



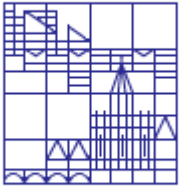
UNIVERSITÄT KONSTANZ
FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
LEHRSTUHL MOLEKULARE TOXIKOLOGIE



Einfluss der Poly(ADP-Ribosyl)ierung auf die genomische Stabilität nach genotoxischer Behandlung in Hamsterzell-Transfektanten

Diplomarbeit von Raphael Hahn

Erstprüfer: Prof. Alexander Bürkle
Zweitprüfer: Prof. Volker Ullrich



UNIVERSITÄT KONSTANZ
FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
LEHRSTUHL MOLEKULARE TOXIKOLOGIE



Ich versichere hiermit, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Falle durch Angabe der Quelle, auch der benutzten Sekundärliteratur, als Entlehnung kenntlich gemacht.

Konstanz, den _____

Unterschrift

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
allg.	allgemein
APS	Amonium persulfat
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
Da	Dalton, Masseneinheit
DBD	DNA bindende Domäne von PARP-1
Dex	Dexamethason
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
DSB	Doppelstrangbrüche
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure (Ethylene diamine tetraacetic acid)
ESB	Einzelstrangbrüche
EtOH	Ethanol
F'ab	IgG AK ohne konstanten Teil (Fc-Teil)
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
GAM	goat-anti-mouse (in der Ziege hergestellter AK, gegen ein Maus-Epitop)
GAR	goat-anti-rabbit (in der Ziege hergestellter AK, gegen ein Kaninchen-Epitop)
h	Stunde (hour)
H ₂ O	Wasser
HeLa	menschlichen Cervix-Karzinomzelllinie
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (High-Performance-Liquid-Chromatography)
HRP	Meerrettichperoxidase (Horse raddish peroxidase)
IgG	Immunglobulin G
k	kilo
m	milli
min	Minute
MP	Magermilchpulver
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NLS	nuclear-localisation-signal

pADPr	poly(ADP-Ribose)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelectrophorese
PARG	Poly(ADP-Ribose)-Glycohydrolase
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase Familie
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1, EC 2.4.2.30
PBS	phosphate buffered saline
RT	Raumtemperatur, ca. 18-20° C
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SSB	Einzelstrangbrüche (single-strand breaks)
TCA	Tri-Chlor-Essigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine
TNT	Tris-NaCl- Tween 20 Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylenesorbitane monolaurate
U/min	Umdrehungen/Minute
μ	mikro

Summary

The formation of poly(ADP-ribose) (pADPr) from nicotinamide-adenine dinucleotide (NAD⁺) is a reaction catalysed in the cell by a family of enzymes called poly(ADP-ribose)-polymerases (PARPs). Among these, poly(ADP-ribose)-polymerase-1 (PARP-1, EC 2.4.2.30) is responsible for the formation of about 90% of total polymer induced by DNA strand breaks, which are potent activators of this enzyme. The product, pADPr, is transferred to acceptors, mainly PARP-1 itself and other nuclear proteins. PARP-1 has been shown to be necessary for maintaining genome stability, via interaction and complex formation with proteins of the DNA repair machinery.

In this study a cell line was used carrying inducible transgenes for either full length PARP-1 or its DNA binding domain (DBD), the latter being known to inhibit the binding of endogenous PARP-1 to DNA strand breaks. These cells served as a system for up- or down regulation of PARP-1 activity, in order to investigate the influence of the enzyme for genome stability after DNA damage induction by the alkylating agent MNNG or bleomycin. Integrity of the genome was assessed by scoring micronucleus formation.

I was able to show a significant increase of micronucleus formation in DBD-expressing cells after treatment with bleomycin. Vice versa the over expression of PARP-1 led to a drastic decrease of micronuclei formation after DNA damage induction. A similar increase or decrease in genomic stability was also shown in previous papers by corresponding changes in sister-chromatid exchange frequency. Additionally, cells lacking PARP-1 activity were more prone to undergo apoptosis after DNA-damaging treatment, which is an indication for impaired DNA repair capacity. Consistent with other reports was also the finding that overexpression of PARP-1 in COMF10 cells did not lead to protection from cytotoxicity, but actually increased necrotic cell death at high MNNG concentrations.

Although the molecular mechanism of PARP-1 action has not yet been elucidated there is clear evidence for a contribution to base-excision-repair (BER) and a regulatory role in homologous recombination. Overall these results suggest that PARP-1 plays an important role for DNA damage recovery in the cell. A beneficial, cytoprotective effect of PARP-1 activity has been shown here, manifested as reduced micronuclei formation and reduced apoptosis.

Inhaltsverzeichnis

<u>SUMMARY</u>	<u>III</u>
<u>1 EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1 Poly(ADP-Ribosyl)ierung	1
1.1.1 SYNTHESE UND ABBAU	1
1.1.2 POLY(ADP-RIBOSE)-POLYMERASE-1 (PARP-1)	2
1.1.3 PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER PARP-1	3
1.1.4 PATHOPHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER PARP-1	4
1.1.5 HEMMUNG DER PARP-1	6
1.2 Mikrokerne	7
1.2.1 DEFINITION	7
1.2.2 ENTSTEHUNG	7
1.2.3 MIKROKERNE ALS MARKER FÜR GENOMISCHE STABILITÄT	8
1.3 Bleomycin	9
1.4 N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG)	10
1.5 Zielsetzung der Diplomarbeit	10
<u>2 MATERIAL</u>	<u>11</u>
2.1 Zellen	11
2.1.1 COM3	11
2.1.2 COR3	11
2.1.3 COMF10	11
2.1.4 COR4	11
2.2 Chemikalien und Reagenzien	12
2.3 Zellkulturmedien	13
2.4 Geräte und sonstige Materialien	14
2.5 Puffer und Lösungen	15
<u>3 METHODEN</u>	<u>17</u>
3.1 Zellkultur	17
3.1.1 ALLGEMEINES	17
3.1.2 KULTIVIERUNG	17
3.1.3 PASSAGIEREN	17
3.1.4 ZELLZAHLBESTIMMUNG	17
3.1.5 KRYOKONSERVIERUNG VON ZELLEN	17

3.1.6	AUFTAUEN VON ZELLEN.....	18
3.1.7	SUBKLONIERUNG VON COM3-, COMF10-ZELLEN	18
3.2	Biochemie und Molekularbiologie.....	19
3.2.1	TOXIZITÄTSNACHWEIS MIT ALAMARBLUE.....	19
3.2.2	WESTERN-BLOT VON PROTEINEN (WESTERNBLOT).....	19
3.2.3	MIKROKERNBESTIMMUNG.....	20
3.2.4	NACHWEIS DER TRANSGEN-EXPRESSION.....	21
3.2.5	NACHWEIS VON DOPPELSTRANGBRÜCHEN.....	22
3.2.6	NACHWEIS VON APOPTOSE UND NEKROSE.....	22
3.2.7	ELEKTROPORATION.....	22
3.2.8	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	23
4	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>24</u>
4.1	Nachweis der Transgenexpression	24
4.2	Nachweis der endogenen PARP-1.....	25
4.3	Toxizität von Bleomycin.....	26
4.4	Mikrokernrate in COM3-Zellen nach DBD Expression	28
4.4.1	EINFLUSS VON BLEOMYCIN.....	28
4.5	Mikrokernrate in COMF10-Zellen nach PARP-1-Expression.....	29
4.5.1	EINFLUSS VON BLEOMYCIN.....	29
4.6	Einfluss von PARP-1 auf Apoptose und Nekrose.....	31
4.6.1	UNTERSUCHUNG DER TOXIZITÄT IN COM3- BZW. COMF10-ZELLEN.....	31
4.6.2	VERGLEICH DES APOPTOTISCHEN UND NEKROTISCHEN ZELLTODS.....	31
4.7	Bildung von pADPr nach DNA-Schädigung.....	35
4.8	Bildung von Doppelstrangbrüchen nach DNA-Schädigung.....	35
5	<u>DISKUSSION</u>	<u>38</u>
5.1	Zelllinien mit Dexamethason-induzierbarem Transgen.....	38
5.2	Nachweis der Transgen-Expression in COM3- und COMF10-Zellen.....	39
5.3	Einfluss der Intrinsischen, und extrinsischen Toxizität von Bleomycin.....	39
5.4	PARP-1 Aktivität hat Einfluss auf die Mikrokernrate.....	40
5.5	Untersuchung von COM3-Zellen auf pADPr-Bildung	41
5.6	Untersuchung von COMF10- und COM3-Zellen auf Doppelstrangbrüche.....	41
5.7	Untersuchung des Zelltods nach MNNG-Behandlung.....	42
5.8	Ausblick.....	44
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>46</u>

1 Einleitung

1.1 Poly(ADP-Ribosyl)ierung

1.1.1 Synthese und Abbau

Poly(ADP-Ribosyl)ierung ist eine kovalente, posttranslationale Modifikation von Proteinen. Die Modifikation wird durch Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARPs) durchgeführt, welche ADP-Ribose auf einen Aminosäurerest - Glutamat, Aspartat oder Lysin - übertragen, und in weiteren Schritten zu längeren Poly(ADP-Ribose) (pADPr)-Ketten ausbauen. Dabei entstehen stark verzweigte Ketten mit bis zu 200 ADP-Ribose Einheiten. Aufgrund der beiden negativen Ladungen in jedem ADP-Ribose-Rest erhalten Akzeptorproteine eine negative Ladung, die mit steigender Kettenlänge zunimmt. Diese verändert in vielen Fällen die Funktionseigenschaften des Proteins. Als Substrat dieser Reaktion dient NAD^+ , aus dem unter Abspaltung von Nicotinamid der ADP-Ribosyl-Rest kovalent übertragen wird. Der Abbau von pADPr erfolgt spezifisch durch die Poly(ADP-Ribose)-Glykohydrolase (PARG), die zwischen den beiden Ribose-Einheiten schneidet. Als Abbauprodukt entsteht freie ADP-Ribose (Abb.1).

