter Verwendung des Fluoreszenz-Farbstoffes *EvaGreen*® ermittelt und als *Heatmap* dargestellt, mit welcher die erfolgreiche Durchführung mittels Schwellenwertmethode überprüft wurde.

Anschließend wurde zur weiteren Verarbeitung der Daten die Software *GenEx* verwendet. Hierbei wurden zunächst alle C_q -Werte größer 22 entfernt und auf die Referenzgene (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT1*) normalisiert. Die optimale Auswahl der Referenzgene wurde über die integrierten Softwares *geNorm* und *Normfinder* bestimmt. Mittels $\Delta\Delta C_q$ -Methode konnte daraufhin die relative Transkriptmenge der Zielgene berechnet und auf die nicht behandelte Kontrolle bezogen werden, wobei diese Kontrolle auf einen Expressionswert von 1 gesetzt wurde. Die nachfolgenden Formeln 4.1 - 4.3 wurden zur Berechnung herangezogen. Bei einer Veränderung der relativen Genexpression um den Faktor 2, wurde von einem relevanten Einfluss ausgegangen.

$$\Delta C_q = C_q \text{ Zielgen} - C_q \text{ Referenzgen} \quad (4.1)$$

$$\Delta\Delta C_q = \Delta C_q \text{ Behandlung} - \Delta C_q \text{ Kontrolle} \quad (4.2)$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_q} \quad (4.3)$$

4.11 Zellzyklusverteilung und Apoptoseuntersuchungen

Zur Untersuchung der Zellzyklusverteilung und Apoptoseinduktion unter Einfluss von Mangan mittels FACS wurden zunächst $0,5 \cdot 10^6$ Zellen in 6 cm Zellkulturschalen ausgestreut. Versuche wurden in Einzelbestimmung durchgeführt, zusätzlich wurde eine Positivkontrolle mit Staurosporin zur Induktion der Apoptose mitgeführt. Für Experimente mit einer Inkubationszeit von 72 h wurden lediglich $0,25 \cdot 10^6$ Zellen ausgestreut. Die Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase inkubiert (siehe Abschnitt 4.3.1). Für die Inkubation mit $250 \mu\text{M}$ Staurosporin wurde eine 1 mM Stammlösung hergestellt und verdünnt.

Nach 32 h bzw. 72 h wurden $150 \mu\text{l}$ des Mediums in ein Rundboden-Röhrchen überführt, das restliche Medium abgesaugt und die Zellen, wie in Abschnitt 4.1 beschrieben, abgelöst. Die Zellen wurden in 1 ml Medium aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurden erneut $150 \mu\text{l}$ Zellsuspension zu den $150 \mu\text{l}$ Medium zur Apoptose-Messung hinzugegeben. Die restliche Zellsuspension wurde in ein neues Rundboden-Röhrchen zur Zellzyklus-Bestimmung gegeben. Für die Apoptose-Messung wurde ein Mastermix bestehend aus Ringer-Lösung, Propidiumiodid und Annexin V als Fluoresceinisothiocyanat-Konjugat (Annexin V-FITC) angesetzt. Für jedes Röhrchen wurden $200 \mu\text{l}$ Ringer-Lösung, $5 \mu\text{l}$ Propidiumiodid und $1 \mu\text{l}$ Annexin V-FITC benötigt. Es wurden $200 \mu\text{l}$ des Mastermixes zu den Röhrchen der Apoptose-Messung hinzugegeben und 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Dabei färbt Propidiumiodid die DNA toter Zellen an, da es nicht durch die Zellmembran intakter Zellen diffundiert. Während Annexin V-FITC apoptotische Zellen durch die Bindung an Phosphatidylserin, welches bei der Apoptose an die äußere Zellmembran transponiert wird, markiert. Anschließend wurden die Zellen am FACS gemessen. Propidiumiodid wird, wie bereits beschrieben, bei 488 nm angeregt und emittiert Strahlung bei einer Wellenlänge von 620 nm, während Annexin V-FITC ebenfalls bei 488 nm angeregt wird, jedoch Strahlung bei 530 nm emittiert. Für die Apoptose-Messung wurden 10.000 Events gemessen.

Die Rundboden-Röhrchen mit der Zellsuspension zur Zellzyklus-Bestimmung wurden zentrifugiert (1.300 rpm, 3 Minuten, 4°C) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen und resuspendiert. Um Zellagglomeration zu vermeiden, wurde tropfenweise eiskaltes 96 %iges Ethanol auf dem Vortex-Schüttler hinzugegeben und die Zellen über Nacht bei -21°C fixiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (1.300 rpm, 3 Minuten, 4°C), der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 1 ml DAPI-Lösung aufgenommen. Die Färbung erfolgte für 2 h auf Eis, danach wurden die Lösungen am FACS gemessen. DAPI emittiert Strahlung bei 455 nm und wird im UV-Bereich angeregt. Zur Bestimmung der Zellzyklusphasen-

verteilung wurden 30.000 Events am FACS gemessen. Durch die unterschiedliche Intensität des Fluoreszenzsignals konnten die einzelnen Phasen des Zellzyklus bestimmt werden. Abbildung 4.3 zeigt die Apoptose-Messung von HeLa S3-Zellen, wobei Abbildung 4.4 die Einteilung der Zellzyklus-Bestimmung am FACS darstellt.

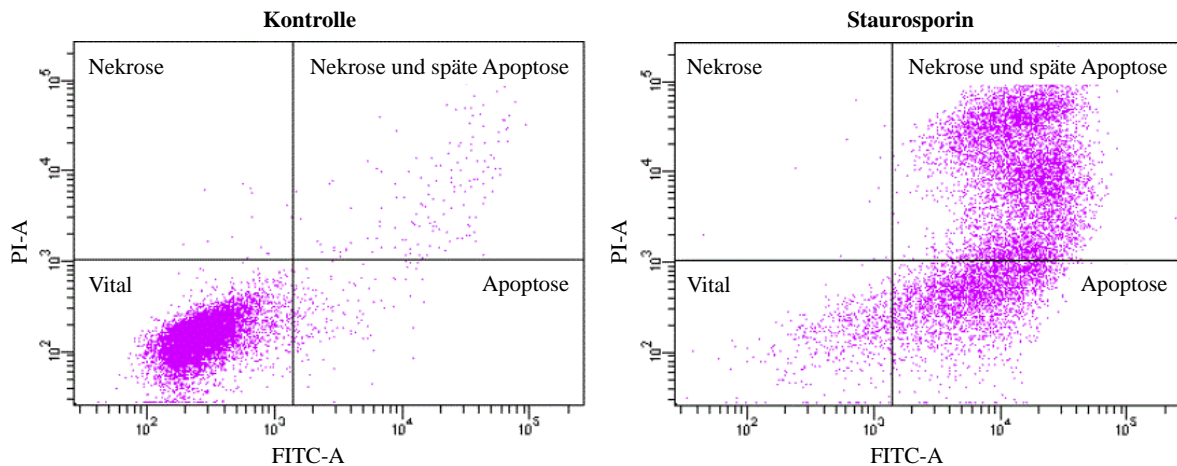


Abbildung 4.3: Exemplarisches Histogramm einer Apoptose-Messung am FACS. Dargestellt sind die Histogramme von HeLa S3-Zellen ohne Behandlung (links) sowie mit Staurosporin-Behandlung (rechts) als Positivkontrolle zur Induktion der Apoptose. Gezeigt ist die Einteilung der Apoptose-Messung am FACS. Hierbei wird die Fläche des Propidiumiodid (PI) Signals gegen die Fläche des Fluoresceinisothiocyanat (FITC) Signals aufgetragen. Vitale Zellen sind PI und FITC negativ, da die Farbstoffe nicht die intakte Zellmembran passieren können (links unten). Apoptotische Zellen sind FITC positiv, da es zur Translokation des Phosphatidylserins an die Zelloberfläche apoptotischer Zellen kommt und FITC an diese binden kann. Gleichzeitig sind die apoptotischen Zellen jedoch PI negativ, da PI die Zellmembran nicht passieren kann (rechts unten). Zellen, welche sich in der Nekrose und späten Apoptose befinden, sind FITC und PI positiv (rechts oben). Nekrotische Zellen sind FITC negativ, jedoch PI positiv (links oben).

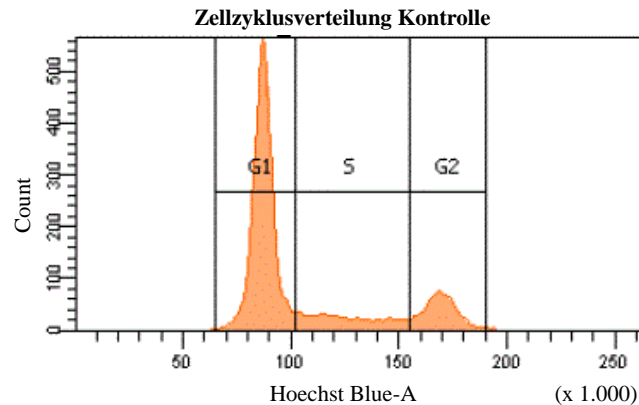


Abbildung 4.4: Exemplarisches Histogramm einer Zellzyklusphasenverteilung von HeLa S3-Zellen. Die Abbildung zeigt die Zellzyklusphasenverteilung von HeLa S3-Zellen. Hierbei werden die gemessenen Events (*Counts*) gegen die Fläche des 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Signals (*Hoechst Blue-A*) aufgetragen. Dabei ist DAPI ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher an die DNA der Zellen bindet. Durch die unterschiedliche Intensität des Fluoreszenzsignals können die einzelnen Phasen des Zellzyklus' in G1, S und G2 eingeteilt werden.

4.12 Primer-Etablierung

Um den Einfluss von Chromatin auf die Transkription der *POLQ* zu untersuchen, wurden zunächst Primer-Paare designt, deren Spezifität und Effizienz gemessen und anschließend eine konventionelle qPCR durchgeführt. Das Primer-Paar für das Gen *POLQ* ist im Anhang 9.2 mit seinen Parametern aufgeführt. Die Ergebnisse zur Primer-Etablierung sind im Anhang 9.3 aufgeführt.

4.12.1 Primer-Design

Zur Untersuchung der Transkriptmenge des Gens *POLQ* mittels konventioneller qPCR wurden zunächst spezifische Primer-Paare designt. Hierfür wurde als Software der *Beacon Designer v.8.20* verwendet. Diese ruft Informationen zum Gen von der *National Center for Biotechnology Information*

(NCBI) Datenbank ab, wobei hierfür die dort hinterlegte NM-Nummer des Gens in die Software kopiert und der zu verwendende Assay ausgewählt wurde. Dabei gibt die NM-Nummer eine bekannte Transkriptvariante des Gens wieder. Anschließend wurde der *SYBR® Green Design* Assay ausgewählt. Daraufhin wurden Kreuzhomologien zu anderen Genen sowie Bereiche, welche Template-Sekundärstrukturen bilden, ausgeschlossen. Zusätzlich wurden Primer-Konzentrationen von 500 nM, ein G/C-Anteil von 40 bis 60 % sowie eine Schmelztemperatur von $60 \pm 5^\circ\text{C}$ angegeben. Weitere Kriterien des Primer-Paares waren eine Länge von 18 bis 24 Basenpaaren sowie eine PCR-Produktlänge von 100 bis 250 Basenpaaren. Um die Primer-Spezifität weiterhin zu erhöhen wurden Primer ausgewählt, welche über eine Exon-Exon-Schnittstelle reichten. Hierbei ist der Vorteil, dass diese erst in der RNA vorzufinden sind. Somit ist ein unerwünschtes Anlagern der Primer an die genomische DNA nicht möglich.

Diese Parameter ergaben sich aus der bereits etablierten HT RT-qPCR Methode aus unserem Arbeitskreis, wodurch später entstandene Primer dem Hochdurchsatz einfach hinzugefügt werden können.

4.12.2 Primer-Spezifität

Um die Spezifität des Primer-Paares zu überprüfen, wurde eine konventionelle qPCR durchgeführt und anschließend die Größe des PCR-Produktes mittels Gelelektrophorese nachgewiesen. Hierfür wurde zunächst der *forward* Primer mit dem *reverse* Primer 1:1 gemischt und gevortext. Anschließend wurde 1 μl des Primer-Paares mit 10 μl *SsoFast™ EvaGreen® Supermix with low ROX* und 1 μl cDNA gemischt und mit PCR-zertifiziertem Wasser auf 20 μl aufgefüllt. Die verwendete cDNA wurde kommerziell erworben. Im Anschluss wurde die qPCR im Thermocycler durchgeführt, wobei folgendes Temperaturprogramm verwendet wurde: 95°C für 1 Minute, 40 Zyklen 95°C für 5 Sekunden sowie 60°C für 20 Sekunden.

Nach Abschluss der qPCR wurde die Größe des PCR-Produktes mittels Gelelektrophorese überprüft. Hierzu wurde ein 2 %iges Agarosegel verwendet, welches sich durch seine großporige Eigenschaft gut zum Trennen von DNA-Fragmenten eignet. Zur Detektion wurde zusätzlich *GelRed* (1:10.000) ins Gel gegeben. Zunächst wurden 7,5 μl Probe mit 1,5 μl Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert, wobei zusätzlich 5 μl eines DNA-Leiters zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente in eine gesonderte Tasche gegeben wurde. Die Elektrophorese wurde bei 110 V für 60 Minuten in 5-fachem Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer durchgeführt und das Gel mittels LAS-3000 *Imaging System* von Fuji und der Software *AIDA Image Analyzer v.3.27* ausgewertet.

4.12.3 Primer-Effizienz

Die Primer-Effizienz wurde mittels kommerziell erworbener cDNA gemessen. Hierzu wurde die cDNA schrittweise in PCR-zertifiziertem Wasser verdünnt (1:5; 1:10; 1:50; 1:100 und 1:200) und, wie bereits in Abschnitt 4.12.2 beschrieben, gemischt. Das Temperaturprogramm der Primer-Spezifität wurde ebenfalls zur Messung der Effizienz verwendet. Im Anschluss an die qPCR konnte über die C_q -Werte und die Konzentration der cDNA eine Kalibrierung erstellt werden. Die Effizienz wurde über die unten angegebene Formel 4.4 berechnet (Raymaekers *et al.* 2009). Dabei ist eine Effizienz zwischen 0,9 bis 1,1 sowie ein Korrelationskoeffizient von 0,99 bis 0,999 akzeptabel.

$$E = 10^{(-1/-\text{Steigung})} - 1 \quad (4.4)$$

4.13 POLQ Genexpression

Zur Untersuchung des Einflusses von Chromat auf die Transkriptmenge der *POLQ* wurde eine konventionelle qPCR durchgeführt. Hierbei wurden die Proben, wie im Kapitel 4.10 beschrieben, ausgestreut, inkubiert und abgebrochen, wobei zusätzlich ein Inkubationszeit von 72 h mitgeführt wurde. Des Weiteren wurden die Proben in der selben Weise, wie in den Abschnitten 4.10.1 bis 4.10.3 beschrieben, behandelt. Für die konventionelle qPCR wurde das Temperaturprogramm, welches in Abschnitt 4.10.5 beschrieben ist, verwendet und die C_q -Werte der Zielamplifikate unter Verwendung des Fluoreszenz-Farbstoffes *EvaGreen*[®] ermittelt. Als Referenzgen wurde *GAPDH* verwendet und zur Auswertung die Formeln 4.1 - 4.3 der $\Delta\Delta C_q$ -Methode angewandt.

4.14 Statistik

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Zur Überprüfung auf Varianzhomogenität wurde der Levene-Test und auf Abweichung zwischen den Mittelwerten die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) angewandt. Bei Varianzhomogenität wurde anschließend der Dunnett T3-Test, bei Varianzinhomogenität der Dunnett T-Test verwendet. Als statistisch signifikant galt $p < 0,05$.

5 Ergebnisse und Diskussion

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dargestellt, beschrieben sowie ausführlich diskutiert. Zunächst werden die Ergebnisse mit MnCl_2 aufgezeigt, während im späteren Verlauf auf die Ergebnisse zu $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ genauer eingegangen wird. Im Anhang sind in Abschnitt 9.6 ergänzende Daten sowie der Reporter-Assay mit weiteren löslichen Metallverbindungen dokumentiert.

5.1 Mangan

5.1.1 Zytotoxizität von Mangan in HeLa S3-Zellen

Um einen geeigneten Konzentrationsbereich nach einer Behandlung mit Mangan festzulegen, wurde zunächst die Zytotoxizität in HeLa S3-Zellen untersucht. Hierfür wurde durch Bestimmung der Zellzahl die akute und durch die CFA die langfristige Toxizität festgestellt. Zusätzlich wurde der ATP-Gehalt mittels Lumineszenz-Messung bestimmt, um die metabolische Aktivität der Zellen wiederzugeben. Weiterhin sind Zytotoxizitätsversuche mit Röntgenstrahlung, welche DNA-DSB erzeugen, durchgeführt wurden, da in nachfolgend aufgeführten Experimenten die DNA-Schadensreparatur betrachtet wurde. Die Zellen wurden für 24 h mit MnCl_2 inkubiert, mit 1 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Für nicht bestrahlte Versuche wurden eine Gesamtkubationszeit von 32 h gewählt. Zusätzlich wurde eine Inkubation von 72 h untersucht, um die subchronische Toxizität zu bestimmen.

In Abbildung 5.1 ist die Zellzahl von HeLa S3-Zellen unter Einfluss von MnCl_2 dargestellt. Hierbei zeigte sich ein leicht zytotoxischer Effekt bei $500 \mu\text{M}$ MnCl_2 , wobei die Zellzahl ohne Bestrahlung auf 82 % und mit 1 Gy Bestrahlung auf 77 % der nicht bestrahlten Kontrolle zurück ging. Es zeigte sich, dass die Bestrahlung mit 1 Gy nur einen geringen Einfluss auf die Zellzahl von HeLa S3-Zellen aufwies. Bei der höchsten Konzentration von $1000 \mu\text{M}$ MnCl_2 hingegen zeigte sich ein Abfall auf 61 % der Kontrolle bei den nicht bestrahlten sowie bestrahlten Proben. Eine Inkubationszeit von 72 h zeigte bei einer Konzentration von $250 \mu\text{M}$ eine Viabilität von 99 % der Kontrolle und keinen Einfluss von MnCl_2 in HeLa S3-Zellen in diesem Zeitraum und Konzentrationsbereich.

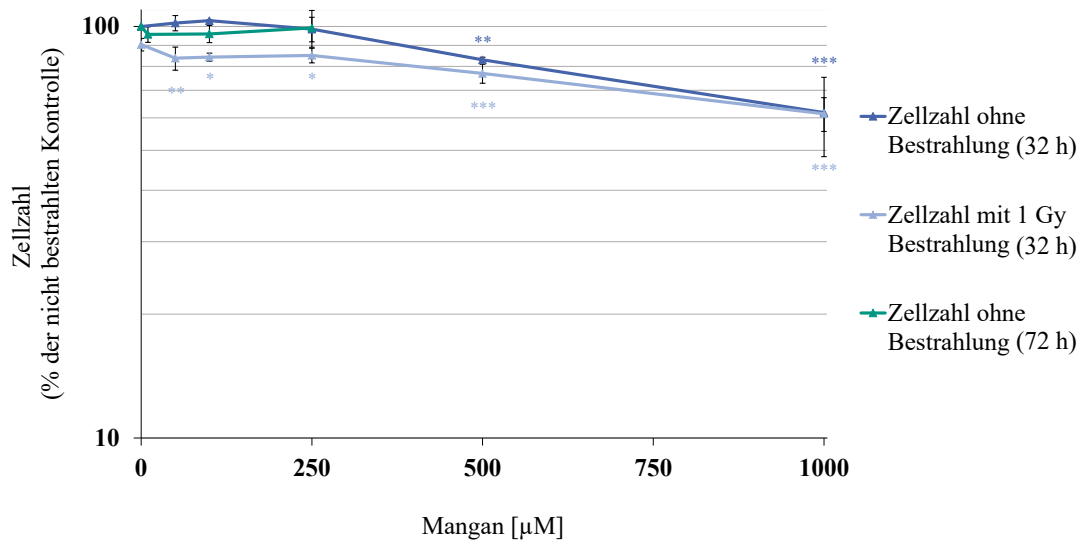


Abbildung 5.1: Einfluss von Mangan auf die Zellzahl von HeLa S3-Zellen. Gezeigt ist die Zellzahl von HeLa S3-Zellen nach einer Inkubation mit Manganchlorid (MnCl_2). Hierfür wurden Konzentrationen von $10 \mu\text{M}$ bis $1000 \mu\text{M}$ eingesetzt. Die Zellen wurden für 32 h inkubiert bzw. für 24 h vorinkubiert, mit 1 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Zur Untersuchung der subchronischen Toxizität wurde eine Inkubationszeit von 72 h gewählt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der nicht bestrahlten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

In Abbildung 5.2 ist die Koloniebildungsfähigkeit von HeLa S3-Zellen unter Einfluss von Mangan dargestellt. Hierbei zeigte sich kein zytotoxischer Effekt bis $250 \mu\text{M}$ MnCl_2 ohne Bestrahlung bei einer Inkubationszeit von 32 h und 72 h. Ab einer Konzentration von $500 \mu\text{M}$ konnte ein leicht zytotoxischer Effekt von MnCl_2 festgestellt werden, hierbei kam es zu einem Rückgang der Anzahl der Kolonien auf circa 70 % der Kontrolle. Eine Behandlung mit $1000 \mu\text{M}$ zeigte einen stark zytotoxischen Einfluss auf circa 25 % der Kontrolle. Dementgegen zeigte sich bei einer Bestrahlung mit 1 Gy eine additive Wirkung auf die Anzahl der Kolonien. Bereits die bestrahlte Kontrolle zeigte eine Rückgang der Kolonien auf 65 % bezogen auf die nicht bestrahlte Kontrolle. Eine Behandlung von $500 \mu\text{M}$ MnCl_2 führte zu einer Reduktion der Kolonienanzahl auf circa 35 % und bei einer Konzentration von $1000 \mu\text{M}$ auf 5 % der nicht bestrahlten Kontrolle.

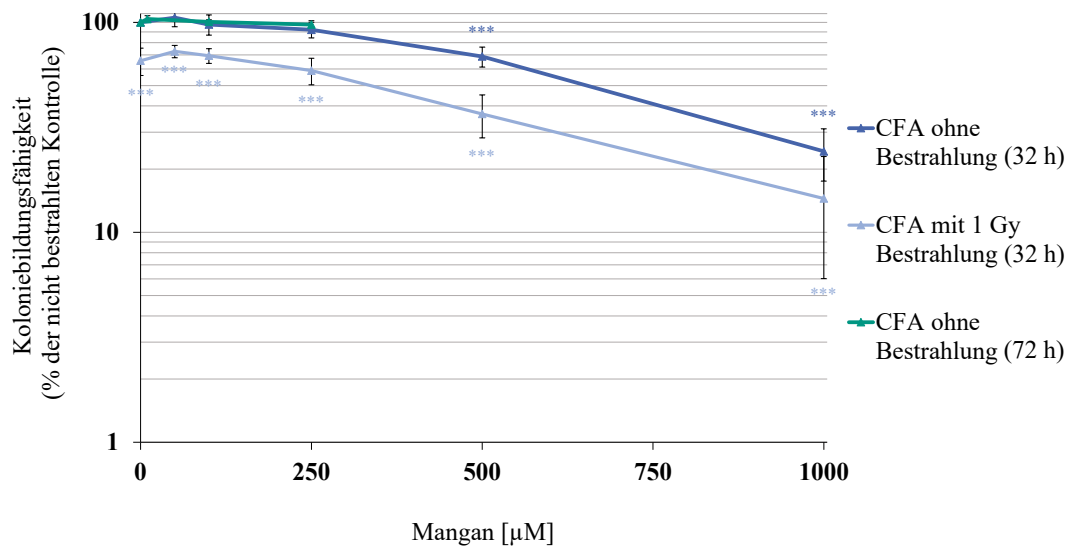


Abbildung 5.2: Einfluss von Mangan auf die Koloniebildungsfähigkeit (CFA) von HeLa S3-Zellen.

Dargestellt ist die CFA bezogen auf die nicht bestrahlte Kontrolle von HeLa S3-Zellen in Abhängigkeit der Manganchlorid (MnCl_2)-Konzentration. Dabei wurden Konzentrationen von $10 \mu\text{M}$ bis $1000 \mu\text{M}$ verwendet. Die Zellen wurden nach einer Inkubationszeit von 32 h bzw. 24 h Vorinkubation, 1 Gy Bestrahlung und 8 h Nachinkubation für 7 bis 10 Tage subkultiviert. Zusätzlich wurde für eine subchronische Toxizität eine Inkubationszeit von 72 h getestet. Gezeigt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der nicht bestrahlten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (***) ($p \leq 0,001$).

Der konzentrationsabhängige Rückgang der Zellzahl sowie der CFA von HeLa S3-Zellen konnte in der Literatur bereits gezeigt werden. Hierbei konnten keine zytotoxischen Einflüsse bis $100 \mu\text{M}$ MnCl_2 nach einer Inkubationszeit von 24 h festgestellt werden, wobei die Zellzahl auf 33 % der Kontrolle nach einer Behandlung mit $1000 \mu\text{M}$ MnCl_2 abfiel (Bornhorst *et al.* 2010). Zusätzlich wurde ein ähnlicher Effekt in A549-Zellen beobachtet. Die Zellzahl zeigte bei einer Behandlung mit $500 \mu\text{M}$ nach einer 24-stündigen Inkubationszeit einen leicht zytotoxischen Effekt auf etwa 75 % der Kontrolle und mit einer Inkubation von $1000 \mu\text{M}$ MnCl_2 einen Abfall auf 60 % der Kontrolle. Die CFA nahm bei der höchst getesteten Konzentration von $1000 \mu\text{M}$ MnCl_2 auf 80 % der Kontrolle ab (Bornhorst *et al.* 2012).

Abbildung 5.3 zeigt den ATP-Gehalt von HeLa S3-Zellen unter Einfluss von MnCl_2 . Es zeigte sich ebenfalls kein zytotoxischer Effekt von MnCl_2 bis $250 \mu\text{M}$ mit und ohne Bestrahlung sowie nach einer 72-stündigen Inkubationszeit. Erst ab einer Konzentration von $1000 \mu\text{M}$ nahm der ATP-Gehalt der Zellen ab. Dabei sank die metabolische Aktivität der Zellen ohne Bestrahlung auf 60 % und mit Bestrahlung auf 70 % der nicht bestrahlten Kontrolle.

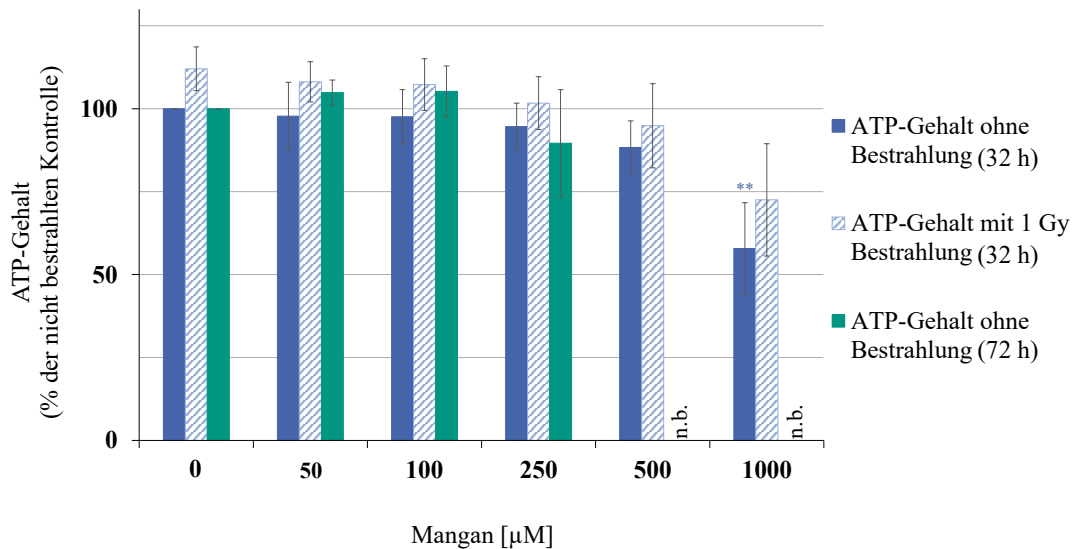


Abbildung 5.3: Einfluss von Mangan auf die metabolische Aktivität von HeLa S3-Zellen. Die Zellen wurden für 32 h mit Manganchlorid (MnCl_2) inkubiert bzw. für 24 h vorinkubiert, mit 1 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Zusätzlich wurde eine Inkubation mit MnCl_2 für 72 h zur Bestimmung der subchronischen Toxizität mitgeführt. Die metabolische Aktivität wurde über den intrazellulären ATP-Gehalt gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung. Die Abkürzung n.b. steht für nicht bestimmt. Statistische Signifikanz gegenüber der nicht bestrahlten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T3-Test (** $p \leq 0,01$).

Die metabolische Aktivität unter Einfluss von MnCl_2 wurde bereits in B-Lymphozyten untersucht. Hierbei konnte ebenfalls eine dosisabhängige Abnahme des ATP-Gehaltes festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch ein stärkerer Einfluss von Mangan bereits nach 12 h bzw. 24 h (Roth *et al.* 2012). Dies lässt sich möglicherweise mit den unterschiedlich verwendeten Zelllinien begründen.

Die zytotoxische Wirkung von Mangan kann auf verschiedene zugrundeliegende Mechanismen zurückgeführt werden. Dabei wird vor allem die Induktion von oxidativem Stress, durch das vermehrte Auftreten von ROS, und den damit verbundenen Signalwegen postuliert. Mangan ist in der Lage, mit Eisen-Schwefel-Clustern von Proteinen zu interagieren und Eisen aus diesen Verbindungen zu verdrängen. Beispiele für solche Proteine sind in den Komplexen der Atmungskette der

Mitochondrien, in denen Mangan bei erhöhter Exposition bevorzugt akkumuliert, anzutreffen. Die Beeinflussung vom Elektronentransport der Atmungskette durch Mangan führt dabei zur Generierung von ROS. Die Freisetzung von Eisen kann darüber hinaus verstärkt zu Fenton-Reaktionen führen, wodurch es zu einem zusätzlichen Anstieg an ROS kommt. Diese wiederum können Lipide, Proteine und auch die DNA schädigen. Außerdem kann durch die erhöhte Induktion von ROS die mitochondriale Membranpermeabilität erhöht werden. Dies wiederum führt zu einer Glutathion- sowie Cytochrom c-Depletion und somit zum Verlust antioxidativer Schutzsysteme durch Mangan (Zhang *et al.* 2004, zusammengefasst in Liu *et al.* 2013). Die Entstehung von oxidativem Stress über die Induktion von ROS ausgelöst durch Metallverbindungen konnte bereits mehrfach gezeigt werden (zusammengefasst in Hartwig 2013 sowie Li und Yang 2018).

Die Abnahme des ATP-Gehaltes nach einer Inkubation mit MnCl_2 lässt sich ebenfalls über die mögliche Hemmung der Atmungskette und der damit einhergehenden Inhibierung der ATP-Synthese erklären (zusammengefasst in Li und Yang 2018). Röntgenstrahlung ist zudem in der Lage, Moleküle zu ionisieren und somit die DNA zu schädigen. Die zusätzliche Behandlung mit ionisierender Strahlung scheint in der CFA einen additiven Effekt hervorzurufen und kann auf strahleninduzierte DNA-Schäden zurückgeführt werden (zusammengefasst in Ward 1990).

Für nachfolgende Versuche wurde aufgrund der vorliegenden Ergebnisse sowie der Literaturdaten ein Konzentrationsbereich bis $250 \mu\text{M}$ gewählt. Die PFGE wurde, aufgrund der Unempfindlichkeit der Methode, zusätzlich mit $500 \mu\text{M}$ MnCl_2 durchgeführt. Im Anschluss an die Bestimmung der Zytotoxizität wurde die Aufnahme von Mangan in HeLa S3-Zellen untersucht.

5.1.2 Zelluläre Aufnahme von Mangan in HeLa S3-Zellen

Zur Untersuchung der zellulären Aufnahme von Mangan in HeLa S3-Zellen wurde die GF-AAS verwendet. Dabei wurde ein Konzentrationsbereich von $100 \mu\text{M}$ bis $500 \mu\text{M}$ MnCl_2 sowie ein Zeitraum von 1 h bis 32 h gewählt. Abbildung 5.4 zeigt die konzentrations- und zeitabhängige Aufnahme von Mangan in HeLa S3-Zellen. Aufgrund der essentiellen Funktionen von Mangan wurde der basale Gehalt in HeLa S3-Zellen gemessen, wobei $15 \mu\text{M}$ festgestellt wurden. Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit wurde eine maximale Aufnahme von MnCl_2 beobachtet. Für $100 \mu\text{M}$ konnte ein zellulärer Gehalt von $0,25 \text{ mM}$ festgestellt werden, die Konzentrationen $250 \mu\text{M}$ und $500 \mu\text{M}$ zeigten einen Gehalt von 1 mM sowie $1,6 \text{ mM}$. Die Aufnahme stagnierte bei 32 h, weshalb eine Inkubationszeit von 24 h für nachfolgende Versuche eingehalten wurde.

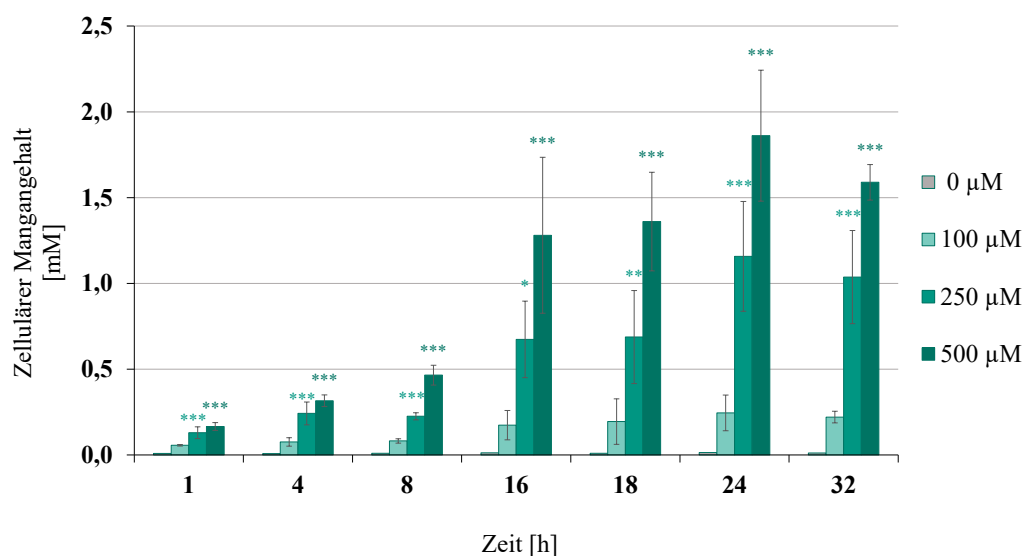


Abbildung 5.4: Zellulärer Gehalt von Mangan in HeLa S3-Zellen. Die Zellen wurden mit Manganchlorid (MnCl_2)-Konzentrationen von $100 \mu\text{M}$ bis $500 \mu\text{M}$ für einen Zeitraum von 1 h bis 32 h behandelt. Gezeigt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der jeweiligen Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Bornhorst *et al.* (2010, 2012) zeigten ebenfalls eine konzentrationsabhängige Aufnahme von Mangan. Dabei verwendeten Bornhorst *et al.* (2010) HeLa S3-Zellen und untersuchten die Gesamtaufnahme mittels ICP-OES (induktiv gekoppeltes Plasma mit optischer Emissionsspektrometrie). Eine andere Studie von Bornhorst *et al.* (2012) hingegen untersuchte den intrazellulären Gehalt auch mittels GF-AAS, jedoch in A549-Zellen. Unterschiede zeigten sich in den resultierenden Mangangehalten, welche in den beschriebenen Arbeiten gemessen wurden. Während Mangan in der vorliegenden Arbeit bis $100 \mu\text{M}$ und 8 h Inkubationszeit reguliert zu sein scheint, wurde ab einer Behandlungszeit von 16 h eine leichte Akkumulation beobachtet. Konzentrationen ab $250 \mu\text{M}$ wiesen zudem eine starke Akkumulation in HeLa S3-Zellen auf. Dies könnte möglicherweise auf eine gestörte Homöostase von Mangan ab einer Konzentration von $250 \mu\text{M}$ hindeuten. In den Studien von Bornhorst *et al.* (2010, 2012) hingegen konnte keine Akkumulation nach 24 h festgestellt werden. Diese Erkenntnisse können möglicherweise auf die unterschiedlichen Messmethoden sowie Zelllinien zurückgeführt werden.

Mangan als essentielles Spurenelement unterliegt einer homöostatischen Regulation. Der Influx wird vor allem über den DMT-1 und den Transferrin Rezeptor (TfR), welche ebenfalls von Eisen

genutzt werden, gesteuert. Weitere zelluläre Aufnahmemechanismen sind über die Calcium-Kanäle sowie Citrat- und Cholintransporter beschrieben. Der Efflux von Mangan hingegen ist bislang weniger erforscht, wobei bereits bekannt ist, dass der Efflux gegenüber dem Influx deutlich langsamer erfolgt. Mögliche Mechanismen hierfür sind der Transport über Ferroportin oder Natrium-Calcium-Austauscher (zusammengefasst in Bowman *et al.* 2011 und Chen *et al.* 2018). Denkbar wäre eine Dysregulation von Mangan bei hohen Konzentrationen, aufgrund der konkurrierenden Nutzung der Transportmechanismen mit Eisen. Bekannt ist bereits, dass Mangan in den Eisenhaushalt der Zelle eingreift und zu einer erhöhten Induktion von Eisen-Transportproteinen führt (Zheng und Zhao 2001, Garrick *et al.* 2006, Fitsanakis *et al.* 2010). Dies bestärkt die zuvor beschriebenen Vermutungen. Möglicherweise können durch eine gesteigerte Exposition von Mangan vermehrt Eisen-Transportproteine induziert werden, welche wiederum Mangan in die Zelle transportieren. Dabei könnte Mangan vermehrt in die Zelle aufgenommen werden, während der Efflux aufgrund der langsameren Ausscheidung von Mangan möglicherweise nicht beeinflusst ist. Zudem konnte eine erhöhte Affinität von Mangan gegenüber anderen Metallen an den DMT-1 festgestellt werden (Garrick *et al.* 2006). Dies würde ebenfalls eine Akkumulation von Mangan bei erhöhtem Vorkommen erklären.

5.1.3 Einfluss von Mangan auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Nach der Feststellung eines geeigneten Konzentrationsbereichs sowie der Inkubationszeit wurde der Einfluss von Mangan auf die Reparatur von DNA-DSB untersucht. Hierzu wurde zunächst die PFGE als direkter Nachweis von DNA-DSB durchgeführt und der Reporter-Assay zur Unterscheidung der einzelnen Reparaturmechanismen von DNA-DSB angewandt. Im Anschluss folgte die Betrachtung spezifischer Reparaturproteine mittels IF. Zudem wurde die Genexpression von 95 Genen untersucht, darunter auch eine Vielzahl von Genen der DNA-Reparatur.

5.1.3.1 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die PFGE gibt Aufschluss über die Induktion und Reparatur von DNA-DSB, wobei eine Unterscheidung der einzelnen Reparaturwege HR, SSA, NHEJ und MMEJ nicht möglich ist. Dabei wurden DSB der DNA durch Röntgenstrahlung erzeugt, welche nach 0 h sowie 8 h Reparaturzeit und Anfärben der DNA betrachtet wurden. Eine 8-stündige Nachinkubationszeit wurde gewählt, da

gezeigt werden konnte, dass beim Normalzustand der Zelle ein Großteil der strahleninduzierten DNA-DSB nach dieser Zeit repariert sind (Beucher *et al.* 2009). Der Gehalt an DNA im Gel zur DNA in den Blöckchen (*fraction of activity released* (FAR)-Wert) gibt hierbei Aufschluss über die Reparaturkinetik und Induktion von DNA-DSB. Je mehr DNA im Gel vorliegt, desto höher der FAR-Wert. Abbildung 5.5 zeigt ein exemplarisches Agarosegel einer PFGE, in welchem HeLa S3-Zellen für 24 h mit Mangan inkubiert, mit 80 Gy zur Induktion von DNA-DSB bestrahlt und für 0 h sowie 8 h nachinkubiert wurden. Durch das Entstehen von DNA-DSB kann die geschädigte DNA das großporige Agarosegel durchqueren. Diese DNA-Segmente können mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes *GelRed* angefärbt und über die Bestimmung der Grauwerte analysiert werden. Dabei erlaubt die PFGE eine Auftrennung von DNA-Fragmenten bis 50 Mbp (Herschleb *et al.* 2007).

Das dargestellte Gel (Abbildung 5.5) zeigt, dass die bestrahlten und mit 100 μM MnCl_2 behandelten Proben im Gegensatz zu den nicht bestrahlten Proben DNA im Gel aufwiesen. Bei einer Behandlung mit 500 μM MnCl_2 konnten zudem in den nicht bestrahlten Proben DNA-Fragmente im Gel nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine Induktion von DNA-DSB durch Mangan selbst hin. Mit zusätzlicher Bestrahlung zeigte die Behandlung mit 500 μM Mangan im Vergleich zur Kontrolle einen höheren Anteil an DNA im Gel auf. Zusätzlich konnte nach einer 8-stündigen Reparaturzeit eine stärkere Schweifbildung beobachtet werden, als direkt nach der Bestrahlung.

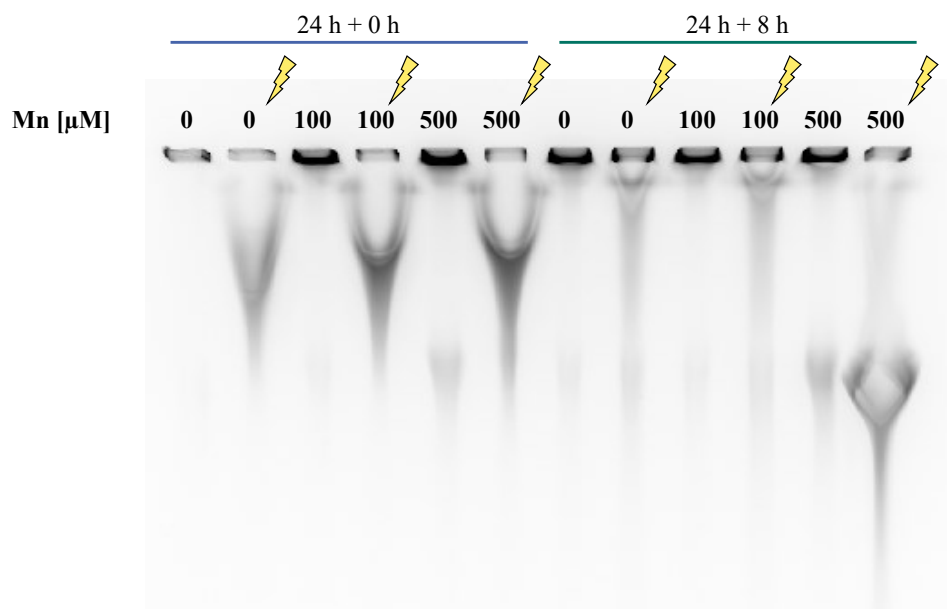


Abbildung 5.5: Repräsentatives Agarosegel einer Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE). Dargestellt ist ein exemplarisches Agarosegel, in welchem HeLa S3-Zellen für 24 h mit 100 μM und 500 μM Manganchlorid (MnCl_2) vorinkubiert, mit 80 Gy bestrahlt und 0 h sowie 8 h nachinkubiert wurden. Zusätzlich wurde eine nicht bestrahlte Kontrolle sowie nicht bestrahlte Inkubationen mitgeführt.

Die semiquantitative Auswertung über den FAR-Wert bestätigte die Betrachtung des Gels (Abbildung 5.6). Er stieg mit zunehmender Mangan-Konzentration auf das 3-fache bei den nicht bestrahlten Proben gegenüber der Kontrolle an. Ebenfalls wurde für die bestrahlten Proben dosisabhängig ein bis zu 20-facher FAR-Wert gegenüber der nicht bestrahlten Kontrolle festgestellt.

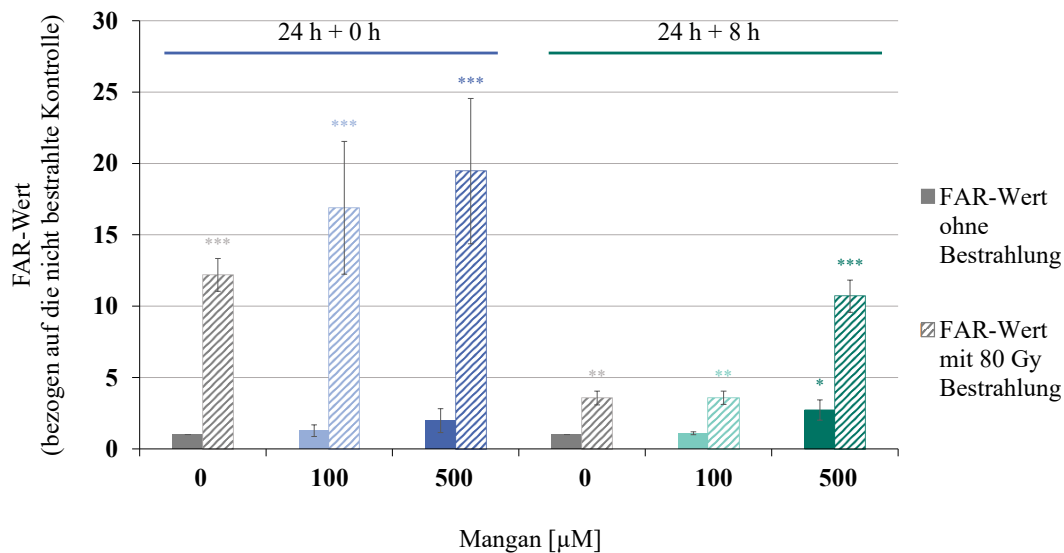


Abbildung 5.6: Einfluss von Mangan auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSB) mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE). Die Zellen wurden für 24 h mit Manganchlorid (MnCl_2) ($100 \mu\text{M}$ und $500 \mu\text{M}$) behandelt, mit 80 Gy bestrahlt und für 0 h und 8 h nachinkubiert. Zur Auswertung wurde der *fraction of activity released* (FAR)-Wert bestimmt. Der FAR-Wert gibt das Verhältnis zwischen dem DNA-Gehalt im Gel zum DNA-Gehalt im Blöckchen wieder. Dargestellt sind drei, in Doppelbestimmung durchgeführte, unabhängige Versuche \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der nicht bestrahlten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Diese Ergebnisse deuten auf eine intakte Reparatur von DNA-DSB bis zu einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ Mangan hin. Zudem scheint es, dass die Inkubation mit Mangan in diesem Konzentrationsbereich keine DNA-DSB erzeugt. Während nach einer Gesamtinkubationszeit von 24 h und $500 \mu\text{M}$ Mangan eine Tendenz zur Induktion von DNA-DSB ersichtlich wurde, zeigte sich nach einer Behandlungszeit von 32 h eine signifikante Erhöhung gegenüber der nicht bestrahlten Kontrolle. Dies deutet auf eine Induktion von DNA-DSB in diesem Zeitraum bei einer Behandlung mit $500 \mu\text{M}$ MnCl_2 hin.