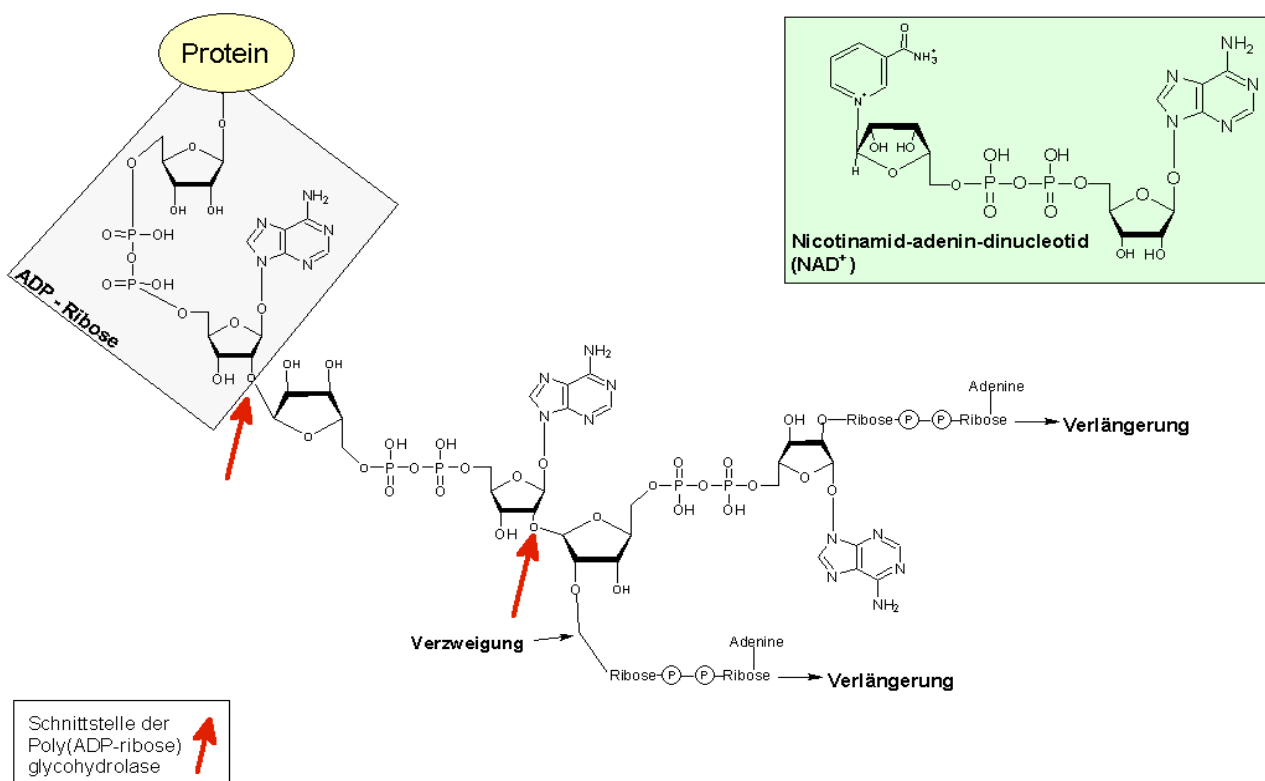


Abbildung 1 Synthese und Abbau von Poly(ADP-Ribose)

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

Nach der Entdeckung des ersten Enzyms der PARP-Familie vor 40 Jahren [1], der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1: EC 2.4.2.30), sind weitere Mitglieder dazugekommen, die alle als gemeinsames Merkmal eine hoch konservierte katalytische Domäne am Carboxy-Terminus besitzen. Zu den bisher sieben nachgewiesenen Mitgliedern (PARP-1, PARP-2, VPARP, Tankyrase-1, Tankyrase-2, sPARP-1, TipARP) vermutet man noch zahlreiche weitere aufgrund von Sequenzhomologien in genomischen Datenbanken [2]. Der allergrößte Teil der in einer Zelle - nach DNA-Schädigung - vorkommenden ADP-Ribosylierungen (ca. 90%) wird aber von PARP-1 durchgeführt.

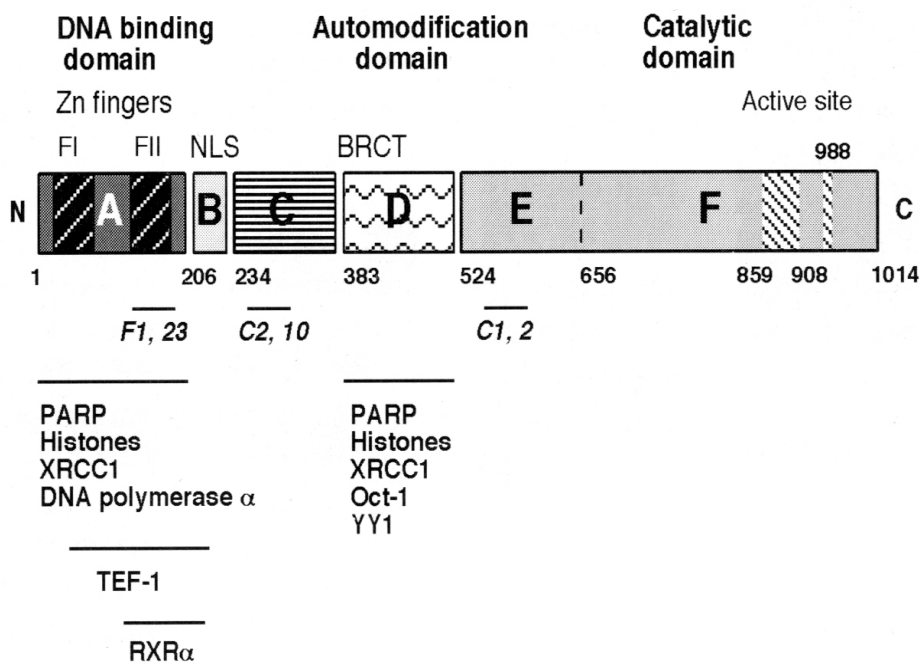


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Domänen der humanen Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP-1). NLS, nuclear localisation signal; BRCT, BRCA1 C-terminus motif; darunter sind die Bindestellen von anti-PARP-1 Antikörpern eingezeichnet; darunter die Bindestellen einiger PARP-Partner (aus [7]).

PARP-1 ist ein 113 kDa großes, nukleäres Protein, das über zwei Zinkfinger an DNA mit Einzel- oder Doppelstrangbrüchen bindet (Abb.2). Nach Bindung an die DNA bildet PARP-1 ein Homo- oder Heterodimer und die katalytische Aktivität steigt um den Faktor 500 [3]. Neben vielen nukleären Proteinen wie Histone, p53 und ATM, dient PARP-1 selber als Hauptakzeptor für die ADP-Ribosylierung. Die Modifikation erfolgt an Glutaminresten in der Automodifikationsdomäne und verringert die Affinität von PARP-1 für DNA-Strangbrüche, und damit ihre katalytische Aktivität. Die ADP-Ribosylierung erreicht ca. 15 min nach DNA-Schädigung ihr Maximum und nimmt dann wieder ab. Dies wird einerseits durch Inaktivierung der PARP-1 mittels Automodifikation erreicht, und andererseits durch den Abbau von pADPr durch PARG.

Die Funktionen der PARP-1 sind vielfältig und umfassen die Bereiche DNA-Reparatur, Zelltod, Zell-Proliferation und Gen-Expression [4][2][5], und PARP-1 kann dabei eine physiologische oder pathophysiologische Rolle einnehmen.

1.1.3 Physiologische Bedeutung der PARP-1

Die Aktivierung der PARP-1 stellt eines der frühesten Ereignisse der Zelle nach DNA-Schädigung dar. Bei PARP-1 knock-out Mäusen (ohne funktionelles PARP-1 Gen) oder nach Inhibition der Poly(ADP-Ribosyl)ierung beobachtet man eine erhöhte genetische Instabilität, gekennzeichnet durch erhöhte Mikrokernbildung, Schwester-Chromatid-Austauschrage und Gen-Amplifikation [6] [4]. Die Strukturen in der PARP-Familie verschiedener Spezies sind hoch konserviert. Im Bereich der katalytischen Domäne (aa 859-908) ist sie vom Mensch bis zur Pflanze fast 100 % homolog [7] (Abb.2). Dies ist zusätzlich ein Indiz für eine wichtige Rolle von PARP-1 für die Zelle und den ganzen Organismus. Beim Vergleich zwischen PARP-1 Aktivität und der Lebenserwartung von 11 verschiedenen Säugetieren konnte gezeigt werden, dass beide positiv korrelieren [8].

Einfluss von PARP-1 in der Basen Exisions Reparatur (BER)

Aus unterschiedlichen experimentellen Ansätzen geht PARP-1 als ein wichtiger Faktor für die Basen Exisions Reparatur (BER) hervor [2]. Hemmung von PARP-1 durch DBD-Überexpression oder Zugabe von Inhibitoren führt zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Substanzen wie Monoalkylanzien und ionisierender Strahlung. 3-Aminobenzamid (3-AB) führt zum Beispiel zu einer verzögerten DNA-Strangbruch Reparatur und erhöht auch die Schwester-Chromatid-Austauschrage sowie unplanmäßige DNA-Synthese [9]. Zur möglichen Funktion ist bekannt, dass PARP-1 Teil des BER Multi-Enzym-Komplexes ist, zudem auch XRCC1, DNA-Ligase III und Polymerase-β gehören. Die Rolle von PARP-1 in der BER ist noch nicht vollständig geklärt. Man vermutet, dass PARP-1 an SSB, die während der BER entstehen, bindet und diese stabilisiert. Zusätzlich könnte sie für die Rekrutierung anderer Reparaturenzyme sorgen. Ausserdem könnte durch ihre Aktivität und die dadurch verursachte Umordnung bzw. Öffnung des Chromatins ein erleichterter Zugang für andere Reparaturenzyme geschaffen werden [10].

Einfluss von PARP-1 in der Doppelstrangbruch (DSB) Reparatur

Die Beteiligung von PARP-1 an der Reparatur von DSB wurde von zahlreichen Arbeitsgruppen untersucht, mit teilweise widersprüchlichen Ergebnissen. Während Noel, G. und Kollegen keinen Einfluss von PARP-1 auf die DSB-Reparatur sehen konnten [11] und Schulz *et al.* nur eine indirekt-kontrollierende Funktion sahen [12], konnte in anderen Publikationen ein direkter Einfluss auf die Reparaturkinetik beobachtet werden [13][6]. Dies scheint jedoch teilweise unabhängig von der katalytischen Aktivität von PARP-1 zu sein. Zur Klärung der genauen Rolle von PARP-1 in der Doppelstrangbruch-Reparatur bedarf es noch weiterer Untersuchungen, um ein genaueres Bild der Vorgänge zu erhalten.

1.1.4 Pathophysiologische Bedeutung der PARP-1

Neben den oben beschriebenen positiven Effekten wurde PARP-1 in vielen Fällen als ein Faktor erkannt, dessen Aktivität ein negatives Ergebnis für die Zelle und den Organismus als Ganzes haben kann. Die Hauptursache dafür sieht man darin, dass die Synthese der pADPr einen energiekonsumierenden Prozess darstellt. NAD⁺ ist ein Hauptakzeptor für viele energieerzeugenden Prozesse und stellt in seiner oxidierten Form den wichtigsten Donor für das mitochondriale Elektronen-Transport-System dar. Daraus resultiert ein Energieverlust zum einen durch das Fehlen von NAD⁺ als Akzeptor, und zum anderen durch dessen notwendiger Neusynthese. Viele Reparaturprozesse sind jedoch abhängig vom Vorhandensein ausreichender Energiereserven der Zelle, und auch für den kontrollierten Zelltod, der Apoptose, ist dies essentiell.

PARP-1 im Zelltod

Als Bestätigung dieser Theorie sehen viele die Spaltung von PARP-1 zu Beginn der Apoptose. Dabei wird das in der NLS enthaltene DEVD-Motif erkannt, und durch Caspase-7 oder Caspase-3 in zwei Fragmente gespalten (89 kDa und 24 kDa) [9]. Die Schnittstelle trennt die katalytische- von der DNA-bindenden Domäne. Letztere kann jedoch immer noch an Strangbrüche in der DNA binden und sorgt so für eine dominant-negative Inhibierung von PARP-1. Dies stellt für die Zelle einen sinnvollen Mechanismus dar, mit dem sie ihre restlichen Energiereserven schützt, um den für den Organismus günstigeren Weg des programmierten Zelltods gehen zu können. Diese Theorie hat sich jedoch als unzureichend erwiesen, da neuere Befunde die Bildung von Homo- und Heterodimeren mit dem 40 kDa Carboxy-Terminus von PARP-1 gezeigt haben. Diese sind, unabhängig von DNA, zur Auto-Poly(ADP-Ribosyl)ierung fähig [14].

Der Weg der Apoptose als Zelltod ist für den Organismus vorteilhafter als der nekrotischer Zelltod, da durch diesen keine unkontrollierte Freisetzung von Radikalen und anderer Metabolite erfolgt. Dieses kann zu einer Schädigung benachbarter Zellen oder einer Entzündungsreaktion führen. Nekrose kann durch PARP-1 ausgelöst werden, und zwar bei exzessiven Schäden, die zu einer Überaktivierung der PARP-1 führen. Die Erschöpfung der NAD⁺- und daraus resultierend der ATP-Vorräte blockiert die Apoptose und führt zur Nekrose (Abb.3). In Fibroblasten, die aus PARP-1^{-/-}-Mäusen gewonnen wurden, führt eine Schädigung mit MNNG nicht zur Apoptose, wie es bei PARP-1 Wildtyp Fibroblasten der Fall ist [15]. Damit fungiert PARP-1 offensichtlich als ein Hauptschalter zwischen Apoptose und Nekrose, wobei PARP-1 bei geringen Schädigungen einen positiven Einfluss auf die Reparatur von DNA-Schäden hat, und bei irreparablen Schädigungen zusammen mit anderen Reparaturenzymen ausgeschaltet wird, um Apoptose gewährleisten zu können.

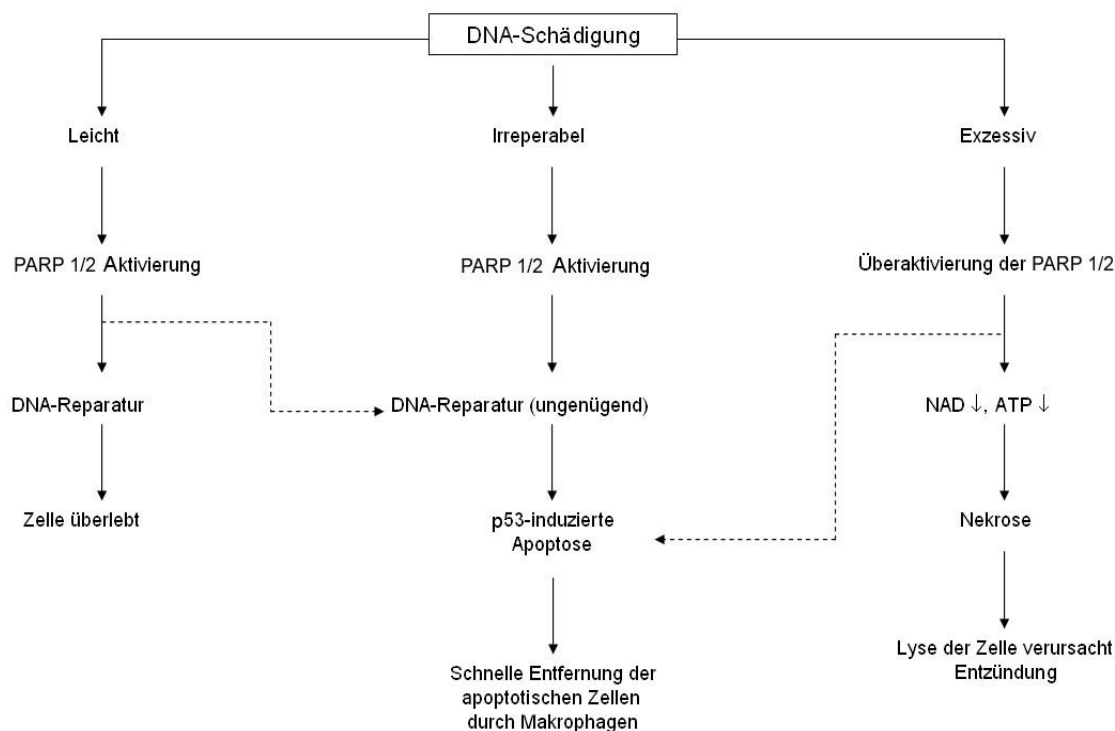


Abbildung 3: Das Maß an DNA-Schädigung legt das Schicksal der Zelle fest: Überleben, Apoptose, oder Nekrose. Dabei ist PARP bei einer leichten Schädigung vorteilhaft, während bei schweren Schäden Nekrose durch Erschöpfung der NAD/ATP-Vorräte ausgelöst wird (verändert nach [9]).

Rolle von PARP-1 in Erkrankungen

Wie im oberen Abschnitt beschrieben, kann die Überaktivierung von PARP-1 zu Zelltod durch Nekrose führen. Daraus resultiert die Beteiligung von PARP-1 an zahlreichen Krankheiten, wie z.B. Diabetes mellitus, Ischämie-Reperfusion-Verletzung, chronisch-entzündliche Krankheiten oder Schlaganfall [9][4], um nur einige davon zu nennen. 1997 konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass PARP-1 knock-out Mäuse resistent gegen Gehirn-Ischämie sind. Die Hemmung von PARP-1 durch neue, potente Inhibitoren ist deshalb in das Interesse der Pharmakologie gerückt.

Die Hemmung soll die Depletion der Energiereserven in der Zelle durch PARP-1 verhindern. Diese werden gerade bei akuten oder chronischen Krankheiten im Zusammenhang mit der Überproduktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies benötigt, um die Schädigung von Geweben zu verhindern [16].

Bei Befunden im Bezug auf Krankheiten in PARP-1 knock-out Mäusen ist die Funktion von PARP-1 als Coaktivator von NF- κ B ein wahrscheinlich sehr wichtiger Faktor, da NF- κ B als Transkriptionsfaktor für zahlreiche pro-inflammatorische Gene wie z.B. iNOS, IL-1 oder TNF- α dient. Es wurde gezeigt, dass die katalytische Aktivität keinen Einfluss auf die Coaktivatorfunktion von PARP-1 hat, und eine reine Protein-Protein-Interaktion mit p300 und den beiden Untereinheiten von NF- κ B, p50 und p65, dafür verantwortlich ist [17][18].

1.1.5 Hemmung der PARP-1

Zur Hemmung der PARP-1 werden in der Regel Inhibitoren verwendet, die das katalytische Zentrum des Enzyms blockieren. Viele der klassischen Inhibitoren, wie z.B. Nicotinamid oder 3-Aminobenzamid (3AB), wirken dabei als Kompetitoren, indem sie an das katalytische Zentrum von PARP-1 binden. Diese sind jedoch keine potenten Inhibitoren und erreichen nur IC_{50} -Werte im Bereich von 210 μ M für Nicotinamid bis 22 μ M für Benzamide [16]. Durch bessere Kenntnis der katalytischen Domäne von PARP-1 sind heute Inhibitoren erhältlich, die im submikromolaren Bereich hemmen.