In der Literatur konnte mittels *alkaline unwinding* (AU) bereits gezeigt werden, dass MnCl_2 in HeLa S3-Zellen ab $100 \mu\text{M}$ DNA-Strangbrüche erzeugen kann (Bornhorst *et al.* 2010). Da diese Methode sensitiver ist als die PFGE, können hier möglicherweise schon bei geringeren Mangan-Konzentrationen DNA-Strangbrüche detektiert werden. Zusätzlich ist zu bedenken, dass mit Hilfe der AU DNA-Einzelstrangbrüche und DNA-DSB betrachtet, während mittels PFGE nur DNA-DSB detektiert werden können.

Des Weiteren konnte in einer Studie von Lima *et al.* (2008) mit humanen Lymphozyten die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ mittels Comet Assay gezeigt werden. Nach einer Inkubationszeit von 3 h wurden bereits ab $25 \mu\text{M}$ DNA-Strangbrüche induziert. Der Comet Assay ist eine Einzelzellanalyse und somit empfindlicher als die PFGE, weshalb vermutlich bereits geringe Mangan-Konzentrationen einen Einfluss zeigen können. Zudem ist eine Differenzierung von DNA-Einzelstrangbrüchen und DNA-DSB nur unter neutralen Bedingungen möglich. Der Comet Assay in der Studie von Lima *et al.* (2008) wurde unter alkalischen Bedingungen durchgeführt. Ein möglicher Mechanismus der DNA-Schadensinduktion durch Mangan wäre, dass durch die Generierung von ROS die DNA geschädigt wird und DNA-DSB erzeugt werden (Jiao *et al.* 2008, Lima *et al.* 2008). Zudem könnte der gesteigerte DNA-Gehalt im Gel auf eine Beeinträchtigung der Reparatur dieser DNA-Schäden hinweisen. Möglich wäre ebenfalls eine fortwährende Induktion von DNA-DSB durch die Anwesenheit von Mangan auch im Nachinkubationsmedium. Die Ergebnisse der 8-stündigen Nachinkubationszeit deuten außerdem darauf hin, dass kürzere DNA-Fragmente durch $500 \mu\text{M}$ Mangan und Bestrahlung in diesem Zeitraum erzeugt werden und diese weiter ins Gel vordringen können. Möglicherweise könnte die DNA jedoch auch aufgrund apoptotischer Vorgänge fragmentiert werden. Beim Einleiten der Apoptose werden zelluläre Bestandteile, wie die DNA, abgebaut (zusammengefasst in Bortner *et al.* 1995). Für Mangan konnte dieser Mechanismus im zytotoxischen Konzentrationsbereich bereits gezeigt werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen führte die Behandlung mit Mangan in unterschiedlichen Zelllinien ab 1 mM zu einer Apoptoseinduktion (Oubrahim *et al.* 2001, Hirata 2002, Deng *et al.* 2011).

Die vorliegenden Ergebnisse sowie die Literaturdaten deuten somit auf eine Induktion von DNA-DSB durch Mangan selbst hin. Unterschiede im Vergleich zur Literatur sind möglicherweise auf die unterschiedlichen Methoden, Zelllinien und Mangan-Verbindungen zurückzuführen. Aufgrund des möglichen Einflusses von Mangan auf die Apoptose wurden Gene, welche mit der Apoptose assoziiert werden (5.1.4) sowie die Zelltodmechanismen der HeLa S3-Zellen (5.1.5) überprüft. Möglicherweise kann über die Genexpression eine Veränderung der Transkriptmenge von Genen der Apoptose bei einer Konzentration von $500 \mu\text{M}$ beobachtet werden und somit auf eine mögliche Fragmentierung der DNA geschlossen werden. Außerdem wurde weiterhin die Reparatur von DNA-DSB untersucht. Da die PFGE jedoch keine Differenzierung zwischen den Reparaturmechanismen von DNA-DSB zulässt, wurden die einzelnen Reparaturwege HR, NHEJ, SSA sowie MMEJ mittels Reporter-Assay betrachtet.

5.1.3.2 Reporter-Assay

Dieser Assay bietet die Möglichkeit, die Wege HR, NHEJ, SSA sowie MMEJ separat zu betrachten. Hierbei wurden U2OS-Zellen mit individuellen Plasmiden stabil transfiziert. Diese enthalten inaktive GFP-Expressionskassetten, welche durch den Einsatz des Restriktionsenzym (I-SceI) und der anschließenden erfolgreichen Reparatur spezifisch aktiviert werden. Um ein maximales GFP-Signal zu erhalten, wurden die Zellen nach der Transfektion für 66 h inkubiert. Die Mechanismen des Reporter-Assays sind im Kapitel 2.3 näher erklärt sowie in Abbildung 2.5 dargestellt.

In Abbildung 5.7 ist das GFP-Signal der transfizierten U2OS-Zellen unter Einfluss von Mangan dargestellt. Dabei war ersichtlich, dass die GFP-Signale der Reparaturwege NHEJ und MMEJ bei einer Konzentration von 250 μM MnCl_2 auf 87 % der transfizierten Kontrolle abfielen. Im Gegensatz dazu sank das GFP-Signal der HR bereits ab 100 μM und das SSA-Signal ab 250 μM MnCl_2 auf 55 % der transfizierten Kontrolle. Dabei nahm mit steigender Mangan-Konzentration das GFP-Signal der HR weiterhin ab und erreichte bei einer Konzentration von 250 μM 13 % der transfizierten Kontrolle.

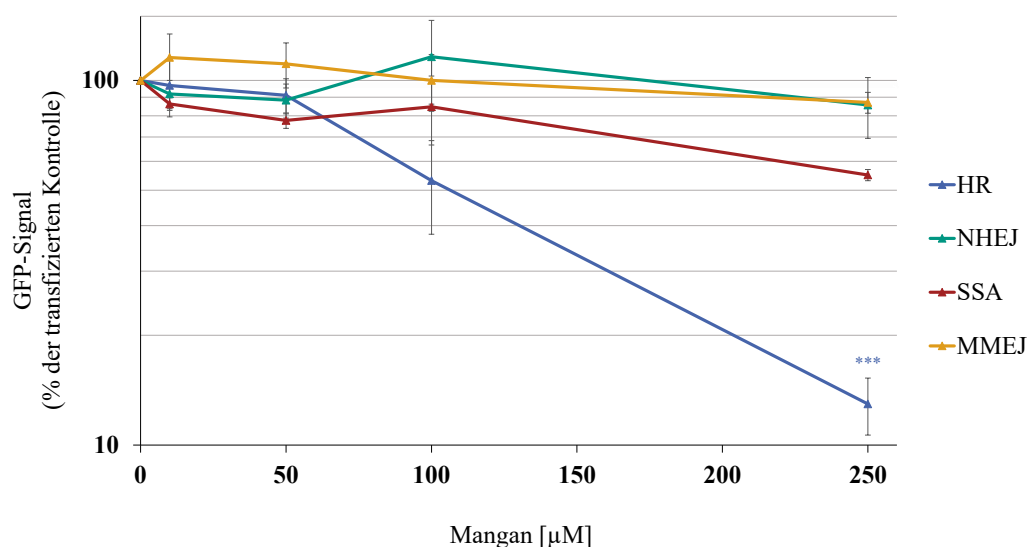


Abbildung 5.7: Einfluss von Mangan auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSB) in U2OS-Zellen mittels Reporter-Assay. Die Zellen wurden mit dem Restriktionsenzym (I-SceI) für 6 h transfiziert, anschließend für 66 h, um ein maximales Signal zu erhalten, mit Manganchlorid (MnCl_2) (10 μM bis 250 μM) inkubiert und das gemessene GFP-Signal auf die transfizierte Kontrolle bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der transfizierten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-Test (***) $p \leq 0,001$.

Die Ergebnisse des Reporter-Assays deuten daraufhin, dass Mangan die Reparaturwege NHEJ und MMEJ nicht beeinflusst, während die Funktion der HR durch die Inkubation mit MnCl_2 fast vollständig inhibiert scheint. Zusätzlich ist eine Tendenz der Beeinträchtigung der Reparatur mittels SSA bei höheren Mangan-Konzentrationen ersichtlich, weshalb dieser Reparaturweg in weiterführenden Arbeiten untersucht werden sollte.

Die vorliegenden Daten des Reporter-Assays unter Einfluss von Mangan wurden in dieser Arbeit nach unserer Erkenntnis erstmalig untersucht, jedoch konnte bereits der Einfluss anderer Metallverbindungen mit Hilfe dieses Assays nachgewiesen werden. In der Publikation von Morales *et al.* (2016) wurden die Metallverbindungen Nickelchlorid, Cadmiumchlorid und Arsen trioxid mittels Reporter-Assay untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Nickelchlorid ab einer Konzentration von $500 \mu\text{M}$ alle vier Reparaturwege inhibiert. Arsen trioxid zeigte ebenfalls eine Inhibierung der HR und des SSA, während das MMEJ signifikant erhöht wurde. Dementgegen konnte durch Cadmiumchlorid kein Einfluss auf die Reparaturmechanismen der DNA-DSB festgestellt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie die aufgezeigten Literaturdaten verdeutlichen einen Einfluss von verschiedenen Metallverbindungen auf die nahezu fehlerfreie HR, während andere fehlerbehaftete Reparaturwege von DNA-DSB nicht beeinflusst scheinen. Kann die fehlerfreie HR nicht mehr ablaufen, führt dies zu Akkumulationen von Mutationen und somit zu einem erhöhten Risiko einer Tumorentstehung. Die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Beeinträchtigung sind möglicherweise auf einzelne Reparaturproteine mit funktionellen Strukturen oder Zinkfinger-Motiven zurückzuführen. Im Anschluss wurden deshalb diese mit Hilfe der IF betrachtet, um die Funktionen der Reparaturproteine zu überprüfen und einen möglichen Einfluss von Mangan auf diese zu untersuchen.

5.1.3.3 Immunfluoreszenz (IF)

Die IF gibt Aufschluss über die Rekrutierung und Dissoziation spezifischer Reparaturproteine an den DNA-Schaden. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bzw. 64 h, 1 Gy Bestrahlung und 8 h Nachinkubationszeit wurden die Proteine Rad51 sowie Rad54 angefärbt. Zusätzlich wurden Versuche ohne Bestrahlung mit einer Inkubationszeit von 32 h sowie 72 h mitgeführt.

Die Anlagerung sowie Abspaltung der Proteine wurde durch Auszählen der Foci betrachtet. Dabei spiegelt ein Focus einen DNA-DSB wider. Zur Auswertung wurden nur Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus herangezogen, da in dieser Phase das für die HR notwendige Schwesterchromatid vorliegt.

Rad51

Rad51 spielt eine wichtige Rolle in der Reparatur von DNA-DSB mittels HR, es lagert an die prozessierten DNA-Einzelstränge an und bildet dort ein Nukleoproteinfilament zur Stabilisation aus. Zudem ist es ausschließlich in der HR vorzufinden, weshalb es sich als Markerprotein eignet (Sak *et al.* 2005, zusammengefasst in Heyer *et al.* 2010). Aufgrund der vorhandenen Thiolgruppen im Protein stellt Rad51 eine Angriffsstelle für Metalle dar (zusammengefasst in Hartwig 2001).

Abbildung 5.8 stellt die Ergebnisse der IF-Färbung von Rad51 nach einer Inkubation mit MnCl_2 ($100 \mu\text{M}$ und $250 \mu\text{M}$) dar. Es zeigte sich, dass die Kontrollen ohne Bestrahlung etwa 6 Foci und mit Bestrahlung etwa 20 Foci pro Zelle aufwiesen. Nach einer 32-stündigen Mangan-Behandlung mit und ohne Bestrahlung konnte eine minimale Erhöhung um etwa 3 Foci festgestellt werden, welche durch die hohe Standardabweichung vernachlässigbar scheint. Nach einer Inkubationszeit von 72 h konnten unter Einfluss von Mangan 5 bis 7 Foci mehr im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden.

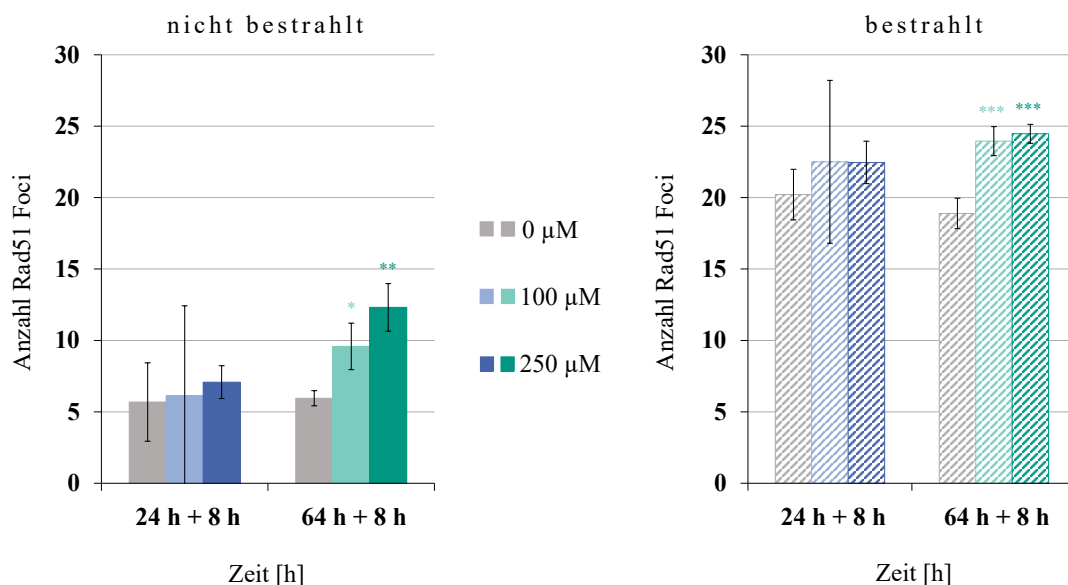


Abbildung 5.8: Einfluss von Mangan auf die Anlagerung von Rad51 in HeLa S3-Zellen mittels Immunfluoreszenz (IF)-Färbung. Die Zellen wurden für 24 h bzw. 64 h mit Manganchlorid (MnCl_2) vorinkubiert ($100 \mu\text{M}$ und $250 \mu\text{M}$), mit 1 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Nicht bestrahlte Proben wurden für 32 h bzw. 72 h mit MnCl_2 inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der jeweiligen Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass Mangan nach einer Inkubationszeit von 32 h nur einen geringen Einfluss auf die Anzahl der Rad51 Foci zeigt, während nach einer 72-stündigen Behandlungszeit signifikant mehr Foci beobachtet werden konnten. Nach unserem Kenntnisstand existieren bislang keine Literaturergebnisse bezüglich des Einflusses von Mangan auf das Protein Rad51. Die vorliegenden Ergebnisse implizieren eine Induktion von DNA-DSB unter Einfluss von Mangan bei einer Gesamtinkubationszeit von 72 h bereits ab 100 μM . Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Rad51 trotz Zugabe von MnCl_2 an den DNA-DSB bindet. Möglich wäre jedoch, dass die vollständige Ausbildung des Nukleoproteinfilaments sowie der Abbau von Rad51 gestört wird. Ein möglicher Mechanismus könnte die Oxidation der Thiolgruppen im Protein und dem damit verbundenen fehlenden Aufbau des Nukleoproteinfilaments sein. Die erhöhte Affinität von Metallen zu Thiolgruppen konnte bereits festgestellt werden (zusammengefasst in Hartwig 2001 und Hartwig 2013). Das Nukleoproteinfilament kann jedoch nicht mit der Methode der IF betrachtet werden. Zudem wäre eine Beeinträchtigung des intrazellulären Rad51-Proteingehaltes denkbar. Diese Effekte wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits mit anderen Metallen, wie Arsen, Antimon und Aluminium gezeigt. Hierbei störte Arsen die Dissoziation von Rad51, während Antimon die Assoziation des Proteins beeinträchtigte. Aluminium hingegen trug zu einem verminderten zellulären Rad51-Gehalt bei (Niemand 2018, Koch *et al.* 2017, Ott 2019).

Die Daten der vorliegenden Arbeit deuten auf eine mögliche Induktion von DNA-DSB durch Mangan selbst hin. Zusätzlich könnte die Dissoziation von Rad51 vom DNA-DSB beeinträchtigt sein, wobei eine Reparaturkinetik Aufschluss über diese mögliche Inhibierung geben könnte. Ebenfalls wäre eine Beeinflussung auf ein folgendes Reparaturprotein denkbar. Hierbei stellt Rad54 ein potenzielles *target* dar, da es durch seine Zink-bindende Struktur am C-terminalen Ende einen möglichen Angriffspunkt bietet. Aufgrund dieser Ergebnisse sowie der aufgeführten Vermutungen wurde anschließend die IF von Rad54 betrachtet.

Rad54

Rad54 ist in der HR für die Suche und das Eindringen in die Homologie des Schwesterchromatids verantwortlich. Dabei bindet Rad54 an Rad51 und stabilisiert das Nukleoproteinfilament. Nach der Stranginvasion ist Rad54 zusätzlich für den Abbau von Rad51 zuständig (zusammengefasst in Mazin *et al.* 2010). Das Protein Rad54 ist ebenfalls als Marker der HR geeignet, da es ausschließlich in diesem Reparaturweg zu finden ist.

In Abbildung 5.9 ist die Auswertung des IF-Versuchs von Rad54 zu sehen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Kontrollen ohne Bestrahlung etwa 1 Focus und mit Bestrahlung circa 15 Foci pro Zelle zeigten. Nach einer Behandlung mit Mangan konnte nach 32 h Inkubationszeit kein signifikanter Anstieg der Foci-Anzahl detektiert werden. Nach einer Inkubationszeit von 72 h mit und ohne Bestrahlung konnten bei einer Behandlung mit 100 μM etwa 5 Foci und bei einer Konzentration von 250 μM MnCl₂ circa 10 Foci mehr im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden.

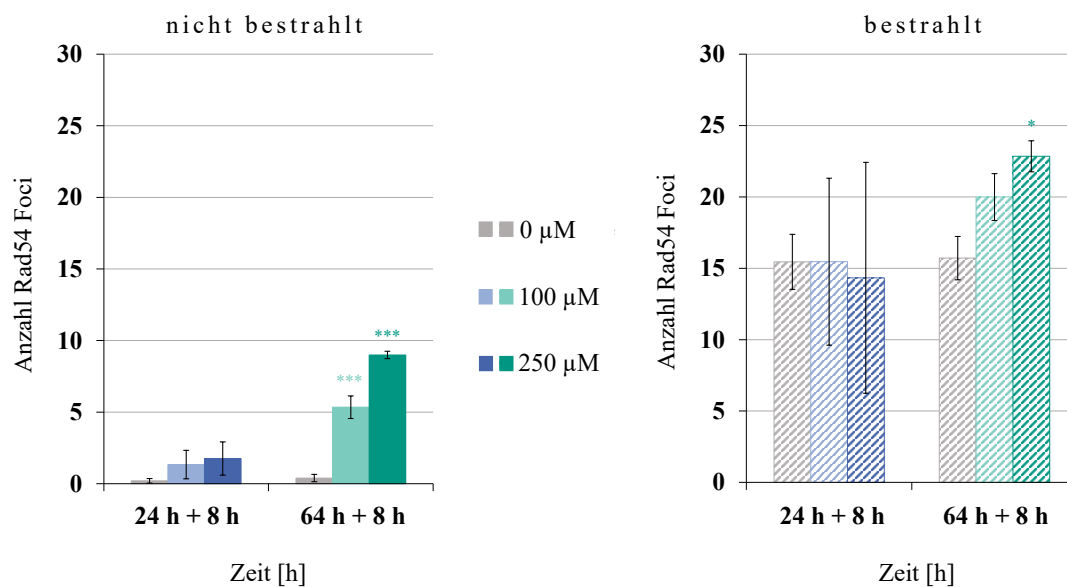


Abbildung 5.9: Einfluss von Mangan auf die Anlagerung von Rad54 in HeLa S3-Zellen mittels Immunfluoreszenz (IF)-Färbung. Die Zellen wurden für 24 h bzw. 64 h mit Manganchlorid (MnCl₂) vorinkubiert (100 μM und 250 μM), mit 1 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Nicht bestrahlte Proben wurden für 32 h bzw. 72 h mit MnCl₂ inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der jeweiligen Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (* $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$).

Diese Ergebnisse spiegeln die IF von Rad51 wider, welche ebenfalls nach einer 32-stündigen Inkubationszeit von MnCl₂ nur einen geringen Einfluss auf die Anzahl der Foci zeigte, während nach einer 72-stündigen Inkubation eine erhöhte Anzahl an Foci nachgewiesen werden konnte.

Der Einfluss von Mangan auf Rad54 wurde nach unserem Wissensstand ebenfalls noch nicht untersucht. Die vorliegenden Ergebnisse implizieren auch hier keinen Einfluss von Mangan auf dieses Protein, deuten jedoch auf eine Induktion von DNA-DSB hin und bestätigen somit die zuvor

beschriebenen Ergebnisse der IF von Rad51 sowie der PFGE. Möglich wäre, dass Proteine, welche auf Rad54 in der Reparatur folgen, beeinflusst sind. Hier stellt die DNA-Polymerase ein mögliches Ziel von Mangan dar. Das aktive Zentrum von DNA-Polymerasen ist meist durch Magnesiumionen besetzt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Magnesiumionen durch Manganionen in diesen Strukturen ersetzt werden können und damit die Funktion der Polymerase beeinträchtigen. Durch diesen Austausch konnte festgestellt werden, dass die Fehlerhäufigkeit der Polymerase erhöht und der DNA-Doppelstrang nicht korrekt aufgebaut wird (Sirover und Loeb 1976, Seal *et al.* 1979, Beckman *et al.* 1985, Bock *et al.* 1999, Lakhin *et al.* 2013, 2014). Denkbar wäre eine fehlerhafte Reparatur des DNA-DSB über die sonst fehlerfreie HR, welche somit zu einer Sequenzveränderung in der DNA führt. Dies kann zu einem erhöhten Aufkommen von Mutationen führen und somit zur Kanzerogenese beitragen.

Es ist zu beachten, dass der vorangestellte Reporter-Assay, welcher eine Inhibierung der HR in diesem Konzentrationsbereich zeigte, in U2OS-Zellen durchgeführt, während die IF in HeLa S3-Zellen angewandt wurde. Möglicherweise sind die Ergebnisse Zelllinien-spezifisch. Aufgrund der etablierten Methode der IF in HeLa S3-Zellen sowie der besseren Transfektions-Effizienz von U2OS-Zellen, wurden die Versuche in unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt. Zusätzlich ist der Reporter-Assay Zellzyklusphasen-unabhängig, im Gegensatz dazu ist die Betrachtung der Proteine der HR mittels IF nur in der G2-Phase möglich. Es müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um diese Hypothesen zu stützen. Eine Möglichkeit stellt die Etablierung der Methode der IF in U2OS-Zellen dar. Zusätzlich könnten weitere Proteine der HR in der IF sowie mit Hilfe von Western Blot Analysen betrachtet werden, um Aufschluss über mögliche Änderungen im Proteingehalt festzustellen.

Im Anschluss an die IF wurde mit Hilfe der HT RT-qPCR die Veränderung der Transkriptmenge von Genen der DNA-Schadensantwort untersucht. Möglicherweise kann die Betrachtung der Expression bestimmter Gene Aufschluss über den Einfluss von Mangan auf die DNA-Reparatur geben.

5.1.4 Einfluss von Mangan auf die Genexpression in HeLa S3-Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses von Mangan auf die Transkriptmenge spezifischer Gene wurde die in unserem Arbeitskreis etablierte Methode der HT RT-qPCR angewandt. Diese Methode ermöglicht eine gleichzeitige Analyse von 95 Genen in 96 Proben. Bei einer Veränderung der Transkriptmenge um den Faktor 2 wird von einem relevanten Einfluss ausgegangen. Die 95 untersuchten Gene sind im Anhang 9.1 aufgeführt. Zur Untersuchung wurden HeLa S3-Zellen für 24 h mit $MnCl_2$ inkubiert, mit 1 Gy bestrahlt und 8 h nachinkubiert. Zusätzlich wurden nicht bestrahlte Proben mit einer Gesamtinkubationszeit von 32 h mitgeführt. Alle Behandlungen wurden auf die nicht bestrahlte Kontrolle bezogen. In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 20 Gene aus verschiedenen Genclustern der DNA-Schadensantwort, Metallhomöostase, oxidativen Stressantwort und Transkriptionsfaktoren sowie Zellzyklusregulation und Apoptose unter Einfluss von Mangan in ihrer Transkriptmenge verändert. Es konnte festgestellt werden, dass eine zusätzliche Bestrahlung keinen Einfluss auf die Genexpression zeigte. Somit scheint die Bestrahlung mit 1 Gy keine DNA-Schadensantwort der Zelle auf Ebene der Genexpression auszulösen. Um den Einfluss von Mangan auf die Gene der DNA-Schadensantwort besser abzuklären, könnte zur Induktion der Gene eine höhere Bestrahlung angewandt werden. Abbildung 5.10 zeigt den Einfluss von Mangan mit und ohne Bestrahlung auf die Genexpression der 95 untersuchten Gene mittels *Heatmap*.

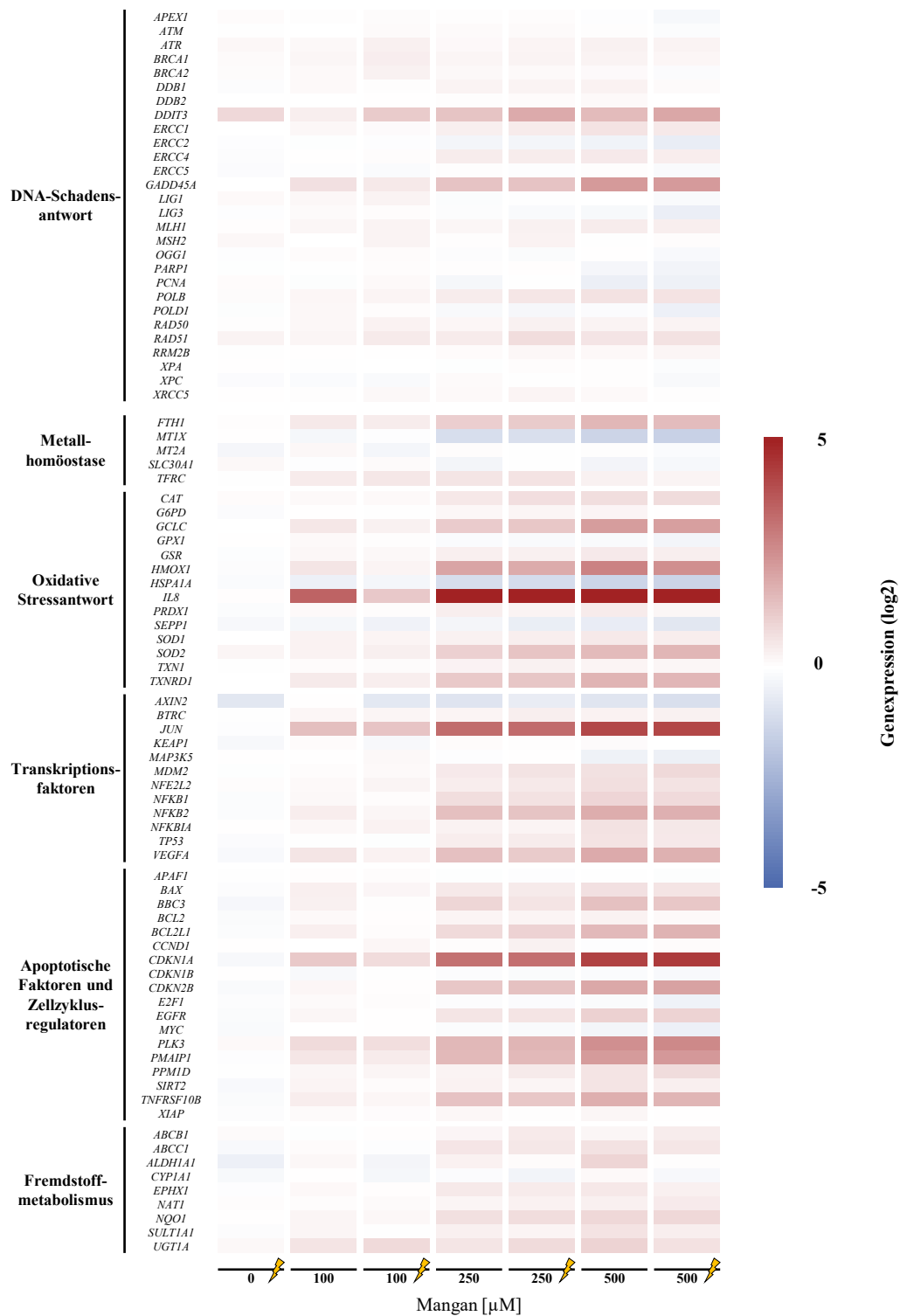


Abbildung 5.10: Einfluss von Mangan auf die Genexpression in HeLa S3-Zellen. Dargestellt sind die Gencluster der Hochdurchsatz *real time-quantitative polymerase chain reaction* (HT RT-qPCR) mit Hilfe einer *Heatmap*. Dabei stellt Rot eine Hochregulation und Blau eine Herunterregulation dar.

In Abbildung 5.11 ist der Einfluss von Mangan auf die Gene der DNA-Schadensantwort dargestellt. Dabei stellen *DDIT3* sowie *GADD45A* Gene dar, welche in Folge einer DNA-Schädigung induziert werden (Fornace *et al.* 1989, zusammengefasst in Zhan 2005). Die beiden Gene *DDIT3* und *GADD45A* wurden durch MnCl_2 konzentrationsabhängig verstärkt exprimiert. *DDIT3* zeigte dabei eine maximale Induktion um etwa das 4-fache, während *GADD45A* eine Erhöhung um das 5-fache zeigte.

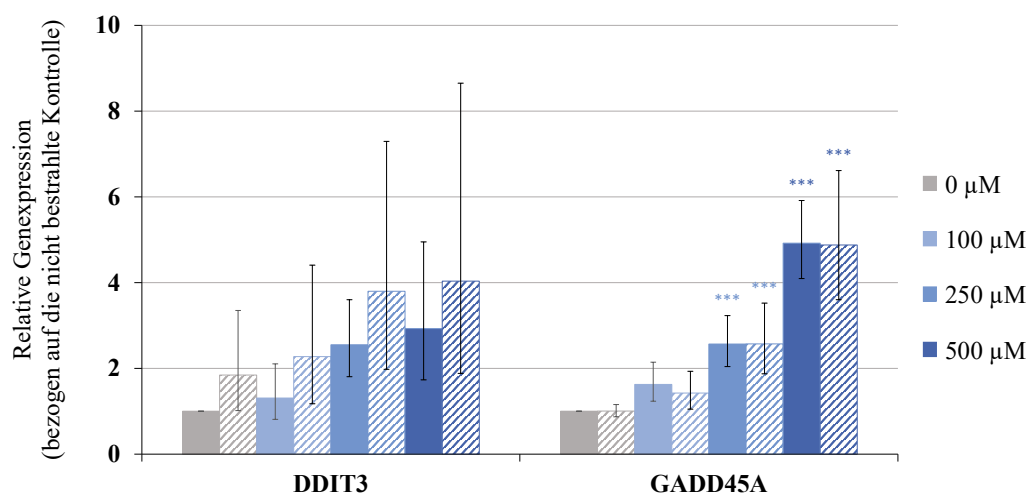


Abbildung 5.11: Einfluss von Mangan auf die relative Expression von Genen der DNA-Schadensantwort. Die Zellen wurden für 32 h mit Manganchlorid (MnCl_2) behandelt (100 μM bis 500 μM) bzw. für 24 h vorinkubiert, mit 1 Gy bestrahlt (schraffiert) und für 8 h nachinkubiert. Gezeigt sind die Gene *DDIT3* und *GADD45A*. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der nicht bestrahlten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-Test (***) ($p \leq 0,001$).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen implizieren eine DNA-schädigende Wirkung durch die Inkubation mit MnCl_2 und bestätigen damit die zuvor beschriebenen Ergebnisse der PFGE (5.1.3.1) und IF (5.1.3.3). Ebenfalls zeigte die Literatur, dass Mangan DNA-Schäden induzieren kann (Bornhorst *et al.* 2010, Lima *et al.* 2008).

Die Induktion der Gene *DDIT3* sowie *GADD45A* durch Mangan konnte bereits in Mausfibroblasten gezeigt werden. Dabei verursachte Mangan eine Induktion von *DDIT3* und *GADD45A* um das 10-fache im Vergleich zur Kontrolle nach einer 24-stündigen Inkubation mit 0,25 mg/ml, wobei diese Konzentration die Behandlungen in dieser Arbeit um das 8-fache übersteigt (Purnama *et al.* 2013).

Die vorliegenden Ergebnisse und die Literaturdaten deuten somit auf Schäden der DNA durch Mangan hin. Möglicherweise könnten diese, wie bereits beschrieben, durch oxidativen Stress verursacht werden. Die Generierung von ROS durch Mangan konnte bereits in der Literatur gezeigt werden (Jiao *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2004). Die Ergebnisse der Gene der oxidativen Stressantwort werden im späteren Verlauf betrachtet (Abbildungen 5.15, 5.16). Zunächst folgt jedoch die Ergebnisse und Diskussion weiterer Gene der DNA-Reparatur.

Abbildung 5.12 zeigt einige Gene der zwei Hauptreparaturwege NHEJ und HR. *XRCC5* codiert für das Protein Ku80, welches ein Heterodimer mit Ku70 bildet und für die Schadenserkennung beim NHEJ zuständig ist (zusammengefasst in Mladenov und Iliakis 2011). *Rad50* codiert für ein gleichnamiges Protein, welches Teil des MRN-Komplexes und ebenfalls an der Schadenerkennung sowie der Prozessierung der DNA-Enden beteiligt ist (zusammengefasst in Stracker und Petrini 2011). Des Weiteren sind wichtige Mediatoren der HR in Abbildung 5.12 aufgeführt. Dabei codieren *BRCA1*, *BRCA2* und *Rad51* für gleichnamige Proteine. *BRCA1* und *BRCA2* bilden zusammen einen Komplex und rekrutieren *Rad51* an den DNA-DSB. Mehrere *Rad51* Monomere werden anschließend an den DNA-DSB angelagert und bilden ein Nukleoproteinfilament aus. Dieses wiederum stabilisiert den DNA-Strang und sucht nach der homologen Sequenz im Schwesterchromatid (zusammengefasst in Jasin und Rothstein 2013).

Dabei konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass Mangan keinen Einfluss auf die Gene *XRCC5*, *Rad50*, *BRCA1* sowie *BRCA2* zeigte. Es konnte lediglich eine Tendenz der Erhöhung des mRNA-Gehaltes von *Rad51* ab einer Konzentration von 250 μ M beobachtet werden.

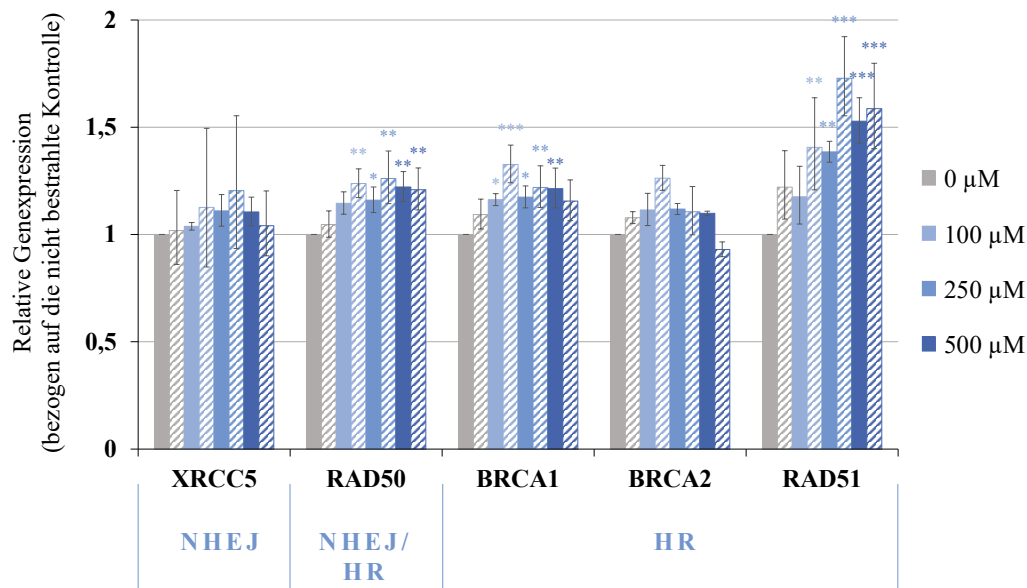


Abbildung 5.12: Einfluss von Mangan auf die relative Expression der Gene der DNA-Doppelstrangbruch (DNA-DSB)-Reparatur. HeLa S3-Zellen wurden für 32 h mit Manganchlorid (MnCl_2) behandelt (100 μM bis 500 μM) bzw. für 24 h vorinkubiert, mit 1 Gy bestrahlt (schraffiert) und für 8 h nachinkubiert. Gezeigt sind die Gene *XRCC5* des nicht-homologen *Endjoining* (NHEJ), *Rad50*, welches im NHEJ sowie in der homologen Rekombination (HR) eine Rolle spielt und *BRCA1*, *BRCA2*, *Rad51*, dessen Genprodukte in der HR beteiligt sind. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der nicht bestrahlten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Abbildung 5.13 zeigt Gene, welche für die DNA-Schadenserkennung und das MMEJ von Bedeutung sind. *ATM* sowie *ATR* codieren für gleichnamige Proteine, welche für die Reparatur von DNA-DSB wichtige Signalüberträger darstellen. Diese Kinasen aktivieren durch Phosphorylierung eine Vielzahl an Proteinen (zusammengefasst in Ohnishi *et al.* 2009, Shiloh 2001). Zusätzlich sind in Abbildung 5.13 Gene, welche mit dem MMEJ in Verbindung stehen, aufgeführt. *PARP1* codiert für ein gleichnamiges Protein, welches bei der Schadenserkennung des MMEJ beteiligt ist. Zusätzlich spielt PARP-1 eine wichtige Rolle bei der Einzelstrangbruch-Reparatur (Audebert *et al.* 2004, zusammengefasst in Bürkle 2001). *LIG3* codiert für die DNA Ligase III, welche zur DNA-Endverknüpfung beim MMEJ unerlässlich ist (Wang *et al.* 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte keine Beeinflussung der Gene *PARP1*, *ATM* sowie *ATR* nach einer Inkubation mit MnCl_2 festgestellt werden. Lediglich eine tendenzielle Abnahme der Transkriptmenge der *LIG3* wurde bei der höchsten getesteten Konzentration von 500 μM beobachtet.

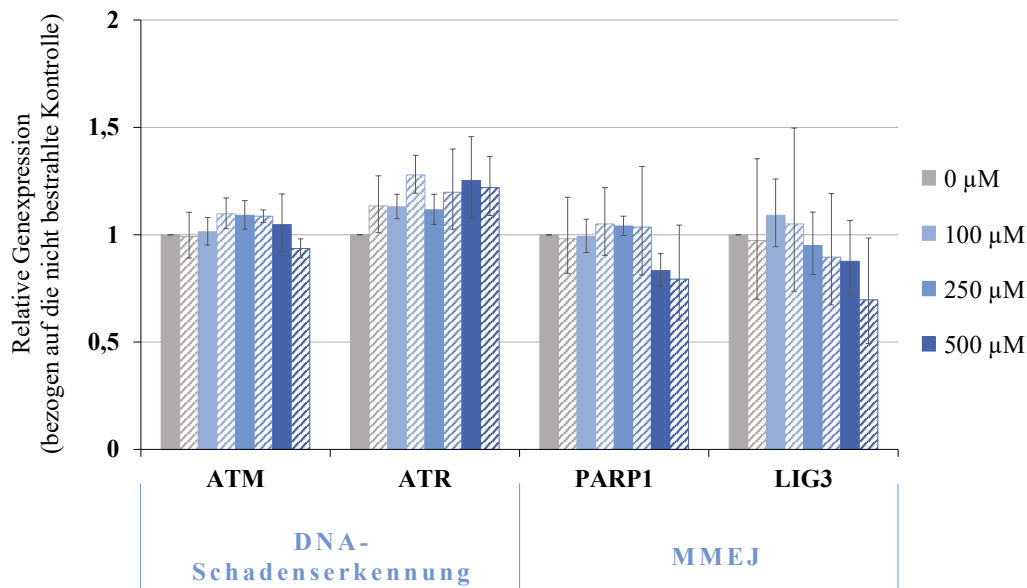


Abbildung 5.13: Einfluss von Mangan auf die relative Expression der Gene der DNA-Doppelstrangbruch (DNA-DSB)-Reparatur (2). Die Zellen wurden für 32 h mit Manganchlorid (MnCl_2) behandelt (100 μM bis 500 μM) bzw. für 24 h vorinkubiert, mit 1 Gy bestrahlt (schraffiert) und für 8 h nachinkubiert. Gezeigt sind die Gene *ATM* und *ATR*, welche bei der DNA-Schadenserkennung eine Rolle spielen sowie die Gene des *micro-mediated Endjoining* (MMEJ) *PARP1* und *LIG3*. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung.

Die Daten der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass Mangan Gene der DNA-DSB-Reparatur nicht beeinträchtigt. Es konnten lediglich Tendenzen einer Beeinflussung des mRNA-Gehaltes von *Rad51* sowie *LIG3* beobachtet werden. Eine Bestrahlung mit beispielsweise 10 Gy könnte eine verstärkte DNA-Schadensantwort auslösen, wobei der Einfluss von Mangan auf diese Gene besser abgeklärt werden könnte.

In einer Studie von Bornhorst *et al.* (2010) konnte bereits festgestellt werden, dass MnCl_2 keinen Einfluss auf die Expression von *PARP1*, jedoch eine Beeinträchtigung auf das codierende Protein PARP-1 in HeLa S3-Zellen zeigte. Die Daten der vorliegenden Arbeit implizieren, dass Mangan auf Ebene der Genexpression keine Beeinträchtigung der DNA-DSB-Reparatur zeigt, wobei eine höhere Bestrahlung zur Aufklärung eingesetzt werden könnte. Möglich wäre außerdem, dass Mangan einen Einfluss auf Protein-Ebene zeigt. Zur Abklärung dieser Theorie müssen weitere Untersuchungen vorgenommen werden. Betrachtungen mit Hilfe des Western Blots können Aufschluss über mögliche Veränderungen im Proteingehalt, die Methode der IF über funktionelle Beeinträchtigungen der Proteine und der elektrophoretische Mobilitäts-Shiftassay (EMSA) über fehlende DNA-Bindung geben.

In Abbildung 5.14 ist die Expression der Gene, welche mit der Metallhomöostase assoziiert werden, unter Einfluss von Mangan dargestellt. *FTH1* codiert für eine Untereinheit des Eisenspeicherproteins Ferritin und *MT1X* codiert für das Cystein-reiche Protein Metallothionein, welches Metalle binden kann (Lee *et al.* 2009, zusammengefasst in Blindauer 2014).

Es konnte festgestellt werden, dass die Expression von *FTH1* ab 250 μM sich verdoppelte und ab 500 μM MnCl_2 um das 3-fache verstärkte. Im Gegensatz dazu trat eine konzentrationsabhängige verminderte Expression von *MT1X* um die Hälfte ab 250 μM MnCl_2 auf.

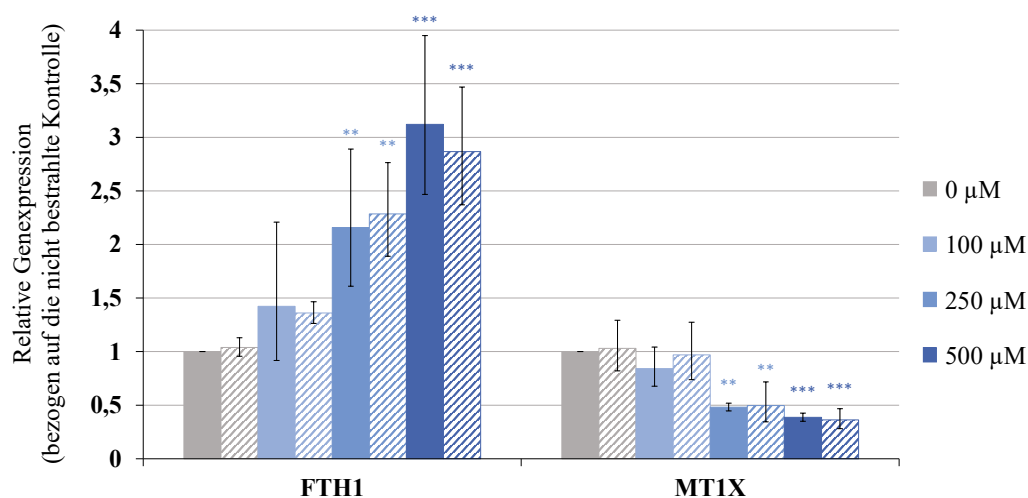


Abbildung 5.14: Einfluss von Mangan auf die relative Expression von Genen der Metallhomöostase. Die Zellen wurden für 32 h mit Manganchlorid (MnCl_2) behandelt (100 μM bis 500 μM) bzw. für 24 h vorinkubiert, mit 1 Gy bestrahlt (schraffiert) und für 8 h nachinkubiert. Gezeigt sind die Gene *FTH1* sowie *MT1X*. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der nicht bestrahlten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Diese Ergebnisse deuten auf einen Eingriff von Mangan in den Eisenhaushalt hin. Möglicherweise kann Mangan Eisen aus Proteinen herauslösen und somit einen Eisenüberschuss in der Zelle erzeugen. Dies wiederum würde zu einer Induktion des Ferritins sowie zu oxidativem Stress über die Fenton-Reaktion führen. In der Studie von Zheng und Zhao (2001) konnte festgestellt werden, dass Mangan in neuronalen Zellen die Aconitase inhibiert. Dabei ist Aconitase ein Enzym, welches eine wichtige Rolle in der Regulation des Eisenhaushaltes spielt. Diese Inhibierung führte zu einem Überschuss an Eisen in der Zelle und zu einer erhöhten Expression des Gens, welches für Transfer-

rin codiert. Transferrin stellt hierbei ein Eisentransportprotein dar. Zusätzlich wird in dieser Studie die Entstehung von oxidativem Stress postuliert. Dabei können ROS über Fenton-Reaktionen mit Hilfe des Eisenüberschusses vermehrt gebildet werden.

Ebenfalls konnte die Inhibierung der Aconitase und dem damit einhergehenden Eisenüberschuss in Mitochondrien von Rattenhirnen durch Mangan in der Literatur gezeigt werden. Hierbei wurde zusätzlich vermutet, dass Mangan Eisen in der Aconitase ersetzt und somit Eisen freigesetzt werden könnte (Zheng *et al.* 1998). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Literaturdaten. Zheng *et al.* (1999) konnten nach Mangan-Behandlung eine erhöhte Transkriptmenge des für Transferrin codierenden Gens feststellen, womit der damit verbundene Eisenüberschuss sowie die Induktion von oxidativem Stress erklärt werden kann. Zusätzlich zeigten sie keine Erhöhung des mRNA-Gehaltes von *MT-1* durch Mangan.

Die beschriebenen Daten sowie die angegebene Literatur deuten auf einen Einfluss von Mangan auf die Regulation des Eisenhaushaltes hin. Dabei konnte gezeigt werden, dass Mangan in der Lage ist, Eisen vor allem aus Eisen-Schwefel-Clustern herauszulösen (Chen *et al.* 2001) und deren Funktion zu beeinträchtigen. Möglich wäre somit die Entstehung eines Eisenüberschusses sowie von oxidativem Stress. Im Anschluss folgt die Betrachtung von Genen, welche mit dem oxidativem Stress assoziiert werden, unter Einfluss von Mangan.

Die Abbildungen 5.15 und 5.16 zeigen die Gene, welche mit der oxidativen Stressantwort der Zelle assoziiert werden. Dabei sind in Abbildung 5.15 die Gene *GCLC*, *HMOX1* und *HSPA1A* dargestellt. Sie sind als Stressmarker der Zelle bekannt und werden infolge von oxidativem Stress erhöht transkribiert. *GCLC* codiert für die Glutamatcysteinylase, welche zur Glutathion-Synthese benötigt wird. Glutathion stellt einen wichtigen Schutzmechanismus der Zelle gegen oxidativen Stress dar. Das Gen *HMOX1* codiert für die Hämoxygenase, welche eine essentielle Rolle im Häm-Katabolismus einnimmt. *HSPA1A* codiert für *heat shock proteine* und gilt als Stressmarker (zusammengefasst in Lu 2013, Waza *et al.* 2018, Bukau und Horwich 1998). Es konnte festgestellt werden, dass der mRNA-Gehalt der Gene *GCLC* und *HMOX1* konzentrationsabhängig um das 5- bis 6-fache gesteigert, während die Transkriptmenge von *HSPA1A* um die Hälfte vermindert wurde.

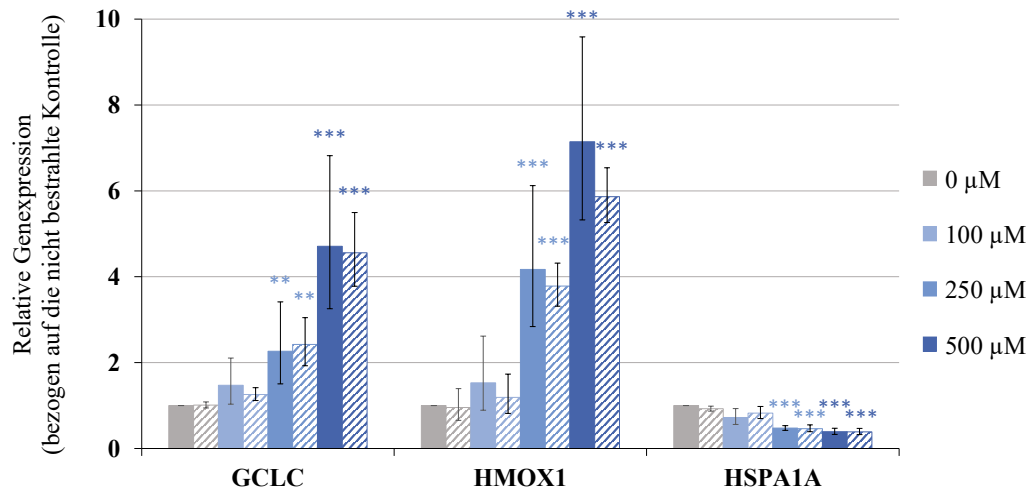


Abbildung 5.15: Einfluss von Mangan auf die relative Expression von Genen der oxidativen Stressantwort. HeLa S3-Zellen wurden für 32 h mit Manganchlorid (MnCl_2) behandelt ($100 \mu\text{M}$ bis $500 \mu\text{M}$) bzw. für 24 h vorinkubiert, mit 1 Gy bestrahlt (schraffiert) und für 8 h nachinkubiert. Dabei wurden die Gene *GCLC*, *HMOX1* sowie *HSPA1A* gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der nicht bestrahlten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Die Gene, welche in Abbildung 5.16 gezeigt sind, wiesen nach Inkubation mit MnCl_2 einen konzentrationsabhängig gesteigerten mRNA-Gehalt auf. Dabei zeigte vor allem *IL8*, welches für Interleukin 8 codiert und als Inflammationsmarker gilt (Harada *et al.* 1994), eine Steigerung der Expression auf das 500-fache nach einer Inkubation mit $500 \mu\text{M}$ MnCl_2 . Bei der Mangan-abhängigen SOD war auf Genexpressions-Ebene eine bis zu 3-fach höhere Transkriptmenge vorzufinden. SODs dienen als Antioxidans vor freien Radikalen als Schutzmechanismus der Zelle (zusammengefasst in Zelko *et al.* 2002). Auch *TXNRD1* zeigte unter Einfluss von Mangan eine konzentrationsabhängige Induktion auf das 3-fache. Dabei codiert *TXNRD1* für die Thioredoxinreduktase, welche ebenfalls als Schutzmechanismus der Zelle eine wichtige Rolle in der Redoxhomöostase einnimmt (zusammengefasst in Arner und Holmgren 2000).

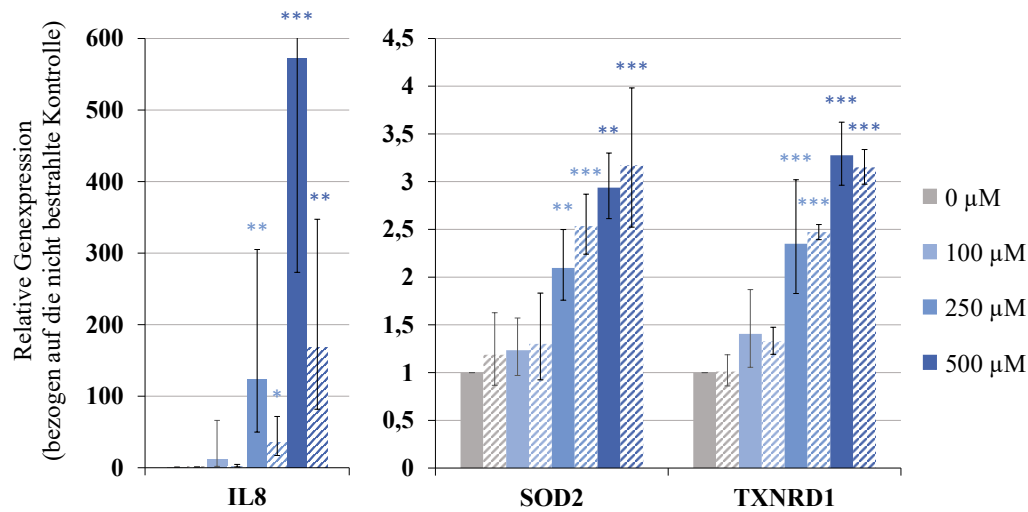


Abbildung 5.16: Einfluss von Mangan auf die relative Expression von Genen der oxidativen Stressantwort (2). Die Zellen wurden für 32 h mit Manganchlorid (MnCl_2) behandelt ($100 \mu\text{M}$ bis $500 \mu\text{M}$) bzw. für 24 h vorinkubiert, mit 1 Gy bestrahlt (schraffiert) und für 8 h nachinkubiert. Gezeigt sind die Gene *IL8*, *SOD2* und *TXNRD1*. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung. Zu beachten sind die unterschiedlich skalierten y-Achsen. Statistische Signifikanz gegenüber der nicht bestrahlten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Diese Ergebnisse implizieren eine oxidative Stressantwort der Zelle durch die Inkubation mit MnCl_2 . Dabei konnte bereits gezeigt werden, dass Mangan ROS induziert und inflammatorische Gene sowie Schutzmechanismen der Zelle hoch reguliert (Zhang *et al.* 2004, Sengupta *et al.* 2007, Park und Park 2010, Bornhorst *et al.* 2013, Mokgobu *et al.* 2015). In der angegebenen Literatur wurden unterschiedliche Zelllinien sowie Mangan-Verbindungen verwendet. Bekannt sind einige mögliche Mechanismen zur Induktion von ROS durch Mangan, diese wurden bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben (zusammengefasst in Li und Yang 2018, Martinez-Finley *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2004, Bornhorst *et al.* 2013).

Die Daten der Literatur sowie die vorliegenden Ergebnisse dieser Dissertation deuten auf eine Generierung von ROS durch Mangan hin. Da die Mechanismen der oxidativen Stressantwort ausgelöst durch Mangan in der Literatur gut abgeklärt sind, wurden keine weiteren Versuche hierzu vorgenommen.

Mangan zeigte ebenfalls einen Einfluss auf die Expression von Genen der Transkriptionsfaktoren *JUN*, *NFKB2* und *VEGFA* (Abbildung 5.17). Dabei codiert *JUN* für eine Untereinheit (c-Jun) des Transkriptionsfaktors AP-1, welcher an Prozessen der Apoptose beteiligt ist (zusammengefasst in Meng und Xia 2011). *NFKB2* codiert für eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- κ B, welcher ebenfalls in Zellproliferations-Vorgängen involviert ist (Lombardi *et al.* 1995). *VEGFA* codiert für ein gleichnamiges Protein, welches im Zusammenhang mit Inflammationsprozessen steht (Martin *et al.* 2009).

Es konnte gezeigt werden, dass die Gene *JUN*, *NFKB2* und *VEGFA* in Abhängigkeit der Konzentration von Mangan vermehrt exprimiert wurden. Die Transkriptmenge des Gens *JUN* stieg auf das 16-fache an. Der mRNA-Gehalt von *NFKB2* und *VEGFA* nahm um das 4-fache bei einer Konzentration von 500 μ M $MnCl_2$ zu.

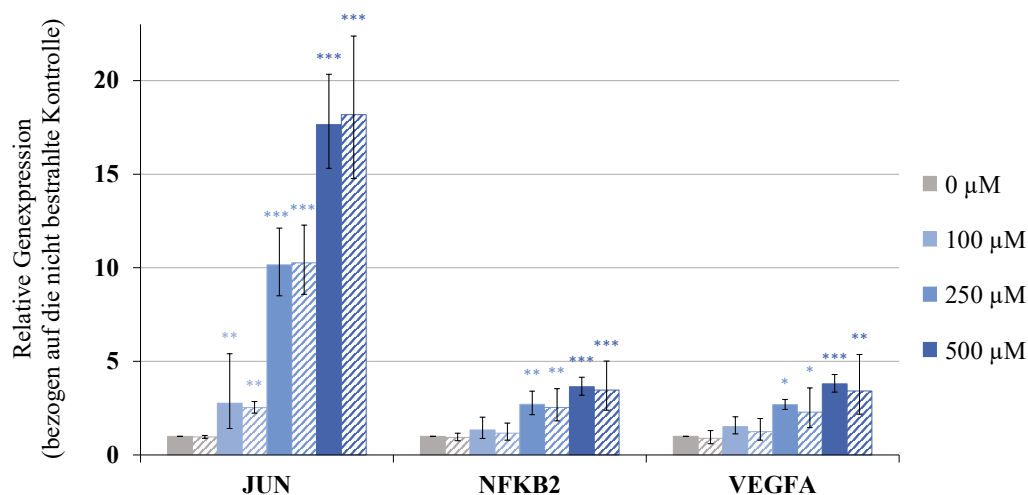


Abbildung 5.17: Einfluss von Mangan auf die relative Expression von Genen der Transkriptionsfaktoren. HeLa S3-Zellen wurden für 32 h mit Manganchlorid ($MnCl_2$) behandelt (100 μ M bis 500 μ M) bzw. für 24 h vorinkubiert, mit 1 Gy bestrahlt (schraffiert) und für 8 h nachinkubiert. Dabei wurden die Gene *JUN*, *NFKB2* sowie *VEGFA* untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der nicht bestrahlten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Die erhöhte Expression der Transkriptionsfaktoren *JUN*, *NFKB2* und *VEGFA* durch Mangan deutet auf eine inflammatorische Antwort sowie auf apoptotische Vorgänge in der Zelle hin. In der Literatur konnte dies bereits auf zellulärer Ebene gezeigt werden. In PC12-Zellen (catecholaminerge Neuronen) konnte durch $MnCl_2$ Behandlung festgestellt werden, dass die Expression des c-Jun Proteins erhöht und die Apoptose eingeleitet wurde (Hirata 2002). In einer Kohortenstudie mit 633 männlichen Probanden im höheren Alter wurden nach täglicher Aufnahme von Mangan Inflammationsmarker in Blutproben gemessen. Dabei konnte festgestellt werden, dass Proteine, welche mit Entzündungsprozessen in Verbindung gebracht werden können (NF- κ B und IL8), erhöht vorlagen (Kresovich *et al.* 2018).

Die vorliegenden Ergebnisse sowie die Literaturdaten implizieren ein inflammatorisches Potenzial sowie die Induktion der Apoptose durch Mangan. Diese Ergebnisse bestätigen die zuvor gezeigten Expressionen der Gene der oxidativen Stressantwort sowie der Metallhomöostase unter Einfluss von Mangan. Mangan könnte durch die Induktion von ROS entzündungsfördernde Prozesse sowie die Apoptose auslösen. Im Anschluss werden Gene, welche mit der Zellzyklusregulation und der Apoptose assoziiert werden, betrachtet.

Abbildung 5.18 zeigt die Gene *CDKN1A*, *CDKN2B* sowie *PLK3*, welche mit der Zellzyklusregulation assoziiert werden, nach Mangan-Behandlung. *CDKN1A* codiert für das Protein p21, welches den Zellzyklusphasen-Arrest einleiten kann, *CDKN2B* codiert ebenfalls für ein Protein (p15), welches in der Zellzyklusregulation eine Rolle spielt. Beide Proteine sind dafür bekannt, einen G1-Zellzyklusphasen-Arrest auszulösen, während *PLK3* für ein Protein codiert, welches für den G2-Checkpoint verantwortlich ist (Hannon und Beach 1994, zusammengefasst in Abbas und Dutta 2009, Helmke *et al.* 2016).

Es konnte festgestellt werden, dass *CDKN1A* dosisabhängig auf das bis zu 20-fache bei einer Konzentration von $500 \mu M MnCl_2$ verstärkt exprimiert wurde. Die Gene *CDKN2B* und *PLK3* wurden im selben Konzentrationsbereich um das 5-fache vermehrt exprimiert.

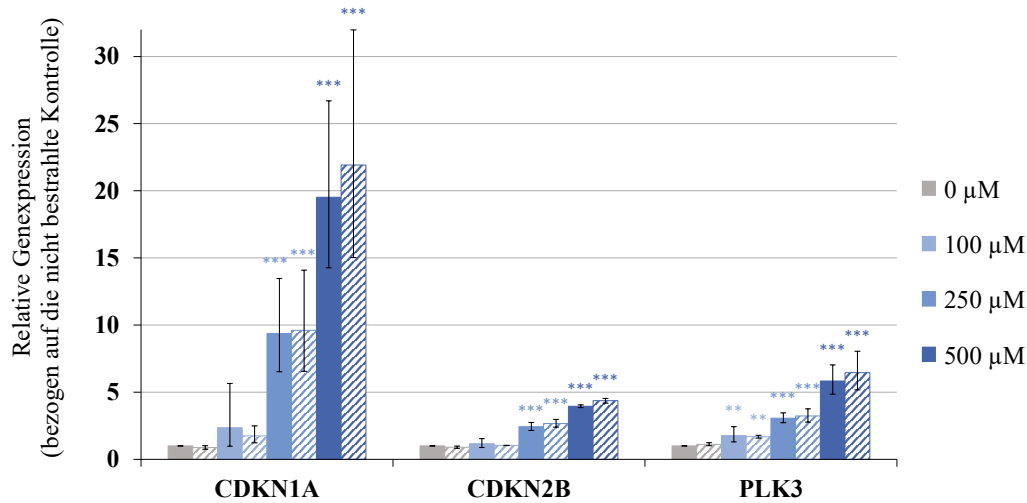


Abbildung 5.18: Einfluss von Mangan auf die relative Expression der Gene der Zellzyklusregulation. HeLa S3-Zellen wurden für 32 h mit Manganchlorid (MnCl_2) behandelt ($100 \mu\text{M}$ bis $500 \mu\text{M}$) bzw. für 24 h vorinkubiert, mit 1 Gy bestrahlt (schraffiert) und für 8 h nachinkubiert. Es wurden die Gene *CDKN1A*, *CDKN2B* sowie *PLK3* untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der nicht bestrahlten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Die vorliegenden Daten implizieren einen Zellzyklusphasen-Arrest durch Mangan. Die erhöhte Expression der Gene *CDKN1A* sowie *CDKN2B* deuten dabei auf einen G1-Phasen-Arrest hin, während die vermehrte Expression von *PLK3* auf einen G2-Phasen-Arrest hinweisen könnte. Die Literatur zeigt auf zellulärer Ebene, dass Mangan einen Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus‘ nimmt. Hierbei konnte bereits ein G1-Phasen-Arrest und auch ein G2-Phasen-Arrest durch Mangan in verschiedenen Zelllinien sowie mit unterschiedlichen Mangan-Verbindungen gezeigt werden (Zhao *et al.* 2008, Sengupta *et al.* 2007, Yu *et al.* 2015).

Die Ergebnisse sowie die Literatur deuten auf einen G1-Phasen-Arrest, ausgelöst durch Mangan, hin. Möglich wäre auch eine Induktion des G2-Phasen-Arrestes. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde anschließend an die Genexpression die Zellzyklusverteilung (5.1.5) betrachtet. Zudem kann ein Zellzyklus-Arrest die Reparatur der DNA oder den programmierten Zelltod einleiten. Die DNA-schädigende Wirkung von Mangan konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden. Das mögliche Einleiten der Apoptose durch Mangan wurde anschließend auf zellulärer Ebene untersucht.

Abbildung 5.19 zeigt den Einfluss von Mangan auf Apoptose-assoziierte Gene. Die Gene *BBC3* und *PMAIP1* codieren für Proteine, welche am intrinsischen Apoptoseweg beteiligt sind. Das Gen *BBC3* codiert für das Protein PUMA, während *PMAIP1* für NOXA codiert (Yu *et al.* 2001, Oda *et al.* 2000). Sie induzieren eine mitochondriale Dysfunktion und leiten die Apoptose ein. Dabei wird durch die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran Cytochrom c freigesetzt, über die Initiator-Caspase 9 ein Apoptosom gebildet und die Effektor-Caspase 3 aktiviert. Anschließend wird die Apoptose eingeleitet (zusammengefasst in Elmore 2007).

Das Gen *BCL2* codiert für anti-apoptotische Proteine, welche den Austritt von Cytochrom c aus dem Mitochondrium verhindern. Das Gen *BCL2L1* ist aufgrund seiner zwei Splicevarianten, eine anti- und eine pro-apoptotische, nicht aussagekräftig (zusammengefasst in Cory und Adams 2002). Im Gegensatz dazu codiert *TNFRSF10B* für den Todesrezeptor, welcher am extrinsischen Weg der Apoptose beteiligt ist (zusammengefasst in Nair *et al.* 2014). Dieser Apoptoseweg wird über Ligandenbindung an sogenannten Todesrezeptoren ausgelöst. Dabei werden über Fas-Rezeptor/Fas-Ligand die Caspasen 8 und 3 aktiviert und die Apoptose eingeleitet (zusammengefasst in Elmore 2007).

Die Ergebnisse zeigten eine verstärkte Expression von *BBC3*, *BCL2L1*, *PMAIP1* und *TNFRSF10B*. Die Transkriptmenge von *PMAIP1* wurde dosisabhängig auf das 5-fache erhöht, während der mRNA-Gehalt von *BBC3*, *BCL2L1* sowie *TNFRSF10B* auf maximal das 3-fache gesteigert wurde.

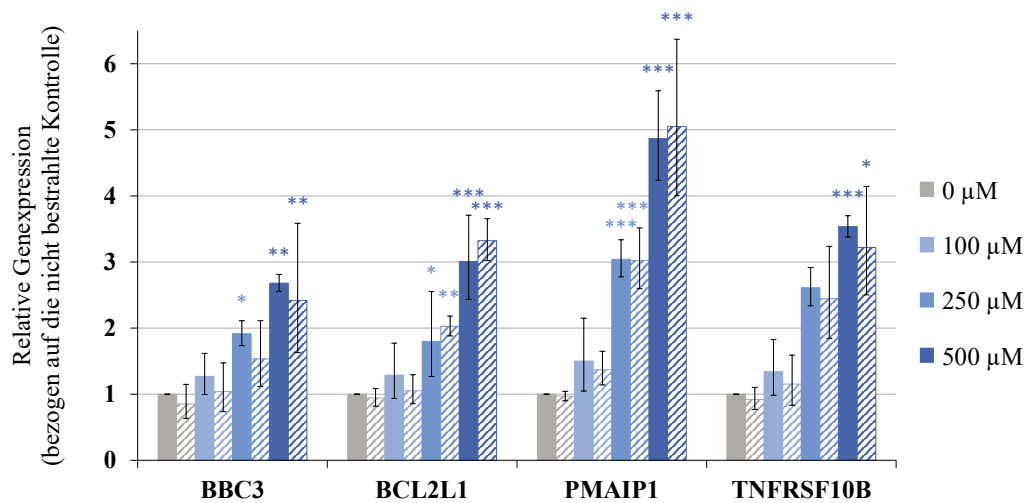


Abbildung 5.19: Einfluss von Mangan auf die relative Expression der Gene, welche für die Apoptose codieren. Die Zellen wurden für 32 h mit Manganchlorid (MnCl_2) behandelt ($100 \mu\text{M}$ bis $500 \mu\text{M}$) bzw. für 24 h vorinkubiert, mit 1 Gy bestrahlt (schraffiert) und für 8 h nachinkubiert. Untersucht wurden die Gene *BBC3*, *BCL2L1*, *PMAIP1* und *TNFRSF10B*. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der nicht bestrahlten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Die Ergebnisse deuten somit auf eine mögliche Induktion der Apoptose durch Mangan hin. Dabei zeigten vor allem die pro-apoptotischen Gene eine verstärkte Expression. Zudem wurden bevorzugt Gene, welche für den intrinsischen Apoptoseweg codieren, exprimiert, weshalb vermutlich die Apoptose über diesen eingeleitet wird. Möglich wäre jedoch auch, dass die Apoptose über den extrinsischen Weg abläuft. In der Literatur sind bereits einige Studien zur Apoptose-Induktion durch Mangan bekannt (Oubrahim *et al.* 2001, Deng *et al.* 2011, Hernroth *et al.* 2018). Darunter auch eine Studie, die zeigte, dass Mangan den intrinsischen Apoptoseweg bevorzugt auslöst (Yoon *et al.* 2011). Die vorliegende Literatur bezieht sich dabei auf unterschiedliche Zelllinien und auch unterschiedlichen Mangan-Verbindungen.

Diese Daten bestätigen die vorangegangenen Ergebnisse der Expression der Gene, welche für Transkriptionsfaktoren sowie für die Zellzyklusregulation codieren. Mangan scheint, wie bereits beschrieben, durch die Induktion von ROS eine inflammatorische Wirkung auf die Zelle auszuüben, die DNA zu schädigen, einen Zellzyklusphasen-Arrest und möglicherweise die Apoptose über den intrinsischen Weg einzuleiten. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden im Anschluss die Zellzyklusphasenverteilung und die Zelltodmechanismen untersucht.

5.1.5 Einfluss von Mangan auf die Zellzyklusphasenverteilung und Viabilität in HeLa S3-Zellen

Aufgrund der Ergebnisse der Genexpression, welche veränderte Transkriptmengen für Gene der Zellzyklusregulation bzw. der Apoptose aufzeigten, wurde die Zellzyklusphasenverteilung sowie die Viabilität der HeLa S3-Zellen auf zellulärer Ebene unter Einfluss von Mangan untersucht. Hierfür wurden die Zellen für 32 h bzw. 72 h mit MnCl_2 inkubiert (100 μM bis 500 μM) und daraufhin am FACS der Zellzyklus sowie die Viabilität der Zellen bestimmt.

Zur Markierung der DNA wurde der Fluoreszenzfarbstoff DAPI, zur Messung der Viabilität wurden die Farbstoffe Propidiumiodid und Annexin V-FITC eingesetzt. Propidiumiodid färbt dabei tote Zellen, da dieser Farbstoff nur geschädigte Zellmembranen passieren kann, während Annexin V-FITC an Phosphatidylserin der äußeren Membran apoptotische Zellen binden kann und diese dadurch markiert. Eine Bestrahlung der Zellen wurde in diesem Versuchsaufbau nicht mitgeführt, da in der Genexpressionsanalyse kein zusätzlicher Effekt durch die Bestrahlung erkennbar war.

In Abbildung 5.20 ist die Zellzyklusphasenverteilung von HeLa S3-Zellen unter Einfluss von Mangan gezeigt. Dabei wurde festgestellt, dass die Kontrollen einen Anteil von etwa 65 % der Zellen in der G1-Phase, 15 % in der S-Phase und 20 % in der G2-Phase aufwiesen. Nach einer Inkubationszeit von 32 h war bis 250 μM MnCl_2 kein Effekt auf die Zellzyklusphasenverteilung ersichtlich. Ab einer Konzentration von 500 μM wurde ein leichter Anstieg der Zellen auf 70 % in der G1-Phase, eine Abnahme auf 10 % in der S-Phase und eine unveränderte G2-Phase nachgewiesen. Aufgrund der hohen Standardabweichung ist dies jedoch vernachlässigbar. Eine Inkubationszeit von 72 h zeigte ebenfalls bis 250 μM MnCl_2 keinen Einfluss auf die Verteilung der Zellzyklusphasen. Der Anteil der Zellen in der G2-Phase stieg jedoch leicht auf 24 % bei einer Konzentration von 500 μM . Der S-Phasen-Anteil blieb dabei unverändert, während der Anteil in der G1-Phase nur leicht auf 61 % abnahm.

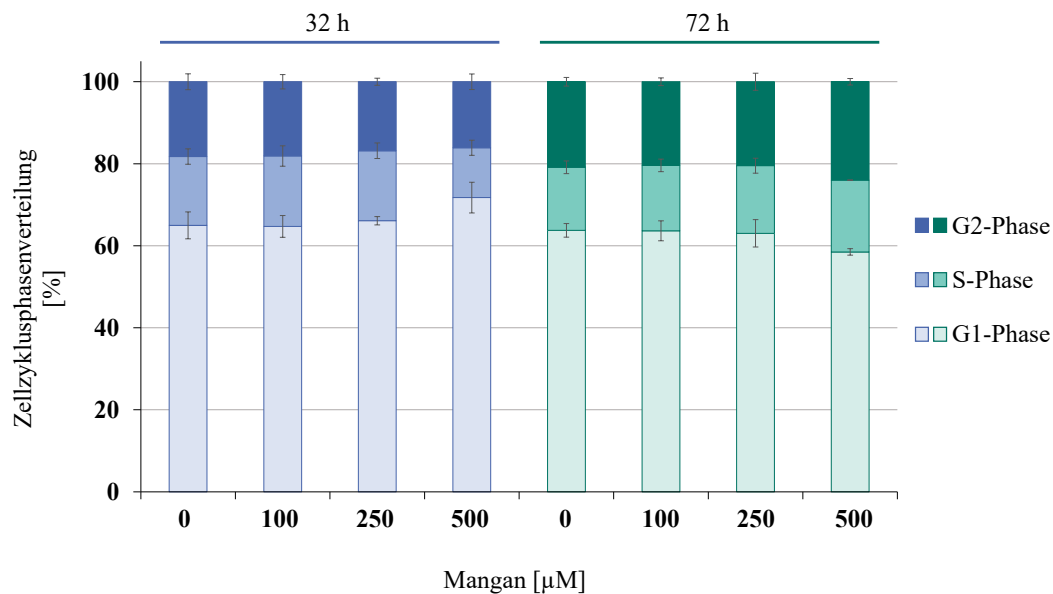


Abbildung 5.20: Einfluss von Mangan auf die Zellzyklusphasenverteilung in HeLa S3-Zellen. Die Zellen wurden für 32 h bzw. 72 h mit Manganchlorid (MnCl_2) ($100 \mu\text{M}$ bis $500 \mu\text{M}$) inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen, in Einzelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung.

Diese Ergebnisse weisen auf eine leichte Tendenz des G1-Phasen-Arrestes mit einer MnCl_2 Behandlung nach 32 h Inkubationszeit hin, während nach 72 h eine Neigung zum Übergang in den G2-Phasen-Arrest ersichtlich scheint. Die hohen Standardabweichungen erschweren zusätzlich die Aussage über einen möglichen Zellzyklusphasen-Arrest. Möglicherweise würden höhere Mangan-Konzentrationen, welche in dieser Arbeit nicht angewandt wurden, zu einem Zellzyklus-Arrest führen.

In der Literatur von Zhao *et al.* (2008) wurde bereits der Einfluss von MnCl_2 auf den Zellzyklus von A549-Zellen gezeigt. Dabei konnte festgestellt werden, dass Mangan bei einer Konzentration von $500 \mu\text{M}$ einen G1- und S-Phasen-Arrest auslösen kann. Dabei wurden Inkubationszeiten von 20 h bis 32 h gewählt. Zusätzlich untersuchte die Studie die Veränderungen Zellzyklus-abhängiger Proteine mit Hilfe des Western Blots und stellte dabei eine Abnahme Cyclin-abhängiger Kinasen fest. Diese Kinasen besitzen wichtige Funktionen in der Kontrolle des Zellzyklus'. Die Beeinträchtigung der Proteine könnte auf eine Induktion des G1-Phasen-Arrestes hinweisen. Die Daten dieser Arbeit deuten auf eine ähnliche Tendenz nach einer Inkubationszeit von 32 h und $500 \mu\text{M}$ MnCl_2 hin. Ebenfalls einen G1-Phasen-Arrest zeigten Deng *et al.* (2011). Deng und Kollegen untersuchten dabei den Einfluss von MnCl_2 in Rattenastrozyten und konnten feststellen, dass nach einer 24-stündigen

Inkubation mit 500 μM MnCl_2 ein G1-Phasen-Arrest auftrat. Jedoch ist zu beachten, dass diese Konzentration in Rattenastrozyten bereits zytotoxisch erschien. In den Versuchen von Hernroth *et al.* (2018) wurde ein G1-Phasen-Arrest in unterschiedlichen Prostata-Krebszellen nach einer Inkubation mit MnCl_2 ermittelt. Hierbei wurden Inkubationszeiten von 24 h bis 72 h und Konzentrationen von 1 μM bis 1000 μM angewandt. Die Induktion des G1-Phasen-Arrestes fand je nach Zelllinie ab 200 μM sowie 48 h statt. Im Gegensatz zu diesen Studien konnten Yu *et al.* (2015) einen G2-Phasen-Arrest in HeLa-Zellen durch die Inkubation mit Mangan-Nanopartikeln ($\text{MnO}@\text{SiO}_2$) beobachten. Diese Partikel besitzen einen Kern aus MnO , welcher mit SiO_2 überzogen ist. Es konnte ein G2-Phasen-Arrest nach einer Inkubation mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nach 24 h gezeigt werden. Die Ergebnisse dieses Experiments deuten auf eine DNA-schädigende Wirkung durch Mangan und der damit verbundenen Reparatur der DNA am G2/M-*Checkpoint* hin.

Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse der angegebenen Studien und der Daten dieser wissenschaftlichen Abschlussarbeit kann keine konkrete Aussage über die Induktion eines Zellzyklusphasen-Arrestes durch Mangan gemacht werden. Unterschiede zwischen den Ergebnissen könnten auf die unterschiedlichen Zelllinien sowie Inkubations-Substanzen zurückgeführt werden. Es sind weitere Untersuchungen nötig, um eindeutiger Aussagen zu erhalten.

In Abbildung 5.21 ist die Viabilität von HeLa S3-Zellen unter Einfluss von Mangan dargestellt. Dabei wurde die Anzahl der vitalen, apoptotischen, spät-apoptotischen sowie nekrotischen Zellen gemessen. Bei den Kontrollen konnte ein Anteil von etwa 96 % vitaler Zellen festgestellt werden. Apoptotische Zellen nahmen einen Anteil von etwa 3 bis 4 % ein, während nekrotische Zellen weniger als 1 % ausmachten. Eine Behandlung mit MnCl_2 (100 μM bis 500 μM) für 32 h zeigte keinen Einfluss, während nach 72 h eine geringe Beeinträchtigung der Viabilität von HeLa S3-Zellen nach einer Inkubation mit 500 μM beobachtet werden konnte. Der Anteil der spät-apoptotischen sowie nekrotischen Zellen stieg dabei von 2,5 % auf 3,6 % leicht an.

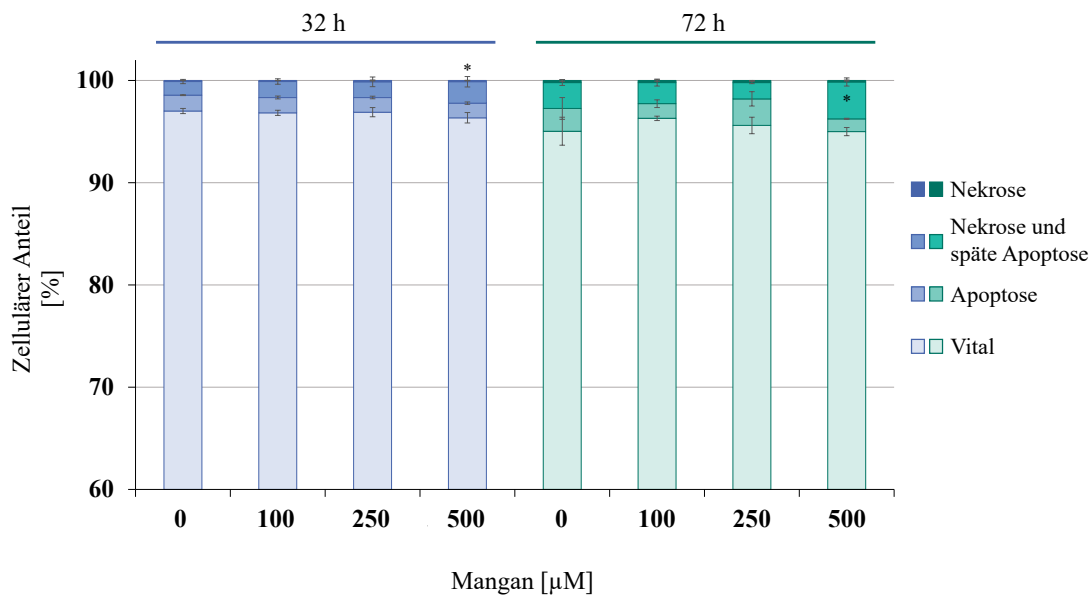


Abbildung 5.21: Einfluss von Mangan auf die Viabilität in HeLa S3-Zellen. HeLa S3-Zellen wurden für 32 h bzw. 72 h mit Manganchlorid (MnCl_2) ($100 \mu\text{M}$ bis $500 \mu\text{M}$) behandelt, als Positivkontrolle wurde Staurosporin verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Einzelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-Test (* $p \leq 0,05$).

Die Literatur hingegen zeigt eine Induktion der Apoptose durch Mangan in HeLa-Zellen. Hierfür wurde $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ als Inkubations-Substanz für 24 h auf HeLa-Zellen gegeben. Dabei wurde eine verstärkte Induktion der Apoptose bei Konzentrationen größer 1 mM gemessen (Oubrahim *et al.* 2001). Zhao *et al.* (2008) untersuchten die Viabilität von A549-Zellen nach einer Inkubation mit MnCl_2 . Sie konnten feststellen, dass Mangan erst ab einer Konzentration von 2 mM die Apoptose auslöst. Zudem waren diese Effekte erst nach einer Inkubationszeit von 48 h sowie 72 h ersichtlich. Zusätzlich konnte eine minimale Erhöhung nekrotischer Zellen nach einer Inkubationszeit von 72 h und $500 \mu\text{M}$ MnCl_2 gemessen werden, welche den Ergebnissen dieser Arbeit ähneln.

In Rattenastrozyten konnte die Apoptose-Rate bei einer Inkubation mit $250 \mu\text{M}$ MnCl_2 nach einer Inkubationszeit von 24 h erhöht werden, während in Prostata-Krebszelllinien spät-apoptotische Zellen nach einer Inkubationszeit von 48 h und einer Konzentration von $200 \mu\text{M}$ gemessen werden konnte (Deng *et al.* 2011, Hernroth *et al.* 2018).

Die Ergebnisse der beschriebenen Studien deuten alle auf eine Induktion der Apoptose durch Mangan hin. Dabei konnte in der Literatur festgestellt werden, dass Mangan erst ab hohen Konzen-

trationen apoptotische Vorgänge auslöst. Unterschiede in den Ergebnissen können möglicherweise auf die unterschiedlichen Zelllinien sowie Mangan-Verbindungen zurückgeführt werden. Zudem könnten die apoptotischen Vorgänge durch die verstärkte Induktion von ROS mittels zunehmender Mangan-Konzentration erzielt werden. In dieser Dissertation wurden jedoch Konzentrationen bis 500 μM verwendet, weshalb vermutlich Unterschiede zur Literatur auftreten und keine Induktion der Apoptose beobachtet werden konnte.

Zusammenfassend konnte im gewählten Konzentrationsbereich kein eindeutiger Effekt durch Mangan auf die Zellzyklusphasenverteilung sowie Zelltodmechanismen von HeLa S3-Zellen beobachtet werden. Lediglich eine Tendenz des G1-Phasen-Arrestes nach 32 h mit einer Behandlung von 500 μM MnCl_2 konnte gezeigt werden. Zudem konnte eine Neigung zum G2-Phasen-Arrest nach 72 h Inkubationszeit mit 500 μM MnCl_2 festgestellt werden. Die Ergebnisse der Genexpression zu Zellzyklus- und Apoptose-assoziierten Genen deuten auf einen Zellzyklusphasen-Arrest sowie dem Auslösen der Apoptose hin. Möglicherweise beeinflusst Mangan die Expression dieser Gene, während auf zellulärer Ebene nur eine geringfügige Beeinträchtigung gezeigt wurde. Somit lässt sich keine eindeutige Aussage über diese Auswirkungen durch Mangan treffen, weshalb weitere Untersuchungen nötig sind. Höhere Konzentrationen sowie andere Zeitpunkte könnten weiterführende Ergebnisse liefern. Die Methode des Western Blots würde Aufschluss über mögliche Veränderungen im Gehalt Zellzyklus-regulierender und Apoptose-induzierender Proteine geben.

5.2 Chromat

5.2.1 Zytotoxizität von Chromat auf HeLa S3-Zellen

Zur Bestimmung eines geeigneten Konzentrationsbereiches wurden zunächst die akute Zytotoxizität durch die Zellzahl, die langfristige Zytotoxizität durch die CFA sowie die metabolische Aktivität mittels ATP-Gehalt unter Einfluss von $K_2Cr_2O_7$ analysiert. Dabei wurde eine Gesamtinkubationszeit von 32 h gewählt und zur Bestimmung der subchronischen Zytotoxizität eine Inkubationszeit von 72 h eingehalten. Eine Bestrahlung fand in den Untersuchungen der Zytotoxizität nicht statt.

In Abbildung 5.22 ist der Einfluss von $K_2Cr_2O_7$ auf die Zellzahl dargestellt. Es zeigte sich ein leicht zytotoxischer Effekt ab $2,5 \mu M$, wobei der Anteil vitaler Zellen auf 80 % der Kontrolle nach 32 h sowie 72 h Inkubationszeit sank. Ab einer Konzentration von $5 \mu M$ fiel die Zellzahl nach 32 h auf 65 % und nach 72 h auf 35 %.

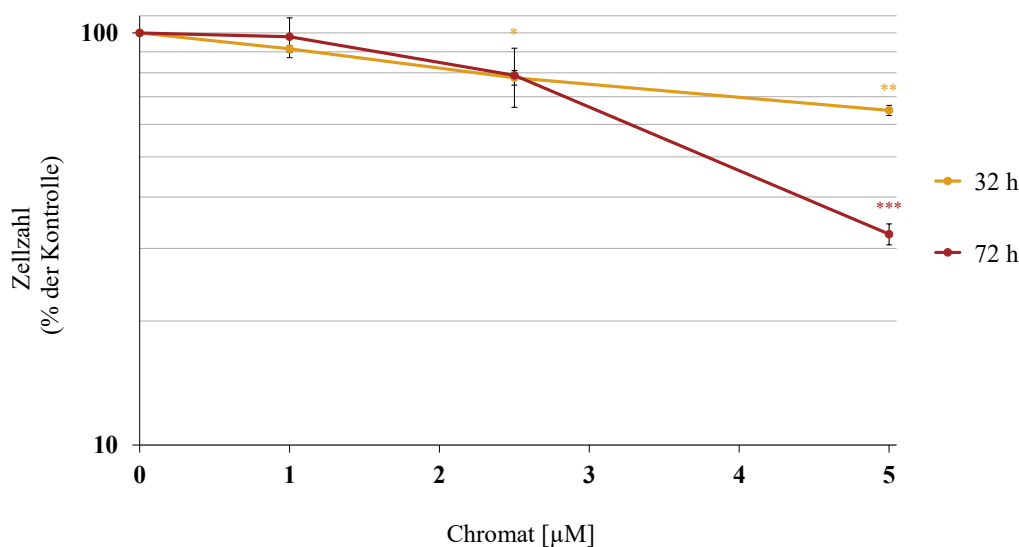


Abbildung 5.22: Einfluss von Chromat auf die Zellzahl von HeLa S3-Zellen. HeLa S3-Zellen wurden für 32 h bzw. 72 h mit Kaliumdichromat ($K_2Cr_2O_7$) ($1 \mu M$ bis $5 \mu M$) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der jeweiligen Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Zur Untersuchung der langfristigen Zytotoxizität von $K_2Cr_2O_7$ auf HeLa S3-Zellen wurde die CFA untersucht. Hierfür wurden nach Bestimmung der Zellzahl, die Zellen für 7 bis 10 Tage subkultiviert. Die Ergebnisse der CFA sind in Abbildung 5.23 aufgeführt. Bei einer Konzentration von $2,5 \mu M$ sank die Anzahl der Kolonien auf 75 % der Kontrolle (nach 32 h sowie 72 h) und somit in den moderat zytotoxischen Bereich. Ab $5 \mu M$ $K_2Cr_2O_7$ war ein stark zytotoxischer Effekt zu erkennen, wobei nach 32 h Inkubationszeit die Anzahl der Kolonien auf 15 % und nach 72 h auf 30 % der Kontrolle fiel.

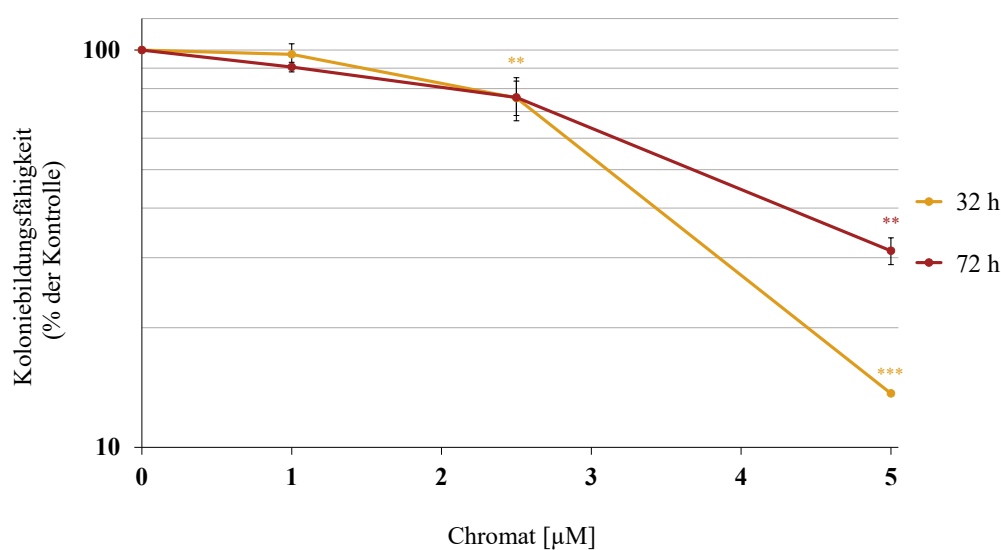


Abbildung 5.23: Einfluss von Chromat auf die Koloniebildungsfähigkeit (CFA) von HeLa S3-Zellen.

Gezeigt ist die Anzahl der Kolonien von HeLa S3-Zellen in Abhängigkeit der Kaliumdichromat ($K_2Cr_2O_7$)-Konzentrationen. Die Zellen wurden für 32 h bzw. 72 h mit $1 \mu M$ bis $5 \mu M$ $K_2Cr_2O_7$ inkubiert und anschließend 7 bis 10 Tage subkultiviert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der jeweiligen Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

In der Literatur wurde die Zytotoxizität von Chrom(VI)-Verbindungen auf unterschiedliche Zelllinien bereits beschrieben. Dabei zeigte Xie *et al.* (2015) eine dosisabhängige Abnahme der Anzahl der Kolonien durch die Inkubation mit Natriumchromat in Lungenfibroblasten. Ab einer Konzentration von $2,5 \mu M$ nach einer Inkubationszeit von 24 h sank die CFA auf 41 % bezogen auf

die Kontrolle, während mit $5 \mu\text{M}$ Natriumchromat noch 5 % der Kolonien detektiert wurden. In einer anderen Studie von Wise *et al.* (2002) wurde die Toxizität von Natriumchromat in humanen Bronchialfibroblasten untersucht. Dabei konnte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Abnahme der Kolonien beobachtet werden. Nach einer Inkubationszeit von 24 h und $2,5 \mu\text{M}$ konnten noch 57 % der Kolonien bezogen auf die Kontrolle nachgewiesen werden. Die postulierten Mechanismen der Chromat-Toxizität beruhen auf der Reduktion von Chrom(VI) zu den Intermediaten Chrom(V), Chrom(IV) und Chrom(III), welche in der Lage sind, mit der DNA Addukte zu bilden und somit die DNA zu schädigen. Dabei weisen vor allem die ternären Chrom(III)-DNA-Addukte mit Ascorbat ein hohes mutagenes Potential auf. Zudem werden bei der Reduktion von Chrom(VI) ROS durch Fenton-ähnliche Reaktionen generiert. Chrom(VI) wird dabei durch die Bindung von Ascorbat, Glutathion und NADPH über Ein- und Zweielektronensysteme zu Chrom(III) reduziert. ROS können anschließend Proteine, Lipide und die DNA schädigen (zusammengefasst in O'Brien *et al.* 2003).

Die Ergebnisse der Literatur sowie die Daten der vorliegenden Arbeit deuten auf eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellviabilität durch $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ hin. Während in den aufgeführten Studien (Xie *et al.* 2015, Wise *et al.* 2002) meist ein stärkerer Effekt durch Chromat ersichtlich war, zeigt sich in den vorliegenden Ergebnissen ein geringerer aber dennoch vorhandener Einfluss auf die Zytotoxizität. Möglicherweise lässt sich diese Betrachtung auf die empfindlicheren Zelllinien, welche in den genannten Studien genutzt wurden, zurückführen. Ebenfalls wurden unterschiedliche Chromat-Verbindungen in der Literatur verwendet. Zur Bestimmung eines weiteren Endpunktes wurde im Anschluss die metabolische Aktivität untersucht.