Expression der DNA-bindenden Domäne (DBD)

Ein anderes System zur Hemmung der PARP-1 zielt auf die, für die Aktivität notwendige, Bindung des Enzyms an die DNA ab. Durch Expression der DBD von PARP-1 wird diese daran gehindert, an die DNA zu binden. Der kompetitive Effekt hängt von der Konzentration der DBD in der Zelle ab, sowie von der Anzahl von Schäden [19]. Der inhibitorische Effekt kann z.B. durch hohe Dosen an MNNG oder γ -Strahlung aufgehoben werden. Das System bietet den Vorteil, dass nur die PARP-Proteine gehemmt werden, die durch Bindung an die DNA aktiviert werden (PARP-1/2). Auf die Verwendung von Inhibitoren auf chemischer Basis kann verzichtet, und so unerwünschte Nebenwirkungen ausgeschlossen werden. Ein großer Unterschied bei dieser Art der Hemmung ist - wie man später herausfand -, dass die Zellen nach Schädigung durch z.B. MNNG weiterhin große Mengen an NAD^+ verbrauchen, obwohl keine pADPr gebildet wird [20]. Grund könnte die Wirkweise von PARP-1 als Dimer sein. Eine Interaktion von PARP-1 mit der an die DNA gebundenen DBD könnte weiterhin eine Aktivierung der katalytischen Domäne zur Folge haben. Da aber, anders als bei einem Homodimer, dann der Akzeptor fehlt, sollte die Reaktion als Hydrolyse mit Wasser ablaufen. Als Bildungsprodukt würde freie NAD-Ribose entstehen.

1.2 Mikrokerne

1.2.1 Definition

Mikrokerne sind kleine Zellkerne, die maximal ein Viertel der Größe eines normalen Zellkerns haben und vom Hauptkern separiert vorliegen. Sie besitzen eine vollständige Kernmembran mit Poren und liegen innerhalb der Zelle im Zytoplasma in geringer Entfernung in Nachbarschaft zum Zellkern vor. Sie enthalten DNA in Form von Chromosomenfragmenten oder vollständigen Chromosomen, je nach Art ihrer Entstehung. Als Beispiel für einen Mikrokern siehe Abb. 4.

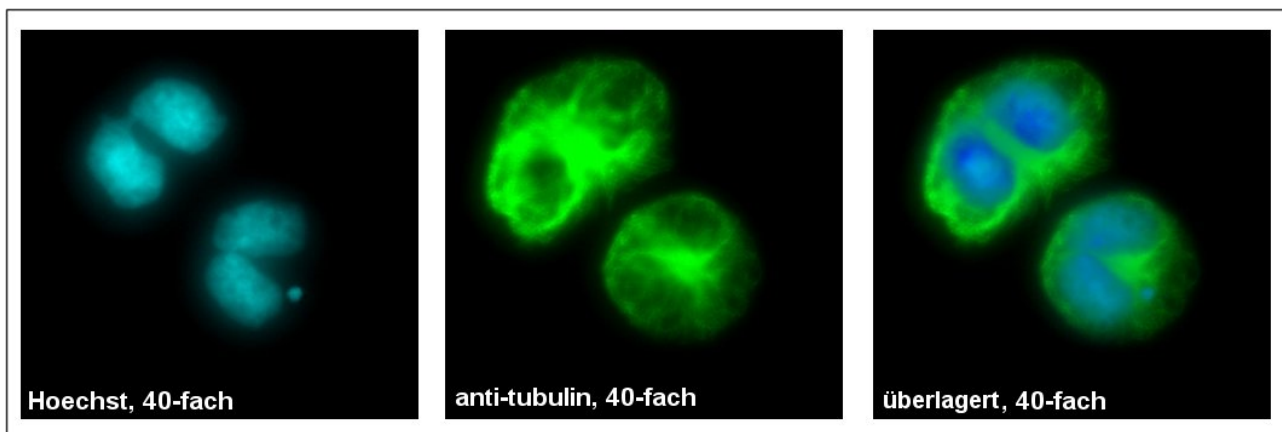


Abbildung 4: Zwei binukleäre COMF-10 Zellen, eine davon mit Mikrokern (unten rechts). Behandelt mit 6 μg Cytochalasin und 10 $\mu\text{g/ml}$ Bleomycin für 1h. Immunfärbung mit anti- α -Tubulin + Alexa488 und Hoechst 33342.

1.2.2 Entstehung

Mikrokerne entstehen während der Mitose einer Zelle. Dabei wird nicht das gesamte Erbgut der Zelle zu den beiden Spindelpolen separiert, sondern es bleiben Teile davon in der Mitte der beiden Spindelpole zurück. Die Menge an DNA, die während der Anaphase zurückbleibt, ist unterschiedlich und kann auch ganze Chromosomen beinhalten. Während der Telophase der Mitose bildet sich um diese Fragmente eine voll-funktionsfähige Kernmembran aus.

Als Ursache für die Entstehung von Mikrokernen kommen Defekte von Proteinen in Frage, die sich direkt oder indirekt auf den Aufbau und die Funktion des Centrosoms sowie der Spindelapparatur auswirken. Eine Quelle für Mikrokerne sind des Weiteren alle Schädigungen der DNA, die zur Fragmentierung durch z.B. Doppelstrangbrüche führen [21].

Die Substanzen werden nach der Ursache, die zur Entstehung der Mikrokerne führen, in Klastogene- oder Aneugene-Substanzen eingeteilt. Diese lassen sich durch das Vorhanden- oder Nicht-Vorhandensein eines Centromers im Mikrokern unterscheiden. Klastogene Substanzen sind zum Beispiel Bleomycin, Etoposide oder Mitomycin, und führen zu Chromosomenfragmenten durch

Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen. Aneugene Substanzen sind zum Beispiel Kolchizin oder Diethylstilbestrol -, sogenannte Spindelgifte - die meist zum Verlust ganzer Chromosomen mit intaktem Centromer führen. Eine Färbung mittels Antikörper spezifisch gegen Centromer-Proteine macht eine Unterscheidung möglich. In Abbildung 5 sind die Ursachen gezeigt, die zur Entstehung von Mikrokernen führen können.

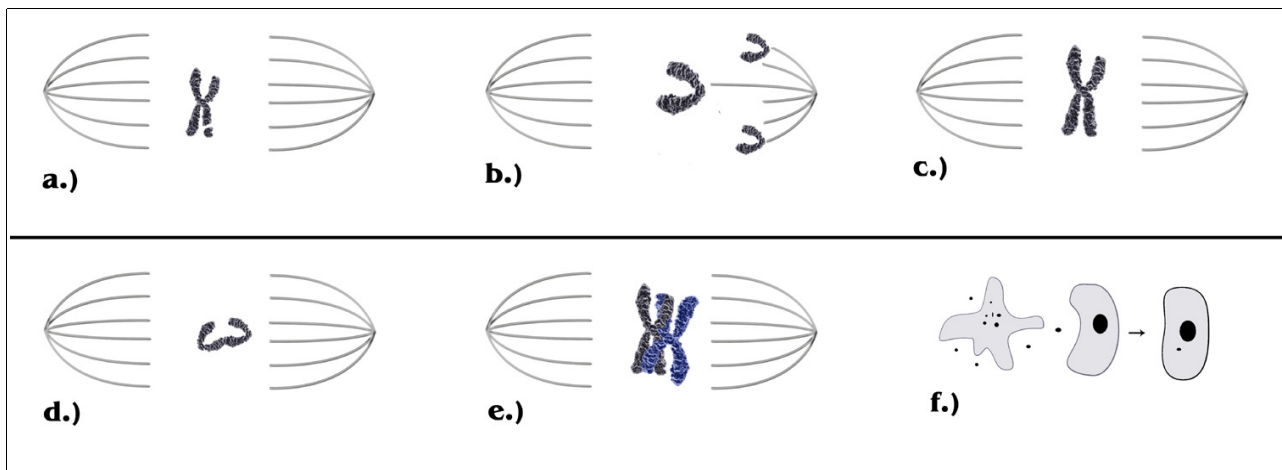


Abbildung 5: Möglichkeiten der Mikrokernentstehung: a.) Chromosomen- bzw. Chromatidbrüche b.) zurückbleibende Chromatide bei Spindeldefekten c.) Störung des Kinetochor und ausbleibende Teilung d.) wegen Brückenbildung verhinderte Separation e.) Verhaken der Chromosomen f.) Phagozytose apoptotischer Körperchen

1.2.3 Mikrokerne als Marker für genomische Stabilität

Schon vor der Entdeckung der DNA und der Erkenntnis ihrer Natur als Informationsträger von Genen, hatte man erkannt, dass man Mutationen in Pflanzen und Tieren durch Einwirkung von Strahlung und Chemikalien hervorrufen kann. Mit der Strukturaufklärung der DNA im Jahre 1953 durch Watson, Crick und Franklin wurde die Veränderung von einzelnen Basen in einem Gen als Mutationsursache erkannt.

Weltweit gibt es seither Bemühungen, möglichst viele Substanzen auf ihre mutagene Wirkung hin zu untersuchen. In Europa hat zum Beispiel die EU im Jahr 2001 eine Richtlinie erarbeitet - das so genannte Weißbuch – in dem die Risikobeurteilung von Chemikalien neu geregelt wird. Für all diese Maßnahmen sind geeignete Methoden gefragt, um genotoxische, bzw. mutagene Wirkungen von Chemikalien zu untersuchen. Diese sollten zuverlässig, preiswert und sensitiv sein.

Der Mikrokerntest

Der Mikrokerntest, der die durch Substanzen verursachte Induktion von Mikokernen misst, hat sich hierbei als sehr brauchbar erwiesen und wurde vielfach überarbeitet und verbessert. Er stellt heute eines der am häufigsten verwendeten Systeme zur Mutationsuntersuchung dar [21].