Die metabolische Aktivität von HeLa S3-Zellen unter Einfluss von $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ wurde mit Hilfe des ATP-Gehaltes analysiert (Abbildung 5.24). Bereits ab $1 \mu\text{M}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ stieg der ATP-Gehalt auf 120 % der Kontrolle an. Nach einer Inkubation mit $2,5 \mu\text{M}$ nahm die metabolische Aktivität auf 145 % der Kontrolle weiterhin zu, fiel jedoch nach einer Inkubation mit $5 \mu\text{M}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ wieder auf 120 %. Dabei zeigten die Inkubationszeiten von 32 h und 72 h in ihrer Auswirkung keine Unterschiede. Aufgrund der hohen Standardabweichung ist eine Aussage über die erhöhte metabolische Aktivität der Zellen jedoch erschwert. Der Anstieg des ATP-Gehaltes unter Einfluss von Chromat ist nicht statistisch signifikant.

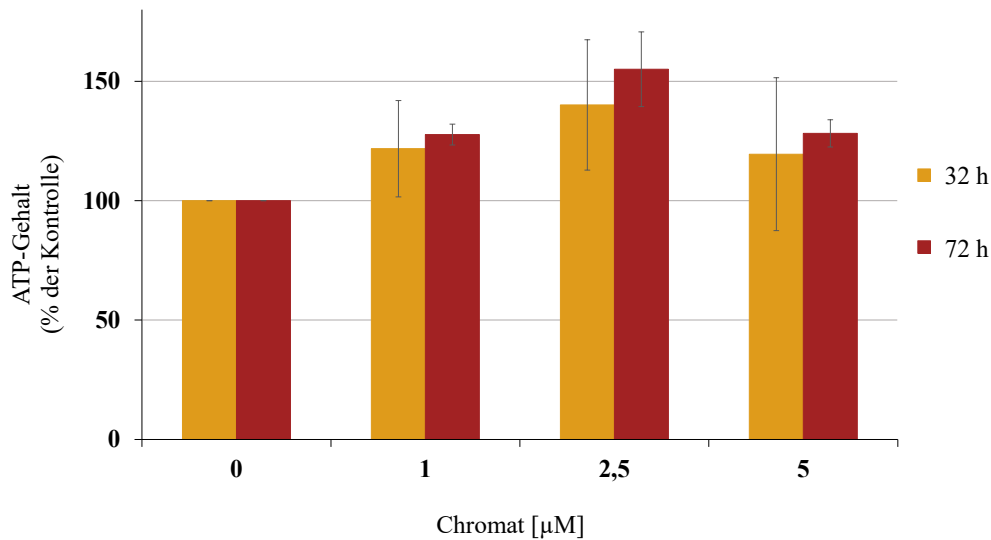


Abbildung 5.24: Einfluss von Chromat auf die metabolische Aktivität von HeLa S3-Zellen. Die Zellen wurden für 32 h bzw. 72 h mit Kaliumdichromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) ($1 \mu\text{M}$ bis $5 \mu\text{M}$) behandelt und die metabolische Aktivität über den ATP-Gehalt mittels Lumineszenz gemessen. Dargestellt sind drei unabhängige, in Doppelbestimmung durchgeführte Versuche \pm Standardabweichung.

In der Literatur von Debetto *et al.* (1982) wurde der ATP-Gehalt in Hamsterfibroblasten unter Einfluss von $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass der ATP-Gehalt mit steigender Konzentration abnimmt, während in der vorliegenden Arbeit die metabolische Aktivität tendenziell verstärkt wird. Unterschiede zwischen den Ergebnissen könnten aufgrund unterschiedlicher Zelllinien sowie Inkubationszeiten entstanden sein. In der Literatur verwendete Behandlungszeiträume waren bis zu 180 Minuten und Dosen von $50 \mu\text{M}$ bis 1 mM . In der vorliegenden Arbeit wurde eine um den Faktor 10 niedrigere Konzentration verwendet als die am geringsten eingesetzte Dosis in der Literatur.

Mit Hilfe des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assays konnte ebenfalls eine dosisabhängige Abnahme der Zellviabilität durch die Inkubation mit $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ festgestellt werden. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten nach 24 h sowie 48 h Inkubationszeit eine Abnahme der Zellviabilität auf 82 % der Kontrolle durch $3,12 \mu\text{M}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ in humanen Leberkarzinomzellen (Patlolla *et al.* 2009). Dabei wird mit dem MTT-Assay ebenfalls die metabolische Aktivität der Zellen gemessen, wobei der Farbstoff MTT durch NADPH in Formazan umgesetzt wird. Formazan ist ein blau-violetter unlöslicher Farbstoff, welcher kolorimetrisch analysiert werden kann. Patlolla *et al.* (2009) unterstützen somit die vorliegenden Ergebnisse der

kurzzeitigen sowie langfristigen Zytotoxizität, wobei eine Aussage über die metabolische Aktivität aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht getroffen werden kann.

Eine möglich Erhöhung des ATP-Gehaltes der Zellen könnte durch das Einleiten der Apoptose verursacht werden. Bekannt ist, dass für die beginnenden apoptotischen Vorgänge ATP zur Aktivierung von Caspasen und für die Chromatin Kondensation benötigt und vermehrt bereitgestellt wird (Zamaraeva *et al.* 2005). Möglich wäre eine Induktion des programmierten Zelltodes durch $K_2Cr_2O_7$ in HeLa S3-Zellen, welcher eine gesteigerte ATP-Synthese verursacht. Das Einleiten der Apoptose durch Chromat konnte bereits in der Literatur gezeigt werden. In den angegebenen Studien wurden jedoch zytotoxische Konzentrationen von mindestens $20 \mu M$ verwendet (Bagchi *et al.* 2002, Hayashi *et al.* 2004, Hill *et al.* 2008).

Die Ergebnisse der Zytotoxizität zeigten einen Einfluss ab $5 \mu M K_2Cr_2O_7$ auf die Zellzahl sowie CFA, während über den ATP-Gehalt aufgrund der hohen Standardabweichung keine eindeutige Aussage getroffen werden kann. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden nachfolgende Versuche mit Konzentrationen bis $2,5 \mu M K_2Cr_2O_7$ durchgeführt. Der im Anschluss aufgeführte Reporter-Assay wurde ebenfalls mit $5 \mu M$ angewandt, um mögliche Effekte deutlicher darstellen zu können.

5.2.2 Einfluss von Chromat auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Nach der Bestimmung eines geeigneten Konzentrationsbereiches wurde der Einfluss von $K_2Cr_2O_7$ auf die Reparatur von durch ein Restriktionsenzym spezifisch gesetzten DNA-DSB und strahleninduzierten DNA-DSB untersucht. Zunächst wurde der Reporter-Assay angewandt, um die einzelnen Mechanismen auf ihre Aktivität zu überprüfen. Anschließend folgte die Färbung spezifischer DNA-Reparaturproteine und die Detektion mittels IF.

5.2.2.1 Reporter-Assay

Zur Untersuchung der Reparaturwege HR, NHEJ, SSA sowie MMEJ wurde zunächst der Reporter-Assay angewandt. Dabei wurden die transfizierten U2OS-Zellen mit $K_2Cr_2O_7$ behandelt und anschließend die Aktivität mittels GFP-Signal am FACS überprüft.

Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 5.25 aufgeführt. Dabei kam es zu einer Abschwächung des GFP-Signals in den Zellen, welche das NHEJ sowie das SSA widerspiegeln, auf 85 % der Kontrolle bei einer Konzentration von 5 μM . Eine Abnahme des GFP-Signals der HR zeigte sich bereits ab 2,5 μM und es sank auf 65 % der Kontrolle. Nach einer Inkubation mit 5 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ wurde ein GFP-Signal von lediglich 15 % erfasst, welches auf eine fast vollständig inhibierte HR hindeutet. Das Signal des MMEJ war im vorliegenden Versuch konzentrationsabhängig auf 140 % bereits nach einer Inkubation von 2,5 μM gestiegen. Nach einer Behandlung mit 5 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ wurde ein um das 8-fache verstärktes GFP-Signal gegenüber der Kontrolle gemessen.

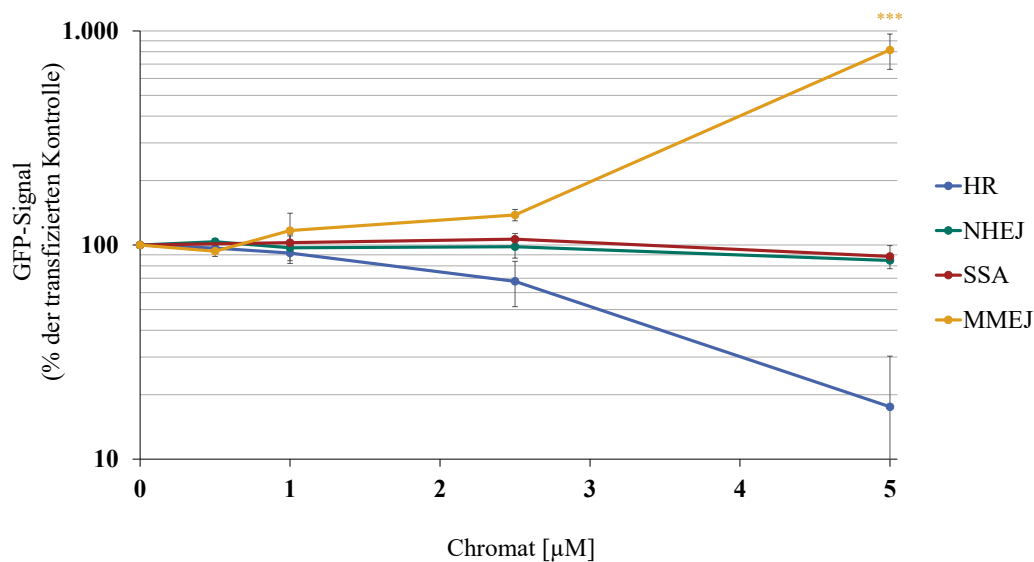


Abbildung 5.25: Einfluss von Chromat auf die Reparaturwege von DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSB) in U2OS-Zellen mittels Reporter-Assay. U2OS-Zellen wurden für 6 h mit dem Restriktionsenzym I-SceI transfiziert, anschließend für 66 h, um ein maximales GFP-Signal zu erhalten, mit Kaliumdichromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) (0,5 μM bis 5 μM) inkubiert und das GFP-Signal mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) gemessen. Die Proben wurden auf die transfizierte Kontrolle bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der transfizierten Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-Test (***) $p \leq 0,001$.

Diese Ergebnisse deuten auf eine intakte Reparatur durch das NHEJ sowie SSA nach einer Behandlung mit $K_2Cr_2O_7$ hin. Während die nahezu fehlerfreie HR fast vollständig inhibiert scheint, wird möglicherweise dieser Verlust durch das fehlerbehaftete MMEJ ausgeglichen.

In der Literatur konnte der Einfluss auf die HR durch Chrom(VI)-Partikel bereits gezeigt werden. Hierbei wurde das dargestellte System des Reporter-Assays in humanen Bronchialfibroblasten angewandt und mit Zinkchromat-Partikeln behandelt. Die Ergebnisse zeigten eine verstärkte Reparatur der DNA-DSB durch die HR nach einer Inkubationszeit von 24 h, während nach 120 h die HR vollständig inhibiert war. Der postulierte Mechanismus basiert auf der Inhibierung der Ausbildung des Rad51 Nukleoproteinfilamentes (Browning *et al.* 2016). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Inkubationszeit von 66 h angewandt und ebenfalls eine Inhibierung der HR festgestellt.

Diese Beeinträchtigung könnte zu einer vermehrten Reparatur durch das MMEJ führen und das gesteigerte GFP-Signal dieses Weges erklären. Die Verstärkung dieses Reparaturweges durch $K_2Cr_2O_7$ wurde in dieser Arbeit erstmalig untersucht. Ein möglicher Mechanismus könnte die Inhibierung des Proteins BRCA1 darstellen. Es konnte bereits festgestellt werden, dass durch eine Beeinträchtigung von BRCA1 eine verstärkte Induktion der Reparatur mittels MMEJ stattfindet (Ahrabi *et al.* 2016). Ebenfalls konnte eine inverse Korrelation zwischen der HR-Aktivität und der Expression der *POLQ*, welche für die Polymerase θ codiert, gezeigt werden (Ceccaldi *et al.* 2015). Möglicherweise wird durch die Inhibierung von BRCA1 die Polymerase θ verstärkt exprimiert bzw. durch eine erhöhte Induktion der Polymerase die HR beeinträchtigt (Ahrabi *et al.* 2016). Dabei stellt BRCA1 ein wichtiges Protein der HR dar, welches für die Rekrutierung von Rad51 an den DNA-DSB verantwortlich ist. Für das MMEJ stellt die Polymerase θ ein wichtiges Markerprotein dar, mit der Funktion die DNA über Mikrohomologien zu verknüpfen (zusammengefasst in Prakash *et al.* 2015 sowie Wood und Doublet 2016).

Die Daten der vorliegenden Arbeit sowie der Literatur implizieren eine Verschiebung von der nahezu fehlerfreien HR zum fehlerbehafteten MMEJ und somit zu einer möglichen Beeinträchtigung der genomischen Stabilität. Dabei führt eine fehlerhafte Reparatur zu einer erhöhten Mutationsrate sowie deren potentiellen Folge einer Kanzerogenese. Im Anschluss wurden die Proteine BRCA1 und Rad51 sowie Rad54 mit Hilfe der IF untersucht, um die mögliche Beeinträchtigung der HR zu überprüfen. Zudem wurde die Transkriptmenge der *POLQ* unter Einfluss von $K_2Cr_2O_7$ betrachtet.

5.2.2.2 Immunfluoreszenz (IF)

Aufgrund der Ergebnisse des Reporter-Assays, welcher eine Inhibierung der HR zeigte, wurde anschließend die IF zur Färbung spezifischer Reparaturproteine durchgeführt. Hierzu wurden die Proteine BRCA1, Rad51 sowie Rad54 als Markerproteine der HR ausgewählt. HeLa S3-Zellen wurden für 24 h bzw. 64 h mit $K_2Cr_2O_7$ inkubiert, mit 1 Gy zur Induktion von DNA-DSB bestrahlt und zur Betrachtung der Reparatur 8 h nachinkubiert. Eine 8-stündige Nachinkubationszeit wurde, wie bereits bei Mangan beschrieben, gewählt, da ein Großteil der strahleninduzierten DNA-DSB nach dieser Zeit repariert sind (Beucher *et al.* 2009). Zusätzlich wurden Versuche mit nicht bestrahlten Zellen mit einer Gesamtinkubationszeit von 32 h bzw. 72 h mitgeführt.

BRCA1

BRCA1 trägt in der HR die Funktion, die DNA-Enden des DSB zu prozessieren und anschließend im Komplex mit BRCA2 die Rad51 Monomere an den DNA-DSB zu rekrutieren. Rad51 stabilisiert daraufhin den DNA-Einzelstrang. BRCA1 besitzt an seinem N-terminalen Ende eine Ringstruktur, welche sich durch die Koordination von zwei Zinkionen auszeichnet (zusammengefasst in Prakash *et al.* 2015, Jensen *et al.* 2010). Diese Struktur bietet eine Angriffsstelle für Metalle (zusammengefasst in Hartwig 2001).

Abbildung 5.26 zeigt die Ergebnisse der BRCA1-Färbung nach einer Inkubation mit $K_2Cr_2O_7$. Dabei wurde nach einer Inkubationszeit von 32 h ohne Bestrahlung etwa 5 Foci in der Kontrolle, 11 Foci nach einer Behandlung mit $1 \mu M$ und 14 Foci mit $2,5 \mu M K_2Cr_2O_7$ gezählt. In diesem Zeitraum wurden mit zusätzlicher Bestrahlung 26 Foci in der Kontrolle, 28 Foci mit $1 \mu M$ sowie 30 Foci mit $2,5 \mu M K_2Cr_2O_7$ detektiert. Nach einer 72-stündigen Behandlungszeit konnten in den nicht bestrahlten Behandlungen 9 Foci in der Kontrolle, mit $1 \mu M$ 5 Foci und mit $2,5 \mu M K_2Cr_2O_7$ nur noch 3 Foci analysiert werden. Mit zusätzlicher Bestrahlung wurde dieser Effekt verstärkt. Hier wies die Kontrolle 29 Foci auf, die Inkubation mit $1 \mu M$ zeigte nur noch 17 Foci und die Behandlung mit $2,5 \mu M K_2Cr_2O_7$ 13 Foci.

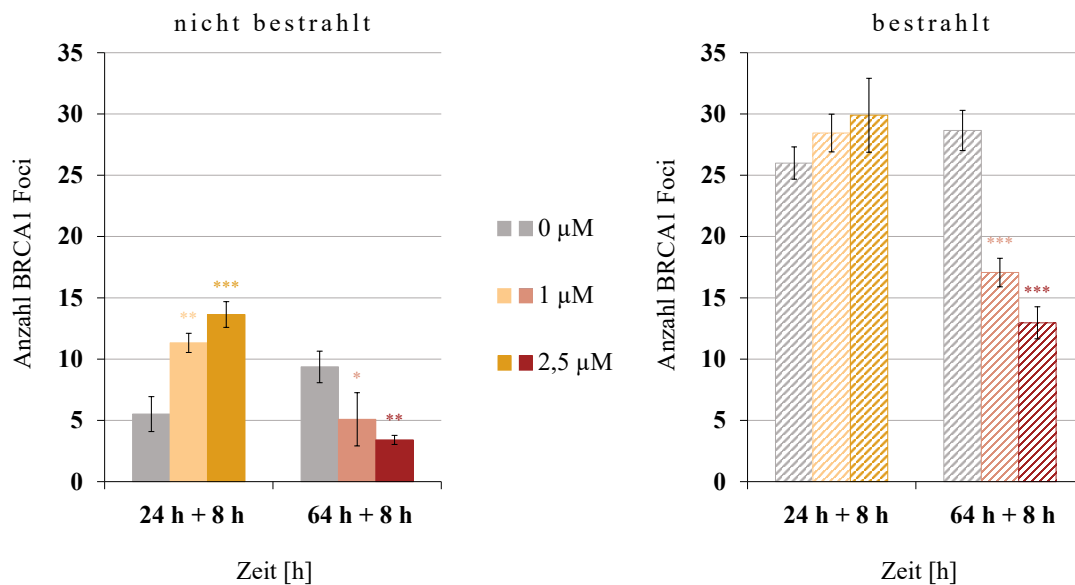


Abbildung 5.26: Einfluss von Chromat auf die Anlagerung von BRCA1 in HeLa S3-Zellen mit Hilfe der Immunfluoreszenz (IF)-Färbung. HeLa S3-Zellen wurden für 24 h bzw. 64 h mit Kaliumdichromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) vorinkubiert (1 μM und 2,5 μM), mit 1 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Nicht bestrahlte Proben wurden für 32 h bzw. 72 h mit $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der jeweiligen Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Die Ergebnisse der 32-stündigen Inkubation deuten auf eine Induktion von DNA-DSB durch Chromat selbst hin. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass BRCA1 am vorhandenen DNA-DSB nicht mehr abgebaut werden kann. Nach einer 72-stündigen Behandlung scheint eine mögliche Beeinträchtigung von BRCA1 durch Chromat vorzuliegen. Möglich wäre, dass BRCA1 nicht mehr an den DNA-DSB binden kann. Der Einfluss von $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ auf BRCA1 wurde mit Hilfe der IF in dieser Arbeit erstmalig untersucht.

Die Induktion von DNA-DSB durch Chrom(VI) konnte bereits festgestellt werden, wobei diese Erkenntnisse in Versuchen mit Hilfe des Comet Assays unter neutralen Bedingungen sowie mit der IF von $\gamma\text{-H2AX}$ beobachtet werden konnten. Hierbei wurden in verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Chrom-Verbindungen und -Partikel getestet. Es konnte bereits bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten mit 10 μM Kaliumchromat in HeLa-Zellen eine Induktion von DNA-DSB nachgewiesen werden (Wakeman *et al.* 2004). Xie *et al.* (2005) zeigten, dass Natriumchromat in humanen

Lungenfibroblasten bereits ab einer Konzentration von 1 μM DNA-DSB induziert. Außerdem verursachte Natriumchromat in dermalen Fibroblasten eine erhöhte Induktion von DNA-DSB. Dabei wurden 6 μM für 3 h eingesetzt (Ha *et al.* 2004). Die Entstehung von DNA-DSB durch Chromat wird auf die Bildung von Chrom-DNA-Addukten und auf die beeinträchtigte Reparatur dieser Addukte zurückgeführt. Zudem wird ebenfalls die Generierung von ROS und den damit verbundenen DNA-Schäden postuliert (Peterson-Roth *et al.* 2005, Reynolds *et al.* 2009, zusammengefasst in O'Brien *et al.* 2003). Die DNA-Addukte können zum Blockieren und anschließenden Zusammenbrechen der Replikationsgabel führen und damit zum Entstehen von DNA-DSB. Zudem stellt die *mismatch repair* ein wichtiges Reparatursystem Chrom-induzierter Schäden dar. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Proteinkomplexe der *mismatch repair* an die DNA-Addukte binden, diese jedoch nicht beheben können. Dies wiederum führt, wie bereits beschrieben, zur Störung der Replikation und folglich zum Entstehen von DNA-DSB (Peterson-Roth *et al.* 2005, Reynolds *et al.* 2007, 2009). Die Effekte von ROS und deren Entstehung durch Chromat wurde bereits in Abschnitt 5.2.1 beschrieben. Während die Entstehung von DNA-DSB durch Chromat gut erforscht ist, ist über die Reparatur dieser Schäden unter Einfluss von Chromat weniger bekannt.

Während nach einer 32-stündigen Inkubation mit Chromat die Anlagerung von BRCA1 beobachtet werden konnte, wurden nach einer 72-stündigen Behandlung weniger Foci nachgewiesen. Diese verminderte Anlagerung von BRCA1 durch Chrom(VI) wurde in der Literatur bisher nicht untersucht und kann in der vorliegenden Dissertation erstmalig gezeigt werden. Möglich wäre eine durch Chrom(VI) verursachte epigenetische Veränderung im *BRCA1*-Gen, woraus eine verminderte Expression des Proteins resultiert. Es ist bereits bekannt, dass Chrom(VI) in Reparaturgenen zur Hypermethylierung führt und somit deren Expression vermindert (Takahashi *et al.* 2005, Hu *et al.* 2018). Dabei werden mehrere Mechanismen der Hypermethylierung postuliert, wobei ein Mechanismus auf die Induktion der Histon-Methyltransferase G9a zurückgeführt werden kann. Die Histon-Methyltransferase G9a methyliert dabei die Aminogruppe von Lysin 9 im Histon 3 (H3K9). Diese Methylierung wiederum führt zur Rekrutierung von DNA-Methyltransferasen, welche anschließend die DNA methylieren. Eine DNA-Methylierung findet vorzugsweise in cytosin- und guanosinreichen Promotorregionen von Genen statt. Das vermehrte Auftreten von 5-Methylcytosin verringert die Affinität von Transkriptionsfaktoren an die entsprechenden Gensequenzen zu binden und reduziert somit deren Transkriptionsrate. Des Weiteren werden durch die Histon-Methylierung von H3K9 Histone deacetyliert, wodurch die DNA unzugänglich für Transkriptionsfaktoren vorliegt. In der Literatur konnte bereits gezeigt werden, dass G9a durch Chrom(VI) verstärkt induziert wird und somit eine Hypermethylierung auslösen kann (Sun *et al.* 2009, Ali *et al.* 2011, Jin *et al.* 2012, zusammengefasst in Jin *et al.* 2011).

Möglich wäre ebenfalls, eine Interaktion von Chromat mit der in BRCA1 enthaltenen Ringstruktur. Diese wird aus einem Zinkion, welches über vier Cysteine gebunden und einem Zinkion, welches über drei Cysteine und einem Histidin koordiniert ist, gebildet (zusammengefasst in Savage und Harkin 2015). Die Interaktion einiger Metalle mit Zink-bindenden Strukturen konnte bereits mehrfach gezeigt werden (zusammengefasst in Hartwig 2001 und Witkiewicz-Kucharczyk und Bal 2006). Chrom(VI) könnte Zink-bindende Motive in Proteinen beeinträchtigen und somit ihre Funktion stören. Möglich wäre eine Oxidation der Thiolgruppen und dem damit einhergehenden Verlust von Zink aus diesen Strukturen. Dass Chrom(VI) bzw. dessen Intermediate in der Lage sind, mit Zink-bindenden Motiven und Thiolgruppen zu wechselwirken, konnte bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden (zusammengefasst in Witkiewicz-Kucharczyk und Bal 2006, Levina *et al.* 2000, Krepkiy *et al.* 2001). Jedoch konnte nach einer 32-stündigen Inkubation mit Chromat BRCA1 Foci nachgewiesen werden, weshalb eine Interaktion mit der Ringstruktur in BRCA1 unwahrscheinlich ist.

Die Daten der vorliegenden Arbeit sowie die Ergebnisse der Literatur deuten auf eine Induktion von DNA-DSB durch Chrom(VI) nach 32-stündiger Behandlung hin. Zudem implizieren die Ergebnisse der 72-stündigen Inkubation einen verminderten Proteingehalt von BRCA1 vermutlich durch epigenetische Veränderungen. Durch die Beeinträchtigung von BRCA1 könnten möglicherweise Folgeproteine dieses Reparaturmechanismus ebenfalls beeinträchtigt sein. Aufgrund dessen, wurde im Anschluss die IF von Rad51 betrachtet. Rad51 wird, wie bereits beschrieben, von BRCA1 und BRCA2 an den DNA-DSB koordiniert. Für den Abbau von Rad51 ist Rad54 verantwortlich, welches ebenfalls mit Hilfe der IF anschließend detektiert wurde. Zusätzlich ist bereits bekannt, dass eine Inhibierung von BRCA1 zu einer verstärkten Expression der Polymerase θ führt (Ahrabi *et al.* 2016), welche wiederum die Reparatur mit Hilfe des MMEJ unterstützt. Aus diesem Grund wurde abschließend die Expression der *POLQ*, welche für die Polymerase θ codiert, untersucht.

Rad51

Im Anschluss an die IF von BRCA1 wurde das Protein Rad51 angefärbt. Wie bereits beschrieben, koordiniert BRCA1 im Komplex mit BRCA2 das Protein Rad51 an den DNA-DSB. Rad51 ist anschließend für die Stabilisierung des DNA-Einzelstranges, durch Ausbilden eines Nukleoproteinfilamentes sowie für das Eindringen in das Schwesterchromatid, verantwortlich (zusammengefasst in Heyer *et al.* 2010). Aufgrund der vorhandenen Thiolgruppen im Protein stellt Rad51 eine Angriffsstelle für Metalle dar (zusammengefasst in Hartwig 2001).

Abbildung 5.27 zeigt die Ergebnisse der IF von Rad51 nach einer 32- sowie 72-stündigen Inkubation mit Chromat mit und ohne Bestrahlung. Nach einer Behandlungszeit von 32 h ohne Bestrahlung konnten 6 Foci in der Kontrolle, 54 Foci und 58 Foci nach einer Inkubation mit 1 und 2,5 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ nachgewiesen werden. Mit zusätzlicher Bestrahlung stieg die Anzahl der Rad51 Foci auf 25 in der Kontrolle an, während die Foci-Anzahl nach einer Inkubation mit 1 und 2,5 μM auf 55 bzw. 63 Foci minimal anstieg. Nach einem Behandlungszeitraum von 72 h wurden ähnliche Daten ermittelt. Eine Inkubation mit 1 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ wies ohne Bestrahlung 38 Foci und mit 2,5 μM 53 Foci auf. In diesem Zeitraum wurde ebenfalls die Foci-Anzahl durch eine zusätzliche Bestrahlung leicht erhöht. Dabei stieg mit einer Konzentration von 1 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ die Anzahl der Foci auf 39 und mit einer Inkubation von 2,5 μM auf 61 an. Die Kombinationsbehandlung von Chromat und Bestrahlung zeigte keinen additiven Effekt, wobei möglicherweise der Sättigungsbereich für die Detektionsmethode erreicht ist.

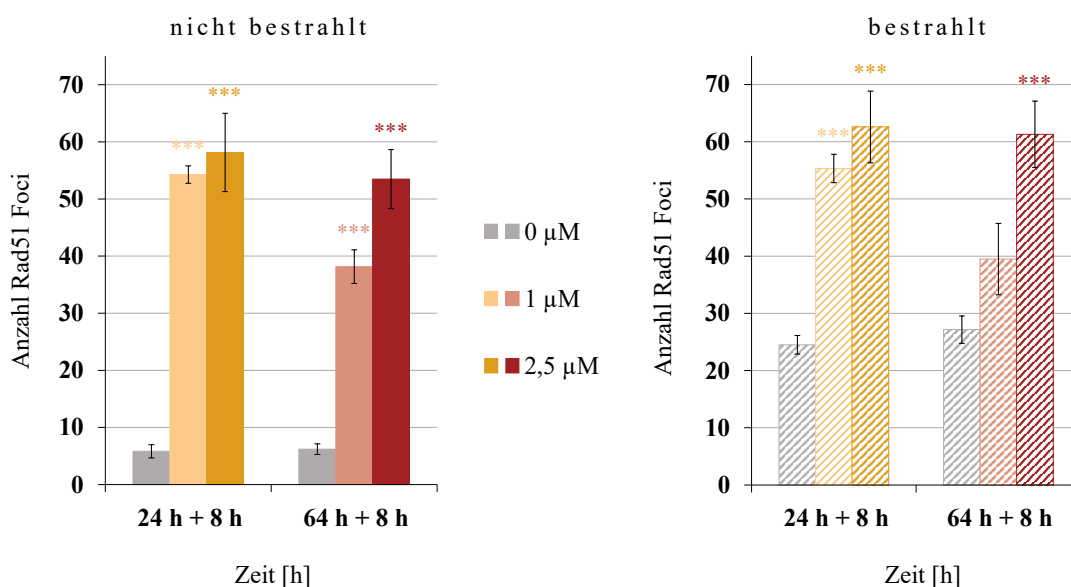


Abbildung 5.27: Einfluss von Chromat auf die Anlagerung von Rad51 in HeLa S3-Zellen mit Hilfe der Immunfluoreszenz (IF)-Färbung. Die Zellen wurden für 24 h bzw. 64 h mit Kaliumdichromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) vorinkubiert (1 μM und 2,5 μM), mit 1 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Nicht bestrahlte Proben wurden für 32 h bzw. 72 h mit $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der jeweiligen Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (***) ($p < 0,001$).

Diese Ergebnisse deuten ebenfalls auf eine Induktion von DNA-DSB durch Chromat selbst hin, während keine direkte Beeinträchtigung auf das Protein Rad51 nachgewiesen werden konnte. Im Widerspruch stehen die Ergebnisse der IF-Färbung von BRCA1, hierbei wurde nach einer Inkubationszeit von 72 h eine verminderte Anlagerung des Proteins beobachtet. Dabei ist BRCA1 im Komplex mit BRCA2 für die Anlagerung von Rad51 verantwortlich. Die vorliegenden Ergebnisse deuten jedoch auf eine Anlagerung von Rad51 hin, obwohl BRCA1 in diesem Zeitraum inhibiert zu sein scheint.

Die Induktion von DNA-DSB durch Chromat wurde mit Hilfe der IF-Färbung von Rad51, wie bereits mit BRCA1 und auch in der Literatur gezeigt, bestätigt (Wakeman *et al.* 2004, Ha *et al.* 2004, Xie *et al.* 2005, Reynolds *et al.* 2007, Xie *et al.* 2009). Widersprüchlich scheinen die Ergebnisse der 72-stündigen Inkubation mit Chromat. In der Literatur wurden Untersuchungen zu Rad51 unter Einfluss von Zinkchromat-Partikeln mit Hilfe der IF bereits durchgeführt. Dabei wurde jedoch festgestellt, dass Rad51 in humanen Lungenzellen nach einer 72-stündigen Inkubation eine geringere Anzahl an Foci bezogen auf die Kontrolle zeigte (Qin *et al.* 2014). Eine andere Studie aus dem selben Arbeitskreis bestätigte die fehlende Foci-Formation nach einer subchronischen Exposition mit Zinkchromat-Partikeln. Sie fanden heraus, dass Rad51 nicht direkt beeinflusst scheint, sondern der Rad51-Proteingehalt im Kern signifikant gesenkt wird (Browning *et al.* 2016). Zusätzlich konnten Browning und Kollegen über Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)-Aufnahmen die fehlende Nukleoproteinfilament-Ausbildung zeigen. Aufgrund dessen untersuchten sie das für den Transport von Rad51 an den DNA-DSB mit verantwortliche Protein BRCA2. Hierfür wurde die Methode der IF herangezogen. Sie konnten feststellen, dass das Protein BRCA2 nicht durch Chromat beeinflusst scheint (Browning *et al.* 2016). Dies wiederum stützt die Ergebnisse der IF von BRCA1 in dieser vorliegenden Arbeit. Möglicherweise wird BRCA1 durch Chromat inhibiert und ist dadurch nicht mehr in der Lage, Rad51 an den DNA-DSB zu koordinieren. Es scheint jedoch, dass die Anlagerung von Rad51 durch BRCA2 weiterhin ausgeführt werden kann. Dies würde die Ergebnisse der IF von Rad51 erklären. Möglicherweise wird Rad51 von BRCA2 an den DNA-DSB koordiniert. Jedoch zeigten Browning *et al.* (2016), dass das Nukleoproteinfilament nicht aufgebaut werden kann. In der von uns verwendeten IF-Methode kann die Ausbildung des Filaments nicht direkt betrachtet werden. Bekannt ist nur, dass eine Foci-Bildung bereits ab 3 bis 6 Rad51-Monomeren ersichtlich wird, wobei die Größe des Filaments abhängig vom Rad51-Proteingehalt scheint (Candelli *et al.* 2014).

Den Einfluss von verschiedenen Metallverbindungen auf das Protein Rad51 konnte bereits in Veröffentlichungen aus unserem Arbeitskreis gezeigt werden. Dabei zeigte Antimon eine Inhibie-

rung der Assoziation von Rad51, während Arsen die Dissoziation störte. Eine Behandlung mit Aluminium hingegen führte zu einem verminderten Proteingehalt (Koch *et al.* 2017, Niemand 2018, Ott 2019). Diese Ergebnisse implizieren unterschiedliche Wirkmechanismen der Inhibierung für die verschiedenen Metalle.

Möglich wäre ein unvollständiger Aufbau des Nukleoproteinfilaments von Rad51 unter Einfluss von Chromat, wobei schon eine geringe Anzahl an Rad51-Monomeren zu einer Foci-Bildung führen kann. Diese werden möglicherweise durch BRCA2 an den DNA-DSB koordiniert, da BRCA1 durch Chromat beeinflusst scheint. Da vermutlich das Filament nicht vollständig aufgebaut werden kann, wäre ein ausbleibender Abbau der Rad51-Monomere ebenfalls denkbar. Hierfür ist das Protein Rad54 verantwortlich, welches bei einem fehlenden Filament nicht an den DNA-DSB koordiniert werden kann. Aufgrund dieser Erkenntnisse und der Daten der Literatur wurde im Anschluss die IF von Rad54 betrachtet. Zudem wurde der Proteingehalt der Zellfraktionen überprüft, um mögliche Veränderungen, wie sie in der Literatur beschrieben wurden, zu untersuchen.

Rad54

Das Protein Rad54 ist, wie bereits beschrieben, ebenfalls an der Reparatur von DNA-DSB über die HR beteiligt. Dabei bindet es an Rad51, sucht die homologe Sequenz im Schwesterchromatid und dringt in dieses ein. Anschließend ist es für den Abbau von Rad51 zuständig (zusammengefasst in Mazin *et al.* 2010).

In Abbildung 5.28 sind die Ergebnisse der IF von Rad54 nach einer Inkubationszeit von 32 h bzw. 72 h mit und ohne Bestrahlung unter Einfluss von Chromat dargestellt. Nach einer Behandlungszeit von 32 h ohne Bestrahlung wurden keine Foci in der Kontrolle detektiert. Mit 1 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ konnten hingegen 35 Foci und mit 2,5 μM 47 Foci nachgewiesen werden. Mit zusätzlicher Bestrahlung wurden in diesem Behandlungszeitraum in der Kontrolle 16 Foci detektiert, während die Chromat-Inkubationen eine ähnliche Anzahl an Foci aufwiesen wie ohne Bestrahlung festgestellt wurde. Nach einer 72-stündigen Behandlung konnten ebenfalls keine Foci in der Kontrolle ohne Bestrahlung beobachtet werden. Die Behandlung mit 1 μM zeigte im Durchschnitt etwa einen Focus, während 2,5 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 2 Foci induzierten. Die zusätzliche Bestrahlung wies hierbei in der Kontrolle 14 Foci auf, eine Behandlung von 1 μM zeigte 8 Foci, während mit 2,5 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ noch 6 Foci detektiert werden konnten. Die Kombinationsbehandlung von Chromat und Bestrahlung zeigte auch in diesem Versuchsaufbau keinen additiven Effekt, wobei möglicherweise der Sättigungsbereich für die Detektionsmethode erreicht ist.

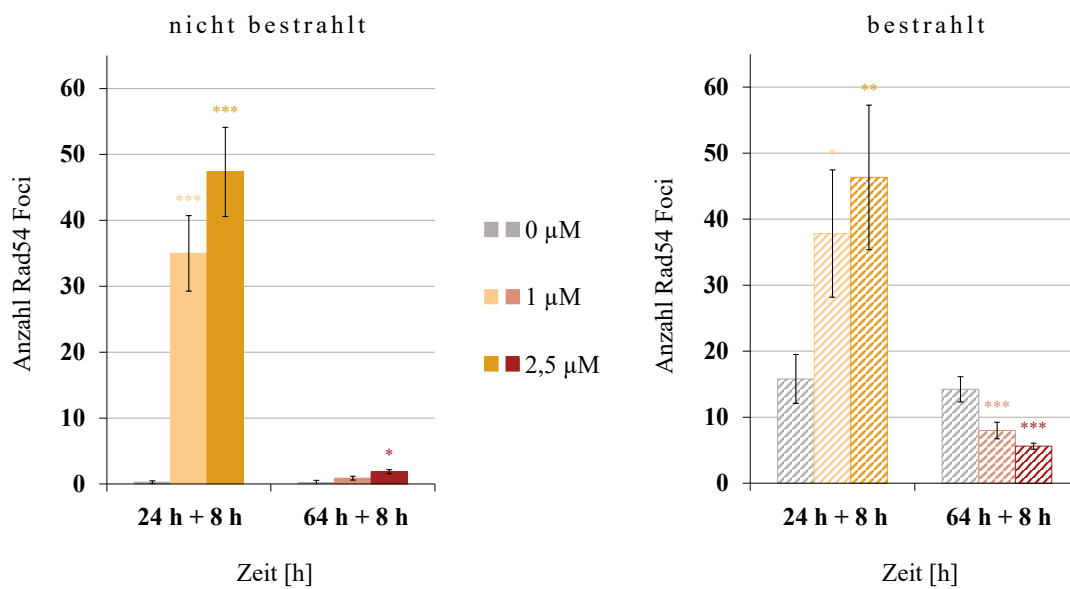


Abbildung 5.28: Einfluss von Chromat auf die Anlagerung von Rad54 in HeLa S3-Zellen mit Hilfe der Immunfluoreszenz (IF)-Färbung. Die Zellen wurden für 24 h bzw. 64 h mit Kaliumdichromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) vorinkubiert (1 μM und 2,5 μM), mit 1 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Nicht bestrahlte Proben wurden für 32 h bzw. 72 h mit $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz gegenüber der jeweiligen Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Die Ergebnisse implizieren eine Induktion von DNA-DSB nach einer 32-stündigen Behandlung mit Chromat und bestätigen somit vorangegangene Versuche sowie die Literatur (Wakeman *et al.* 2004, Ha *et al.* 2004, Xie *et al.* 2005, Reynolds *et al.* 2007, Xie *et al.* 2009). Zudem ist nach einer subchronischen Exposition (72 h) eine Beeinträchtigung von Rad54 erkennbar, wobei dies durch eine verminderte Foci-Anzahl ersichtlich ist. Der Einfluss von $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ auf das Protein Rad54 wurde nach unserem Wissensstand erstmalig in dieser Arbeit untersucht.

Die Ergebnisse von Rad51 widersprechen denen von Rad54. Rad51 zeigte nach einer 72-stündigen Inkubation eine hohe Anzahl an Foci und somit keine Inhibierung, während bei Rad54 eine verminderte Bindung beobachtet werden konnte. Aufgrund dessen könnte Chromat, wie bereits beschrieben, einen Einfluss auf den Aufbau des Nukleoproteinfilaments von Rad51 zeigen und somit die Bindung von Rad54 an den DNA-DSB erschweren. Dass kein vollständiges Nukleoproteinfilament durch die Inkubation mit Zinkchromat-Partikeln aufgebaut werden kann, konnte

Browning *et al.* (2016) bereits zeigen. Zudem wäre, wie bereits bei BRCA1 beschrieben, durch Chromat eine Hypermethylierung des *Rad54*-Gens möglich, wobei die epigenetische Veränderung zu einer verminderten Expression des Rad54 Proteins führen könnte. Ein verminderter Proteingehalt würde somit zu einer geringeren Anzahl an Foci führen. Die Hypermethylierung von Reparaturgenen durch Chromat konnte bereits gezeigt werden (Takahashi *et al.* 2005, Hu *et al.* 2018). Zudem wäre eine direkte Beeinträchtigung von Rad54 möglich, da es an seinem C-terminalen Ende eine Zink-bindende Struktur aufweist (zusammengefasst in Mazin *et al.* 2010). Chromat könnte, wie bereits bei der IF von BRCA1 beschrieben, die Thiolgruppen in den Zink-bindenden Motiven oxidieren und somit die Funktion dieser Proteine beeinträchtigen. Die beschriebenen Interaktionen konnten bereits in unterschiedlichen Studien nachgewiesen werden (zusammengefasst in Witkiewicz-Kucharczyk und Bal 2006, Levina *et al.* 2000, Krepkij *et al.* 2001). Jedoch ist hier ebenfalls zu bedenken, dass nach einer 32-stündigen Inkubation mit Chromat Rad54 Foci nachgewiesen werden konnten und somit eine direkte Beeinträchtigung der Zinkfinger-Struktur unwahrscheinlich ist.

Zusammenfassend konnte durch die Inkubation mit Chromat eine Induktion von DNA-DSB nach 32 h und zusätzlich nach einer subchronischen (72 h) Exposition eine verminderte Anlagerung der Proteine BRCA1 und Rad54 festgestellt werden. Dabei scheint durch epigenetische Veränderungen die Expression dieser Proteine beeinträchtigt zu sein. Möglicherweise wird durch die Beeinträchtigung von BRCA1 das Protein Rad51 über BRCA2 an den DNA-DSB koordiniert, wobei das Rad51-Filament vermutlich unvollständig aufgebaut wird. Denkbar wäre zusätzlich ein fehlender Abbau von Rad51. Dies könnte auf die Beeinträchtigung von Rad54 zurückgeführt werden, da Rad54 für den Abbau zuständig ist. Der Einfluss von Chromat auf die fehlende Ausbildung des Nukleoproteinfilaments konnte bereits gezeigt werden (Browning *et al.* 2016). Zusätzlich wurde in dieser Studie ein verminderter Rad51-Proteingehalt festgestellt und hieraus ein unvollständiger Aufbau des Nukleoproteinfilaments geschlossen. Dabei wird durch eine fehlerhafte Reparatur die Instabilität von MS und somit die Mutationsrate erhöht, wodurch die Tumorentstehung begünstigt wird. Es ist bereits bekannt, dass Chromat MS-Instabilität durch eine Inhibierung der *mismatch repair* hervorrufen kann (Hirose *et al.* 2002, Takahashi *et al.* 2005). Um die vorangestellten Hypothesen zu überprüfen, wurde im Anschluss an die IF der Proteingehalt von Rad51 und Rad54 der Zellfraktionen unter Einfluss von Chromat untersucht.

5.2.3 Einfluss von Chromat auf den Proteingehalt der Zellfraktionen in HeLa S3-Zellen

Zur Überprüfung des Proteingehaltes von HeLa S3-Zellen unter Einfluss von Chromat wurden diese für 32 h bzw. 72 h mit $K_2Cr_2O_7$ inkubiert, in Kern und Zytoplasma fraktioniert und anschließend mit Hilfe des Western Blots untersucht. Zu jeder Probe wurde eine Ladekontrolle mitgeführt, um eine gleichmäßige Proteinauftragung zu überprüfen und die Gehalte auf diese zu normieren. Dabei wurden die Proteine, welche zuvor in der IF betrachtet wurden, Rad51 sowie Rad54 analysiert. Aufgrund des hohen Molekulargewichtes von BRCA1 (220 kDA) konnte dieses Protein nicht mit Hilfe des Western Blots aufgetrennt werden. Als Ladekontrollen diente α -Tubulin für die Zytoplasma- und H3 für die Zellkernfraktion. Der Proteingehalt der Zellfraktionen gibt dabei Aufschluss über die Menge an Protein im Zytoplasma sowie im Zellkern. Es wurde untersucht, ob vermehrt Rad51 sowie Rad54 im Zytoplasma bzw. Zellkern detektiert werden kann.

Rad51

Entstehen durch exo- bzw. endogene Prozesse DNA-DSB, werden Reparatur-spezifische Proteine exprimiert, mobilisiert und in den Kern transportiert. Dort binden sie an den DNA-DSB und tragen zu einer funktionierenden Reparatur bei. Rad51 wird dabei über die Mediatoren BRCA2 und Rad51C in den Zellkern befördert (Davies *et al.* 2001). Werden diese Schritte durch beispielsweise Metalle beeinflusst, kann eine vollständige Reparatur des DNA-DSB nicht garantiert werden. Aufgrund dessen folgt die Betrachtung des Proteingehaltes von Rad51, welches an der Reparatur von DNA-DSB durch die HR beteiligt ist, in den Zellfraktionen Zytoplasma und Zellkern. Kann Rad51 nicht in den Kern gelangen, wird möglicherweise die Reparatur der HR gehemmt.

Abbildung 5.29 zeigt eine exemplarische Darstellung eines Immunoblots von Rad51. Zu sehen ist die Zytoplasmafraktion (links) und die Zellkernfraktion (rechts) nach Behandlung mit $K_2Cr_2O_7$ nach 32 h sowie 72 h. Nach einer Inkubationszeit von 32 h wurde im Zytoplasma keine Veränderung beobachtet, während im Zellkern eine leicht stärkere Bande von Rad51 bei $2,5 \mu M K_2Cr_2O_7$ im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden konnte. Nach einer 72-stündigen Behandlung war keine Veränderung der Banden im Zytoplasma ersichtlich, jedoch zeigte die Kernfraktion bei einer Konzentration von $2,5 \mu M K_2Cr_2O_7$ ebenfalls eine leicht stärkere Proteinbande im Vergleich zur Kontrolle. Jedoch ist zu bedenken, dass im Zellkern keine gleichmäßige Auftragung stattfand, dies ist durch das Protein H3 ersichtlich. Im Gegensatz dazu ist eine gleichmäßige Auftragung der Proteine im Zytoplasma, gezeigt durch α -Tubulin, erkennbar.

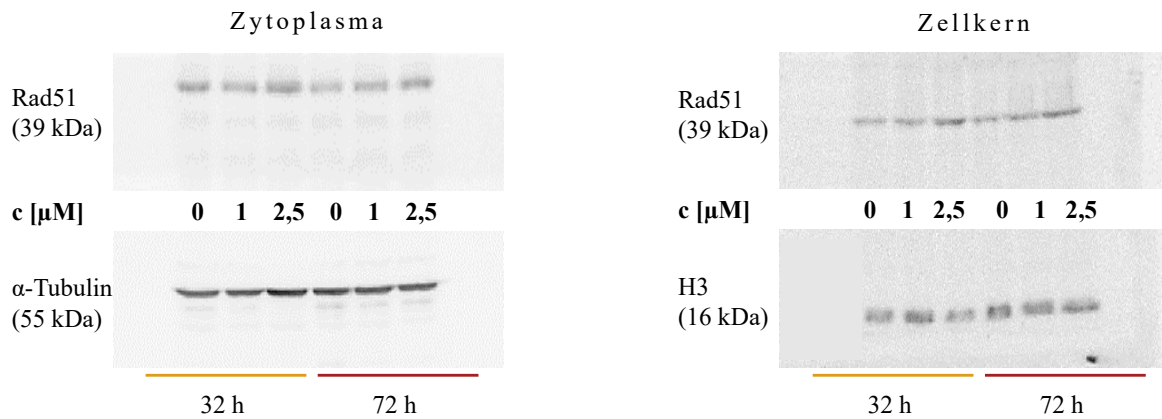


Abbildung 5.29: Repräsentative Abbildung eines Immunoblots von Rad51. Dargestellt ist ein repräsentativer Immunoblot von Rad51, bei welchem HeLa S3-Zellen für 32 h bzw. 72 h mit Kaliumdichromat ($K_2Cr_2O_7$) (1 μ M und 2,5 μ M) inkubiert, das Zytoplasma vom Zellkern getrennt und anschließend die Proteine aufgetrennt wurden. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin im Zytoplasma und H3 im Zellkern.

In Abbildung 5.30 ist die semiquantitative Auswertung des Proteingehaltes von Rad51 im Zytoplasma sowie Zellkern unter Einfluss von Chromat dargestellt, wobei die Proben auf die Ladekontrolle normiert wurden. Der Western Blot zeigte nach einer Inkubationszeit von 32 h einen leichten Anstieg des Rad51-Proteingehaltes im Zytoplasma. Dabei zeigte eine Konzentration von 2,5 μ M $K_2Cr_2O_7$ einen vernachlässigbaren Anstieg auf 130 % der Kontrolle, während im Zellkern der Rad51-Proteingehalt bei der selben Konzentration auf 200 % anstieg. Nach einer 72-stündigen Inkubationszeit stieg der Proteingehalt nach einer Behandlung mit 2,5 μ M auf 115 % im Zytoplasma und auf 140 % im Zellkern bezogen auf die Kontrolle. Aufgrund der hohen Standardabweichungen und der ungleichmäßigen Auftragung der Proteine des Zellkerns ist eine Aussage über den erhöhten Proteingehalt im Zellkern erschwert und zeigt keine statistische Signifikanz.

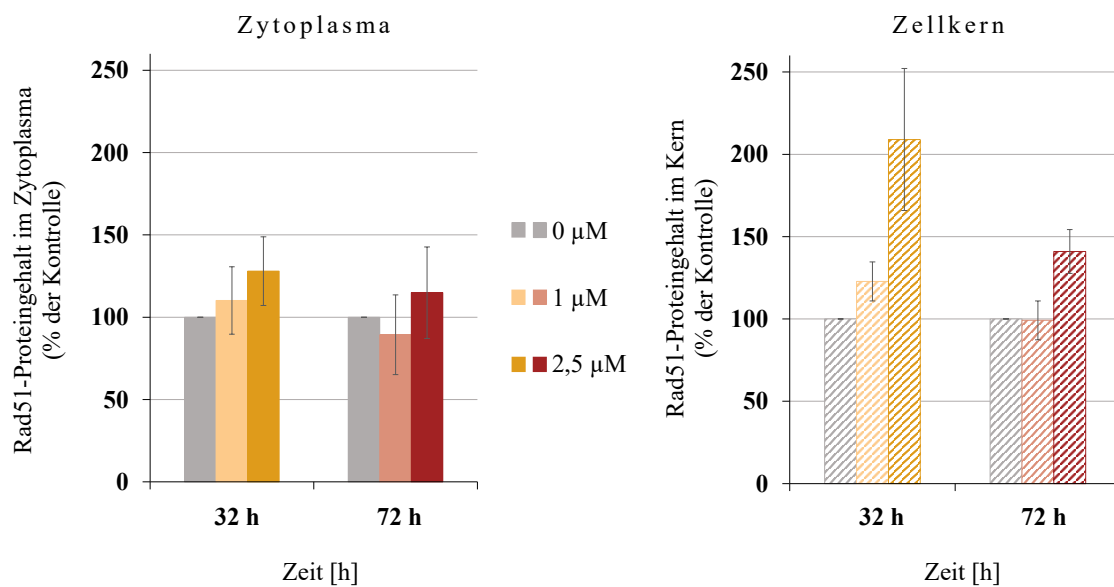


Abbildung 5.30: Einfluss von Chromat auf den Proteingehalt von Rad51 im Zytoplasma und Zellkern in HeLa S3-Zellen. Die Zellen wurden für 32 h bzw. 72 h mit Kaliumdichromat ($K_2Cr_2O_7$) ($1 \mu M$ und $2,5 \mu M$) inkubiert und anschließend der Rad51-Proteingehalt mittels Immunoblot im Zytoplasma und Zellkern bestimmt. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin im Zytoplasma und H3 im Zellkern. Dargestellt sind drei unabhängige, in Einzelbestimmung durchgeführte Versuche \pm Standardabweichung.

Die Ergebnisse zeigten nach 32 h und 72 h einen leichten Anstieg des Rad51-Proteingehaltes im Zellkern, wobei die hohen Standardabweichungen keine eindeutige Aussage über einen veränderten Proteingehalt zulassen. Widersprüchlich scheinen die Ergebnisse im Vergleich zur Literatur. Hierbei konnte gezeigt werden, dass nach einer subchronischen Exposition (72 h) der nukleare Import von Rad51 gestört ist (Qin *et al.* 2014, Browning *et al.* 2016, Browning und Wise 2017). Qin *et al.* (2014) stellten nach Inkubationen mit $0,3 \mu g/cm^2$ an Zinkchromat-Partikeln fest, dass der Rad51-Gehalt ab einer Behandlungszeit von 72 h um die Hälfte bezogen auf die Kontrolle im Zellkern abnahm. Qin und Kollegen postulieren demnach einen möglichen Einfluss von Chromat auf den Transport von Rad51 in den Kern. Jedoch ist hierbei zu beachten, dass die CFA der Partikel auf 25 % der Kontrolle in diesem Zeitraum bereits bei einer Konzentration von $0,2 \mu g/cm^2$ abfiel. Weiter untersuchte die Arbeitsgruppe von Qin *et al.* (2014) die Proteine BRCA2 und RAD51C mit Hilfe der IF, da, wie bereits beschrieben, diese Proteine für den Transport in den Kern von Bedeutung sind (Davies *et al.* 2001, Gildemeister *et al.* 2009, Jeyasekharan *et al.* 2013). Sie konnten feststellen, dass BRCA2 eine erhöhte Anzahl an Foci nach akuter und subchronischer Exposition zeigte und somit eine Inhibierung dieses

Proteins unwahrscheinlich scheint. Untersuchungen von Rad51C hingegen wiesen eine Inhibierung der Foci Formation nach einer 72-stündigen Inkubation mit Zinkchromat-Partikeln auf. Weiter untersuchte dieselbe Arbeitsgruppe in einem weiteren Projekt den Proteingehalt von Rad51C im gesamten Zellextrakt und konnte dabei keine Veränderungen feststellen. Sie postulierten keinen Einfluss von Chromat auf den Proteingehalt der Zelle, jedoch auf das Protein Rad51C direkt und somit eine Inhibierung der Reparatur mittels HR aufgrund fehlenden Kerntransports (Browning *et al.* 2016). Browning und Wise (2017) untersuchten weiter die Beeinträchtigung von Rad51C mit Hilfe des Western Blots. Sie konnten eine zytoplasmatische Akkumulation von Rad51C feststellen und schlossen somit auf einen fehlenden Transport von Rad51 in den Zellkern.

Die Daten der vorliegenden Dissertation zeigten jedoch, dass der Proteingehalt von Rad51 im Zellkern nach einer subchronischen Exposition von Chromat leicht ansteigt. Dieses Ergebnis unterstützt ebenfalls die Ergebnisse der IF von Rad51, bei welcher nach 72 h Inkubationszeit Foci nachgewiesen werden konnten. Der nukleare Transport von Rad51 ist vermutlich in der vorliegenden Dissertation nicht gestört, jedoch kann über den Proteingehalt des gesamten Zellextrakts keine Aussage getroffen werden. Eine Beeinträchtigung des Filamentaufbaus scheint unwahrscheinlich und Chromat zeigt im Gegenteil zu der vorliegenden Literatur keinen Einfluss auf Rad51 direkt. Mögliche Unterschiede könnten durch die unterschiedlichen Zelllinien sowie Chromat-Verbindungen hervorgerufen sein. In der Literatur wurden humane Lungenfibroblasten und Zinkchromat-Partikel, welche im verwendeten Konzentrationsbereich zytotoxisch scheinen, angewandt, während in der vorliegenden Arbeit die unempfindlicheren HeLa S3-Zellen und die lösliche Substanz $K_2Cr_2O_7$ verwendet wurden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit implizieren keine direkte Beeinträchtigung von Rad51. Der leicht steigende Proteingehalt von Rad51 im Zellkern deutet auf einen aktiven nuklearen Transport und die IF von Rad51 auf eine funktionierende Foci-Formation hin. Möglicherweise könnte jedoch der Gesamtproteingehalt von Rad51 beeinträchtigt sein. Zur Überprüfung des Proteingehaltes von Rad51 wurde anschließend der Western Blot der Zellfraktionen von diesem Protein durchgeführt.

Rad54

Ebenfalls wird Rad54 bei der Entstehung eines DNA-DSB mobilisiert und in den Zellkern transportiert (Essers *et al.* 2002). Abbildung 5.31 zeigt eine repräsentative Darstellung eines Immunoblots von Rad54. Dabei ist links die zytoplasmatische Fraktion und rechts die Zellkernfraktion dargestellt. Unter Einfluss von Chromat konnte nach einer Inkubationszeit von 32 h im Zytoplasma eine Abnahme der Intensität der Bande bei 2,5 μM nachgewiesen werden, während im Kern diese Bande im Vergleich zur Kontrolle leicht zunahm. Nach einer 72-stündigen Inkubationszeit wurde im Zytoplasma sowie im Zellkern keine Veränderung der Bandenintensität detektiert. Durch die Normierung auf die Ladekontrolle in der semiquantitativen Auswertung können konkretere Aussagen gemacht werden.

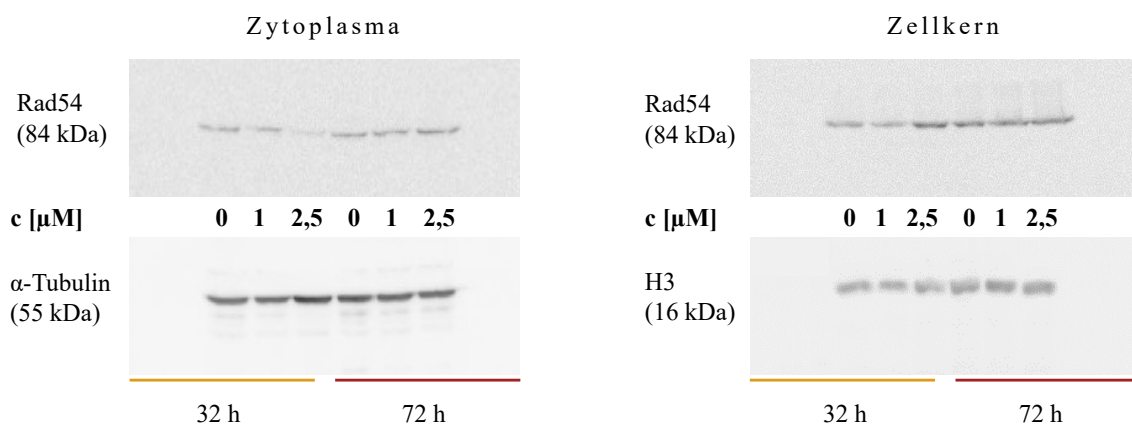


Abbildung 5.31: Repräsentative Abbildung eines Immunoblots von Rad54. Dargestellt ist ein repräsentativer Immunoblot von Rad54, bei welchem HeLa S3-Zellen für 32 h bzw. 72 h mit Kaliumdichromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) (1 μM und 2,5 μM) inkubiert, das Zytoplasma vom Zellkern getrennt und anschließend die Proteine aufgetrennt wurden. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin im Zytoplasma und H3 im Zellkern.

Die semiquantitative Auswertung (Abbildung 5.32) des Immunoblots von Rad54 zeigte nach einer Inkubationszeit von 32 h eine konzentrationsabhängige Abnahme des Proteingehaltes auf 60 % bezogen auf die Kontrolle nach einer Behandlung mit 2,5 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Im selben Zeitraum und mit gleicher Konzentration konnte ein leichter Anstieg am Rad54-Proteingehalt auf 150 % im Zellkern beobachtet werden. Nach einer Inkubationszeit von 72 h war keine Veränderung im

Zytoplasma erkennbar, während im Zellkern eine leichte Abnahme auf 75 % der Kontrolle nach einer Inkubation mit 2,5 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ersichtlich wurde. Aufgrund der hohen Standardabweichungen ist eine Aussage über die Veränderung der Proteingehalte jedoch erschwert und zeigen keine statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle.

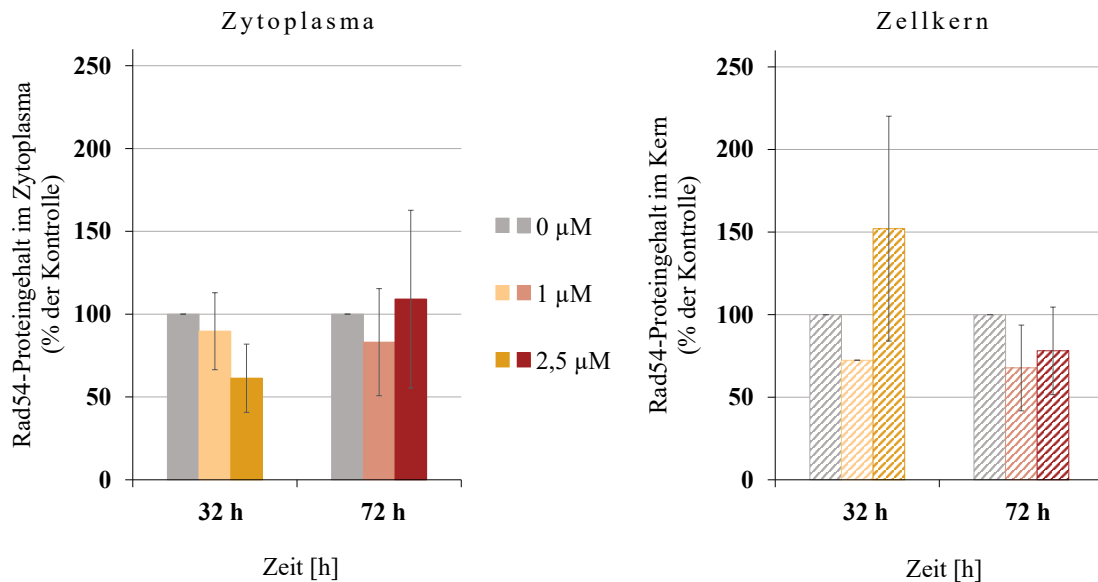


Abbildung 5.32: Einfluss von Chromat auf den Proteingehalt von Rad54 im Zytoplasma und Zellkern in HeLa S3-Zellen. Die Zellen wurden für 32 h bzw. 72 h mit Kaliumdichromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) (1 μM und 2,5 μM) inkubiert und anschließend der Rad54-Proteingehalt mittels Immunoblot im Zytoplasma und Zellkern bestimmt. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin im Zytoplasma und H3 im Zellkern. Dargestellt sind drei unabhängige, in Einzelbestimmung durchgeführte Versuche \pm Standardabweichung.

Der Western Blot von Rad54 wurde nach unserem Wissensstand in dieser Arbeit erstmalig untersucht. Dabei konnte nach einer akuten Exposition (32 h) mit Chromat festgestellt werden, dass Rad54 im Vergleich zur Kontrolle tendenziell verstärkt im Kern vorlag. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurde eine minimale Abnahme des Proteingehaltes von Rad54 im Kern beobachtet. Aufgrund der hohen Standardabweichung ist eine Aussage über den veränderten Proteingehalt jedoch erschwert.

Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass der Proteingehalt der Zellfraktionen von Rad54 aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht durch Chromat beeinflusst ist. Über den Gesamtproteingehalt von Rad54 kann jedoch keine Aussage gemacht werden. Die Ergebnisse der IF zeigen, dass das Protein Rad54 nach einer subchronischen Inkubation mit Chromat beeinträchtigt scheint,

wobei eine fehlende Anlagerung möglicherweise auf einen verminderten Gesamtproteingehalt von Rad54 zurückgeführt werden kann. Um dies genauer zu untersuchen, müssten weitere Versuche zum Proteingehalt des gesamten Zellextraktes mit Hilfe des Western Blots durchgeführt werden. Zudem könnte eine Bisulfit-Sequenzierung Aufschluss über die Methylierung der DNA und damit verbundenen epigenetische Veränderungen geben. Bei der Bisulfit-Sequenzierung wird nicht methyliertes Cytosin zu Uracil umgesetzt, während methyliertes Cytosin keine Reaktion mit Bisulfit eingehen kann.

Zusammenfassend konnte im Reporter-Assay gezeigt werden, dass die HR durch Chromat beeinträchtigt scheint. Aufgrund dessen wurden mit Hilfe der IF Markerproteine des Reparaturweges betrachtet und die Proteine BRCA1 und Rad54 als potentielle *targets* von Chromat identifiziert. Diese Beeinträchtigungen lassen sich möglicherweise auf epigenetische Veränderungen, ausgelöst durch Chromat, zurückführen. Dies wiederum könnte zu einer beeinträchtigten Genexpression führen, wodurch eine Beeinträchtigung der Transkription sowie Translation und somit der Proteinbiosynthese nicht ausgeschlossen werden kann. Eine direkte Aussage über den Einfluss auf Rad51 kann nicht getroffen werden. Das Fehlen von wichtigen Reparaturproteinen kann dabei zu einer verstärkten Akkumulation von DNA-Schäden und Mutationen führen, wobei das Risiko einer Tumorentstehung erhöht ist.

Zusätzlich zeigte der Reporter-Assay einen möglichen *Shift* zum fehlerbehafteten MMEJ unter Einfluss von Chromat. In der Literatur konnte bereits gezeigt werden, dass eine verstärkte Reparatur des MMEJ meist auf eine erhöhte Expression der Polymerase θ zurückgeführt werden kann (Ceccaldi *et al.* 2015, Ahrabi *et al.* 2016), weshalb anschließend die Transkriptmenge des Gens *POLQ*, das für diese Polymerase codiert, untersucht wurde.

5.2.4 Einfluss von Chromat auf die Genexpression der *POLQ*

Das Gen *POLQ* codiert für die Polymerase θ , welche eine wichtige Funktion im MMEJ einnimmt. Sie ist für die Verknüpfung der DNA-Enden über Mikrohomologien zuständig. Diese Homologien umfassen mindestens 2 bis 5 Basenpaare, wodurch eine Deletion von mehreren Nukleotiden verursacht wird (zusammengefasst in Wood und Doublet 2016).

Wie bereits erwähnt, deutet eine verstärkte Reparatur mittels MMEJ auf eine erhöhte Expression der Polymerase θ hin (Ceccaldi *et al.* 2015, Ahrabi *et al.* 2016). Aufgrund dieser Erkenntnisse und der Ergebnisse des Reporter-Assays, durch welchen eine bevorzugte Reparatur des MMEJ festgestellt werden konnte, wurde die Expression der Polymerase θ nach Chromat-Behandlung auf Gen-Ebene untersucht.

In Abbildung 5.33 ist der Einfluss von Chromat auf den mRNA-Gehalt der *POLQ* dargestellt. Es konnte eine leichte Erhöhung um das 1,2-fache mit $2,5 \mu\text{M}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ nach akuter und subchronischer Exposition gezeigt werden. Dabei ist durch die hohe Standardabweichung diese Tendenz jedoch vernachlässigbar.

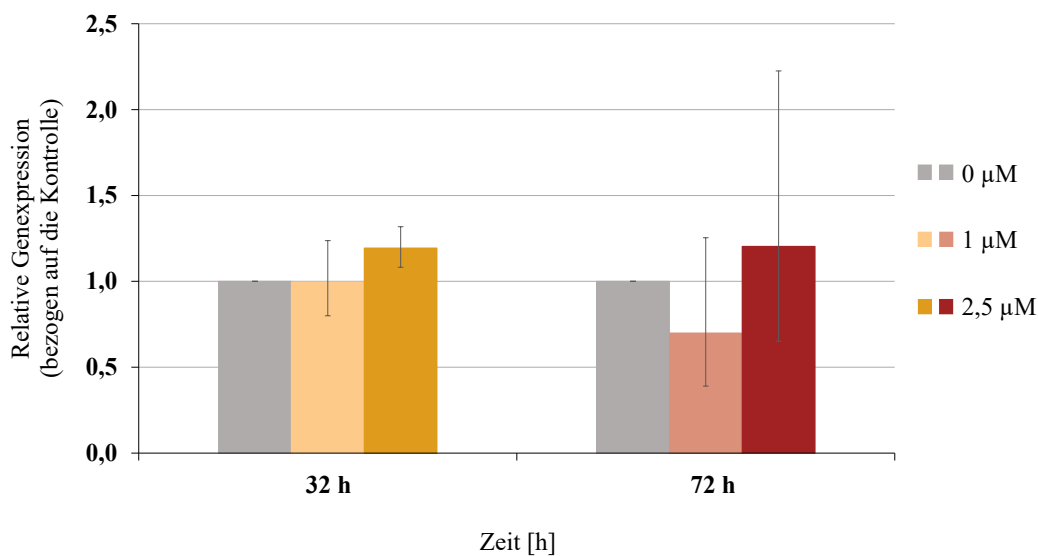


Abbildung 5.33: Einfluss von Chromat auf die relative Expression von *POLQ*. HeLa S3-Zellen wurden für 32 h bzw. 72 h mit Kaliumdichromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) ($1 \mu\text{M}$ und $2,5 \mu\text{M}$) inkubiert und anschließend mittels konventioneller qPCR die Expression der *POLQ* untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Einzelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Chromat keinen Einfluss auf die Transkriptmenge der *POLQ* zeigt und somit die Polymerase auf Genexpressions-Ebene nicht beeinträchtigt scheint. Bisher sind keine Daten zum Einfluss von Chromat auf den mRNA-Gehalt der *POLQ* in der Literatur bekannt. Aufgrund der Ergebnisse des Reporter-Assays, welcher eine verminderte HR-Aktivität sowie eine verstärkte Reparatur durch das MMEJ zeigte, wurde eine erhöhte Expression der *POLQ* vermutet. In der Literatur konnte bereits eine inverse Korrelation zwischen der Reparatur mit Hilfe der HR sowie der Polymerase θ -Aktivität festgestellt werden. Dabei führte ein Fehlen der Polymerase θ zu einer Erhöhung der HR-Aktivität. Dies konnte durch die Auswertung von Rad51 Foci beobachtet werden (Ceccaldi *et al.* 2015). Außerdem stellten Ceccaldi und Kollegen fest, dass die Polymerase θ mit Rad51 interagiert und somit die HR regulieren kann. Dabei bindet, bei einer erhöhten Expression, die Polymerase an Rad51 und blockiert den weiteren Verlauf der HR. Diese Erkenntnisse

konnten mit Hilfe des EMSA, welcher als Nachweis von DNA-bindenden Proteinen eingesetzt wird, festgestellt werden. Zusätzlich untersuchten Ceccaldi und Kollegen die Transkriptmengen der Gene, welche für die Proteine Rad51, BRCA1 und der Polymerase θ codieren. Sie konnten eine gegenseitige Beeinflussung der Expression dieser Gene beobachten. Dabei wurde beispielsweise in BRCA1-defizienten Zellen eine erhöhte Expression der *POLQ* gezeigt (Ceccaldi *et al.* 2015).

In einer anderen Studie konnte ebenfalls eine verminderte HR-Aktivität und ein dadurch verstärktes Ablaufen des MMEJ beobachtet werden (Ahrabi *et al.* 2016). Ahrabi und Kollegen verwendeten dabei den auch in dieser Arbeit angewandten Reporter-Assay. Sie konnten durch Ausschalten von BRCA1 eine verminderte Reparatur durch die HR sowie eine verstärkte Aktivität des MMEJ feststellen. Sie zeigten zusätzlich, dass ein Ausschalten der Polymerase θ zu einer Inhibierung des MMEJ führt. Aufgrund dessen postulieren sie einen Zusammenhang zwischen der Inhibierung der HR und einer vermehrt auftretenden Polymerase θ (Ahrabi *et al.* 2016).

Die Erkenntnisse aus der Literatur deuten somit auf eine verstärkte Expression der *POLQ* durch eine Inhibierung der mit der HR assoziierten Gene *BRCA1* sowie *Rad51* hin. Die Daten der vorliegenden Dissertation hingegen zeigten keine Beeinträchtigung der Transkriptmenge von *POLQ*, wobei eine Untersuchung der Expression von *BRCA1* und *Rad51* auf Gen-Ebene in dieser wissenschaftlichen Arbeit nicht stattfand. Aus diesem Grund kann keine Aussage über die Veränderung des mRNA-Gehaltes der genannten Gene getroffen werden. Vermutlich könnte eine höhere Konzentration von $5 \mu\text{M}$ Chromat, wie sie im Reporter-Assay angewandt wurde, zu einer Erhöhung der Transkriptmenge führen. Die vorliegenden Ergebnisse deuten auf eine Tendenz zur verstärkten Expression der *POLQ* hin. In der empfindlicheren Methode der IF konnte bereits ab einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ eine Inhibierung von BRCA1 festgestellt werden. Für die Untersuchungen der Genexpression sollten weitere Konzentrationen getestet werden. Zudem wäre eine Stabilisation der Polymerase auf Protein-Ebene möglich, welche durch die Beeinträchtigung der HR mobilisiert wird und anschließend das MMEJ bevorzugt durchführt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf eine Inhibierung der HR und einem bevorzugt ablaufenden MMEJ durch eine Inkubation mit $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ hin. Dabei sind die Proteine BRCA1 und Rad54 beeinträchtigt, wobei eine Untersuchung auf Genexpressions-Ebene nicht stattfand. Diese Daten implizieren eine mögliche Beeinträchtigung der Polymerase θ durch Chromat auf Protein-Ebene. Zur Überprüfung dieser Hypothesen sind weitere Untersuchungen notwendig. Dabei könnte der Western Blot sowie der EMSA Aufschluss über mögliche Interaktionen der Polymerase geben.

6 Zusammenfassende Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit dem Einfluss von Mangan und Chromat auf die Reparatur von strahleninduzierten sowie durch ein Restriktionsenzym spezifisch gesetzten DNA-DSB. Dabei wurde die mögliche Induktion von DNA-DSB sowie deren Reparatur mit Hilfe der PFGE, die vier Wege HR, SSA, NHEJ sowie MMEJ mittels Reporter-Assay und die beteiligten Proteine BRCA1, Rad51 und Rad54 der HR mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern betrachtet. Zudem wurden weitere Endpunkte zellulärer Mechanismen untersucht.

Beginnend mit Mangan wurde zunächst die zytotoxische Wirkung auf HeLa S3-Zellen nachgewiesen. Es wurden Konzentrationen von 50 μM bis 1000 μM getestet, wobei eine dosisabhängige Abnahme der Zellzahl sowie der CFA ab 500 μM MnCl_2 gezeigt werden konnte. Hierbei fiel die Zellzahl auf etwa 80 % und die CFA auf circa 70 % der Kontrolle. Eine zusätzliche Bestrahlung mit 1 Gy zeigte keine additive Auswirkung auf die Zellzahl, jedoch sank die Anzahl der Kolonien auf 35 % der nicht bestrahlten Kontrolle bei einer Konzentration von 500 μM . Zudem wurde die metabolische Aktivität mit Hilfe des ATP-Assays gemessen, wobei eine zytotoxische Wirkung durch eine Abnahme auf etwa 60 % erst bei einer Konzentration von 1000 μM beobachtet wurde. Die dosisabhängige zytotoxische Wirkung von MnCl_2 in HeLa-Zellen konnte in der Literatur bereits gezeigt werden (Bornhorst *et al.* 2010, 2012). Dabei wurden mehrere Mechanismen postuliert, welche vor allem auf die Induktion von ROS und damit einhergehende Signalwege zurückgeführt werden können. Da Mangan in den Mitochondrien von Zellen bevorzugt akkumuliert (Gavin *et al.* 1990, Morello *et al.* 2008), kann es mit den Komplexen der Atmungskette interagieren. Dabei wird vermutet, dass Mangan vor allem in den Mitochondrien anzutreffen ist, da die SOD auf Mangan als Cofaktor angewiesen ist. Mangan ist in der Lage, Eisen aus Eisen-Schwefel-Proteinen, welche in der Atmungskette zu finden sind, zu verdrängen und deren Funktion zu inhibieren. Die freigesetzten Eisenionen können verstärkt Fenton-Reaktionen auslösen und dadurch ROS generieren. Ebenfalls wird der Elektronentransport der Atmungskette gestört, wobei zusätzlich ROS induziert werden. Die bei diesen Vorgängen entstandenen ROS sind in der Lage, Proteine, Lipide und die DNA zu schädigen. Zudem setzt Mangan durch die Erhöhung der mitochondrialen Membranpermeabilität antioxidative Systeme außer Kraft und beeinträchtigt somit zusätzlich Schutzmechanismen gegen ROS (zusammengefasst in Liu *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2004). Der verminderte ATP-Gehalt kann ebenfalls über die Hemmung der Atmungskette und der damit einhergehenden Inhibierung der ATP-Synthese erklärt werden (zusammengefasst in Li und Yang 2018).

Um die zytotoxischen Effekte auf die zellulären Gehalte von Mangan zurückführen zu können, wurde anschließend der Mangangehalt der Zelle mit Hilfe von Aufnahmestudien in HeLa S3-Zellen untersucht. Hierfür wurde mittels GF-AAS eine dosis- und zeitabhängige Aufnahme von Mangan untersucht und dabei eine Akkumulation ab einer Konzentration von 250 μM festgestellt. Der Mangangehalt scheint bis zu einer Konzentration von 100 μM reguliert zu sein. Aufgrund wichtiger Funktionen wie beispielsweise als Cofaktor einiger Enzyme (SOD, Arginase etc.), dient Mangan als essentielles Spurenelement und unterliegt einer strengen homöostatischen Regulation. Dabei findet der Influx von Mangan über Transporter statt, welche ebenfalls von Eisen genutzt werden. Die Affinität von Mangan gegenüber diesen Transportern scheint jedoch erhöht, wodurch mehr Mangan in die Zelle gelangt (Garrick *et al.* 2006). Bei einem Überschuss an Mangan liegt möglicherweise eine Dysregulation der Homöostase vor, wobei dies auf die konkurrierende Nutzung der Transportprozesse mit Eisen zurückgeführt werden könnte (zusammengefasst in Chen *et al.* 2018 und Fitsanakis *et al.* 2010). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Mangan in den Eisenhaushalt eingreift und zu einer erhöhten Induktion von Eisen-Transportproteinen auf Genexpressions-Ebene führt. Diese verstärkte Induktion könnte zu einer vermehrten Aufnahme von Mangan führen (Zheng und Zhao 2001, Garrick *et al.* 2006).

Nach der Festlegung eines geeigneten Konzentrationsbereiches sowie der Überprüfung der Akkumulation in HeLa S3-Zellen wurde mit Hilfe der PFGE der Einfluss von Mangan auf die Reparatur von DNA-DSB untersucht. Dabei stellt die PFGE einen direkten Nachweis von DNA-DSB dar und gibt Aufschluss über die Induktion und Reparatur. Eine Unterscheidung der einzelnen Reparaturmechanismen ist mit dieser Methode jedoch nicht möglich (zusammengefasst in Herschleb *et al.* 2007).

Die Ergebnisse der PFGE implizieren eine Induktion von DNA-DSB durch Mangan bei einer Konzentration von 500 μM . In der Literatur konnten diese Ergebnisse bereits gezeigt werden, wobei diese Studien meist mit dem Comet Assay durchgeführt wurden, welcher unter alkalischen Bedingungen eine Differenzierung zwischen DNA-Einzelstrangbrüchen und DNA-DSB nicht ermöglicht. Möglicherweise induziert Mangan über die Generierung von ROS und der damit verbundenen DNA-schädigenden Wirkung DNA-DSB (Jiao *et al.* 2008, Lima *et al.* 2008). Zudem deuten die Ergebnisse möglicherweise auf eine Inhibierung der Reparatur von DNA-DSB hin, wobei keine Literatur hierzu bekannt ist. Zur weiteren und genaueren Untersuchung sowie Unterscheidung der Reparaturwege wurde anschließend der Reporter-Assay durchgeführt.

Mit Hilfe des Reporter-Assays können die Reparaturwege HR, SSA, NHEJ und MMEJ selektiv eingeleitet werden, wobei aktives GFP bei einer funktionsfähigen Reparatur am FACS gemessen

werden kann. Unter Einfluss von Mangan konnte keine Inhibierung der Reparaturwege NHEJ und MMEJ im untersuchten Konzentrationsbereich festgestellt werden, während die HR schon bei geringen Konzentrationen von 100 μM Mangan inhibiert wurde. Das SSA zeigte ebenfalls eine Beeinträchtigung nach einer Inkubation mit 250 μM . Eine Hemmung der HR sowie des SSA konnte erstmalig in dieser Arbeit gezeigt werden.

In der Literatur wurde die Beeinträchtigung der Reparatur von DNA-DSB mittels Reporter-Assay lediglich mit anderen Metallverbindungen, nicht jedoch mit Mangan untersucht. Dabei wurde durch die meisten Metallverbindungen insbesondere der Reparaturweg der HR gehemmt (Browning *et al.* 2016, Morales *et al.* 2016). Aufgrund dessen wurden im Anschluss die Proteine Rad51 sowie Rad54 betrachtet, welche in der HR wichtige Funktionen einnehmen.

Das Protein Rad51 stellt ein Markerprotein der HR dar, welches zum Aufbau des Nukleoproteinfilamentes und der Stabilisierung am DNA-Einzelstrang zuständig ist. Aufgrund dieser Funktionen in der HR dient es als spezifischer Nachweis dieses Reparaturweges (Sak *et al.* 2005, zusammengefasst in Heyer *et al.* 2010).

Die IF von Rad51 zeigte eine Induktion von DNA-DSB durch Mangan, wodurch die Ergebnisse der PFGE bestätigt werden können. Die sensitivere Methode der IF zeigte zudem, dass bereits ab 100 μM MnCl_2 DNA-DSB auftraten, während bei der PFGE erst ab 500 μM DNA-DSB erkennbar waren. Eine direkte Beeinträchtigung des Proteins konnte nicht eindeutig beobachtet werden.

In der Literatur sind bisher keine Daten zu Rad51 unter Einfluss von Mangan bekannt. Jedoch konnten in unserer Arbeitsgruppe bereits Effekte auf Rad51 mit anderen Metallverbindungen gezeigt werden. Dabei wurden Beeinträchtigungen in der Anlagerung sowie der Dissoziation und des Gehaltes des Proteins festgestellt (Niemand 2018, Koch *et al.* 2017, Ott 2019). Möglicherweise ist ein Protein, welches auf Rad51 in der Reparatur folgt, durch Mangan beeinflusst. Aufgrund dessen wurde anschließend Rad54 mit Hilfe der IF nachgewiesen. Rad54 ist ebenso wie Rad51 ausschließlich an der HR beteiligt, weshalb es sich ebenfalls als Markerprotein eignet. Es bindet an das Protein Rad51, sucht die homologe Sequenz im Schwesterchromatid und dringt in dieses ein (zusammengefasst in Mazin *et al.* 2010).

Die IF von Rad54 unter Einfluss von Mangan zeigte, analog zu der IF von Rad51 eine Induktion von DNA-DSB durch Mangan selbst. Dabei ist ebenfalls nicht eindeutig, ob eine Inhibierung des Proteins vorlag.

Möglicherweise ist ein Protein, welches in der Reparatur auf Rad54 folgt, durch Mangan beeinträchtigt. Hierbei stellen DNA-Polymerasen potentielle Angriffspunkte für Mangan dar. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Mangan mit den aktiven Zentren der Polymerase wechselwirken kann, wodurch die Funktion der DNA-Verknüpfung beeinträchtigt wird (Sirover und Loeb 1976, Seal *et al.* 1979, Beckman *et al.* 1985, Bock *et al.* 1999, Lakhin *et al.* 2013, 2014).

Da mittels IF keine eindeutigen Aussagen über die DNA-Reparatur unter Einfluss von Mangan gezogen werden konnten, wurde auf Ebene der Genexpression die DNA-Schadensantwort betrachtet. Mit Hilfe der HT RT-qPCR konnten 95 Gene in 96 Proben gleichzeitig unter Einfluss von Mangan analysiert werden. Dabei wurden insgesamt 20 Gene, aus den verschiedenen Genclustern der DNA-Schadensantwort, der Metallhomöostase, der oxidativen Stressantwort und unterschiedliche Transkriptionsfaktoren sowie der Zellzyklusregulation und der Apoptose, durch Mangan induziert bzw. reprimiert.

Die Expression der Gene *DDIT3* und *GADD45A*, welche in Folge einer DNA-Schädigung induziert werden (Fornace *et al.* 1989, zusammengefasst in Zhan 2005), wurden durch Mangan um das etwa 5-fache erhöht. Diese Ergebnisse deuten auf eine DNA-Schädigung durch Mangan hin und unterstützen somit die Ergebnisse der PFGE sowie der IF, bei welchen eine Induktion von DNA-DSB durch Mangan festgestellt werden konnte. Eine Beeinträchtigung weiterer Gene der DNA-Schadensantwort fand durch Mangan alleine jedoch nicht statt, möglicherweise könnte eine höhere Bestrahlung eine DNA-Schadensantwort auslösen und somit den Einfluss von Mangan zeigen.

Weiterhin konnte eine verstärkte Expression des Gens *FTH1*, welches mit der Metallhomöostase assoziiert wird, beobachtet werden. Hierbei wurde *FTH1* um das bis zu 3-fache erhöht. Dabei codiert dieses Gen für eine Untereinheit des Eisenspeicherproteins Ferritin (Lee *et al.* 2009). Diese Beobachtungen stützen die Hypothese, dass Mangan in den Eisenhaushalt eingreifen kann. Durch die mögliche Interaktion von Mangan mit Eisen-Schwefel-Proteinen könnte ein Überschuss an Eisen in der Zelle erzeugt und somit eine Induktion des Ferritins verstärkt werden. Zudem scheint ein erhöhter Eisengehalt in der Zelle bevorzugt die Fenton-Reaktion auszulösen und hierdurch ROS zu generieren. Aufgrund dessen wurden Gene betrachtet, welche mit der oxidativen Stressantwort der Zelle in Verbindung gebracht werden. Hierbei konnte eine verstärkte Induktion von Genen, welche für Schutzmechanismen (*GCLC*, *SOD2*, *TXNRD1*) codieren, gezeigt werden. Zusätzlich wurde festgestellt, dass Gene, welche als oxidativer Stressmarker (*HMOX1*) und für inflammatorische Prozesse (*IL8*) codieren, ebenfalls verstärkt exprimiert wurden. Die Ergebnisse bestätigen die Daten der Literatur und zeigen eine verstärkte Induktion von ROS durch eine Behandlung mit Mangan (Zhang *et al.* 2004, Sengupta *et al.* 2007, Park und Park 2010, Bornhorst *et al.* 2013, Mokgobu *et al.* 2015). Diese Erkenntnisse unterstützen die möglichen Mechanismen der Mangan-Toxizität, welche auf der Induktion von ROS beruhen.

Zudem wurden Gene, welche mit der Zellzyklusregulation assoziiert werden, betrachtet. Es konnte eine verstärkte Induktion der Gene *CDKN1A*, *CDKN2B* sowie *PLK3* festgestellt werden. Dabei deuten die Gene *CDKN1A*, *CDKN2B* auf einen Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus hin, während *PLK3* auf das Auslösen eines G2-Phasen-Arrestes hinweisen könnte. Diese Ergebnisse wurden

auf zellulärer Ebene mit Hilfe der Zellzyklusverteilung am FACS überprüft. Dabei konnte keine Veränderung der Zellzyklusphasenverteilung festgestellt werden. Mangan scheint bis zu einer Konzentration von 500 μM keinen Zellzyklusphasen-Arrest auszulösen. In der Literatur wird die Zellzyklusphasenverteilung unter Einfluss von Mangan kontrovers diskutiert. Dabei konnten einige Studien das Auslösen eines G1-Phasen-Arrestes nachweisen (Zhao *et al.* 2008, Deng *et al.* 2011, Hernroth *et al.* 2018), während in einer anderen Forschungsgruppe ein G2-Phasen-Arrest durch die Inkubation mit Mangan beobachtet werden konnte (Yu *et al.* 2015). Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse der Literatur sowie der vorliegenden Daten dieser Arbeit kann keine eindeutige Aussage über einen möglichen Zellzyklusphasen-Arrest getroffen werden.

Zur Untersuchung der Viabilität von HeLa S3-Zellen unter Einfluss von Mangan wurden abschließend Apoptose-assoziierte Gene sowie Zelltodmechanismen mit Hilfe des FACS untersucht. Die Gene *BBC3*, *BCL2L1*, *PMAIP1* sowie *TNFRSF10B* codieren für Proteine, welche mit dem programmierten Zelltod in Verbindung gebracht werden. In dieser Arbeit konnte eine verstärkte Induktion um das bis zu 5-fache der vier genannten Gene festgestellt werden. Diese Ergebnisse implizieren eine Induktion der Apoptose durch Mangan. Dabei zeigten vor allem Gene, welche für den intrinsischen Caspaseweg codieren, eine erhöhte Expression. Jedoch wurde auch *TNFRSF10B* verstärkt exprimiert, wobei dieses Gen für den extrinsischen Caspaseweg codiert. Vermutlich wird die Apoptose über den intrinsischen Weg ausgelöst, möglich wäre jedoch auch das Einleiten der Apoptose über den extrinsischen Weg. Die Erkenntnisse der Genexpression wurden anschließend mittels FACS auf zellulärer Ebene überprüft. Dabei konnte jedoch keine Induktion der Apoptose oder Nekrose festgestellt werden, wohingegen in der Literatur die Induktion der Apoptose bereits gezeigt werden konnte. Hierbei wurden jedoch deutlich höhere (1 mM und 2 mM) als die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen (500 μM) von Mangan eingesetzt (Oubrahim *et al.* 2001, Deng *et al.* 2011, Hernroth *et al.* 2018, Yoon *et al.* 2011). Aufgrund der Erkenntnisse der Literatur sowie der Daten der vorliegenden Arbeit scheint Mangan erst in hohen Konzentrationen die Apoptose einzuleiten, während Konzentrationen bis 500 μM MnCl_2 Apoptose-assoziierte Gene induzieren, jedoch die Viabilität der Zellen nicht beeinflussen. Um eindeutigere Aussagen über die Zellzyklusphasenverteilung sowie die Zelltodmechanismen treffen zu können, müssen weitere Untersuchungen mit zusätzlichen Konzentrationen sowie Zeitpunkten vorgenommen werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Dissertation eine Induktion von DNA-DSB durch eine Behandlung mit Mangan festgestellt werden. Diese können möglicherweise über die Generierung von ROS durch Mangan und den damit verbundenen Reaktionen der Zelle entstehen. Zudem scheint eine Inhibierung der DNA-DSB-Reparatur über die fehlerfreie HR vorzuliegen. Die genauen Mechanismen der Beeinträchtigung konnten jedoch nicht eindeutig geklärt werden. Scheinbar sind die

Proteine Rad51 und Rad54 nicht durch Mangan beeinflusst. Denkbar wäre eine Beeinträchtigung der in der Reparatur folgenden DNA-Polymerase, wodurch eine Reparatur von DNA-DSB über die HR möglicherweise fehlerbehaftet verlaufen würde. Können DNA-DSB nicht repariert werden, besteht die Gefahr von Chromosomenaberrationen, wobei die Zelle die Apoptose einleiten kann. Eine fehlerbehaftete Reparatur würde dabei zu einer Akkumulation von Mutationen führen, welche möglicherweise zu einem negativen Einfluss auf die genomischen Stabilität beitragen, wobei dies jedoch über weitere Untersuchungen abgeklärt werden sollte. Abbildung 6.1 zeigt abschließend die durch Mangan beeinträchtigten zellulären Mechanismen.

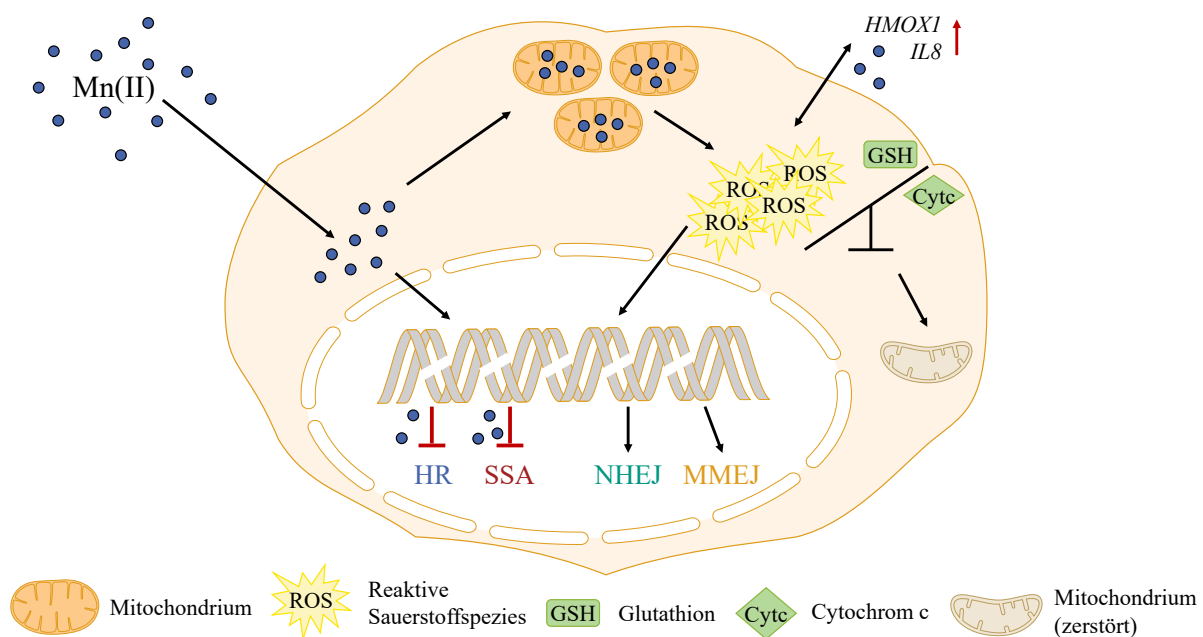


Abbildung 6.1: Postulierter Wirkmechanismus von Mangan auf zellulärer Ebene. Dargestellt sind die Aufnahme sowie weitere zelluläre Reaktionen, welche durch Mangan ausgelöst werden können. Dabei wird zweiwertiges Mangan in die Zelle aufgenommen und bevorzugt in den Mitochondrien akkumuliert. Dort ist das Metall in der Lage, die Atmungskette zu beeinträchtigen und hierdurch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu generieren. Die Induktion von oxidativem Stress wird ebenfalls durch die erhöhte Expression des oxidativen Stressmarkers *HMOX1* sowie des Entzündungsfaktors *IL8* gezeigt. Zudem setzt Mangan antioxidative Schutzsysteme außer Kraft, welches zu einem defekten Mitochondrium führt. Die verstärkte Induktion von ROS durch Mangan kann die DNA schädigen und zu DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSB) führen. Diese wiederum können über die homologe Rekombination (HR), das *Single Strand Annealing* (SSA), das nicht-homologe *Endjoining* (NHEJ) sowie das *micro-mediated Endjoining* (MMEJ) repariert werden. Dabei scheint die fehlerfreie HR durch bereits niedrigere Konzentrationen und das fehlerbehaftete SSA durch höhere Konzentrationen an Mangan beeinträchtigt. Möglicherweise könnte dies zu einer Beeinträchtigung der genomischen Stabilität führen.