Dabei hat sich die Zytokineseblock-Methode als besonders zuverlässig erwiesen. Hier wird dem Kulturmedium Cytochalasin zugesetzt, um eine Zytokinese zu unterdrücken. Cytochalasin hemmt die Aktinpolymerisation und verhindert so die Bildung des kontraktilen Rings am Ende der Mitose. Dadurch wird eine Abschnürung in zwei Zellen verhindert. Die Karyokinese wird dadurch nicht beeinflusst, was am Ende zur Bildung von Zellen mit zwei Kernen führt. Durch die selektive Erfassung von binukleären Zellen wird eine Verfälschung des Ergebnisses durch sich nicht teilende Zellen verhindert. Dies ist ein wichtiges Kriterium, da viele Zellen nach Einwirkung eines Mutagens die Fähigkeit zur Teilung verlieren [22][23]. Die Auszählung erfolgt mittels Fluoreszenzmikroskopie. Dabei werden die Kerne mit Hoechst 33342 angefärbt. Ein zusätzlicher Antikörper gegen α -Tubulin wird für die Anfärbung des Zytoplasmas verwendet, um erstens zweifelsfrei eine binukleäre Zelle identifizieren zu können, und zweitens sicher zu sein, dass ein Mikrokern im Zytoplasma der Zelle vorliegt und nicht außerhalb der Zelle lokalisiert ist.

1.3 Bleomycin

Bleomycin ist ein ca. 1500 Da großes, wasserlösliches Glykopeptid, das von *Streptomyces verticillus* produziert wird [24]. Es ist cytotoxisch, und wird als Chemotherapeutikum verwendet. Es kommt in verschiedenen Varianten vor, die sich durch eine Modifikation des Zuckerrests am aminoterminalen-Ende unterscheiden. Bleomycin hat verschiedene Untereinheiten, die verantwortlich sind für die Aufnahme von Bleomycin in die Zelle, die Bindung von Metallionen (vorwiegend Eisen oder Kupfer) und die Bindung an die DNA. Wegen seiner Wasserlöslichkeit und seiner Größe kann Bleomycin die Zellmembran nicht passieren und muß aktiv von der Zelle aufgenommen werden. Den genauen Mechanismus der Aufnahme in die Zelle kennt man bis jetzt nicht. Nach Aufnahme in die Zelle bindet es an die DNA und in einer Reaktion des gebundenen Metallions mit Sauerstoff werden verschiedene Radikale erzeugt, die die DNA schädigen und zu Strangbrüchen führen. Dabei treten Doppelstrangbrüche viel häufiger auf als Einzelstrangbrüche [25] und ein einziges Molekül kann die DNA an mehreren Stellen schädigen. Bleomycin kann von der Bleomycin-Hydrolase abgebaut werden, solange es kein Eisen gebunden hat.

In der Zytotoxizität unterscheidet sich Bleomycin von allen anderen Chemotherapeutika. Die übliche sigmoidale Kurve die man erhält, wenn man eine halblogarithmische Auftragung der Konzentration gegen die Überlebensrate aufzeichnet, weicht erheblich von anderen ab und zeigt eine konkave Aufwärtskrümmung [25]. Genauere Gründe dafür hat man nicht gefunden. Eine Erklärungsmöglichkeit ist die nötige aktive Aufnahme ins Zellinnere und der dortige aktive Abbau durch ein spezifisches Enzym.

1.4 N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG)

MNNG ist ein alkylierendes Agens. Es überträgt einen Methylrest auf die DNA an verschiedenen Stellen, mit N⁷-Methylguanin als der häufigsten und O⁶-Methylguanin als der schädlichsten Modifikation. Die Zelle kann den Schaden durch die Basen-Exzisions-Reparatur reparieren, bei der die modifizierte Base erkannt, herausgeschnitten und danach durch Neusynthese und Ligation ersetzt wird. Die durch MNNG verursachten Schäden sind stark mutagen.

MNNG ist instabil und sensitiv gegen Hitze, Licht und Feuchtigkeit. Es zersetzt sich sehr schnell durch Behandlung mit einer 10 %igen Lösung des stark reduzierend-wirkenden Thiosulfats.

1.5 Zielsetzung der Diplomarbeit

Wie in der obigen Einleitung bereits beschrieben, zeichnet sich für PARP-1 viel wichtige Funktionen in der zellulären Physiologie ab, die abhängig von den Bedingungen in der Zelle einen positiven oder negativen Einfluss haben können. Bisherige Untersuchungen des Einflusses von PARP-1 für die genomische Stabilität untersuchten meistens die Schwester-Chromatid-Austauschrate nach Schädigung mit Alkylierenden Agenzien oder durch Ionisierende Strahlung [26][27]. Einen Einfluß von PARP-1 in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen, wie sie hauptsächlich durch Bleomycin verursacht werden, brachte bis jetzt keine schlüssigen- und teilweise sogar konträren-Aussage hervor [6][11][12][13].

In dieser Diplomarbeit soll die Funktion der PARP-1 in der Zelle untersucht werden. Das hierbei verwendete System der induzierbaren PARP-1-Überexpression, bzw. -Hemmung soll benutzt werden, um im Zellsystem den Einfluss nach genotoxischer Behandlung aufzuklären. Als Meßgröße für das Auftreten genomischer Störungen sollen die Mikrokernbildung und das Einsetzen von Apoptose und Nekrose verwendet werden. Als Verursacher der genomischen Instabilität soll Bleomycin und MNNG verwendet werden.

Die Arbeitshypothese die dabei verfolgt wird, geht von einem für die Zelle positiven Effekt aus wenn PARP-1 in der Zelle vorhanden ist und physiologisch, in Form einer Aktivierung, wirksam werden kann. Umgekehrt wird in diesem System ein negativer Effekt erwartet, wenn PARP-1 dazu nicht in der Lage ist. Dies wird auf Beobachtungen und Ergebnisse gestützt, die man durch andere Marker für genomische Instabilität gemacht hat [26][27].

2 Material

2.1 Zellen

<i>Zellen</i>	<i>Plasmide</i>	<i>Selektionsplasmide</i>	<i>Herkunft</i>
COM3	DBD (pPARP125) + HGO	pTKneo + pTKhygro	J.H. Küpper, DKFZ Heidelberg
COR3	HGO	pTKhygro	J.H. Küpper, DKFZ Heidelberg
COMF10	PARP-1 (pPARP93) + HGO	pTKneo + pTKhygro	R. Meyer, DKFZ Heidelberg
COR4	HGO	pTKhygro	P.Chambon und H. Gronemeyer, Illkirch-Graffenstaden, France

Alle Zellen wachsen adhärent

2.1.1 COM3

COM-3 Zellen sind SV-40-transformierte CO60 Zellen, die stabil transfiziert wurden. Sie enthalten ein Konstrukt zur Dexamethason-induzierbaren Überexpression der DNA-bindenden Domäne (DBD) der humanen PARP-1 (pPARP125). Zur Verbesserung der Induktion der DBD durch Dexamethason besitzen die Zellen ein Plasmid, das einen Glukokortikoidrezeptor unter Kontrolle des MMTV-Promotors trägt. Die Zellen enthalten zur Selektion zusätzlich Resistenzen für G418 (pTKhygro) und Hygromycin (pTKneo) [28].

2.1.2 COR3

COR3 Zellen sind eine Kontrollzelllinie für COM3 Zellen. Sie tragen nur das Plasmid für die Überexpression des Glukokortikoidrezeptors (HGO). Zur möglichen Selektion sind die Zellen mit einer Hygromycinresistenz cotransfiziert.

2.1.3 COMF10

COMF10 Zellen sind SV-40 transformierte, stabil transfizierte CO60 Zellen. Sie enthalten ein Konstrukt (pPARP93) zur Dexamethason-induzierbaren Überexpression der gesamten codierenden PARP-1 cDNA. Zur Verbesserung der Induktion der DBD durch Dexamethason besitzen die Zellen ein Plasmid das einen Glukokortikoidrezeptor unter Kontrolle des MMTV-Promotors trägt. Die Zellen enthalten zur Selektion zusätzlich Resistenzen für G418 und Hygromycin [26].

2.1.4 COR4

COR4 Zellen sind die Vorläuferzellen, aus denen durch Transfektion des PARP-1 Gens die COMF10 Zellen entstanden sind. Sie tragen nur das Plasmid für die Überexpression des Glukokortikoidrezeptors (HGO) und das, für die Selektion notwendige, Plasmid mit dem Hygromycin Resistenz-Gen (pTKhygro).

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Zellkulturreagenzien

DMEM (41965-039)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
FCS	Biochrom AG/ Seromed, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA (0,25 %)	Invitrogen (45300-019)

Chemikalien

AlamarBlue	BioSource (DAL 1010)
APS (Aminopropyltriethoxysilane)	Fluka (09324), Buchs, Schweiz
Aqua PolyMount	Polysciences (18606), Warrington, USA
Biotinylated SDS Broad Range Marker	BioRad (161-0319), München, Deutschland
Bleomycin-Sulfat	Sigma (B8416), München, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma (B 5525), München, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Merk (L.40614404), Darmstadt, Deutschland
Cytochalasin B	Sigma (C 6255), München, Deutschland
Dexamethason	Sigma (D-1756), München, Deutschland
DMSO	Sigma (D2650), München, Deutschland
Ethanol	Roth (CL 4025), Karlsruhe, Deutschland
G418 (Geneticin)	PAA GmbH (P11-001), Cölbe, Deutschland
Glycerin	Roth (3783.1), Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Sigma (1440), München, Deutschland
Hoechst 33342	MolekularProbes (H 1399), Leiden, Niederlande
Hygromycin B (400052)	Calbiochem, Merk, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Fluka (65543), Buchs, Schweiz
Milchpulver, Magermilchpulver	Migros, Schweiz
MNNG	Sigma, München, Deutschland
Paraformaldehyd	Serva (31628), Heidelberg, Deutschland
Prestained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas (SM 0441), Lot 1211
Protease-Inhibitorlösung, Complete	Roche (1836145), Schweiz
Rotiphorese-Gel 30	Roth (3029.1), Karlsruhe, Deutschland
SDS	Serva (20760), Heidelberg, Deutschland
SuperSignal, Peroxidase-Substrat	Pierce (1856150), Bonn, Deutschland