Im zweiten Teil dieser Dissertation wurde der Einfluss von Chromat auf die Reparatur von DNA-DSB untersucht. Zunächst wurde ein geeigneter Konzentrationsbereich durch die Bestimmung der Zytotoxizität in HeLa S3-Zellen festgelegt. Betrachtete Endpunkte waren die Zellzahl, die CFA und der ATP-Gehalt. Beginnend mit der Zellzahl konnte eine dosisabhängige Abnahme der Anzahl an Zellen beobachtet werden, wobei die höchste getestete Konzentration von 5 μM nach einer 72-stündigen Inkubation auf 35 % der Kontrolle abfiel. Dabei zeigte eine Konzentration von 2,5 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ noch 80 % der Kontrolle nach einer Inkubationszeit von 32 h sowie 72 h. In der CFA waren in diesem Konzentrationsbereich noch 75 % der Kontrolle ersichtlich, während mit 5 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ein stark zytotoxischer Effekt auf 15 % (32 h) und 30 % (72 h) analysiert wurde. Der ATP-Gehalt stieg auf 145 % der Kontrolle nach einer Inkubation mit 2,5 μM Chromat an und sank anschließend bei der höchsten getesteten Konzentration auf 120 %. Aufgrund der hohen Standardabweichungen im ATP-Assay ist eine Aussage über die erhöhte metabolische Aktivität der Zellen jedoch erschwert.

In der Literatur sind bereits Daten zur Zytotoxizität von Chromat bekannt, wobei ebenfalls eine dosisabhängige Abnahme der Zellzahl und der CFA beobachtet wurde (Xie *et al.* 2015, Wise *et al.* 2002, Debetto *et al.* 1982, Patlolla *et al.* 2009). Die gesteigerte Chromat-Toxizität wird auf die Reduktion von Chrom(VI) zu dessen Intermediaten (Chrom(V), Chrom(IV), Chrom(III)) zurückgeführt. Dabei weist vor allem Chrom(III) eine hohe Affinität gegenüber der DNA auf und bildet Addukte. Dabei zeigen insbesondere ternäre Chrom-DNA-Addukte mit Ascorbat ein hohes mutagenes Potential. Zusätzlich werden bei der Reduktion von Chrom(VI) ROS generiert, welche Proteine, Lipide und die DNA schädigen können (zusammengefasst in O'Brien *et al.* 2003).

Nach der Bestimmung eines geeigneten Konzentrationsbereiches wurde anschließend der Reporter-Assay unter Einfluss von Chromat durchgeführt. Dabei wurde keine Veränderung der Reparaturwege des NHEJ sowie des SSA beobachtet, während eine Abnahme des GFP-Signals in der Zelllinie, welche die HR widerspiegelt, gezeigt werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigte das MMEJ eine verstärkte Reparatur nach einer Inkubation mit $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Diese Ergebnisse implizieren eine Inhibierung der nahezu fehlerfreien HR und einen damit verbundenen *Shift* zum fehlerbehafteten MMEJ.

In der Literatur konnte eine Beeinträchtigung der HR durch Chromat bereits festgestellt werden, das bevorzugt ablaufende MMEJ konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden. Die Inhibierung der HR konnte in der Literatur auf die Beeinträchtigung der an der Reparatur beteiligten Proteine zurückgeführt werden, wobei ein negativer Einfluss auf Rad51 festgestellt werden konnte (Browning *et al.* 2016). Der *Shift* zum MMEJ könnte möglicherweise auf eine verstärkte Induktion der Polymerase θ zurückgeführt werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Beeinträchti-

gung HR-relevanter Proteine eine verstärkte Induktion der Polymerase, welche für das MMEJ verantwortlich scheint, hervorruft (Ahrabi *et al.* 2016, Ceccaldi *et al.* 2015). Aufgrund dieser Hypothesen wurden im weiteren Verlauf der Arbeit zunächst die Proteine der HR und anschließend die Genexpression der *POLQ*, welche für die Polymerase θ codiert, untersucht.

Mit Hilfe der IF wurden die Proteine BRCA1, Rad51 und Rad54 betrachtet. BRCA1 koordiniert dabei im Komplex mit BRCA2 das Protein Rad51 an den DNA-DSB, Rad51 bildet ein Nukleoproteinfilament aus und stabilisiert den Einzelstrang, während Rad54 für das Eindringen in das Schwesterchromatid und den Abbau von Rad51 zuständig ist (zusammengefasst in Prakash *et al.* 2015 und Mazin *et al.* 2010 sowie Heyer *et al.* 2010, Jensen *et al.* 2010). Es konnte festgestellt werden, dass Chromat bereits nach akuter Exposition (32 h) DNA-DSB induzierte und BRCA1 sowie Rad54 nach subchronischer Exposition (72 h) eine verminderte Anlagerung an den DNA-DSB zeigten. Das Protein Rad51 hingegen wurde sowohl nach akuter als auch subchronischer Exposition an den DNA-DSB rekrutiert.

Eine Induktion von DNA-DSB konnte bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden. Dabei werden Mechanismen postuliert, welche auf die Bildung von Chrom-DNA-Addukten, der beeinträchtigten Reparatur dieser DNA-Addukte und der Generierung von ROS zurückgeführt werden können (Wakeman *et al.* 2004, Xie *et al.* 2005, Reynolds *et al.* 2007, Xie *et al.* 2009). Die Beeinträchtigung von BRCA1 und Rad54 durch Chromat wurde in dieser Arbeit erstmalig untersucht. Dabei könnte möglicherweise die Inhibierung der Expression dieser Proteine eine Folge epigenetischer Veränderungen sein. Ein verminderter Proteingehalt würde somit zu einer geringeren Anzahl an Foci führen. Epigenetische Veränderungen, ausgelöst durch Chromat, konnten bereits in Reparaturgenen der *mismatch repair* gezeigt werden. Eine Hypermethylierung des *hMLH1*-Gens führte zu einer verminderten Expression des Proteins und somit zu einem Verlust der Reparatur von Basenfehlpaarungen (Takahashi *et al.* 2005). Die *mismatch repair*-Defizienz kann dabei zu MS-Instabilität führen und infolgedessen zur Tumorentstehung beitragen. Auch in weiteren Reparaturgenen konnte eine Hypermethylierung und die damit verbundene Inhibierung der Expression durch Chrom(VI) gezeigt werden (Hu *et al.* 2018), weshalb ebenfalls eine Beeinträchtigung der Genexpression sowie im weiteren Verlauf der Proteinexpression von BRCA1 und Rad54 über diesen Mechanismus denkbar wäre. Eine direkte Beeinträchtigung von Rad51 konnte mit Hilfe der IF nicht gezeigt werden, allerdings sind bereits Studien zur Inhibierung des Proteins unter Einfluss von Chromat bekannt. Dabei wird ein fehlender Aufbau des Nukleoproteinfilamentes postuliert (Browning *et al.* 2016). Möglich wäre eine verminderte Expression von BRCA1, wodurch das Protein Rad51 mit Hilfe von BRCA2 an den DNA-DSB koordiniert wird. Weiter wäre ein unvollständiger Aufbau des Nukleoproteinfilamentes denkbar, wodurch eine Anlagerung von Rad54

zusätzlich erschwert sein könnte. Die Inhibierung dieser Proteine könnte zu einer verstärkten Expression der Polymerase θ und somit zum bevorzugt ablaufenden MMEJ führen (Ahrabi *et al.* 2016).

Die Proteingehalte der Zellfraktionen von Rad51 und Rad54 wurden anschließend mit Hilfe des Western Blots untersucht, um zu überprüfen, ob diese Proteine unter Einfluss von Chromat weiterhin gebildet und zur Reparatur der Schäden in den Zellkern transportiert werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass nach einer akuten Exposition gegenüber Chromat der Proteingehalt von Rad51 sowie Rad54 im Kern leicht anstieg, während nach subchronischer Exposition unter Betrachtung der hohen Standardabweichungen die Gehalte der Proteine in den Zellfraktionen unverändert schienen. Aufgrund der Fraktionierung der Zelle kann jedoch keine Aussage über den Gesamtproteingehalt getroffen werden.

In der Literatur sind bisher Daten zum Proteingehalt von Rad51 nach Exposition gegenüber Chromat bekannt. Dabei konnte eine Abnahme des Rad51-Gehaltes im Zellkern festgestellt werden, wobei der nukleare Transport von Rad51 gestört scheint (Qin *et al.* 2014, Browning *et al.* 2016, Browning und Wise 2017). Diese Beobachtungen konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Möglicherweise könnte dies auf Unterschiede in den verwendeten Zelllinien und Chromat-Verbindungen zurückgeführt werden. Aufgrund der hohen Standardabweichung in der vorliegenden Arbeit ist jedoch eine eindeutige Aussage über den Proteingehalt von Rad51 sowie Rad54 erschwert. Um eindeutigere Aussagen über die Proteingehalte sowie mögliche epigenetische Veränderungen zu erhalten, werden weitere Untersuchungen benötigt. Dabei sollte der Proteingehalt des gesamten Zellextraktes und zusätzliche Zeitpunkte sowie Konzentrationen mittels Western Blot nachgewiesen werden. Zudem könnte die mögliche Hypermethylierung der Gene mit Hilfe der Bisulfit-Sequenzierung untersucht werden.

Zum Abschluss der Chrom-Untersuchungen wurde die Transkriptmenge der *POLQ* untersucht. Dabei codiert *POLQ* für die Polymerase θ , welche für die DNA-Verknüpfung über Mikrohomologien beim MMEJ zuständig ist (zusammengefasst in Wood und Doublet 2016). In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass keine Veränderung des mRNA-Gehaltes der *POLQ* durch die Inkubation mit $K_2Cr_2O_7$ vorlag.

In der Literatur sind bisher keine Daten zum Einfluss von $K_2Cr_2O_7$ auf die Polymerase θ bekannt. Jedoch konnte bereits eine inverse Korrelation zwischen der Reparatur der HR und der Aktivität der Polymerase θ gezeigt werden. Ebenfalls wurde eine erhöhte Transkriptmenge der *POLQ* bei BRCA1-defizienten Zellen beobachtet (Ceccaldi *et al.* 2015). Zudem konnte eine Verbindung zwischen einer beeinträchtigten HR-Aktivität und einem verstärkten Ablauf des MMEJ fest-

gestellt werden (Ahrabi *et al.* 2016). Die Literatur deutet somit auf ein verstärktes Auftreten der Polymerase θ bei einer Beeinträchtigung der HR hin, wobei in dieser Arbeit keine Veränderung auf Genexpressions-Ebene gezeigt werden konnte. Denkbar wäre eine Stabilisierung der Polymerase auf Protein-Ebene, welche im Zuge der Reparatur mobilisiert wird. Möglicherweise wird die Polymerase θ auf Protein-Ebene beeinflusst, weshalb weitere Endpunkte betrachtet werden sollten. Hierbei könnte der Western Blot sowie der EMSA Aufschluss über mögliche Beeinträchtigungen der Polymerase θ geben.

Basierend auf den Ergebnissen der Arbeit zum Einfluss von Chromat auf die Reparatur von DNA-DSB konnte eine Beeinträchtigung der nahezu fehlerfreien HR sowie ein bevorzugt ablaufendes fehlerbehaftetes MMEJ festgestellt werden. Dabei wurde eine verminderte Foci-Bildung der Proteine BRCA1 und Rad54 durch Chromat festgestellt, wobei möglicherweise epigenetische Veränderungen zu einer beeinträchtigten Genexpression und somit zu einer verminderten Proteinbiosynthese führen. Dies sollte über weitere Untersuchungen abgeklärt werden. Über die Proteingehalte der Zellfraktionen von Rad51 sowie Rad54 können aufgrund der hohen Standardabweichungen keine klaren Aussagen getroffen werden. Auch hier sollten weitere Versuche in nachfolgenden Arbeiten durchgeführt werden, um diesen Sachverhalt zu klären. Das verstärkt ablaufende fehlerbehaftete MMEJ kann nicht auf eine erhöhte Transkriptmenge der *POLQ* zurückgeführt werden, weshalb weitere Untersuchungen auf Protein-Ebene durchgeführt werden sollten. Dennoch implizieren die Ergebnisse einen *Shift* von einer fehlerfreien zu einer fehlerbehafteten Reparatur und somit zu einer vermehrten Akkumulation von Mutationen und der damit verbundenen Instabilität von MS. Dabei zeigt Chromat einen möglichen Einfluss auf die genomische Stabilität und erhöht somit das Risiko einer Tumorentstehung. Abbildung 6.2 zeigt zusammenfassend den Einfluss von Chromat auf die untersuchten zellulären Mechanismen.

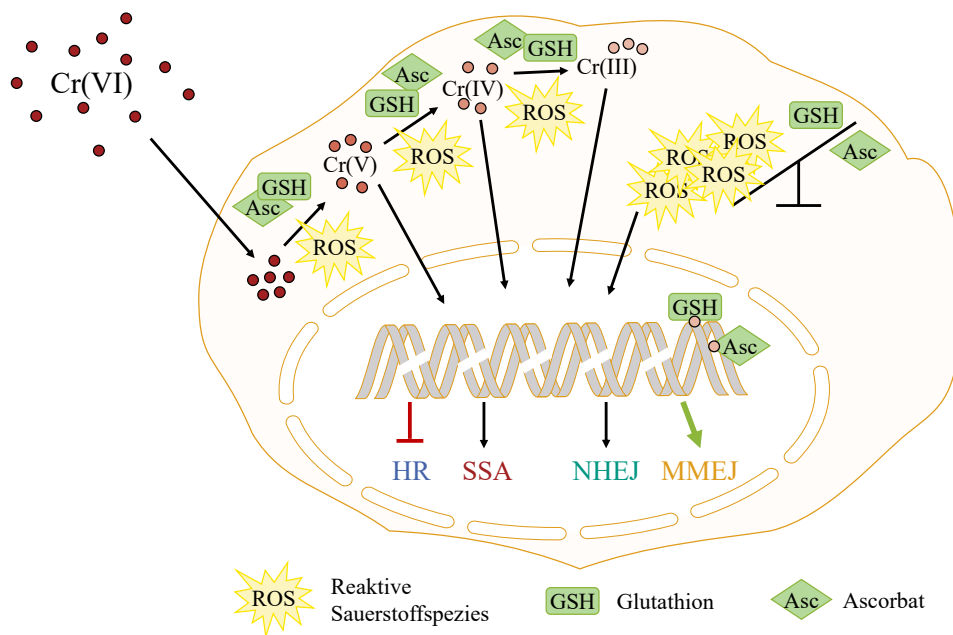


Abbildung 6.2: Postulierter Wirkmechanismus von Chromat auf zellulärer Ebene. Gezeigt sind die zellulären Auswirkungen von Chrom(VI). Das Metall wird in die Zelle aufgenommen und durch Ascorbat, Glutathion (GSH) und weitere antioxidative Schutzsysteme umgesetzt. Hierbei wird Chrom(VI) über Chrom(V) und Chrom(IV) zu Chrom(III) reduziert. Durch den in diesen Reaktionen stattfindenden Elektronentransport können reaktive Sauerstoffspezies (ROS), welche in der Zelle zu DNA-Schäden führen, generiert werden. Zusätzlich sind die entstandenen Intermediate von Chrom in der Lage, mit der DNA Addukte zu bilden und dadurch ebenfalls die DNA zu schädigen. Hierbei zeigt Chrom(III) eine hohe Affinität zur DNA, wobei zusätzlich Querverbindungen mit Ascorbat und Glutathion (ternäre DNA-Addukte) entstehen können. Diese DNA-Schäden wiederum können zu DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSB) umgesetzt werden, welche mit Hilfe der homologen Rekombination (HR), dem *Single Strand Annealing* (SSA) sowie dem nicht-homologen *Endjoining* (NHEJ) und dem *micro-mediated Endjoining* (MMEJ) repariert werden können. Dabei scheint die fehlerfreie HR inhibiert, während das fehlerbehaftete MMEJ unter Einfluss von Chromat bevorzugt stattfindet. Dies könnte möglicherweise die genomische Stabilität negativ beeinflussen.

7 Literaturverzeichnis

- Abbas, T. und Dutta, A. 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews Cancer*, 9(6):400–414.
- Agarwal, S., van Cappellen, W. A., Guenole, A., Eppink, B., Linsen, S. E. V., Meijering, E., Houtsmuller, A., Kanaar, R., und Essers, J. 2011. ATP-dependent and independent functions of Rad54 in genome maintenance. *Journal of Cell Biology*, 192(5):735–750.
- Ahrabi, S., Sarkar, S., Pfister, S. X., Pirovano, G., Higgins, G. S., Porter, A. C. G., und Humphrey, T. C. 2016. A role for human homologous recombination factors in suppressing microhomology-mediated end joining. *Nucleic Acids Research*, 44(12):5743–5757.
- Aihara, H., Ito, Y., Kurumizaka, H., Yokoyama, S., und Shibata, T. 1999. The N-terminal domain of the human Rad51 protein binds DNA: structure and a DNA binding surface as revealed by NMR. Edited by P. E. Wright. *Journal of Molecular Biology*, 290(2):495–504.
- Ali, A. H. K., Kondo, K., Namura, T., Senba, Y., Takizawa, H., Nakagawa, Y., Toba, H., Kenzaki, K., Sakiyama, S., und Tangoku, A. 2011. Aberrant DNA methylation of some tumor suppressor genes in lung cancers from workers with chromate exposure. *Molecular Carcinogenesis*, 50(2):89–99.
- Arner, E. S. J. und Holmgren, A. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry*, 267(20):6102–6109.
- Aschner, J. L. und Aschner, M. 2005. Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(4):353–362.
- Aschner, M. und Aschner, J. L. 1991. Manganese neurotoxicity: cellular effects and blood-brain barrier transport. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 15(3):333–40.
- Audebert, M., Salles, B., und Calsou, P. 2004. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *Journal of Biological Chemistry*, 279(53):55117–55126.
- Bader, M., Dietz, M. C., Ihrig, A., und Triebig, G. 1999. Biomonitoring of manganese in blood, urine and axillary hair following low-dose exposure during the manufacture of dry cell batteries. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 72(8):521–527.

- Bagchi, D., Stohs, S. J., Downs, B. W., Bagchi, M., und Preuss, H. G. 2002. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology*, 180(1):5–22.
- Barceloux, D. G. 1999. Chromium. *Journal of Toxicology-Clinical Toxicology*, 37(2):173–194.
- Baumann, P., Benson, F. E., und West, S. C. 1996. Human Rad51 Protein Promotes ATP-Dependent Homologous Pairing and Strand Transfer Reactions In Vitro. *Cell*, 87(4):757–766.
- Beagan, K. und Mcvey, M. 2016. Linking DNA polymerase theta structure and function in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(3):603–615.
- Beckman, R. A., Mildvan, A. S., und Loeb, L. A. 1985. On the fidelity of DNA replication: manganese mutagenesis in vitro. *Biochemistry*, 24(21):5810–7.
- Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N., und Stark, J. M. 2008. Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genetics*, 4(6):e1000110.
- Benova, D., Hadjidekova, V., Hristova, R., Nikolova, T., Boulanova, M., Georgieva, I., Grigorova, M., Popov, T., Panev, T., Georgieva, R., Natarajan, A. T., Darroudi, F., und Nilsson, R. 2002. Cytogenetic effects of hexavalent chromium in Bulgarian chromium platers. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 514(1-2):29–38.
- Beucher, A., Birraux, J., Tchouandong, L., Barton, O., Shibata, A., Conrad, S., Goodarzi, A. A., Krempler, A., Jeggo, P. A., und Löbrich, M. 2009. ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *The EMBO Journal*, 28(21):3413–3427.
- Bhargava, R., Onyango, D. O., und Stark, J. M. 2016. Regulation of Single-Strand Annealing and its Role in Genome Maintenance. *Trends in Genetics*, 32(9):566–575.
- Björklund, G., Dadar, M., Peana, M., Rahaman, M. S., und Aaseth, J. 2020. Interactions between iron and manganese in neurotoxicity. *Archives of Toxicology*, 94(3):725–734.
- Black, S. J., Ozdemir, A. Y., Kashkina, E., Kent, T., Rusanov, T., Ristic, D., Shin, Y., Suma, A., Hoang, T., Chandramouly, G., Siddique, L. A., Borisonnik, N., Sullivan-Reed, K., Mallon, J. S., Skorski, T., Carnevale, V., Murakami, K. S., Wyman, C., und Pomerantz, R. T. 2019. Molecular basis of microhomology-mediated end-joining by purified full-length Pol θ . *Nature Communications*, 10(1):4423.
- Blindauer, C. A. 2014. *Metallothioneins*, pages 606–665. Metallobiology. The Royal Society of Chemistry.
- Bock, C. W., Katz, A. K., Markham, G. D., und Glusker, J. P. 1999. Manganese as a Replacement for Magnesium and Zinc: Functional Comparison of the Divalent Ions. *Journal of the American Chemical Society*, 121(32):7360–7372.

- Bornhorst, J., Ebert, F., Hartwig, A., Michalke, B., und Schwerdtle, T. 2010. Manganese inhibits poly(ADP-ribose)ylation in human cells: a possible mechanism behind manganese-induced toxicity? *Journal of Environmental Monitoring*, 12(11):2062–9.
- Bornhorst, J., Ebert, F., Lohren, H., Humpf, H. U., Karst, U., und Schwerdtle, T. 2012. Effects of manganese and arsenic species on the level of energy related nucleotides in human cells. *Metallomics*, 4(3):297–306.
- Bornhorst, J., Meyer, S., Weber, T., Boker, C., Marschall, T., Mangerich, A., Beneke, S., Bürkle, A., und Schwerdtle, T. 2013. Molecular mechanisms of Mn induced neurotoxicity: RONS generation, genotoxicity, and DNA-damage response. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(7):1255–69.
- Bortner, C. D., Oldenburg, N. B. E., und Cidlowski, J. A. 1995. The Role of DNA Fragmentation in Apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 5(1):21–26.
- Bowman, A. B., Kwakye, G. F., Hernandez, E. H., und Aschner, M. 2011. Role of manganese in neurodegenerative diseases. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 25(4):191–203.
- Bregnbak, D., Thyssen, J. P., Zachariae, C., und Johansen, J. D. 2014. Characteristics of chromium-allergic dermatitis patients prior to regulatory intervention for chromium in leather: a questionnaire study. *Contact Dermatitis*, 71(6):338–347.
- Bürkle, A. 2001. Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribose)ylation. *BioEssays*, 23(9):795–806.
- Brown, R. O., Forloineslynn, S., Cross, R. E., und Heizer, W. D. 1986. Chromium deficiency after long-term total parenteral nutrition. *Digestive Diseases and Sciences*, 31(6):661–664.
- Browning, C. L., Qin, Q., Kelly, D. F., Prakash, R., Vanoli, F., Jasin, M., und Wise, J. P., S. 2016. Prolonged Particulate Hexavalent Chromium Exposure Suppresses Homologous Recombination Repair in Human Lung Cells. *Toxicological Sciences*, 153(1):70–8.
- Browning, C. L. und Wise, J. P., S. 2017. Prolonged exposure to particulate chromate inhibits RAD51 nuclear import mediator proteins. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 331:101–107.
- Bukau, B. und Horwich, A. L. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92(3):351–366.
- Candelli, A., Holthausen, J. T., Depken, M., Brouwer, I., Franker, M. A. M., Marchetti, M., Heller, I., Bernard, S., Garcin, E. B., Modesti, M., Wyman, C., Wuite, G. J. L., und Peterman, E. J. G. 2014. Visualization and quantification of nascent RAD51 filament formation at single-monomer resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(42):15090–15095.

- 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., und D'Andrea, A. D. 2015. Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Pol theta-mediated repair. *Nature*, 518(7538):258–U306.
- Ceccaldi, R., Rondinelli, B., und D'Andrea, A. D. 2016. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends in Cell Biology*, 26(1):52–64.
- Chang, H. H. Y., Pannunzio, N. R., Adachi, N., und Lieber, M. R. 2017. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(8):495–506.
- Chen, J. Y., Tsao, G. C., Zhao, Q., und Zheng, W. 2001. Differential cytotoxicity of Mn(II) and Mn(III): special reference to mitochondrial [Fe-S] containing enzymes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 175(2):160–168.
- Chen, P., Bornhorst, J., und Aschner, M. 2018. Manganese metabolism in humans. *Frontiers in Bioscience*, 23:1655–1679.
- Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P., und Kaina, B. 2003. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, 193(1-2):3–34.
- Cory, S. und Adams, J. M. 2002. The BCL2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, 2(9):647–656.
- Cowan, D. M., Fan, Q., Zou, Y., Shi, X., Chen, J., Aschner, M., Rosenthal, F. S., und Zheng, W. 2009. Manganese exposure among smelting workers: blood manganese-iron ratio as a novel tool for manganese exposure assessment. *Biomarkers*, 14(1):3–16.
- Davies, A. A., Masson, J.-Y., McIlwraith, M. J., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., Venkitaraman, A. R., und West, S. C. 2001. Role of BRCA2 in Control of the RAD51 Recombination and DNA Repair Protein. *Molecular Cell*, 7(2):273–282.
- Deakynne, J. S., Huang, F., Negri, J., Tolliday, N., Cocklin, S., und Mazin, A. V. 2013. Analysis of the Activities of RAD54, a SWI2/SNF2 Protein, Using a Specific Small-molecule Inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 288(44):31567–31580.
- Debetto, P., Toso, R. D., Varotto, R., Bianchi, V., und Luciani, S. 1982. Effects of Potassium Dichromate on ATP Content of Mammalian-Cells Cultured Invitro. *Chemico-Biological Interactions*, 41(1):15–24.
- Deng, Y., Xu, D. H., Xu, B., Xu, Z. F., Tian, Y. W., Feng, W. Y., Liu, W., und Yang, H. B. 2011. G0/G1 Phase Arrest and Apoptosis Induced by Manganese Chloride on Cultured Rat Astrocytes and Protective Effects of Riluzole. *Biological Trace Element Research*, 144(1-3):832–842.

- Domke, A., Großklaus, R., Niemann, B., Przyrembel, H., Richter, K., Schmidt, E., Weißenborn, A., Wörner, B., und Ziegenhagen, R. 2004. Verwendung von Mineralstoffen in Lebensmitteln. Toxikologische und ernährungsphysiologische Aspekte - Teil 2. *Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)*, pages 303–303.
- Ducros, V. 1992. Chromium Metabolism - a Literature-Review. *Biological Trace Element Research*, 32:65–77.
- Dueva, R. und Iliakis, G. 2013. Alternative pathways of non-homologous end joining (NHEJ) in genomic instability and cancer. *Translational Cancer Research*, 2(3):163–177.
- Eastmond, D. A., MacGregor, J. T., und Slesinski, R. S. 2008. Trivalent chromium: Assessing the genotoxic risk of an essential trace element and widely used human and animal nutritional supplement. *Critical Reviews in Toxicology*, 38(3):173–190.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4):495–516.
- Essers, J., Houtsmuller, A. B., van Veelen, L., Paulusma, C., Nigg, A. L., Pastink, A., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J. H. J., und Kanaar, R. 2002. Nuclear dynamics of RAD52 group homologous recombination proteins in response to DNA damage. *The EMBO Journal*, 21(8):2030–2037.
- Farina, M., Avila, D. S., da Rocha, J. B., und Aschner, M. 2013. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. *Neurochemistry International*, 62(5):575–94.
- Fischer, B. M. 2016. *Einfluss von Cadmium und Kupferoxid-Nanopartikeln auf die genomische Stabilität: Identifizierung der Wirkmechanismen auf Basis von Genexpressionsprofilen mittels High-Throughput RT-qPCR*. Thesis, Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- Fischer, B. M., Neumann, D., Piberger, A. L., Risnes, S. F., Köberle, B., und Hartwig, A. 2016. Use of high-throughput RT-qPCR to assess modulations of gene expression profiles related to genomic stability and interactions by cadmium. *Archives of Toxicology*, 90(11):2745–2761.
- Fitsanakis, V. A., Zhang, N., Garcia, S., und Aschner, M. 2010. Manganese (Mn) and Iron (Fe): Interdependency of Transport and Regulation. *Neurotoxicity Research*, 18(2):124–131.
- Fornace, A. J., Nebert, D. W., Hollander, M. C., Luethy, J. D., Papathanasiou, M., Fargnoli, J., und Holbrook, N. J. 1989. Mammalian Genes Coordinately Regulated by Growth Arrest Signals and DNA-Damaging Agents. *Molecular and Cellular Biology*, 9(10):4196–4203.
- Garrick, M. D., Singleton, S. T., Vargas, F., Kuo, H. C., Zhao, L., Knopfel, M., Davidson, T., Costa, M., Paradkar, P., Roth, J. A., und Garrick, L. M. 2006. DMT1: Which metals does it transport? *Biological Research*, 39(1):79–85.
- Gavin, C. E., Gunter, K. K., und Gunter, T. E. 1990. Manganese and calcium efflux kinetics in brain mitochondria. Relevance to manganese toxicity. *Biochemical Journal*, 266(2):329–34.

- Gildemeister, O. S., Sage, J. M., und Knight, K. L. 2009. Cellular Redistribution of Rad51 in Response to DNA Damage NOVEL ROLE FOR Rad51C. *Journal of Biological Chemistry*, 284(46):31945–31952.
- Gunn, A. und Stark, J. M. 2012. I-SceI-based assays to examine distinct repair outcomes of mammalian chromosomal double strand breaks. *Methods in Molecular Biology*, 920:379–91.
- Ha, L., Ceryak, S., und Patierno, S. R. 2004. Generation of S phase-dependent DNA double-strand breaks by Cr(VI) exposure: involvement of ATM in Cr(VI) induction of γ -H2AX. *Carcinogenesis*, 25(11):2265–2274.
- Hannon, G. J. und Beach, D. 1994. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*, 371(6494):257–261.
- Harada, A., Sekido, N., Akahoshi, T., Wada, T., Mukaida, N., und Matsushima, K. 1994. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 56(5):559–564.
- Hartwig, A. 2001. Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: Differential effects on structure and function. *Antioxidants & Redox Signaling*, 3(4):625–634.
- Hartwig, A. 2011. *Mangan und seine anorganischen Verbindungen. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 50. Lieferung*, pages 1–72. Wiley-VCH, Weinheim.
- Hartwig, A. 2013. Metal interaction with redox regulation: an integrating concept in metal carcinogenesis? *Free Radical Biology and Medicine*, 55:63–72.
- Hayashi, Y., Kondo, T., Zhao, Q. L., Ogawa, R., Cui, Z. G., Feril, L. B., Teranishi, H., und Kasuya, M. 2004. Signal transduction of p53-independent apoptotic pathway induced by hexavalent chromium in U937 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 197(2):96–106.
- Helmke, C., Becker, S., und Strebhardt, K. 2016. The role of Plk3 in oncogenesis. *Oncogene*, 35(2):135–147.
- Hernroth, B., Holm, I., Gondikas, A., und Tassidis, H. 2018. Manganese Inhibits Viability of Prostate Cancer Cells. *Anticancer Research*, 38(1):137–145.
- Herschleb, J., Ananiev, G., und Schwartz, D. C. 2007. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nature Protocols*, 2(3):677–684.
- Heyer, W. D., Ehmsen, K. T., und Liu, J. 2010. Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, 44:113–139.
- Heyer, W. D., Li, X., Rolfmeier, M., und Zhang, X. P. 2006. Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic Acids Research*, 34(15):4115–4125.

- Hilario, J., Amitani, I., Baskin, R. J., und Kowalczykowski, S. C. 2009. Direct imaging of human Rad51 nucleoprotein dynamics on individual DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(2):361–368.
- Hill, R., Leidal, A. M., Madureira, P. A., Gillis, L. D., Cochrane, H. K., Waisman, D. M., Chiu, A., und Lee, P. W. 2008. Hypersensitivity to chromium-induced DNA damage correlates with constitutive deregulation of upstream p53 kinases in p21^{-/-}-HCT116 colon cancer cells. *DNA Repair*, 7(2):239–252.
- Hirata, Y. 2002. Manganese-induced apoptosis in PC12 cells. *Neurotoxicology and Teratology*, 24(5):639–653.
- Hirose, T., Kondo, K., Takahashi, Y., Ishikura, H., Fujino, H., Tsuyuguchi, M., Hashimoto, M., Yokose, T., Mukai, K., Kodama, T., und Monden, Y. 2002. Frequent microsatellite instability in lung cancer from chromate-exposed workers. *Molecular Carcinogenesis*, 33(3):172–180.
- Hjollund, N. H. I., Bonde, J. P. E., Jensen, T. K., Henriksen, T. B., Andersson, A. M., Kolstad, H. A., Ernst, E., Giwercman, A., Skakkebaek, N. E., und Olsen, J. 2000. Male-mediated spontaneous abortion among spouses of stainless steel welders. *Scandinavian Journal of Work Environment & Health*, 26(3):187–192.
- Hu, G. P., Li, P., Cui, X. X., Li, Y., Zhang, J., Zhai, X. X., Yu, S. F., Tang, S. C., Zhao, Z. C., Wang, J., und Jia, G. 2018. Cr(VI)-induced methylation and down-regulation of DNA repair genes and its association with markers of genetic damage in workers and 16HBE cells. *Environmental Pollution*, 238:833–843.
- IARC 1990. Chromium and chromium compounds. *IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*, 49:49 – 256.
- Irminger-Finger, I., Ratajska, M., und Pilyugin, M. 2016. New concepts on BARD1: Regulator of BRCA pathways and beyond. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 72:1–17.
- Jackson, S. P. 2002. Sensing and repairing DNA double-strand breaks - Commentary. *Carcinogenesis*, 23(5):687–696.
- Jasin, M. und Rothstein, R. 2013. Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(11):a012740.
- Jensen, R. B., Carreira, A., und Kowalczykowski, S. C. 2010. Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature*, 467(7316):678–U62.
- Jeyasekharan, A. D., Liu, Y., Hattori, H., Pisupati, V., Jonsdottir, A. B., Rajendra, E., Lee, M., Sundaramoorthy, E., Schlachter, S., Kaminski, C. F., Rosenfeld, Y., Sato, K., Savill, J., Ayoub, N., und Venkitaraman, A. R. 2013. A cancer-associated BRCA2 mutation reveals masked nuclear export signals controlling localization. *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(10):1191.

- Jiang, Q. und Greenberg, R. A. 2015. Deciphering the BRCA1 Tumor Suppressor Network. *Journal of Biological Chemistry*, 290(29):17724–32.
- Jiao, J., Qi, Y. M., Fu, J. L., und Zhou, Z. C. 2008. Manganese-induced single strand breaks of mitochondrial DNA in vitro and in vivo. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26(2):123–127.
- Jin, B., Li, Y., und Robertson, K. D. 2011. DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy? *Genes & Cancer*, 2(6):607–617.
- Jin, B. L., Ernst, J., Tiedemann, R. L., Xu, H. Y., Sureshchandra, S., Kellis, M., Dalton, S., Liu, C., Choi, J. H., und Robertson, K. D. 2012. Linking DNA Methyltransferases to Epigenetic Marks and Nucleosome Structure Genome-wide in Human Tumor Cells. *Cell Reports*, 2(5):1411–1424.
- Karran, P. 1996. Microsatellite instability and DNA mismatch repair in human cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 7(1):15–24.
- Koch, B., Maser, E., und Hartwig, A. 2017. Low concentrations of antimony impair DNA damage signaling and the repair of radiation-induced DSB in HeLa S3 cells. *Archives of Toxicology*, 91(12):3823–3833.
- Krepkiy, D., Antholine, W. E., Myers, C., und Petering, D. H. 2001. Model reactions of Cr (VI) with DNA mediated by thiol species. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 222(1-2):213–219.
- Kresovich, J. K., Bulka, C. M., Joyce, B. T., Vokonas, P. S., Schwartz, J., Baccarelli, A. A., Hibler, E. A., und Hou, L. 2018. The Inflammatory Potential of Dietary Manganese in a Cohort of Elderly Men. *Biological Trace Element Research*, 183(1):49–57.
- Lakhin, A. V., Efremova, A. S., Makarova, I. V., Grishina, E. E., Shram, S. I., Tarantul, V. Z., und Gening, L. V. 2013. Effect of Mn(II) on the error-prone DNA polymerase iota activity in extracts from human normal and tumor cells. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 28(1):14–20.
- Lakhin, A. V., Tarantul, V. Z., und Gening, L. V. 2014. Manganese-induced infidelity of DNA synthesis as a possible cause of manganism. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 29(1):16–22.
- Lee, J. H., Jang, H., Cho, E. J., und Youn, H. D. 2009. Ferritin binds and activates p53 under oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 389(3):399–404.
- Levina, A., Bailey, A. M., Champion, G., und Lay, P. A. 2000. Reactions of chromium(VI/V/IV) with bis(O-ethyl-L-cysteinato-N,S)zinc(II): A model for the action of carcinogenic chromium on zinc-finger proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 122(26):6208–6216.
- Lewicki, S., Zdanowski, R., Krzyzowska, M., Lewicka, A., Debski, B., Niemcewicz, M., und Goniewicz, M. 2014. The role of Chromium III in the organism and its possible use in diabetes and obesity treatment. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 21(2):331–335.

- Li, L. M. und Yang, X. B. 2018. The Essential Element Manganese, Oxidative Stress, and Metabolic Diseases: Links and Interactions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018:7580707.
- Lieber, M. R. 2010. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 79:181–211.
- Lim, T. H., Sargent, T., und Kusubov, N. 1983. Kinetics of trace element chromium(III) in the human body. *American Journal of Physiology*, 244(4):445–454.
- Lima, P. D., Vasconcellos, M. C., Bahia, M. O., Montenegro, R. C., Pessoa, C. O., Costa-Lotufu, L. V., Moraes, M. O., und Burbano, R. R. 2008. Genotoxic and cytotoxic effects of manganese chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. *Toxicology In Vitro*, 22(4):1032–7.
- Liu, Y., Barber, D. S., Zhang, P., und Liu, B. 2013. Complex II of the Mitochondrial Respiratory Chain Is the Key Mediator of Divalent Manganese-Induced Hydrogen Peroxide Production in Microglia. *Toxicological Sciences*, 132(2):298–306.
- Lombardi, L., Ciana, P., Cappellini, C., Trecca, D., Guerrini, L., Migliazza, A., Maiolo, A. T., und Neri, A. 1995. Structural and Functional-Characterization of the Promoter Regions of the Nfkb2 Gene. *Nucleic Acids Research*, 23(12):2328–2336.
- Lu, S. C. 2013. Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(5):3143–3153.
- Mark, W. Y., Liao, J. C., Lu, Y., Ayed, A., Laister, R., Szymczyna, B., Chakrabartty, A., und Arrowsmith, C. H. 2005. Characterization of segments from the central region of BRCA1: an intrinsically disordered scaffold for multiple protein-protein and protein-DNA interactions? *Journal of Molecular Biology*, 345(2):275–87.
- Marlis, F.-S., Anja, G., Cordula, K., Hartmut, W., Elke, P., und Dieter, F. 2009. Single-Strand Annealing, Conservative Homologous Recombination, Nonhomologous DNA End Joining, and the Cell Cycle-Dependent Repair of DNA Double-Strand Breaks Induced by Sparsely or Densely Ionizing Radiation. *Radiation Research*, 171(3):265–273.
- Martin, D., Galisteo, R., und Gutkind, J. S. 2009. CXCL8/IL8 Stimulates Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression and the Autocrine Activation of VEGFR2 in Endothelial Cells by Activating NF kappa B through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 284(10):6038–6042.
- Martinez-Finley, E. J., Gavin, C. E., Aschner, M., und Gunter, T. E. 2013. Manganese neurotoxicity and the role of reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 62:65–75.
- Mason, J. M., Dusad, K., Wright, W. D., Grubb, J., Budke, B., Heyer, W. D., Connell, P. P., Weichselbaum, R. R., und Bishop, D. K. 2015. RAD54 family translocases counter genotoxic effects of RAD51 in human tumor cells. *Nucleic Acids Research*, 43(6):3180–3196.

- Mazin, A. V., Bornarth, C. J., Solinger, J. A., Heyer, W. D., und Kowalczykowski, S. C. 2000. Rad54 protein is targeted to pairing loci by the Rad51 nucleoprotein filament. *Molecular Cell*, 6(3):583–592.
- Mazin, A. V., Mazina, O. M., Bugreev, D. V., und Rossi, M. J. 2010. Rad54, the motor of homologous recombination. *DNA Repair*, 9(3):286–302.
- Meng, Q. H. und Xia, Y. 2011. c-Jun, at the crossroad of the signaling network. *Protein & Cell*, 2(11):889–898.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuckeids, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q. Y., Cochran, C., Bennett, L. M., Ding, W., Bell, R., Rosenthal, J., Hussey, C., Tran, T., McClure, M., Frye, C., Hattier, T., Phelps, R., Haugenstrano, A., Katcher, H., Yakumo, K., Gholami, Z., Shaffer, D., Stone, S., Bayer, S., Wray, C., Bogden, R., Dayananth, P., Ward, J., Tonin, P., Narod, S., Bristow, P. K., Norris, F. H., Helvering, L., Morrison, P., Rosteck, P., Lai, M., Barrett, J. C., Lewis, C., Neuhausen, S., Cannonalbright, L., Goldgar, D., Wiseman, R., Kamb, A., und Skolnick, M. H. 1994. A Strong Candidate for the Breast and Ovarian-Cancer Susceptibility Gene BRCA1. *Science*, 266(5182):66–71.
- Mladenov, E. und Iliakis, G. 2011. Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutation Research*, 711(1-2):61–72.
- Mladenov, E., Magin, S., Soni, A., und Iliakis, G. 2016. DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: Cell cycle and proliferation-dependent regulation. *Seminars in Cancer Biology*, 37-38:51–64.
- Mladenov, E. V., Kalev, P. S., und Anachkova, B. B. 2009. Nuclear Matrix Binding Site in the Rad51 Recombinase. *Journal of Cellular Physiology*, 219(1):202–208.
- Modesti, M., Ristic, D., van der Heijden, T., Dekker, C., van Mameren, J., Peterman, E. J. G., Wuite, G. J. L., Kanaar, R., und Wyman, C. 2007. Fluorescent human RAD51 reveals multiple nucleation sites and filament segments tightly associated along a single DNA molecule. *Structure*, 15(5):599–609.
- Mokgobu, M. I., Cholo, M. C., Anderson, R., Steel, H. C., Motheo, M. P., Hlatshwayo, T. N., Tintinger, G. R., und Theron, A. J. 2015. Oxidative induction of pro-inflammatory cytokine formation by human monocyte-derived macrophages following exposure to manganese in vitro. *Journal of Immunotoxicology*, 12(1):98–103.
- Morales, M. E., Derbes, R. S., Ade, C. M., Ortego, J. C., Stark, J., Deininger, P. L., und Roy-Engel, A. M. 2016. Heavy Metal Exposure Influences Double Strand Break DNA Repair Outcomes. *PLoS One*, 11(3):e0151367.
- Morello, M., Canini, A., Mattioli, P., Sorge, R. P., Alimonti, A., Bocca, B., Forte, G., Martorana, A., Bernardi, G., und Sancesario, G. 2008. Sub-cellular localization of manganese in the basal ganglia of normal and manganese-treated rats An electron spectroscopy imaging and electron energy-loss spectroscopy study. *Neurotoxicology*, 29(1):60–72.

- Mori, R., Matsuya, Y., Yoshii, Y., und Date, H. 2018. Estimation of the radiation-induced DNA double-strand breaks number by considering cell cycle and absorbed dose per cell nucleus. *Journal of Radiation Research*, 59(3):253–260.
- Morriscal, S. W. 2015. DNA-Pairing and Annealing Processes in Homologous Recombination and Homology-Directed Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(2):a016444.
- Nair, P., Lu, M., Petersen, S., und Ashkenazi, A. 2014. Apoptosis Initiation Through the Cell-Extrinsic Pathway. *Regulated Cell Death Part A: Apoptotic Mechanisms*, 544:99–128.
- Niemand, R. K. 2018. *Einfluss von Arsen auf die DNA-Doppelstrangbruchreparatur und damit assoziierte zelluläre Signalwege*. Thesis, Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- O'Brien, T. J., Ceryak, S., und Patierno, S. R. 2003. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutation Research*, 533(1-2):3–36.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., und Tanaka, N. 2000. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, 288(5468):1053–1058.
- Ohnishi, T., Mori, E., und Takahashi, A. 2009. DNA double-strand breaks: Their production, recognition, and repair in eukaryotes. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 669(1-2):8–12.
- Ott, D. B. 2019. *Einfluss von Aluminium auf die genomische Stabilität und Proteine der Eisenhomöostase*. Thesis, Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- Oubrahim, H., Stadtman, E. R., und Chock, P. B. 2001. Mitochondria play no roles in Mn(II)-induced apoptosis in HeLa cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(17):9505–9510.
- Park, E. J. und Park, K. 2010. Induction of oxidative stress and inflammatory cytokines by manganese chloride in cultured T98G cells, human brain glioblastoma cell line. *Toxicology in Vitro*, 24(2):472–479.
- Patlolla, A. K., Barnes, C., Hackett, D., und Tchounwou, P. B. 2009. Potassium Dichromate Induced Cytotoxicity, Genotoxicity and Oxidative Stress in Human Liver Carcinoma (HepG(2)) Cells. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(2):643–653.
- Paull, T. T. und Gellert, M. 1998. The 3' to 5' Exonuclease Activity of Mre11 Facilitates Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Molecular Cell*, 1(7):969–979.
- Pechova, A. und Pavlata, L. 2007. Chromium as an essential nutrient: a review. *Veterinarni Medicina*, 52(1):1–18.

- Peterson-Roth, E., Reynolds, M., Quievryn, G., und Zhitkovich, A. 2005. Mismatch repair proteins are activators of toxic responses to chromium-DNA damage. *Molecular and Cellular Biology*, 25(9):3596–607.
- Pierce, A. J., Johnson, R. D., Thompson, L. H., und Jasin, M. 1999. XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes & Development*, 13(20):2633–8.
- Powell, S. N. und Kachnic, L. A. 2003. Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation. *Oncogene*, 22(37):5784–91.
- Prakash, R., Zhang, Y., Feng, W., und 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.
- Purnama, A., Hermawan, H., Champetier, S., Mantovani, D., und Couet, J. 2013. Gene expression profile of mouse fibroblasts exposed to a biodegradable iron alloy for stents. *Acta Biomaterialia*, 9(10):8746–8753.
- Qin, Q., Xie, H., Wise, S. S., Browning, C. L., Thompson, K. N., Holmes, A. L., und Wise, J. P., S. 2014. Homologous recombination repair signaling in chemical carcinogenesis: prolonged particulate hexavalent chromium exposure suppresses the Rad51 response in human lung cells. *Toxicological Sciences*, 142(1):117–25.
- Rasio, D., Murakumo, Y., Robbins, D., Roth, T., Silver, A., Negrini, M., Schmidt, C., Burczak, J., Fishel, R., und Croce, C. M. 1997. Characterization of the human homologue of RAD54: A gene located on chromosome 1p32 at a region of high loss of heterozygosity in breast tumors. *Cancer Research*, 57(12):2378–2383.
- Raymaekers, M., Smets, R., Maes, B., und Cartuyvels, R. 2009. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 23(3):145–151.
- Reynolds, M., Stoddard, L., Bernalov, I., und Zhitkovich, A. 2007. Ascorbate acts as a highly potent inducer of chromate mutagenesis and clastogenesis: linkage to DNA breaks in G(2) phase by mismatch repair. *Nucleic Acids Research*, 35(2):465–476.
- Reynolds, M. F., Peterson-Roth, E. C., Bernalov, I. A., Johnston, T., Gurel, V. M., Menard, H. L., und Zhitkovich, A. 2009. Rapid DNA double-strand breaks resulting from processing of Cr-DNA cross-links by both MutS dimers. *Cancer Research*, 69(3):1071–9.
- Rosen, E. M. 2013. BRCA1 in the DNA damage response and at telomeres. *Frontiers in Genetics*, 4:85.
- Roth, J. A., Ganapathy, B., und Ghio, A. J. 2012. Manganese-induced toxicity in normal and human B lymphocyte cell lines containing a homozygous mutation in parkin. *Toxicology in Vitro*, 26(7):1143–1149.
- Sak, A., Stueben, G., Groneberg, M., Bocker, W., und Stuschke, M. 2005. Targeting of Rad51-dependent homologous recombination: implications for the radiation sensitivity of human lung cancer cell lines. *British Journal of Cancer*, 92(6):1089–1097.

- Sallmyr, A. und Tomkinson, A. E. 2018. Repair of DNA double-strand breaks by mammalian alternative end-joining pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 293(27):10536–10546.
- Salnikow, K. und Zhitkovich, A. 2008. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: Nickel, arsenic, and chromium. *Chemical Research in Toxicology*, 21(1):28–44.
- San Filippo, J., Sung, P., und Klein, H. 2008. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annual Review of Biochemistry*, 77:229–57.
- Santamaria, A. B. 2008. Manganese exposure, essentiality & toxicity. *Indian Journal of Medical Research*, 128(4):484–500.
- Sartori, A. A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., und Jackson, S. P. 2007. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, 450(7169):509–14.
- Savage, K. I. und Harkin, D. P. 2015. BRCA1, a 'complex' protein involved in the maintenance of genomic stability. *FEBS Journal*, 282(4):630–646.
- Seal, G., Shearman, C. W., und Loeb, L. A. 1979. On the fidelity of DNA replication. Studies with human placenta DNA polymerases. *Journal of Biological Chemistry*, 254(12):5229–37.
- Sengupta, A., Mense, S. M., Lan, C., Zhou, M., Mauro, R. E., Kellerman, L., Bentsman, G., Volsky, D. J., Louis, E. D., Graziano, J. H., und Zhang, L. 2007. Gene expression profiling of human primary astrocytes exposed to manganese chloride indicates selective effects on several functions of the cells. *Neurotoxicology*, 28(3):478–489.
- Seol, J.-H., Shim, E. Y., und Lee, S. E. 2018. Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 809:81–87.
- Shigematsu, H., Kumagai, K., Kobayashi, H., Eguchi, T., Kitaura, K., Suzuki, S., Horikawa, T., Matsutani, T., Ogasawara, K., Hamada, Y., und Suzuki, R. 2014. Accumulation of Metal-Specific T Cells in Inflamed Skin in a Novel Murine Model of Chromium-Induced Allergic Contact Dermatitis. *PLoS One*, 9(1):e85983.
- Shiloh, Y. 2001. ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Current Opinion in Genetics & Development*, 11(1):71–77.
- Sirover, M. A. und Loeb, L. A. 1976. Metal activation of DNA synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 70(3):812–7.
- Stracker, T. H. und Petrini, J. H. J. 2011. The MRE11 complex: starting from the ends. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(2):90–103.

- Sun, H., Zhou, X., Chen, H., Li, Q., und Costa, M. 2009. Modulation of histone methylation and MLH1 gene silencing by hexavalent chromium. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 237(3):258–266.
- Sy, S. M. H., Huen, M. S. Y., und Chen, J. J. 2009. PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(17):7155–7160.
- Takahashi, Y., Kondo, K., Hirose, T., Nakagawa, H., Tsuyuguchi, M., Hashimoto, M., Sano, T., Ochiai, A., und Monden, Y. 2005. Microsatellite instability and protein expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1, of lung cancer in chromate-exposed workers. *Molecular Carcinogenesis*, 42(3):150–8.
- Thoma, N. H., Czyzewski, B. K., Alexeev, A. A., Mazin, A. V., Kowalczykowski, S. C., und Pavletich, N. P. 2005. Structure of the SWI2/SNF2 chromatin-remodeling domain of eukaryotic Rad54. *Nature Structural and Molecular Biology*, 12(4):350–356.
- van Gent, D. C., Hoeijmakers, J. H. J., und Kanaar, R. 2001. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature Reviews Genetics*, 2(3):196–206.
- Vashishtha, A. K., Wang, J., und Konigsberg, W. H. 2016. Different Divalent Cations Alter the Kinetics and Fidelity of DNA Polymerases. *Journal of Biological Chemistry*, 291(40):20869–20875.
- Vincent, J. B. 2000. The biochemistry of chromium. *Journal of Nutrition*, 130(4):715–718.
- Wakeman, T. P., Kim, W. J., Callens, S., Chiu, A., Brown, K. D., und Xu, B. 2004. The ATM-SMC1 pathway is essential for activation of the chromium[VI]-induced S-phase checkpoint. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 554(1-2):241–251.
- Wang, H. C., Rosidi, B., Perrault, R., Wang, M. L., Zhang, L. H., Windhofer, F., und Iliakis, G. 2005. DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Research*, 65(10):4020–4030.
- Ward, J. F. 1990. The Yield of DNA Double-Strand Breaks Produced Intracellularly by Ionizing-Radiation - a Review. *International Journal of Radiation Biology*, 57(6):1141–1150.
- Waza, A. A., Hamid, Z., Ali, S., Bhat, S. A., und Bhat, M. A. 2018. A review on heme oxygenase-1 induction: is it a necessary evil. *Inflammation Research*, 67(7):579–588.
- Wiese, C., Hinz, J. M., Tebbs, R. S., Nham, P. B., Urbin, S. S., Collins, D. W., Thompson, L. H., und Schild, D. 2006. Disparate requirements for the Walker A and B ATPase motifs of human RAD51D in homologous recombination. *Nucleic Acids Research*, 34(9):2833–2843.

- Wise, J. P., Wise, S. S., und Little, J. E. 2002. The cytotoxicity and genotoxicity of particulate and soluble hexavalent chromium in human lung cells. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 517(1-2):221–229.
- Wise, S. S. und Wise, J. P., S. 2012. Chromium and genomic stability. *Mutation Research*, 733(1-2):78–82.
- Witkiewicz-Kucharczyk, A. und Bal, W. 2006. Damage of zinc fingers in DNA repair proteins, a novel molecular mechanism in carcinogenesis. *Toxicology Letters*, 162(1):29–42.
- Wood, R. D. und Doubleie, S. 2016. DNA polymerase theta (POLQ), double-strand break repair, and cancer. *DNA Repair*, 44:22–32.
- Xie, H., Holmes, A. L., Wise, S. S., Young, J. L., Wise, J. T. F., und Wise, J. P. 2015. Human Skin Cells Are More Sensitive than Human Lung Cells to the Cytotoxic and Cell Cycle Arresting Impacts of Particulate and Soluble Hexavalent Chromium. *Biological Trace Element Research*, 166(1):49–56.
- Xie, H., Holmes, A. L., Young, J. L., Qin, Q., Joyce, K., Pelsue, S. C., Peng, C., Wise, S. S., Jeevarajan, A. S., Wallace, W. T., Hammond, D., und Wise, J. P. 2009. Zinc chromate induces chromosome instability and DNA double strand breaks in human lung cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 234(3):293–299.
- Xie, H., Wise, S. S., Holmes, A. L., Xu, B., Wakeman, T. P., Pelsue, S. C., Singh, N. P., und Wise, J. P., S. 2005. Carcinogenic lead chromate induces DNA double-strand breaks in human lung cells. *Mutation Research*, 586(2):160–72.
- Xiong, X. H., Du, Z. W., Wang, Y., Feng, Z. H., Fan, P., Yan, C. H., Willers, H. N., und Zhang, J. R. 2015. 53BP1 promotes microhomology-mediated end-joining in G1-phase cells. *Nucleic Acids Research*, 43(3):1659–1670.
- Yokel, R. A. 2009. Manganese Flux Across the Blood-Brain Barrier. *Neuromolecular Medicine*, 11(4):297–310.
- Yoon, H., Kim, D.-S., Lee, G.-H., Kim, K.-W., Kim, H.-R., und Chae, H.-J. 2011. Apoptosis Induced by Manganese on Neuronal SK-N-MC Cell Line: Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Mitochondria Dysfunction. *Environmental Health and Toxicology*, 26:e2011017–e2011017.
- Yu, C., Zhou, Z. G., Wang, J., Sun, J., Liu, W., Sun, Y. A., Kong, B., Yang, H., und Yang, S. P. 2015. In depth analysis of apoptosis induced by silica coated manganese oxide nanoparticles in vitro. *Journal of Hazardous Materials*, 283:519–528.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W., und Vogelstein, B. 2001. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Molecular Cell*, 7(3):673–682.
- Yu, X. C., Chini, C. C. S., He, M., Mer, G., und Chen, J. J. 2003. The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science*, 302(5645):639–642.

- Zamaraeva, M. V., Sabirov, R. Z., Maeno, E., Ando-Akatsuka, Y., Bessonova, S. V., und Okada, Y. 2005. Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. *Cell Death and Differentiation*, 12(11):1390–1397.
- Zelko, I. N., Mariani, T. J., und Folz, R. J. 2002. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(3):337–349.
- Zhan, Q. M. 2005. Gadd45a, a p53-and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 569(1-2):133–143.
- Zhang, S., Fu, J., und Zhou, Z. 2004. In vitro effect of manganese chloride exposure on reactive oxygen species generation and respiratory chain complexes activities of mitochondria isolated from rat brain. *Toxicology in Vitro*, 18(1):71–77.
- Zhao, P., Zhong, W. J., Ying, X. P., Yuan, Z., Fu, J. L., und Zhou, Z. C. 2008. Manganese chloride-induced G0/G1 and S phase arrest in A549 cells. *Toxicology*, 250(1):39–46.
- Zheng, W., Ren, S., und Graziano, J. H. 1998. Manganese inhibits mitochondrial aconitase: A mechanism of manganese neurotoxicity. *Brain Research*, 799(2):334–342.
- Zheng, W. und Zhao, Q. 2001. Iron overload following manganese exposure in cultured neuronal, but not neuroglial cells. *Brain Research*, 897(1):175–179.
- Zheng, W., Zhao, Q. Q., Slavkovich, V., Aschner, M., und Graziano, J. H. 1999. Alteration of iron homeostasis following chronic exposure to manganese in rats. *Brain Research*, 833(1):125–132.
- Zhitkovich, A. 2005. Importance of chromium-DNA adducts in mutagenicity and toxicity of chromium(VI). *Chemical Research in Toxicology*, 18(1):3–11.
- Zhitkovich, A., Peterson-Roth, E., und Reynolds, M. 2005. Killing of chromium-damaged cells by mismatch repair and its relevance to carcinogenesis. *Cell Cycle*, 4(8):1050–1052.
- Zoroddu, M. A., Aaseth, J., Crisponi, G., Medici, S., Peana, M., und Nurchi, V. M. 2019. The essential metals for humans: a brief overview. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 195:120–129.

8 Chemikalien und Instrumente

8.1 Chemikalien

Tabelle 8.1: Auflistung der verwendeten Chemikalien sowie deren Hersteller.

Chemikalie	Hersteller
20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco)
2x Assay Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco)
2x TaqMan® PreAmp Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt)
AAS-Manganstandard (1 g/l)	Perkin Elmer (Rodgau)
AAS-Magnesium-Matrixmodifier	Perkin Elmer (Rodgau)
AAS-Palladium-Matrixmodifier	Perkin Elmer (Rodgau)
Albumin Fraktion V	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin (10 mg/mL)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Annexin V-FITC	BioLegend (San Diego)
Borsäure	Roth (Karlsruhe)
Bradfordreagenz	BioRad (München)
CasyTon®	Roche (Mannheim)
CellROX Green	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
DAPI (CyStain® DNA/Protein)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
di-Kaliumhydrogenphosphat, ≥ 99 %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO), ≥ 99,9 %	Sigma-Aldrich (Steinheim)
di-Natriumhydrogenphosphat, ≥ 99 %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DNA Away	Roth (Karlsruhe)
DNA Suspension Buffer	TEKnova (Kristiansand)
Ethanol 80 % und 96 %	Roth (Karlsruhe)
Exonuklease I (20 U/ml) New England	BioLabs (Frankfurt)
Exonuklease Reaktionspuffer New England	BioLabs (Frankfurt)
FACS Flow	BD (Heidelberg)
Fetales Kälberserum 10 % (FKS)	Invitrogen (Darmstadt)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 8.1 – Fortsetzung der vorherigen Seite

Chemikalie	Hersteller
Formaldehyd 37 %	Roth (Karlsruhe)
Gel-Red®	VWR (Darmstadt)
Giemsa® Stammlösung	Roth (Karlsruhe)
Glycerin (Rotipuran®), ≥ 99,5 %	Roth (Karlsruhe)
Glycin®, ≥ 99,5 %	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt (ultra pure)	VWR (Darmstadt)
HEPES, ≥ 99,5 %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Hydroxylapatit, high resolution	Calbiochem (Läufelfingen)
IFC Control Line Fluid	Fluidigm (San Francisco)
Immersionsöl	Zeiss (Oberkochen)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid, ≥ 99,5 %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat, ≥ 99,5 %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Kanamycin (15 mg/mL)	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Mangan(II)chlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid, ≥ 99,5 %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat, ≥ 99 %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid, ≥ %, p.A.	Roth (Karlsruhe)
Natronlauge 1 N	Roth (Karlsruhe)
PCR Certified Water	TEKnova (Kristiansand)
Penicillin-Streptomycin-Lösung (P.: 5000 U/ml, S.: 5 mg/l)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
PAGE Ruler Prestained Protein Ladder (10 - 170 kDa)	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Primer Eurofins	Eurofins (Ebersberg)
Primer Fluidigm	Fluidigm (San Francisco)
Propidiumiodid (1 g/l)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Protease Inhibitor Cocktail (cOmplete)	Roche (Basel)
Proteinase K	Merck Millipore (Darmstadt)
Pulsed Field Certified™ Agarose	BioRad (München)
RNase	Roche (Mannheim)
RNase Away	VWR (Darmstadt)
Roti® -Load 1 4x (Ladepuffer)	Roth (Karlsruhe)
Polyvinylidenfluorid Membran	GE Healthcare (Buckinghamshire)
Roti® -Phenol	Roth (Karlsruhe)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 8.1 – Fortsetzung der vorherigen Seite

Chemikalie	Hersteller
Rotiphorese® (Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (40 %))	Roth (Karlsruhe)
Rotisol (Ethanol 100 %)	Roth (Karlsruhe)
Salpetersäure Supra Qualität (69 %)	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure 0,1 N	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure 4 N	Roth (Karlsruhe)
SDS 10 %	Roth (Karlsruhe)
SsoFast™ EvaGreen® Supermix mit Low ROX	BioRad (München)
Staurosporin (1 mM)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
TE-Puffer	TEKnova (Kristiansand)
Tris, ≥ 99,5 %	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100 10 % Lsg.	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Trypsin, 0,25 % Trypsin in EDTA	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Trypton	VWR (Darmstadt)
Tween®20	Roth (Karlsruhe)
Wasserstoffperoxid Suprapur® (30 %)	Merck Millipore (Darmstadt)

8.2 Lösungen und Puffer

Tabelle 8.2: Auflistung der verwendeten Puffer oder Lösungen sowie deren Zusammensetzung.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Laufpuffer (10x)	0,25 M Tris 1,92 M Glycin
Laufpuffer (1x)	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS
PBS (pH 7,4)	0,1 M NaCl 0,0045 M KCl 0,007 M Na ₂ HPO ₄ 0,003 M KH ₂ PO ₄
PBS-EDTA (pH 7,4)	0,5 mM EDTA in PBS
PBST	0.05 % (w/v) Tween®20 in PBS
Ringer-Lösung	147 mM NaCl 402 mM KCl 297 mM CaCl ₂ H ₂ O aufgefüllt auf 1 l bidest. H ₂ O
TAE-Puffer (pH 8)	40 mM Tris 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA
TBE-Puffer (pH 8)	89 mM Tris 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
TE-Puffer (pH 8)	10 mM Tris-HCl 6,25 mM EDTA
Transferpuffer (1x)	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % Methanol
Trypsin-Lösung	0,25 % Trypsin in PBS-EDTA

8.3 Verwendete Kits

Tabelle 8.3: Auflistung der verwendeten Kits.

Verwendete Kits	Hersteller
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare (Buckinghamshire)
CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay	Promega (Fitchburg)
CHEF Mammalian Genomic DNA Plug	BioRad (München)
Effectene Transfection Reagent	Qiagen (Venlo)
Nuclear Extract	Active Motif (La Hulpe)
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin® RNA Plus	Macherey-Nagel (Düren)
qScript™ cDNA Synthesis	QuantaBio (Beverly)

8.4 Verwendete Antikörper

Tabelle 8.4: Auflistung der verwendeten Antikörper.

Verwendete Antikörper	Hersteller
Anti- α -Tubulin mouse	Santa Cruz (Dallas)
Anti-BRCA1 mouse	Abcam (Cambridge)
Anti-CENP-F rabbit	Abcam (Cambridge)
Anti-CENP-F mouse	Santa Cruz (Dallas)
Anti-Histon H3 rabbit	Santa Cruz (Dallas)
Anti-mouse Alexa Fluor® 488	Invitrogen (Darmstadt)
Anti-mouse IgG BP-HRP	Santa Cruz (Dallas)
Anti-rabbit Cy3	Jackson (Suffolk)
Anti-Rad51 rabbit	Abcam (Cambridge)
Anti-Rad54 mouse	Santa Cruz (Dallas)
Goat-anti-mouse IgG	Biologend (London)
Mouse-anti-rabbit IgG HRP	Santa Cruz (Dallas)

8.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8.5: Auflistung der benötigten Verbrauchsmaterialien sowie deren Hersteller.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
1,2 ml Sample Cups	Perkin Elmer (Waltham)
12-well Platten	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
2,5 ml Sample Cups	Perkin Elmer (Waltham)
48-well Platten	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
5 ml Rundboden-Röhrchen	Corning (Amsterdam)
6-well Platten	Corning (Amsterdam)
96-well Platten NUNC™ (weiß)	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
96-well Platten	TPP (Transadingen)
Amersham Nitrocellulose Membran	GE Healthcare (Buckinghamshire)
Casy-Cups	Roche (Mannheim)
Deckgläschen (Ø 10 mm)	Roth (Karlsruhe)
Dynamic Array IFC	Fluidigm (San Francisco)
Einmalspritzen (5 ml)	Terumo (Eschborn)
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Falcon Tubes (3,5 mL)	BD (Heidelberg)
Glaspipetten (1,2,5,10 und 20 mL)	Roth (Karlsruhe)
Handschuhe (Latex)	VWR International (Darmstadt)
Handschuhe (Nitril)	Ansell (Richmond)
Kulturkolben nach Fernbach	VWR International (Darmstadt)
Kryoröhrchen mit Gewinde (1,8 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Magnetrührstäbe	Roth (Karlsruhe)
MultiPLY® μ Strip (8er Kette)	Sarstedt (Nümbrecht)
Objektträger (76x26 mm)	Roth (Karlsruhe)
Parafilm	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Pipettenspitzen (10 μ l)	Mettler-Toledo (Gießen)
Pipettenspitzen (10 μ l)	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen (100-1000 μ l)	Brandt (Wertheim)
Pipettenspitzen (1-200 μ l)	Ratiolab (Deieck)
Pipettenspitzen (5 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Plastik-Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Polyvinylidenfluorid Membran	GE Healthcare (Buckinghamshire)
Sterilfilter (500 mL), 0,2 μ M, PES	VWR (Darmstadt)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 8.5 – Fortsetzung der vorherigen Seite

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Sterilindikatorband Autoklav	Roth (Karlsruhe)
Sterilindikatorband Heißluftsterilisator	Roth (Karlsruhe)
Vernichtungsbeutel	VWR (Darmstadt)
Wägeschiffchen	Roth (Karlsruhe)
Whatman-Papier (3 mm)	Whatman (Dassel)
Zellkulturschalen (Ø 15 cm, Ø 10 cm, Ø 6 cm, Ø 3,5 cm)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellschaber	VWR (Darmstadt)

8.6 Instrumente und Software

Tabelle 8.6: Auflistung der verwendeten Instrumente bzw. Software sowie deren Hersteller.

Instrument/Software	Hersteller
Atomabsorptionsspektrometer PinAAcle 900 T	Perkin Elmer (Waltham)
Autoklav D-150	Systemec (Linden)
Axio Imager Z2	Zeiss (Oberkochen)
Axio Observer	Zeiss (Oberkochen)
Axiovert 40C	Zeiss (Oberkochen)
Biofreezer Herafreeze top	Thermo Scientific (Langenselbold)
Biomark	Fluidigm (San Francisco)
Blotting Kammer	Peqlab (Erlangen)
Brutschrank Heracell 150i	Thermo Scientific (Langenselbold)
Casy® TTC Cell Couter & Analyser System	Roche (Mannheim)
Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Centrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)
Colony Counter BZG-30	WTW (Weilheim)
Cryo 1°C Cooler (Mr. Frosty)	VWR International (Darmstadt)
Durchflusszytometer LSR Fortessa FACS	Becton-Dickinson (Heidelberg)
Eismaschine	Ziegler (Isernhagen)
Elektrophorese Kammer	BioRad (München)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 8.6 – Fortsetzung der vorherigen Seite

Instrument/Software	Hersteller
Elektrophorese Stromgerät	BioRad (München)
Eppendorf Pipette (1000-5000 μ l)	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette (100-1000 μ l)	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette (10-100 μ l)	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette (2,5-10 μ l)	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette (20-200 μ l)	Eppendorf (Hamburg)
Feinwaage BP 61 S	Sartorius (Göttingen)
Galaxy Mini Centrifuge	VWR International (Darmstadt)
Glaspipetten (5, 10, 20 ml)	Roth (Karlsruhe)
Heißluftsterilisator	Memmert (Büchenbach)
Heizschüttler Thermomixer C	Eppendorf (Hamburg)
IFC Controller HX	Fluidigm (San Francisco)
Kühl- und Gefrierschränke	Bosch (Gerlingen)
Laborspülmaschine Professional G7883	Miele (Güterloh)
Luminescent Image Analyzer LAS-3000	Fujifilm (Düsseldorf)
Magnetrührer Variomag® Poly Komet	VWR (Darmstadt)
Megafuge 1.0	Heraeus (Hanau)
MicroCentrifuge	Roth (Karlsruhe)
Multipipette Pipete Lite XLS® (0,5-10 μ l)	Mettler Toledo (Gießen)
NanoQuant Platte	Tecan Group (Crailsheim)
PCR Workstation Pro	Peqlab (Erlangen)
PFGE CHEF-DR III	BioRad (München)
pH-Meter 3210	WTW (Weilheim)
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Reinstwasseranlage Milli-Q	Merck Millipore (Darmstadt)
Rotator	Labinco B.V. (Bredastadt)
Röntgenröhre CellRad	Faxitron (Much)
Schüttelinkubator Stuart Orbital Incubator SI600C	Stuart (Staffordshire)
Software »AA Winlab 32«	Perkin Elmer (Waltham)
Software »Aida Image Analyzer v.3.27«	Raytest (Straubenhardt)
Software »BD FACSDiva«	Becton-Dickinson (Heidelberg)
Software »Fluidigm Real Time PCR Analysis«	Fluidigm (San Francisco)
Software »GenEx«	MultiD Analyses (Göteborg)
Software »Image J«	Open Source
Software »SPSS«	SPSS Statistics (Chicago)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 8.6 – Fortsetzung der vorherigen Seite

Instrument/Software	Hersteller
Software »ZEN2«	Zeiss (Oberkochen)
Sterilwerkbank HERAsafeKS	Thermo Scientific (Langenselbold)
T100 Thermal Cycler	BioRad (München)
Taumler 3012	GFL (Burgwedel)
Tecan Infinite M200 PRO	Tecan Group (Crailsheim)
Tischzentrifuge Eppireaktionsgefäße	VWR International (Darmstadt)
Ultraschallbad Sonorex Super RK 255 H	Bandelin (Berlin)
Vortex-Genie 2T	Scientific Industries (New York)
Waage VWR 1502	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	Memert (Schwabach)
Wasserbad	Julubo (Seelbach)

9 Anhang

9.1 Liste der untersuchten Gene

In der Tabelle 9.1 ist das Gencluster der verwendeten HT RT-qPCR-Methode dargestellt. In Fischer (2016) können die Primer-Sequenzen sowie weitere Informationen zur Methode eingesehen werden.

Tabelle 9.1: Auflistung aller in der HT RT-qPCR enthaltenen Gene.

Referenzgene	DNA-Schadens- antwort und Reparatur	Metall- homöostase	Oxidative Stress- antwort	Transkriptions- faktoren	Apoptotische Faktoren und Zellzyklus- regulatoren	Fremdstoff- metabolismus
<i>ACTB</i>	<i>APEX1</i>	<i>FTH1</i>	<i>CAT</i>	<i>AXIN2</i>	<i>APAF1</i>	<i>ABCB1</i>
<i>B2M</i>	<i>ATM</i>	<i>MT1X</i>	<i>G6PD</i>	<i>BTRC</i>	<i>BAX</i>	<i>ABCC1</i>
<i>GAPDH</i>	<i>ATR</i>	<i>MT2A</i>	<i>GCLC</i>	<i>JUN</i>	<i>BBC3</i>	<i>ALDH1A1</i>
<i>GUSB</i>	<i>BRCA1</i>	<i>SLC30A1</i>	<i>GPX1</i>	<i>KEAP1</i>	<i>BCL2</i>	<i>CYP1A1</i>
<i>HPRT1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>TFRC</i>	<i>GSR</i>	<i>MAP3K5</i>	<i>BCL2L1</i>	<i>EPHX1</i>
	<i>DDB1</i>		<i>HMOX1</i>	<i>MDM2</i>	<i>CCND1</i>	<i>NAT1</i>
	<i>DDB2</i>		<i>HSPA1A</i>	<i>NFE2L2</i>	<i>CDKN1A</i>	<i>NQO1</i>
	<i>DDIT3</i>		<i>IL8</i>	<i>NFKB1</i>	<i>CDKN1B</i>	<i>SULT1A1</i>
	<i>ERCC1</i>		<i>PRDX1</i>	<i>NFKB2</i>	<i>CDKN2B</i>	<i>UGT1A</i>
	<i>ERCC2</i>		<i>SEPP1</i>	<i>NFKBIA</i>	<i>E2F1</i>	
	<i>ERCC4</i>		<i>SOD1</i>	<i>TP53</i>	<i>EGFR</i>	
	<i>ERCC5</i>		<i>SOD2</i>	<i>VEGFA</i>	<i>MYC</i>	
	<i>GADD45A</i>		<i>TXN1</i>		<i>PLK3</i>	
	<i>LIG1</i>		<i>TXNRD1</i>		<i>PMAIP1</i>	
	<i>LIG3</i>				<i>PPM1D</i>	
	<i>MLH1</i>				<i>SIRT2</i>	
	<i>MSH2</i>				<i>TNFRSF10B</i>	
	<i>OGG1</i>				<i>XIAP</i>	
	<i>PARP1</i>					
	<i>PCNA</i>					
	<i>POLB</i>					
	<i>POLD1</i>					
	<i>RAD50</i>					
	<i>RAD51</i>					
	<i>RRM2B</i>					
	<i>XPA</i>					
	<i>XPC</i>					
	<i>XRCC5</i>					

9.2 Designte Primer

In Tabelle 9.2 ist das designte Primer-Paar der *POLQ* dargestellt. Dabei wurde der *forward* und *reverse* Primer, wie im Kapitel Material und Methoden 4.12.1 beschrieben, designt.

Tabelle 9.2: Designte Primer für die Untersuchungen der Genexpression der *POLQ*.

Gen		Primer-Sequenz [5' → 3']	Schmelztemp. [°C]	Produktlänge [bp]
<i>POLQ</i>	<i>forward</i>	GGCAGCACCTCTCCATCAA	78,1	135
	<i>reverse</i>	TTCATCCACAACCACCATTCT		

9.3 Primer-Etablierung

Tabelle 9.3 zeigt die Effizienz des Primer-Paares der *POLQ*. Es wurden drei Versuche zur Effizienz durchgeführt. Zu beachten ist, dass Versuch 1 mit weniger Preamplifikations-Zyklen durchgeführt wurde. Die Effizienz wurde über die Formel 4.4, welche in Kapitel 4.12.3 angegeben ist, berechnet (Raymaekers *et al.* 2009).

Tabelle 9.3: Berechnung der Primer-Effizienz der *POLQ* (n=3). Zur Berechnung sind die Werte der Steigung (*Slope*) sowie der Schnittpunkt durch die y-Achse (*Intercept*) herangezogen worden. Dabei ist eine Effizienz zwischen 0,9 bis 1,1 sowie ein Korrelationskoeffizient (R^2) von 0,99 bis 0,999 akzeptabel.

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittelwert	Effizienz-Range [%]
<i>Slope</i>	-3,5958	-3,3838	-3,0074		
<i>Intercept</i>	28,234	15,253	15,974		
Effizienz	0,8972	0,9748	1,1503	1,0074	89,72 bis 115,03
R^2	0,9826	0,9859	0,9966	0,9884	

In Abbildung 9.1 ist ein exemplarisches Gel der Bestimmung der Primer-Spezifität dargestellt. Ebenfalls in der Abbildung gezeigt, ist die Bestimmung der Primer-Effizienz anhand eines Beispiels.

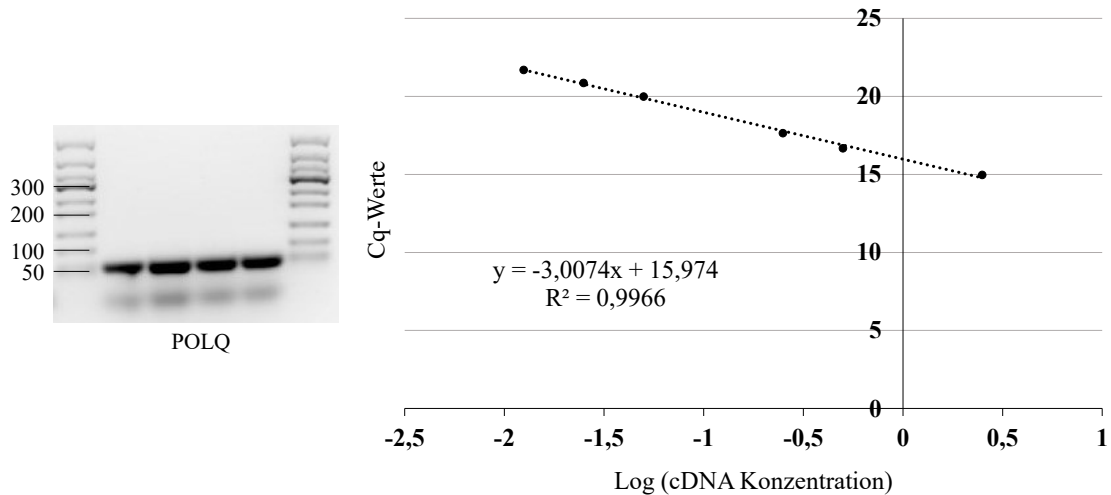


Abbildung 9.1: Beispiel einer Primer-Etablierung. Gezeigt ist links ein exemplarisches Gel einer Gelelektrophorese zur Bestimmung der Primer-Spezifität des PCR-Produktes der *POLQ* (n=4). Die Primer-Effizienz (rechts) des Primer-Paares der *POLQ* wurde mit Hilfe einer cDNA-Verdünnungsreihe erstellt. Dargestellt ist der Logarithmus der relativen *template*-Konzentration gegen die Cq-Werte. Mittels linearer Regression wurde eine Geradengleichung ($y=mx+b$) und ein Korrelationskoeffizient (R^2) bestimmt.

9.4 Bestimmung der Nachweis-, Erfassungs-, und Bestimmungsgrenze

In Tabelle 9.4 sind die Werte der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze dargestellt. Diese wurden mit Hilfe der Leerwertmethode der DIN 32645 berechnet. Die Grenzwerte wurden in Zusammenarbeit mit Frau Yvonne Gil Pascual im Rahmen ihrer Masterarbeit bestimmt.

Tabelle 9.4: Nachweis- (NG), Erfassungs- (EG) und Bestimmungsgrenze (BG) von Mangan.

	Schnellabschätzung	Berechnung nach DIN 32645	Herstellerangaben (PinAAcle)
NG [$\mu\text{g/L}$]	0,35	0,23	0,02
EG [$\mu\text{g/L}$]	0,71	0,45	-
BG [$\mu\text{g/L}$]	1,35	1,29	0,07

9.5 Verwendete Plasmide

Nachfolgend werden die im Reporter-Assay verwendeten Plasmide aufgeführt. Dabei sind die Plasmide DR-GFP (HR), EJ5-GFP (NHEJ), EJ2-GFP (MMEJ) und SA-GFP (SSA) stabil in U2OS-Zellen transfiziert. Das Restriktionsenzym I-SceI wird als Plasmid-DNA transient transfiziert. Zudem wird pEGFP-N1 als Effizienz-Kontrolle ebenfalls transient transfiziert. Die Methode des Reporter-Assays sowie die dazugehörigen Zelllinien wurden von Jeremy Stark entwickelt (Gunn und Stark 2012). Zur Verfügung gestellt wurden die stabil transfizierten U2OS-Zellen sowie das Restriktionsenzym und die Effizienz-Kontrolle von Prof. Dr. George Iliakis (Universitätsklinikum Essen, Institut für medizinische Strahlenbiologie). Die Plasmide sind stark vereinfacht mit Hilfe von *SnapGene* in den Abbildungen 9.2, 9.3 und 9.4 dargestellt. Die genaue Plasmid-Sequenz von DR-GFP kann unter <https://www.addgene.org/26475/> eingesehen werden. Die Plasmid-Sequenz von EJ5-GFP kann unter <https://www.addgene.org/44026/> nachgeschaut werden. Der genaue Expressionsvektor von EJ2-GFP ist unter <https://www.addgene.org/44025/> zu finden. Der genaue Vektor zu SA-GFP kann unter <https://www.addgene.org/41594/> eingesehen werden. Die genaue Plasmid-Sequenz von I-SceI ist unter <https://www.addgene.org/26477/> zu finden, während die Plasmid-DNA von pEGFP-N1 unter <https://www.addgene.org/vector-database/2491/> eingesehen werden kann.

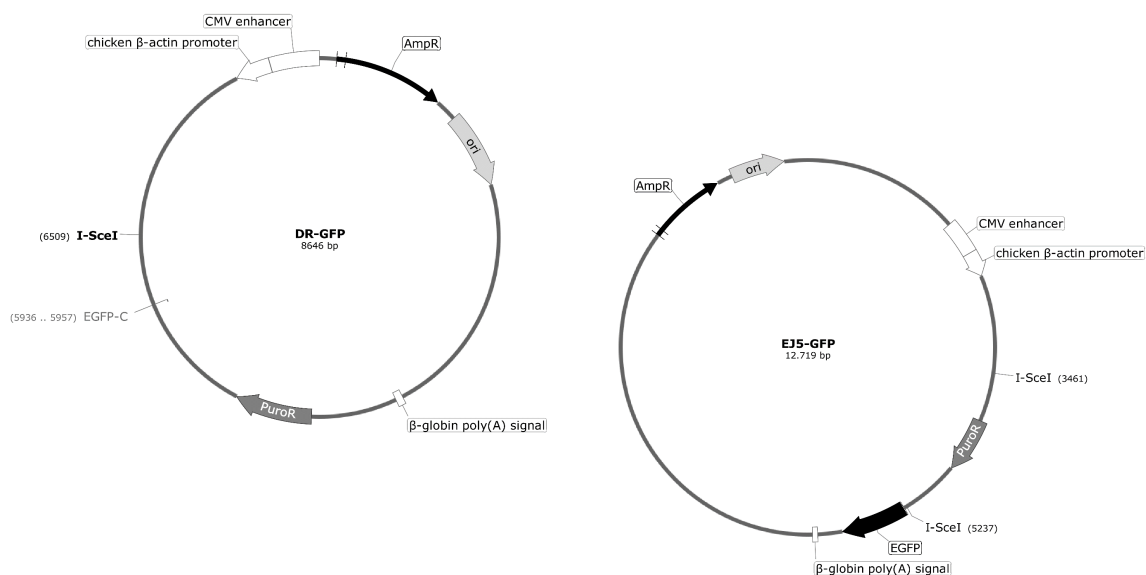


Abbildung 9.2: Darstellung der Plasmid-DNA von DR-GFP und EJ5-GFP. Gezeigt ist links der Expressionsvektor von DR-GFP und rechts die Plasmid-DNA von EJ5-GFP.

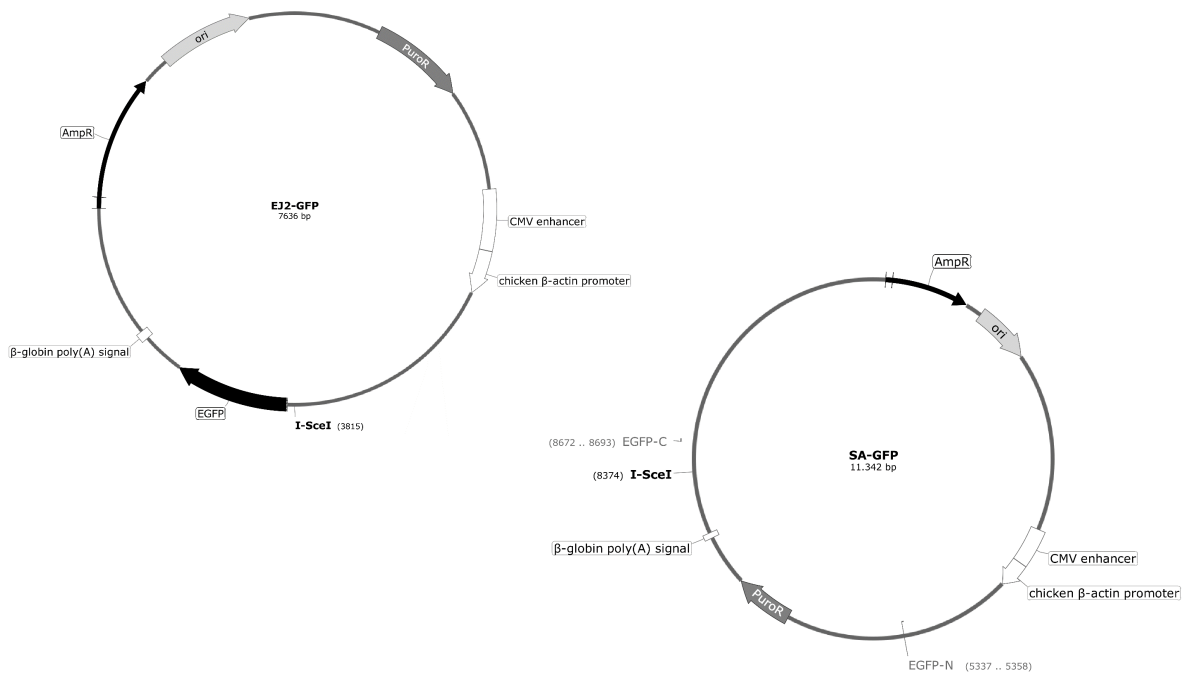


Abbildung 9.3: Darstellung der Plasmid-DNA von EJ2-GFP und SA-GFP. Gezeigt ist links der Expressionsvektor von EJ2-GFP, welcher bei funktionsfähiger Reparatur 8 Nukleotide als Mikrohomologie verwendet und 35 Nukleotide verliert. Rechts ist die Plasmid-DNA von SA-GFP dargestellt. Bei einer vollständigen Reparatur gehen 2,7 kbp verloren.

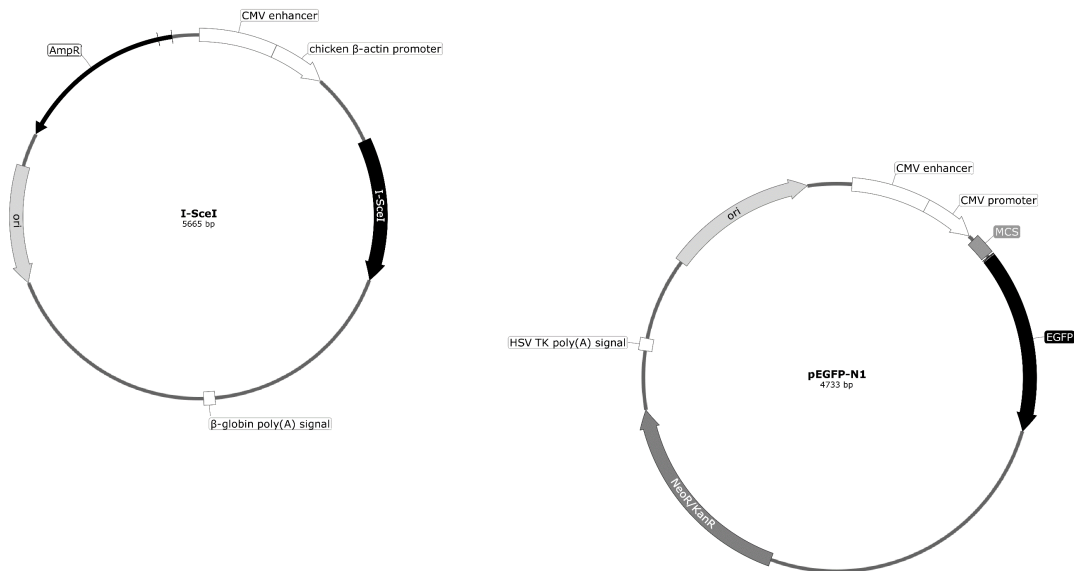


Abbildung 9.4: Darstellung der Plasmid-DNA von I-SceI und pEGFP-N1. Der Expressionsvektor von I-SceI ist links dargestellt und rechts die Plasmid-DNA von pEGFP-N1.

9.6 Ergänzende Daten

Mangan

Zytotoxizität von Mangan und Bestrahlung auf HeLa S3-Zellen

Zur Untersuchung des Einfluss von Mangan auf DNA-DSB wurde die PFGE angewandt, dabei werden Strahlendosen von 80 Gy zur Induktion von DNA-DSB benötigt. Aufgrund dessen wurde ebenfalls die Zytotoxizität von Mangan mit 80 Gy Bestrahlung untersucht. In den Abbildungen 9.5 und 9.6 ist kein signifikanter Unterschied zwischen Bestrahlung und Behandlung ohne Bestrahlung innerhalb der Zellzahl sowie im ATP-Gehalt erkennbar. Versuche mit 80 Gy Bestrahlung wurden teilweise in Zusammenarbeit mit Frau Ann-Kathrin Kull im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

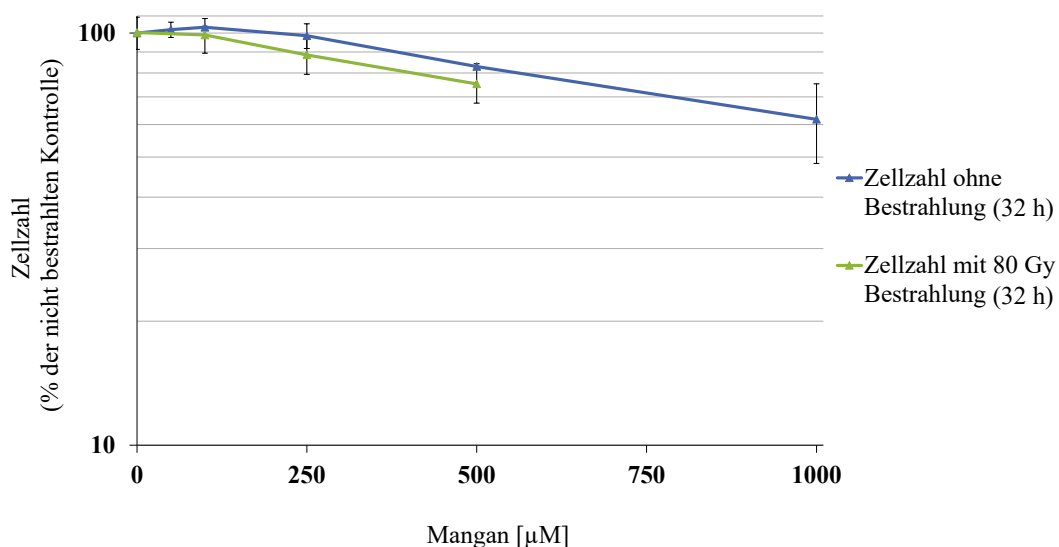


Abbildung 9.5: Einfluss von Mangan auf die Zellzahl von HeLa S3-Zellen. Gezeigt ist die Zellzahl von HeLa S3-Zellen nach einer Inkubation mit Manganchlorid (MnCl_2). Hierfür wurden Konzentrationen von $10 \mu\text{M}$ bis $1000 \mu\text{M}$ eingesetzt. Die Zellen wurden für 32 h inkubiert bzw. für 24 h vorinkubiert, mit 80 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung.