Sytox	MolecularProbes (S7020), Leiden, Niederlande
TEMED	Serva (35925), Heidelberg, Deutschland
Trichloressigsäure	Roth (2066), Karlsruhe, Deutschland
Tris Base	Sigma-Aldrich (T1503), Deutschland
Triton X-100	Sigma (T8787), München, Deutschland
Tween20	Sigma (P 1379), München, Deutschland
Wasserstoffperoxid, H ₂ O ₂	Merck (2110), Darmstadt, Deutschland
Streptavidin-HRP-Komplex	Amersham (RPN 1051), Deutschland
PJ34	Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland

2.3 Zellkulturmedien

DMEM-/-

500 ml	DMEM
50 ml (10%)	FCS
5 ml (5%)	Penicillin G [10 000 U/ml], Streptomycin [10 000 µg/ml] in 0,85% Salzlösung

DMEM+/- (zusätzlich zu DMEM-/-)

2,5 ml	G418 [100 mg/ml]
--------	------------------

DMEM+/+ (zusätzlich zu DMEM-/-)

2,5 ml	G418 [100 mg/ml]
	Hygromycin B [50 mg/ml, 1000 U/mg] (direkt in Zellkulturflasche)
+ 320 µl	auf 20 ml Medium (75 cm ² Kulturflasche)
+ 80 µl	auf 5 ml Medium (25 cm ²)

Einfriermedium

2,1 ml (60%)	DMEM-/-
0,6 ml (20%)	FCS
0,3 ml (10%)	DMSO (steril)

Antikörper

Alle Antikörperverdünnungen wurden in 5 % Magermilch-TNT-Lösung angesetzt
primäre Antikörper:

Antikörper	Epitop	Herkunft
anti- α -Tubulin, monoklonal	α -Tubulin	Sigma(T-5168), Clone B-5-1-2
10H, anti-pADPr, monoklonal	Poly(ADP-Ribose)	Miwa, Masanao [29]
CII-10, anti-PARP	Aminoterminus, allg. PARP	G.G.. Poirier, Québec, Kanada
FI-23, anti-DBD	1. Zinkfinger, humane PARP	G.G.. Poirier, Québec, Kanada
γ -H2AX	anti-phosphohiston H2AX	Trevigen (4411-PC-100)

sekundäre Antikörper:

Alexa488, GAM, F'ab	MolecularProbes (A11017)
Alexa488, GAM, IgG	MolecularProbes (A11001)
Alexa488, GAR, IgG	MolecularProbes (A11008)
HRP, GAM, IgG	BD Bioscience (554002)

2.4 Geräte und sonstige Materialien

Casy CellCounter TT	SchärfeSystems, Reutlingen, Deutschland
Deckgläschen (16mm)	Menzel
Orca C4742-95 (Digitalkamera für Mikroskope)	Hamamatsu
Filterpapier	Schleicher&Schnell (GB002)
Fluoreszenzleser, FL600	Biotek
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop DM IRB	Leica, Glattbrugg, Schweiz
Imager, LAS-1000	Fujifilm
Küvetten für Multiporator (2 mm, V=400 μ l)	Eppendorf (4307-000-593)
Multiporator	Eppendorf
Netzteil für Western-Blot, EPS301	Amersham Biosciences

Nitrocellulose-Membran	Pharmacia (RPN303D)
Objektträger (76 cm x 26 cm)	Superfrost, Micron
Transfer-Apparatur, miniVE	Hoefer
Zellkulturflaschen	Corning, München, Deutschland
Zentrifuge, Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Fellbach, Deutschland
Well-Platten, 12-, 24-, 96-	Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Prism	Software von GraphPad, Version 4.0

2.5 Puffer und Lösungen

PBS:	10 mM 1 mM 4 mM 30 mM	Tris-HCl, pH 7,8 EDTA MgCl ₂ 2-β-Mercaptoethanol
Benchmarker-Ansatz	25,5 µl 1,5 µl 3,0 µl 10,0 µl	1 x Laufpuffer Biotinylierten Marker 10 x SDS (aufkochen bei 95°C, 5 min) Prestained Protein Molecular Weight Marker
Blockier-Puffer	5 % add	Magermilchpulver TNT-Puffer
Harnstoffpuffer: 1,5xProbenpuffer für SDS-PAGE	93,75 mM 9 M 15 % 3 % 0,0045% 7,5 %	Tris pH 6,8 Harnstoff Glycerol SDS Bromphenolblau β-Mercaptoethanol
Laufpuffer 10x	0,25 M 1,92 M 1 %	Tris Glycin SDS
PBS-Glycin	100mM add	Glycin PBS
PBS-Triton-X100	0,4 % 96,6%	Triton PBS

PBS:	10 mM 1 mM 4 mM 30 mM	Tris-HCl, pH 7,8 EDTA MgCl ₂ 2-β-Mercaptoethanol
Sammelgel-Puffer, pH6,8	0,25 M 7 mM	Tris SDS
Sammelgel, (8%)	1,1 ml 2,2 ml 3,2 ml 66,0 µl 12,0 µl	Rotiphorese-Gel 30 H ₂ O Sammelgel-Puffer APS (10%) TEMED
Sytox/Hoechst-Mix	50 µl 20µl 180µl	Sytox [250µM] Hoechst [2,5 mg/ml] DMSO
TNT-Puffer	150 mM 10 mM 0,05 %	NaCl Tris Tween
Towbinpuffer	25 mM 192 mM 1 % 20 %	Tris Glycin SDS Methanol
Trenngel-Puffer, pH 8,8	1,86 M 7 mM	Tris SDS
Trenngel, 8%	4,2 ml 8,2 ml 3,2 ml 132 µl 32µl	Rotiphorese-Gel 30 H ₂ O Trenngelpuffer APS (10%) TEMED

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Allgemeines

Alle Arbeiten mit Zellen fanden unter einer Sterilbank in den dafür vorgesehenen Räumlichkeiten mit S1-Zulassung statt. Zur Desinfektion der Sterilbank sowie aller darin verwendeter Materialien (Zellkulturflaschen, Pipetten) wurde 70 % Ethanol verwendet. Bei allen Zellkulturarbeiten wurden Latexhandschuhe getragen. Abfälle wurden autoklaviert, bevor sie entsorgt wurden.

Zellkulturflaschen, PBS und Trypsin/EDTA-Lösung wurden bei 4°C aufbewahrt und vor Gebrauch im Wasserbad bei 37°C aufgewärmt.

3.1.2 Kultivierung

Alle Zellen wurden im selben Medium kultiviert DMEM(-/-). Außerhalb der Experimente wurden die Zellen unter dem jeweiligem Selektionsdruck gehalten (DMEM+/+ oder DMEM+/-). Mindestens 48 h vor einem Versuch wurden die Zellen in Medium ohne Selektionsdruck überführt (DMEM-/-).

Kultivierungsbedingungen waren: Temperatur = 37° C, Luftfeuchtigkeit = 95 %, CO₂ = 5 %

3.1.3 Passagieren

Die Zellen wurden alle 2 bis 3 Tage passagiert. Zum Passagieren wurde das Kulturmedium aus der Kulturflasche abgesaugt. Danach wurden die Zellen bei RT einmal mit PBS gewaschen und anschließend 5 min mit Trypsin/EDTA abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml (75 cm² Flasche) bzw. 5 ml (25 cm² Flasche) Medium verdünnt, um das Trypsin zu inaktivieren. Zum Entfernen des Trypsins wurden die Zellen für 5 min bei 194 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Entsprechend dem Teilungsfaktor wurde ein Teil der Zellsuspension in die Kulturflasche mit frischem Medium zurückgeführt, und ein anderer Teil für die Experimente verwendet.

3.1.4 Zellzahlbestimmung

Aus der beim Passagieren gewonnenen Zellsuspension (siehe oben) wurden 100 µl in 10 ml Casyton überführt und mehrmals durchmischt. Casyton, mit darin befindlichen Zellen, wurde ins Casyt-Zellzählgerät gestellt und die Zellzahl wurde bestimmt. Vor und nach jeder Messung wurde das Gerät durch 3 Reinigungsschritte und eine Messung mit Casyton gesäubert. Die Überlebensrate aus Gesamtzellzahl und lebenden Zellen wurde berücksichtigt.

3.1.5 Kryokonservierung von Zellen

In einer 75 cm² Kulturflasche konfluent wachsende Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit PBS durch Trypsin/EDTA abgelöst und in 10 ml Medium aufgenommen. Zellen wurden für 5 min

bei 194 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500 µl gekühltem Medium (DMEM-/-) resuspendiert. Nach Zugabe von 2,5 ml gekühltem Einfriermedium wurden die Zellen auf 3 CryoVials aufgeteilt und im Einfrierbehälter bei -80 °C für 24h gelagert. Danach wurden die CryoVials in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.1.6 Auftauen von Zellen

Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und in der Hand leicht angetaut. Danach wurden die Zellen in 50 ml frisches Medium (4° C) überführt, um das DMSO möglichst stark zu verdünnen. Nach 5 min Zentrifugation bei 194 g wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 2 ml Medium resuspendiert und die Zellen in eine Kulturflasche mit kaltem Medium überführt. Die Zellen wurden danach im Brutschrank weiterkultiviert.

3.1.7 Subklonierung von COM3-, COMF10-Zellen

Aus den beim Passagieren (siehe oben) gewonnenen Zellen wurde ein Aliquot mit 96 Zellen entnommen und in 10 ml frisches Medium überführt (Zellzahlbestimmung siehe oben). Nach gründlichem Mischen wurden die Zellen in einer 96 Well-Platte ausplattiert mit 100 µl pro Well. In regelmäßigen Abständen wurde das Medium gewechselt und das Wachstum kontrolliert. Nach 2 Wochen wurden die Zellen, die pro Well eine einzelne Kolonie gebildet hatten, in eine 24 Well-Platte und eine 96 Well-Platte überführt. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 10 µl Trypsin/Well abgelöst, in 150 µl frischem Medium aufgenommen und dieses im Verhältnis 1/3 auf die neuen Platten aufgeteilt. Um positive Klone zu identifizieren, wurden die Zellen der 96 Well-Platte einer Immunfluoreszenzfärbung (siehe unten) mit dem Antikörper FI-23 unterzogen. Die positiven Klone wurden weiterkultiviert und im nächsten Schritt auf eine 6 Well-Platte überführt. Nach einem erneuten Test auf Expression des Transgens wurde ein Klon ausgewählt und für die weiteren Versuche in Kultur genommen.