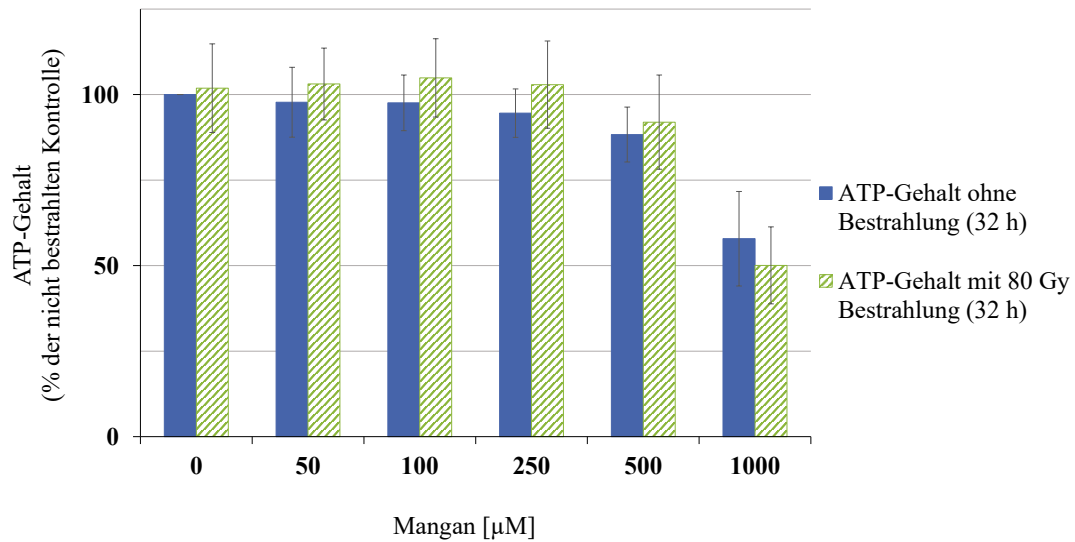


Abbildung 9.6: Einfluss von Mangan auf die metabolische Aktivität von HeLa S3-Zellen. Die Zellen wurden für 32 h mit Manganchlorid (MnCl_2) inkubiert bzw. für 24 h vorinkubiert, mit 80 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung.

Immunfluoreszenz (IF)

In den Abbildungen 9.7 sind weitere Zeitpunkte der IF-Färbung von Rad51 und Rad54 unter Einfluss von Mangan dargestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Behandlung.

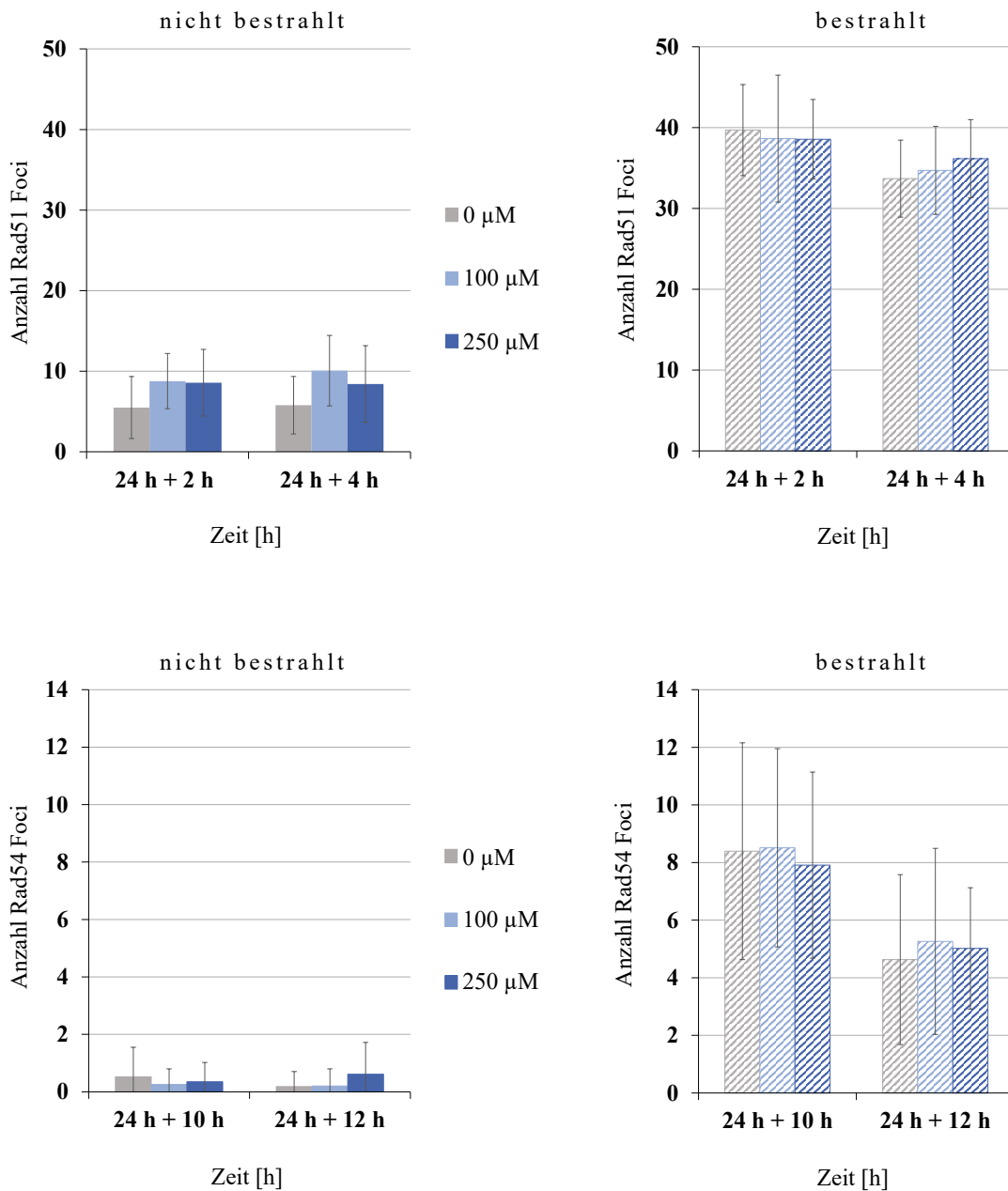


Abbildung 9.7: Einfluss von Mangan auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSB) in HeLa S3-Zellen mittels Immunfluoreszenz (IF)-Färbung von Rad51 und Rad54. Die Zellen wurden für 26 h bzw. 28 h mit Manganchlorid (MnCl_2) inkubiert bzw. für 24 h vorinkubiert, mit 1 Gy bestrahlt und für 2 h und 4 h nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung.

Genexpression

Im folgenden Kapitel werden die Gene, welche unter Einfluss von Mangan keinen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrolle zeigten aufgeführt. Dabei zeigt Abbildung 9.8 Gene der DNA-Schadensantwort. Abbildung 9.9 zeigt Gene der Metallhomöostase (oben) und oxidativen Stressantwort (unten). In Abbildung 9.10 sind Gene aufgeführt, welche mit dem Zellzyklus und der Apoptose (oben) sowie dem Fremdstoffmetabolismus (unten) assoziiert werden. Eine zusätzliche Bestrahlung zeigte auch hier keinen signifikanten Unterschied.

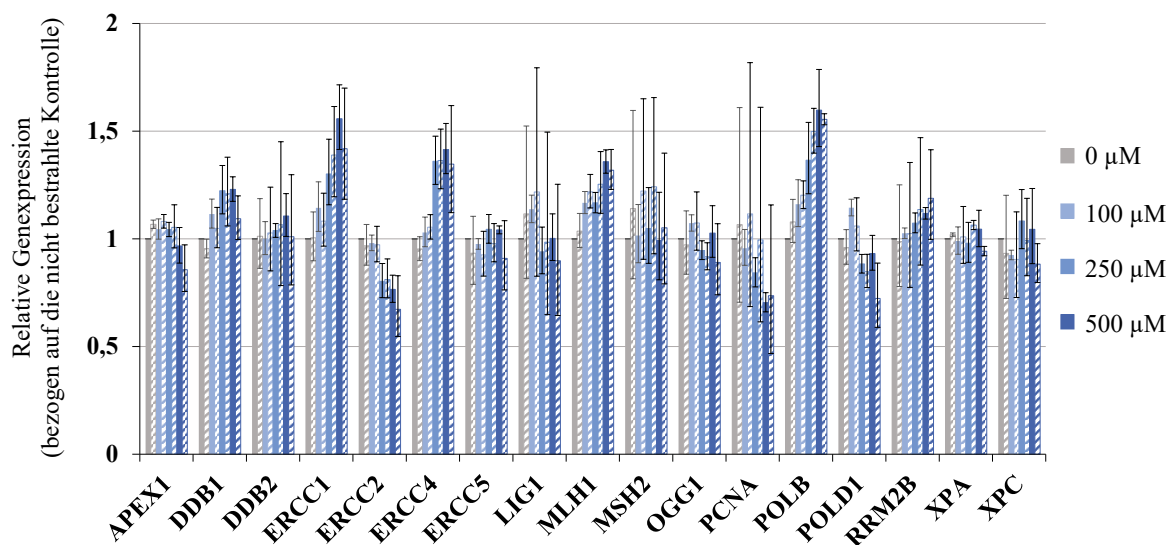


Abbildung 9.8: Einfluss von Mangan auf die relative Expression von Genen der DNA-Schadensantwort. Die Zellen wurden für 32 h mit Manganchlorid (MnCl_2) behandelt ($100 \mu\text{M}$ bis $500 \mu\text{M}$) bzw. für 24 h vorinkubiert, mit 1 Gy bestrahlt (schraffiert) und für 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung.

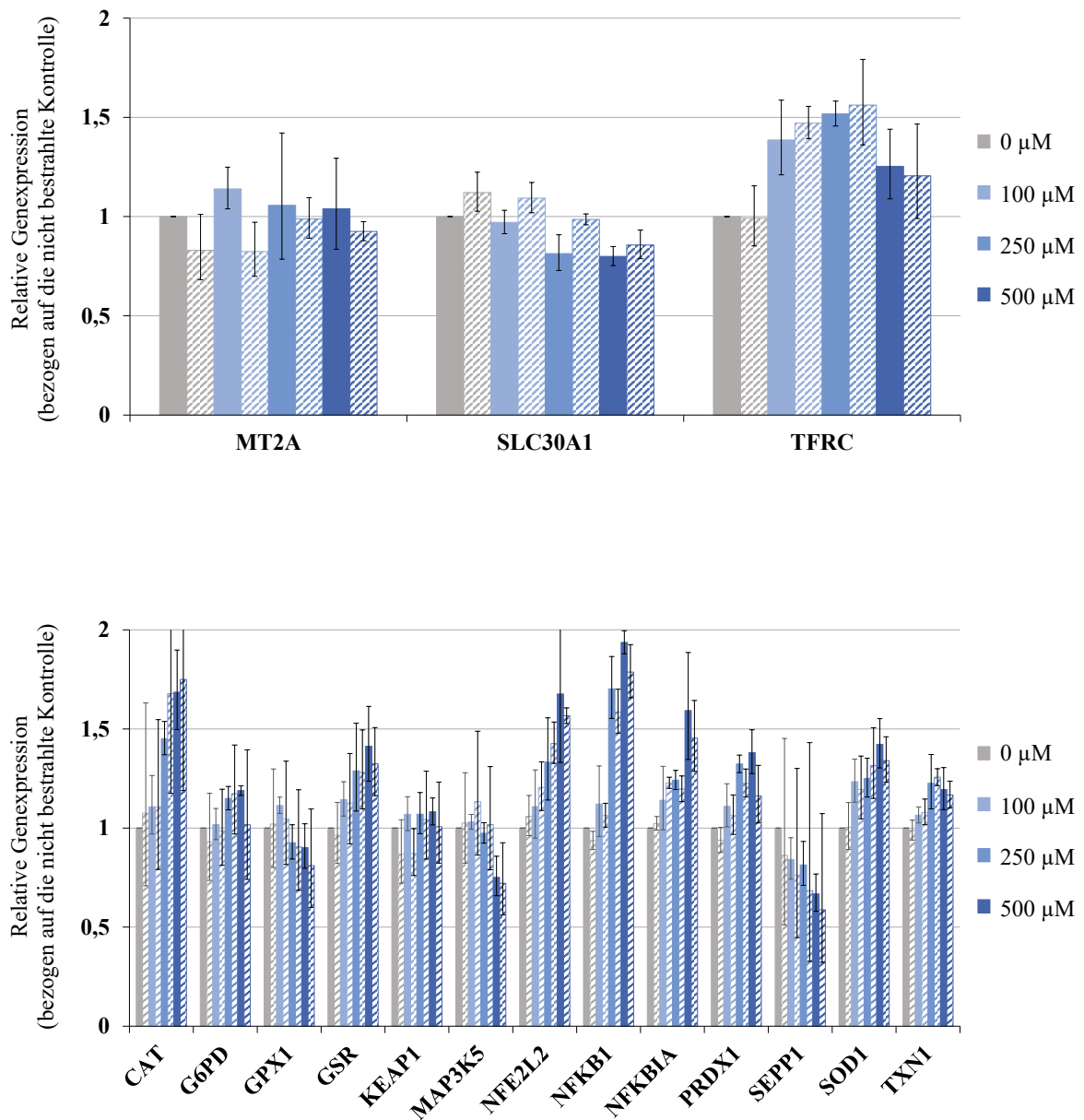


Abbildung 9.9: Einfluss von Mangan auf die relative Expression von Genen der Metallhomöostase (oben) und der oxidativen Stressantwort (unten). Die Zellen wurden für 32 h mit Manganchlorid (MnCl_2) behandelt ($100 \mu\text{M}$ bis $500 \mu\text{M}$) bzw. für 24 h vorinkubiert, mit 1 Gy bestrahlt (schraffiert) und für 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung.

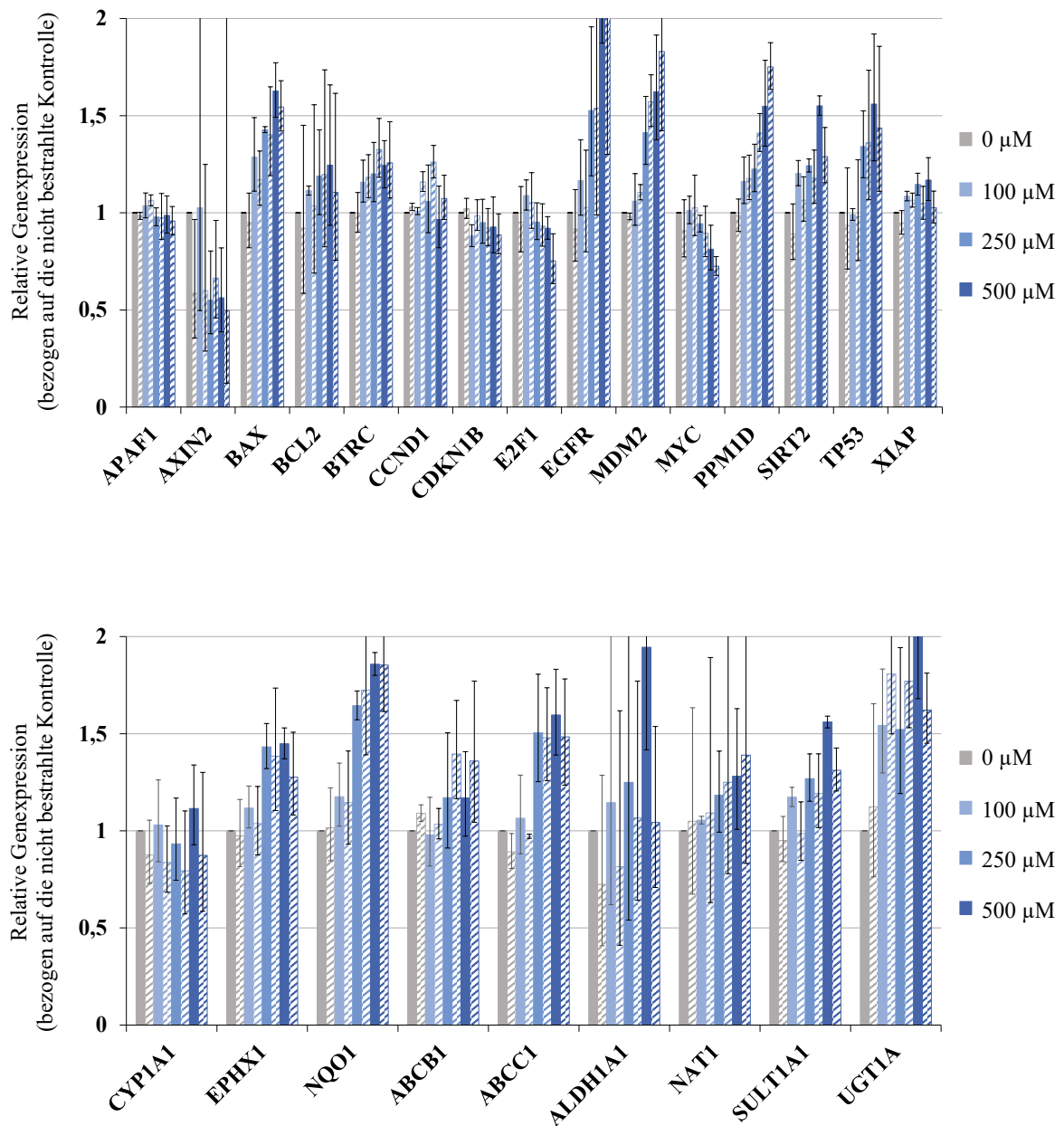


Abbildung 9.10: Einfluss von Mangan auf die relative Expression von Genen des Zellzyklus und der Apoptose (oben) sowie des Fremdstoffmetabolismus (unten). Die Zellen wurden für 32 h mit Manganchlorid (MnCl_2) behandelt ($100 \mu\text{M}$ bis $500 \mu\text{M}$) bzw. für 24 h vorinkubiert, mit 1 Gy bestrahlt (schraffiert) und für 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung.

Ergänzende Daten zu anderen Metallen

Cobalt

Abbildung 9.11 zeigt die Viabilität von HeLa S3-Zellen unter Einfluss von Cobaltchlorid. Abbildung 9.12 zeigt den ATP-Gehalt. Dabei wurden Versuche ohne und mit 80 Gy Bestrahlung durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass kein zytotoxischer Effekt bis 250 μM Cobaltchlorid beobachtet werden konnte. Zudem wurden Experimente zum Einfluss von Cobaltchlorid auf die Reparatur von DNA-DSB durchgeführt. Abbildungen 9.13, 9.14 und 9.15 zeigen den Einfluss von Cobaltchlorid auf die Reparatur von DNA-DSB. Dabei sind in den Abbildungen 9.13 und 9.14 Ergebnisse zur PFGE aufgeführt, während Abbildung 9.15 den Reporter-Assay unter Einfluss von Cobaltchlorid zeigt. Es konnte gezeigt werden, dass Cobaltchlorid im ausgewählten Konzentrationsbereich bis 250 μM keine DNA-DSB erzeugt und die Reparatur von DNA-DSB nicht beeinflusst. Versuche mit 80 Gy Bestrahlung wurden teilweise in Zusammenarbeit mit Frau Ann-Kathrin Kull im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

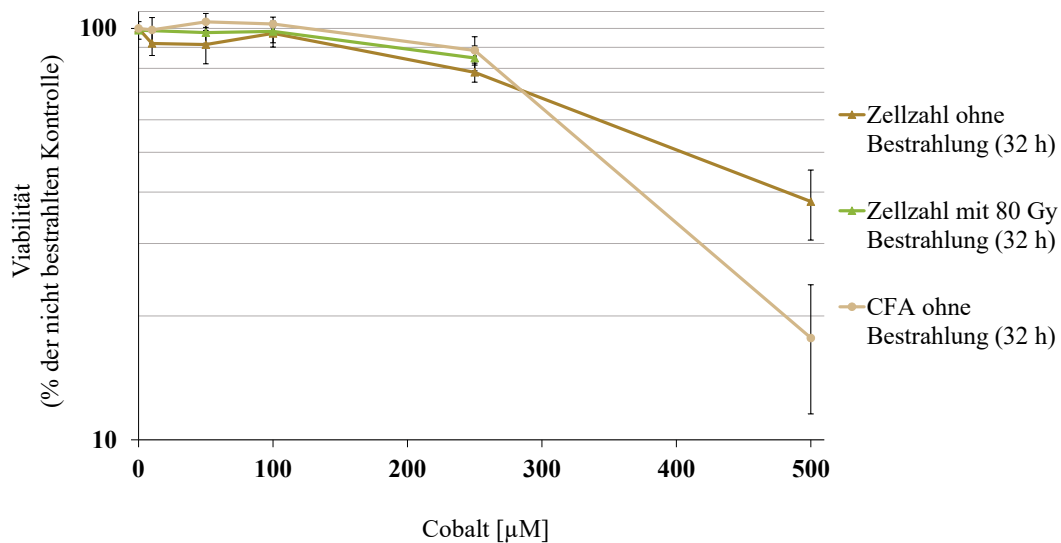


Abbildung 9.11: Einfluss von Cobalt auf die Viabilität von HeLa S3-Zellen. Gezeigt ist die Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit (CFA) von HeLa S3-Zellen nach einer Inkubation mit Cobaltchlorid. Hierfür wurden Konzentrationen von 10 μM bis 500 μM eingesetzt. Die Zellen wurden für 32 h inkubiert bzw. für 24 h vorinkubiert, mit 80 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung.

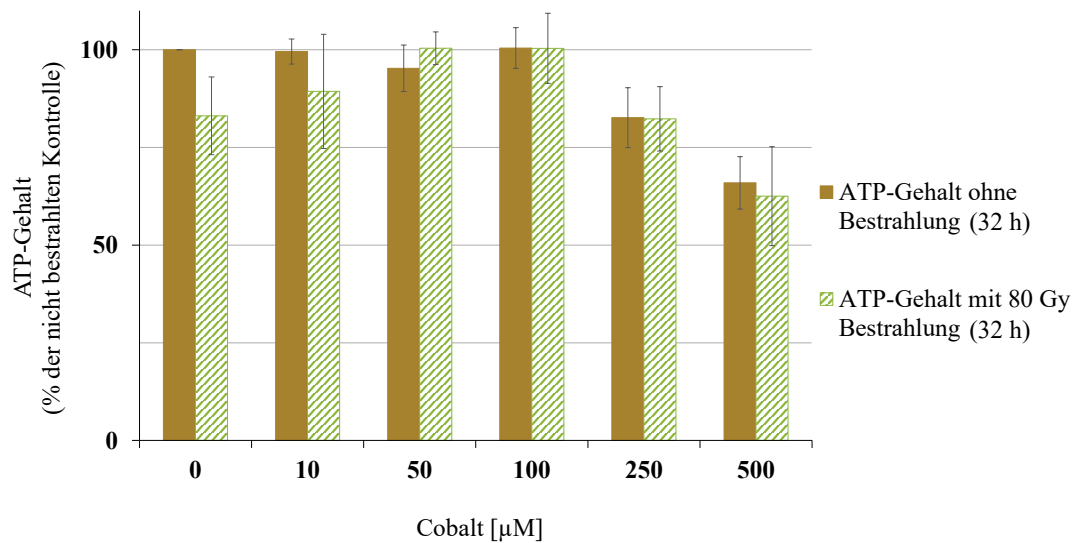


Abbildung 9.12: Einfluss von Cobalt auf die metabolische Aktivität von HeLa S3-Zellen. Die Zellen wurden für 32 h mit Cobaltchlorid inkubiert bzw. für 24 h vorinkubiert, mit 80 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung.

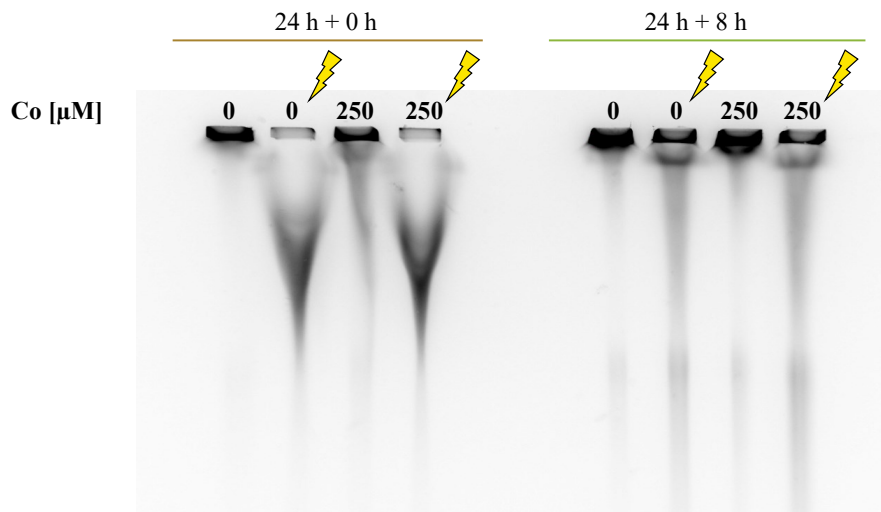


Abbildung 9.13: Repräsentatives Agarosegel einer Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE). Dargestellt ist ein exemplarisches Agarosegel, in welchem HeLa S3-Zellen für 24 h mit 250 μM Cobaltchlorid vorinkubiert, mit 80 Gy bestrahlt und 0 h sowie 8 h nachinkubiert wurden. Zusätzlich wurde eine nicht bestrahlte Kontrolle sowie nicht bestrahlte Inkubationen mitgeführt.

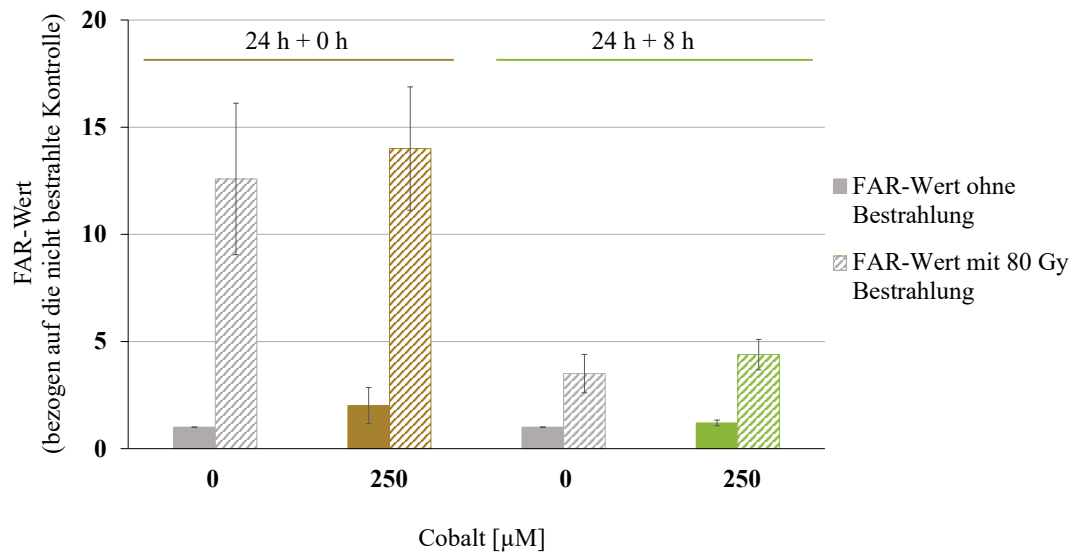


Abbildung 9.14: Einfluss von Cobalt auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSB) mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE). Die Zellen wurden für 24 h mit Cobaltchlorid behandelt, mit 80 Gy bestrahlt und für 0 h und 8 h nachinkubiert. Der *fraction of activity released* (FAR)-Wert diente der Auswertung. Dargestellt sind drei, in Doppelbestimmung durchgeführte, unabhängige Versuche \pm Standardabweichung.

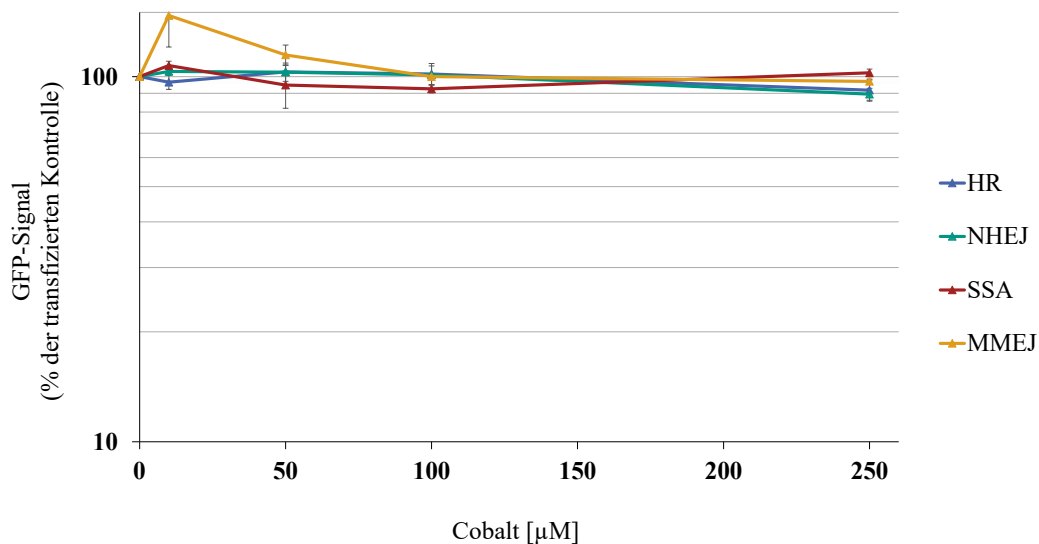


Abbildung 9.15: Einfluss von Cobalt auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSB) in U2OS-Zellen mittels Reporter-Assay. Die Zellen wurden mit dem I-SceI für 6 h transfiziert, anschließend für 66 h mit Cobaltchlorid inkubiert und das GFP-Signal auf die Kontrolle bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung.

Nickel

In Abbildung 9.16 ist die Viabilität von HeLa S3-Zellen unter Einfluss von Nickelchlorid gezeigt. Abbildung 9.17 zeigt den ATP-Gehalt. Dabei wurden Versuche ohne und mit 80 Gy Bestrahlung durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass kein zytotoxischer Effekt bis 500 μM Nickelchlorid beobachtet werden konnte. Eine Konzentration von 1000 μM zeigte einen leicht-zytotoxischen Einfluss auf die Zellzahl und CFA, während der ATP-Gehalt auf 25 % der Kontrolle sank. Zudem wurden Experimente zum Einfluss von Nickelchlorid auf die Reparatur von DNA-DSB durchgeführt. Abbildungen 9.18, 9.19 und 9.20 zeigen den Einfluss von Nickelchlorid auf die Reparatur von DNA-DSB. Dabei sind in den Abbildungen 9.18 und 9.19 Ergebnisse zur PFGE aufgeführt, während Abbildung 9.20 den Reporter-Assay unter Einfluss von Nickelchlorid zeigt. Es konnte gezeigt werden, dass Nickelchlorid im ausgewählten Konzentrationsbereich DNA-DSB bereits ab 500 μM erzeugt und die Reparatur von DNA-DSB inhibiert. Versuche mit 80 Gy Bestrahlung wurden teilweise in Zusammenarbeit mit Frau Ann-Kathrin Kull im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

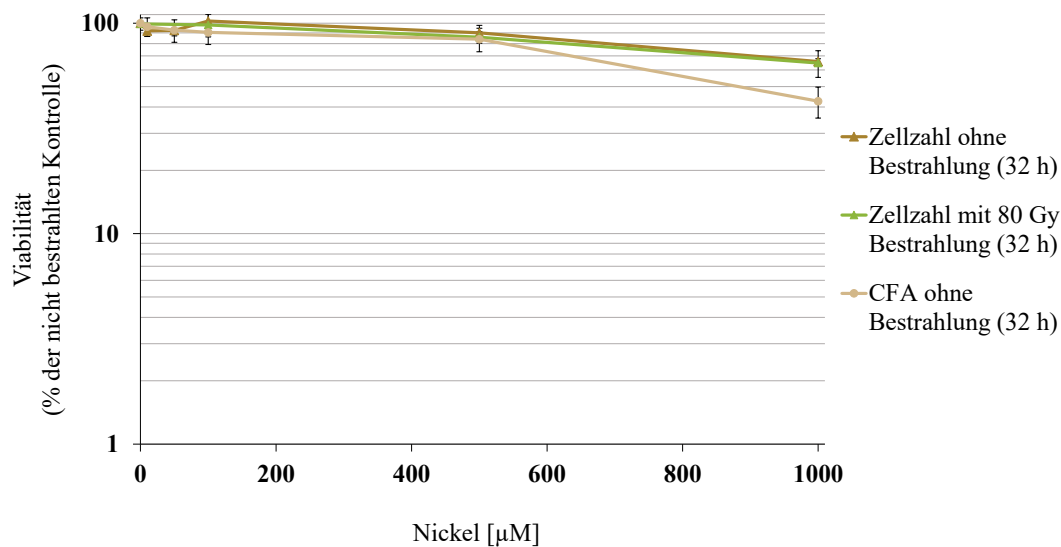


Abbildung 9.16: Einfluss von Nickel auf die Viabilität von HeLa S3-Zellen. Gezeigt ist die Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit (CFA) von HeLa S3-Zellen nach einer Inkubation mit Nickelchlorid. Hierfür wurden Konzentrationen von 10 μM bis 1000 μM eingesetzt. Die Zellen wurden für 32 h inkubiert bzw. für 24 h vorinkubiert, mit 80 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung.

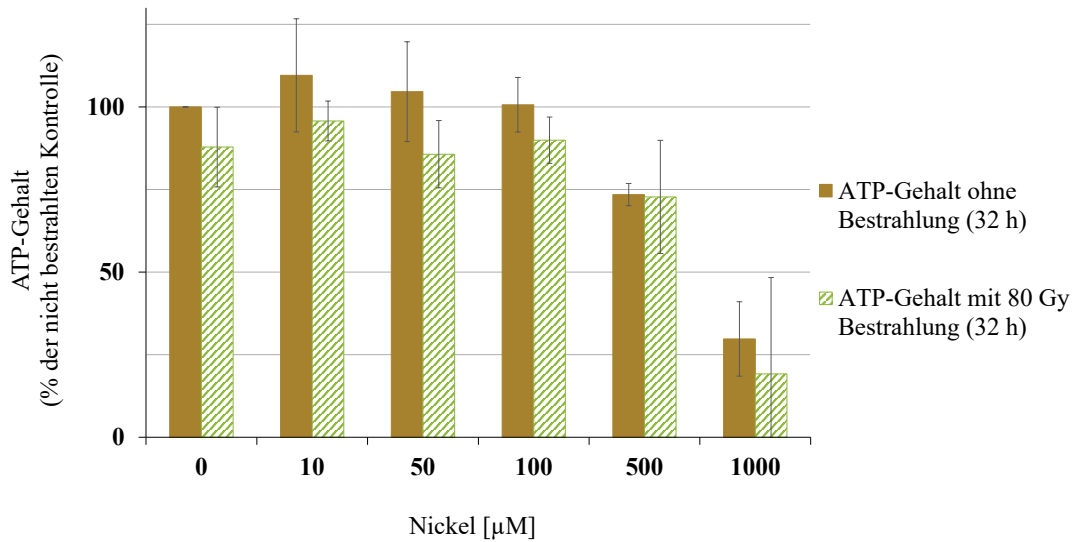


Abbildung 9.17: Einfluss von Nickel auf die metabolische Aktivität von HeLa S3-Zellen. Die Zellen wurden für 32 h mit Nickelchlorid inkubiert bzw. für 24 h vorinkubiert, mit 80 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung.

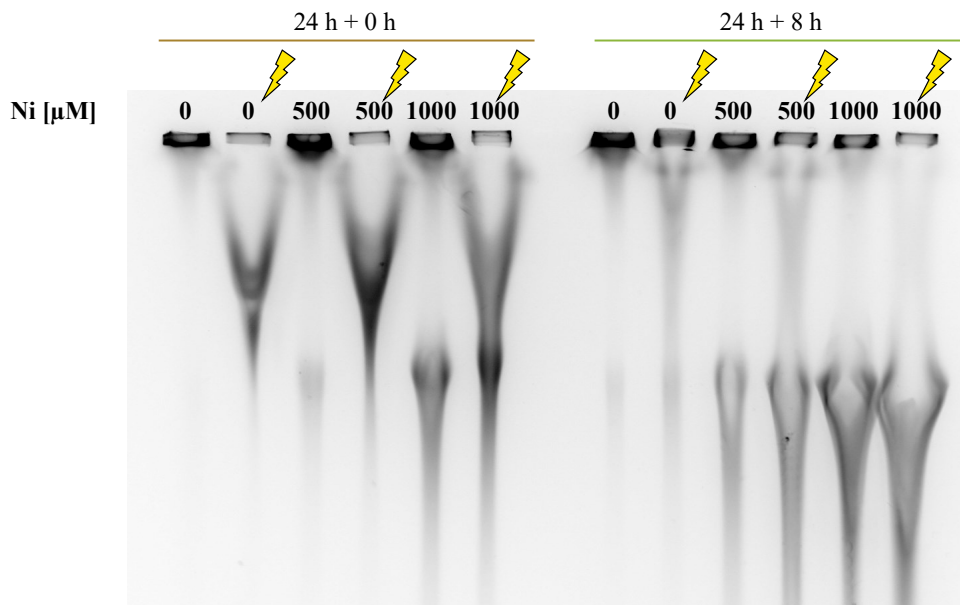


Abbildung 9.18: Repräsentatives Agarosegel einer Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE). Dargestellt ist ein exemplarisches Agarosegel, in welchem HeLa S3-Zellen für 24 h mit 500 μM und 1000 μM Nickelchlorid vorinkubiert, mit 80 Gy bestrahlt und 0 h sowie 8 h nachinkubiert wurden. Zusätzlich wurde eine nicht bestrahlte Kontrolle sowie nicht bestrahlte Inkubationen mitgeführt.

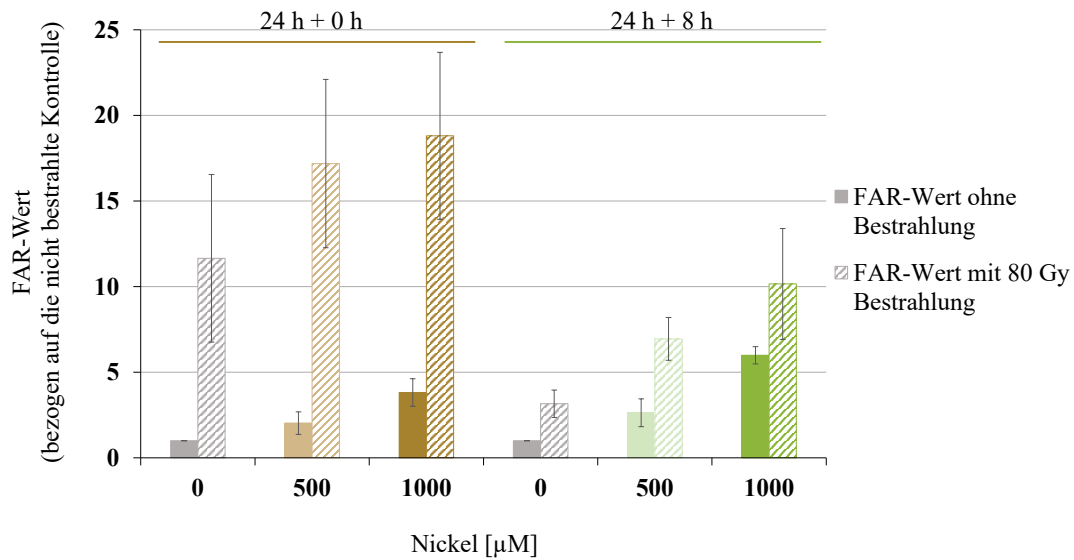


Abbildung 9.19: Einfluss von Nickel auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSB) mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE). Die Zellen wurden für 24 h mit Nickelchlorid behandelt, mit 80 Gy bestrahlt und für 0 h und 8 h nachinkubiert. Der *fraction of activity released* (FAR)-Wert diente der Auswertung. Dargestellt sind drei, in Doppelbestimmung durchgeführte, unabhängige Versuche \pm Standardabweichung.

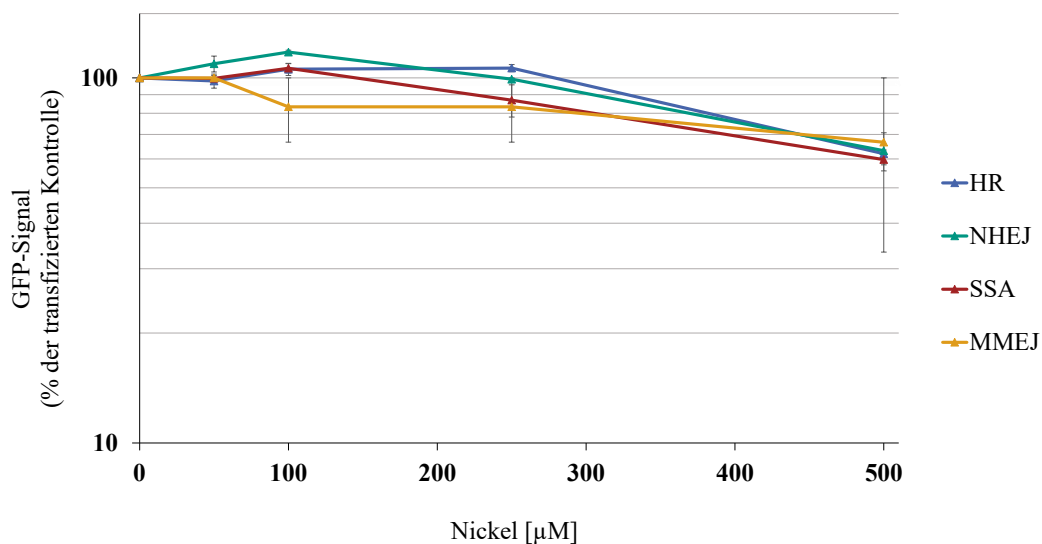


Abbildung 9.20: Einfluss von Nickel auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSB) in U2OS-Zellen mittels Reporter-Assay. Die Zellen wurden mit dem I-SceI für 6 h transfiziert, anschließend für 66 h mit Nickelchlorid inkubiert und das GFP-Signal auf die Kontrolle bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung.

Reporter-Assay

Nachfolgend sind Daten zum Einfluss weiterer Metallverbindungen auf die Reparatur von DNA-DSB mit Hilfe des Reporter-Assays aufgeführt. Dabei wurden die löslichen Metallverbindungen Natriumarsenit und Antimonchlorid verwendet. Abbildung 9.21 zeigt den Einfluss von Natriumarsenit auf die Reparatur von DNA-DSB. Es konnte eine Inhibierung der Reparaturwege HR und SSA ab $2,5 \mu\text{M}$ festgestellt werden, während das NHEJ und das MMEJ nicht beeinflusst scheint. Versuche zu Arsen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Christina Gaag im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

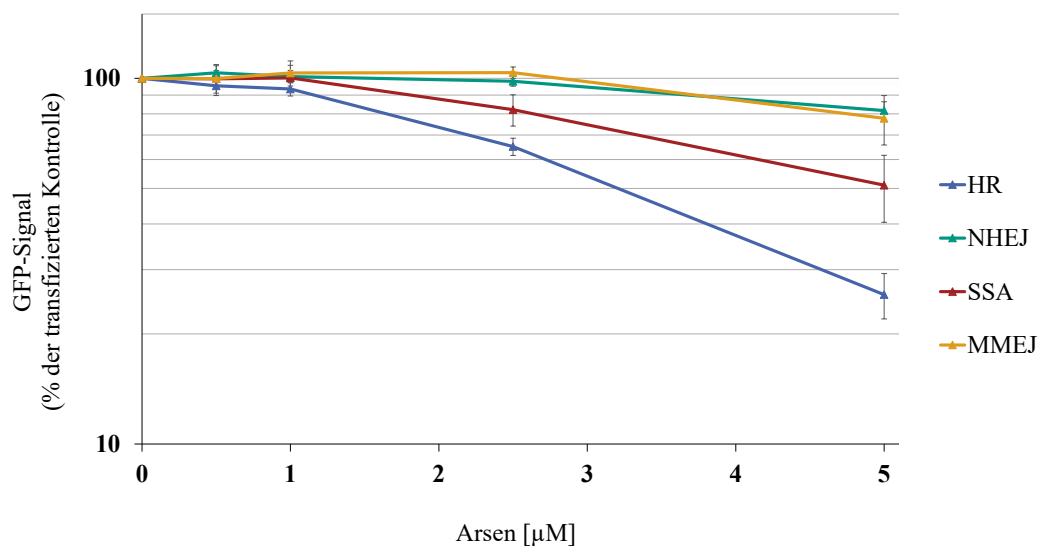


Abbildung 9.21: Einfluss von Natriumarsenit auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSB) in U2OS-Zellen mittels Reporter-Assay. Die Zellen wurden mit I-SceI für 6 h transfiziert, anschließend für 66 h inkubiert und das GFP-Signal auf die transfizierte Kontrolle bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung.

In Abbildung 9.22 ist der Reporter-Assay unter Einfluss von Antimonchlorid gezeigt. Es konnte eine Inhibierung der HR ab $25 \mu\text{M}$ und des SSA ab $50 \mu\text{M}$ festgestellt werden. Das MMEJ scheint bereits ab niedrigen Konzentrationen bis $25 \mu\text{M}$ gehemmt, während das Signal bei einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ wieder anzusteigen scheint. Das NHEJ ist vermutlich nicht beeinflusst. Versuche zu Antimon wurden in Zusammenarbeit mit Frau Christina Gaag im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

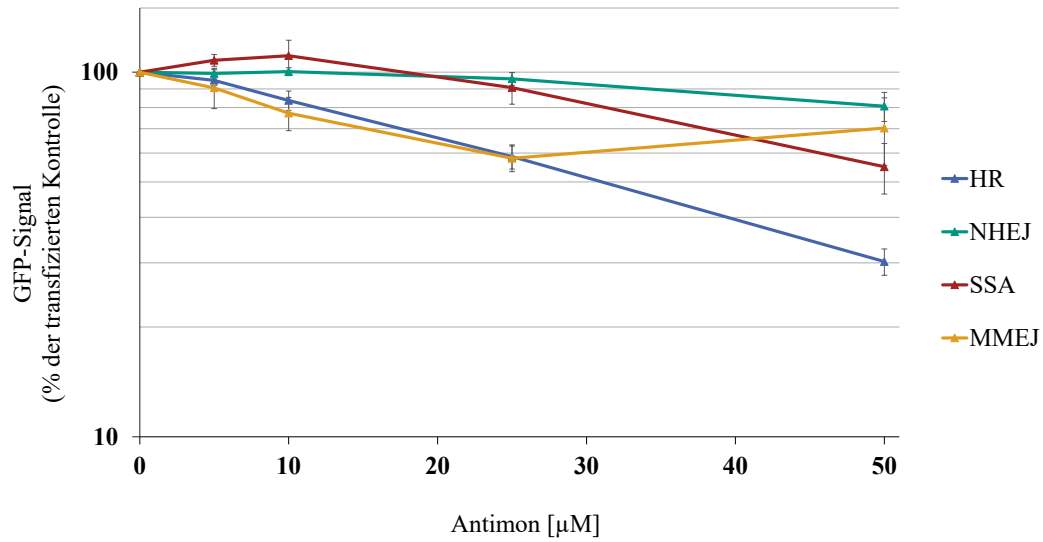


Abbildung 9.22: Einfluss von Antimonchlorid auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSB) in U2OS-Zellen mittels Reporter-Assay. Die Zellen wurden mit I-SceI für 6 h transfiziert, anschließend für 66 h inkubiert und das GFP-Signal auf die transfizierte Kontrolle bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen \pm Standardabweichung.