3.2 Biochemie und Molekularbiologie

3.2.1 Toxizitätsnachweis mit AlamarBlue

AlamarBlue ist ein Farbstoff, der seine Absorption und Fluoreszenz in einem reduzierenden Milieu ändert. Nur lebende Zellen haben eine konstante Menge reduzierender Metabolite, so dass durch den Vergleich mit einer Kontrolle eine Aussage über die relative Toxizität der Probe getätigt werden kann. Dazu wurden Zellen mit einer Dichte von 2500 Zellen/Well in eine 96 Well-Platte ausgebracht. Nach 24 h wurden die Zellen mit der Testsubstanz in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt und weiter im Brutschrank kultiviert. Für jede Konzentration wurde ein Triplett-Ansatz pipettiert. Hiernach wurde dem Medium 10 % AlamarBlue zugegeben und bis zum Farbwechsel der Kontrolle bei 37° C inkubiert (ca. 4 Stunden). Die Werte wurden mittels eines Fluoreszenzmeßgeräts ermittelt (Exzitation = 530nm, Emission = 590nm) und in Excel in Prozentwerte, relativ zu den unbehandelten (100 %), bzw. Lysierten (0 %) Werten, umgerechnet.

3.2.2 Western-Blot von Proteinen (WesternBlot)

Zellextraktion

Für den Western-Blot wurden pro Tasche 5×10^5 Zellen verwendet. Dazu wurde das alte Medium entnommen, die Zellen mit Trypsin gelöst und im alten Medium aufgenommen. Nach 5 min Zentrifugation bei 194 g wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und danach 4 ml PBS zugegeben. Nach Bestimmung der Zellzahl (siehe oben) wurden pro Tasche 5×10^5 Zellen entnommen, abzentrifugiert und mit 16,67 µl Proteaseinhibitorlösung resuspendiert. Danach wurde, auf 95° C vorgeheizter, 1,5x Probenpuffer zugegeben, um auf ein Endvolumen von 50 µl pro Tasche zu kommen. Die Probe wurde dann auf dem Schüttler für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Zum Scheren der DNA wurde der Zellextrakt danach in einer 1ml-Spritze (G26) mehrmals auf- und abgezogen. Der Zellextrakt wurde auf das Gel geladen oder bei -20° C eingefroren.

SDS-PAGE

Es wurde die Gelkammer Hoefer MiniVE und die dazu passenden Platten benutzt. Das Trenngel wurde angesetzt und nach dem Gießen sofort mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel darüber gegossen und der Kamm eingesetzt. Das fertige Gel wurde in die Gelkammer montiert und diese mit Laufpuffer befüllt. Der Benchmark-Ansatz wurde neben den Proben auf das Gel geladen. Zum Einlaufen wurden 50 V (variabel) und 300 mA (konstant) verwendet, und danach wurde die Voltzahl auf 75 V erhöht.

Transfer (WetBlot)

Die Membranen und Filter wurden auf die richtige Größe zugeschnitten und in Towbinpuffer eingelegt. Für den Transfer wurde die Materialien wie folgt angeordnet (von oben nach unten): 2xSchwämme, 3xFilterpapier, Nitrocellulose-Membran, Gel, 3xFilterpapier, 4 Schwämme. Nach Entfernen der Luftblasen wurde das Sandwich in die Blotapparatur der Hoefer-miniVE überführt

und mit Towbinpuffer aufgefüllt. Die ganze Apparatur wurde mit kaltem Wasser gekühlt. Der Blot wurde für 3 h bei konstanten 400 mA und variablen 300 V laufen gelassen.

Immunmarkierung und Entwicklung

Die fertig-transferierte Membran wurde 2 h bei RT in Blockier-Puffer geblockt und danach mit dem Erstantikörper CII-10 (1:1) für 30 min bei 37° C inkubiert. Die Membran wurde danach 3x 10 min mit TNT-Puffer gewaschen und im Anschluss mit dem Meerrettichperoxidase-Verknüpften Sekundärantikörper (IgG, GAM, 1:1500) für 30 min bei 37°C inkubiert. Zeitgleich wurde die Markerspur für 30 min mit Streptavidin-HRP-Komplex (1:5000 in TNT-Puffer) bei RT inkubiert. Die gesamte Membran wurde danach in TNT-Puffer 3 x 10 min gewaschen , und danach mit Peroxidasesubstrat (SuperSignal) nach Herstellerangaben inkubiert. Die Chemilumineszenz wurde mit dem LAS-1000 erfasst.

3.2.3 Mikrokernbestimmung

Versuchsansatz:

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden 10 000 Zellen pro Well in einer 24 Well-Platte ausplattiert, mit 500 ml Medium pro Well. Je nach Versuch wurde dem Medium Dexamethason in einer Konzentration von 5×10^{-8} M zugegeben, um das Transgen zu exprimieren. Kontrollen blieben unbehandelt. Zum Zeitpunkt 0 h wurde zur Induktion der Mikronuklei das entsprechende Genotoxikum (Bleomycin oder MNNG) zugegeben, und im Falle von Bleomycin nach einer Stunde das bleomycinhaltige Medium durch frisches ersetzt. Kontrollen blieben unbehandelt. Aus den beiden Kontrollen resultierte eine Aufteilung der Platte in 4 Sektoren mit je 6 Wells (Abb. 6). Notwendigerweise wurde allen Wells Cytochalasin B mit einer Konzentration von 6 µg/ml zugesetzt, um die Zytokinese zu hemmen. Die so behandelten Zellen wurden für weiter 30 h bei 37° C kultiviert.

Fixierung:

Nach der Inkubation wurden die Zellen bei 4 °C in 4 % Paraformaldehyd (in H₂O) für 20 min fixiert. Danach wurde das Paraformaldehyd abgesaugt und zu dessen Inaktivierung 100 mM PBS-Glycin für 2 min bei RT zugegeben. Um die fixierten Zellen durchlässig für den Antikörper zu machen, wurden die Zellen für 5 min mit PBS mit 0,4 % TritonX-100 behandelt, welches danach abgesaugt und die Zellen 3x mit PBS gewaschen wurden, um sämtliche Reste des Permeabilisierungsmittels zu entfernen. Zur Färbung des Zytoskeletts wurde der Erstantikörper (anti- α -Tubulin, 1:5000) in einer Magermilchpulver-TNT-Lösung (5 %) zugegeben und für 30 min bei 37° C auf dem Schüttler inkubiert. Der nicht gebundene AK wurde durch 3x 5 min waschen mit PBS entfernt, bevor der Zweitantikörper (Alexa488, IgG, 1:400) für 30 min bei 37°C zugegeben wurde. Die Zellen wurden wieder 3x 5min mit PBS gewaschen. Danach wurde die DNA mit 67 ng/ml Hoechst 33342 für 5 min bei RT angefärbt, mit anschließendem dreimaligem Waschen mit PBS. Bis zur Auswertung wurden die Zellen in PBS bei 4° C gelagert.

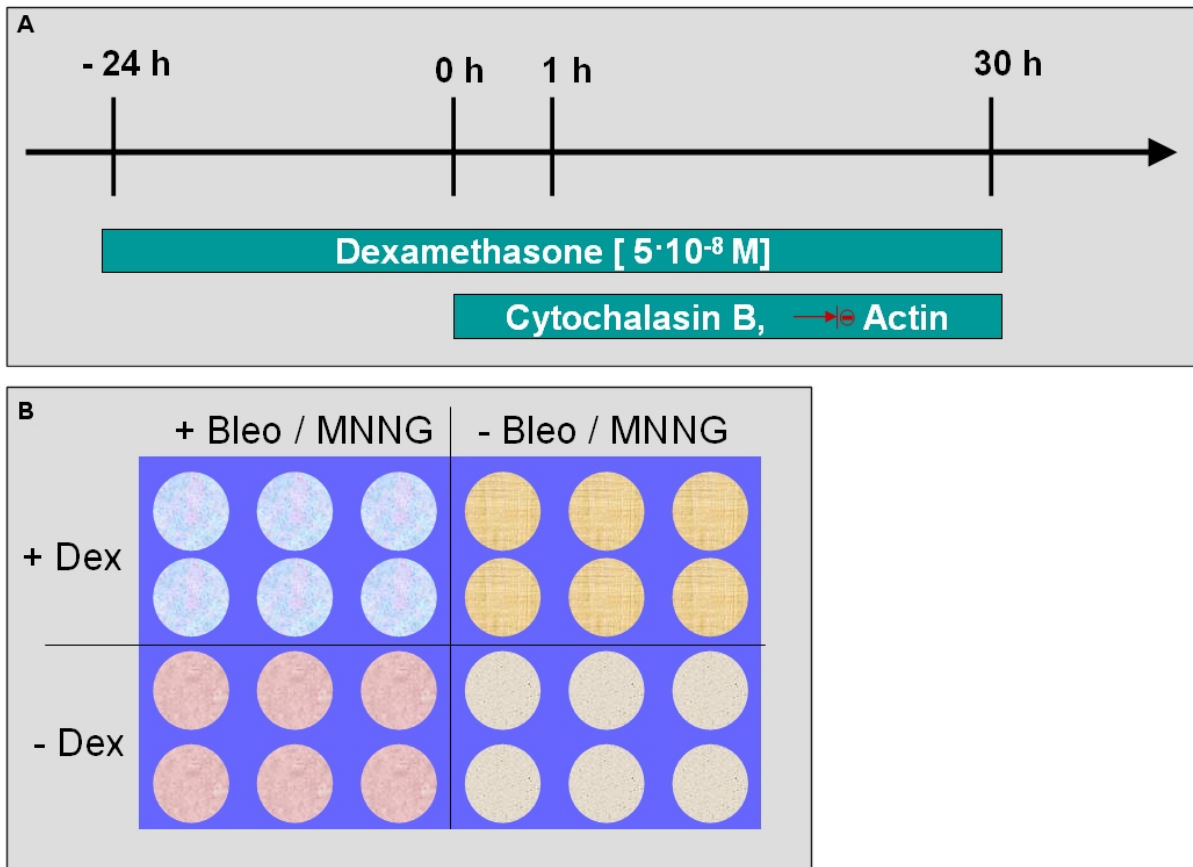


Abbildung 6: Zeitverlauf des Mikrokerntests, grüne Balken repräsentieren Zeitpunkt und Dauer der Chemikali-
enzugabe (A) Versuchsansatz in einer 24' Well-Platte (B) Beschreibung siehe Text.

Auswertung:

Die Mikrokernfrequenz wurde bestimmt als die Anzahl binukleärer Zellen mit Mikrokern, geteilt durch die Gesamtzahl binukleärer Zellen. Für die Auswertung wurde das Leica Fluoreszenzmikroskop und 40-fache Vergrößerung benutzt. Wenn möglich, wurden pro Versuchsansatz 2000 binukleäre Zellen ausgezählt, um statistische Schwankungen gering zu halten. Fehlerbalken entstanden durch den Vergleich der Daten aus dem selben Experiment, aus mindestens 2 Wells. Die Auswertung und die grafische Darstellung erfolgte mit den Programmen Excel und Prism.

3.2.4 Nachweis der Transgen-Expression

Der Nachweis der Transgenexpression wurde in einer 96 Well-Platte durchgeführt, in der 2500 Zellen pro Well 24h vor Versuchsbeginn mit oder ohne 5×10^{-8} M Dexamethason ausplattiert wurden. Danach wurden die Zellen in Paraformaldehyd fixiert (siehe oben) und mit dem Primärantikörper FI-23 (1:10) und Sekundärantikörper Alexa488 (F'ab, 1:1000), sowie mit 67 ng/ml Hoechst 33342 angefärbt. Die Zellen wurden anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Transgenexpression getestet.

3.2.5 Nachweis von Doppelstrangbrüchen

Auf sterilen Deckgläschen wurden 40 000 Zellen in einer 12 Well-Platte ausgebracht. Die Zellen wurden 24 h mit oder ohne 5×10^{-8} M Dexamethason kultiviert und anschließend fixiert. Dazu wurden die Deckgläschen kurz in kaltes PBS getaucht und anschließend für 10 min in 10%ige Trichloressigsäure (TCA) auf Eis überführt. Danach wurden die Deckgläschen für je 5 min in 70 %, 90 % und 100 % eiskaltem Ethanol gewaschen und danach zum Trocknen für mindestens 20 min auf Papiertücher gelegt. Die Deckgläschen wurden hiernach 10 min in PBS auf dem Schüttler rehydriert und danach in eine Feuchtkammer (Glasgefäß mit nassen Tüchern darin) gelegt. In dieser wurden die Zellen für 30 min bei 37° C mit dem Erstantikörper (γ -H2AX, 1:200) inkubiert. Nach 3 x 5 min Waschen in PBS wurden die Zellen wieder in der Feuchtkammer mit dem Zweitantikörper (Alexa488, GAR, 1:400) für 30 min bei 37° C inkubiert. Danach wurden die Zellen 3 x 5 min in PBS gewaschen und für 5 min mit 67 ng/ml Hoechst 33342 gefärbt. Die Deckgläschen wurden dann auf gereinigten Objektträgern mit AquaPolyMount befestigt und für 1 h bei RT getrocknet. Bis zur Auswertung wurden sie danach bei 4° C aufbewahrt.

3.2.6 Nachweis von Apoptose und Nekrose

Zellen wurden in einer 96 Well-Platte mit 2500 Zellen pro Well ausplattiert. Nach 24 h wurde 100 μ l Medium mit den entsprechenden MNNG-Konzentrationen, sowie mit und ohne Dexamethason in Dreifachansätzen zugegeben und weitere 72 h bei 37° C kultiviert. Danach wurden weiter 100 μ l Medium mit Sytox/Hoechst-Mix (0,5 %) dazu pipettiert. Sytox interkaliert, genau wie Hoechst 33342, in die DNA und ist fluoreszierend. Es ist jedoch nicht membranpermeabel und kann somit nur die DNA in Zellen mit beschädigter Membran anfärben. Kerne, die Sytox-gefärbt waren wurden als nekrotisch, Hoechst 33342-gefärbte Zellen mit fragmentiertem Kern als apoptotisch gezählt. Die restlichen Zellen wurden als lebendig gewertet. Pro Konzentration wurden mindestens 500 Zellen ausgezählt.

3.2.7 Elektroporation

Zellen wurden mit Trypsin abgelöst, in 10 ml Medium aufgenommen und 400 μ l pro Küvette eingesetzt. Die entsprechende Menge Bleomycin wurde hinzupipetiert und die Küvetten mit einem Spannungspuls (290 V, 40 μ s) behandelt. Nach 5 Minuten Inkubation in der Küvette wurde der Inhalt in 5 ml Medium überführt und je 500 μ l pro Well in einer 24 Well-Platte für 72 h inkubiert. Danach wurde die Überlebensrate mit AlamarBlue (siehe oben) bestimmt. Dazu wurde ein Teil der Zellen lysiert, um den Wert für 0 % Überlebensrate zu erhalten. Zellen ohne Bleomycinbehandlung wurden auf 100 % gesetzt. Nach Zugabe von 50 μ l AlamarBlue und 4 h Inkubation bei 37° C wurde die Fluoreszenz ausgelesen.

3.2.8 Statistische Auswertung

Chi-Quadrat-Test:

Zur Abschätzung der Signifikanz der gewonnenen Mikrokerndaten, wurde aus den Rohdaten (Anzahl binukleärer Zellen, Anzahl Mikokerne) das Chi-Quadrat gebildet und daraus die Wahrscheinlichkeit als P-Wert berechnet. Ein Ergebnis wurde als signifikant erachtet, wenn es einen P-Wert $< 0,05$ hatte. Die Auswertung wurde mit dem Programm Prism durchgeführt.

IC₅₀-Wert

Der IC₅₀-Wert stellt die Konzentration dar, bei der noch die Hälfte der Zellen am Leben ist. Konzentrationen wurden in logarithmische Werte transformiert [$\log_{10}(X)$]. Mittels Prism wurde eine sigmoidale Dosis-Wirkungskurve angepasst und daraus der IC₅₀ -Wert berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis der Transgenexpression

Als Zellsysteme wurden COM3- und COMF10-Zellen verwendet, die ein Dexamethason-induzierbares Transgen zur Überexpression der DBD, bzw. der PARP-1 tragen. Bei der Herstellung der Zelllinien wurden diese mit Plasmiden für die Resistenzen Hygromycin und G418 nur cotransfiziert, so dass, trotz Kultivierung unter Selektionsdruck, ein Verlust des Transgen-tragenden Plasmids erfolgen kann. Zum Nachweis der erfolgreichen Transgen-Expression nach Dexamethason-Induktion wurden die Expressionsprodukte mittels Immunofluoreszenz -Mikroskopie nachgewiesen (Abb 7+8).

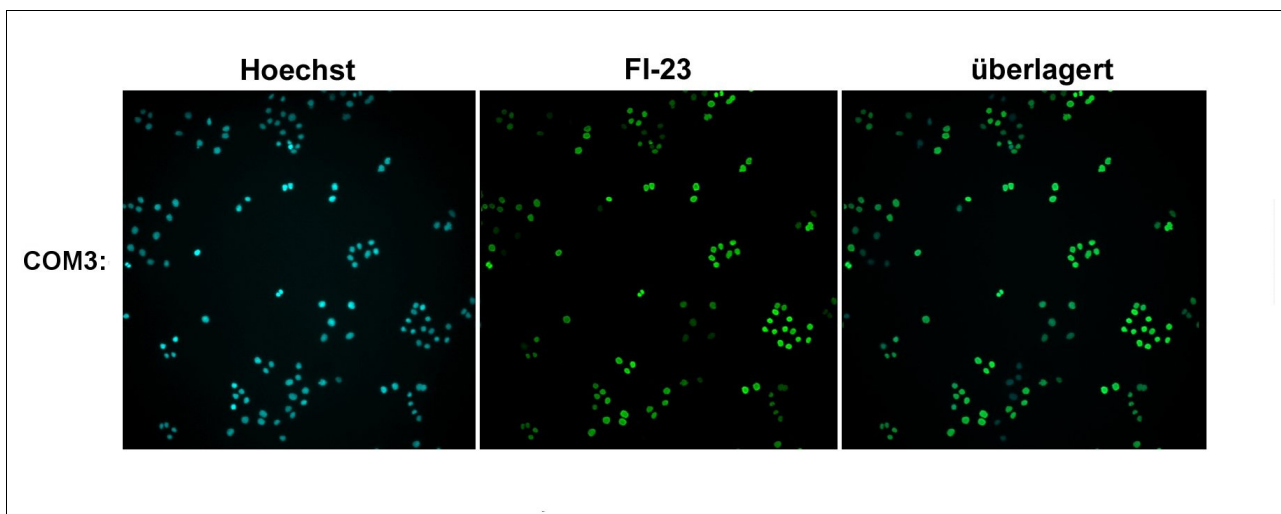


Abbildung 7: Detektion der DBD-Expression mittels Immunofluoreszenz in COM3 Zellen. mit dem AK FI-23. Zellen wurden 24 h vor der Fixierung mit 5×10^{-8} M Dexamethason induziert.

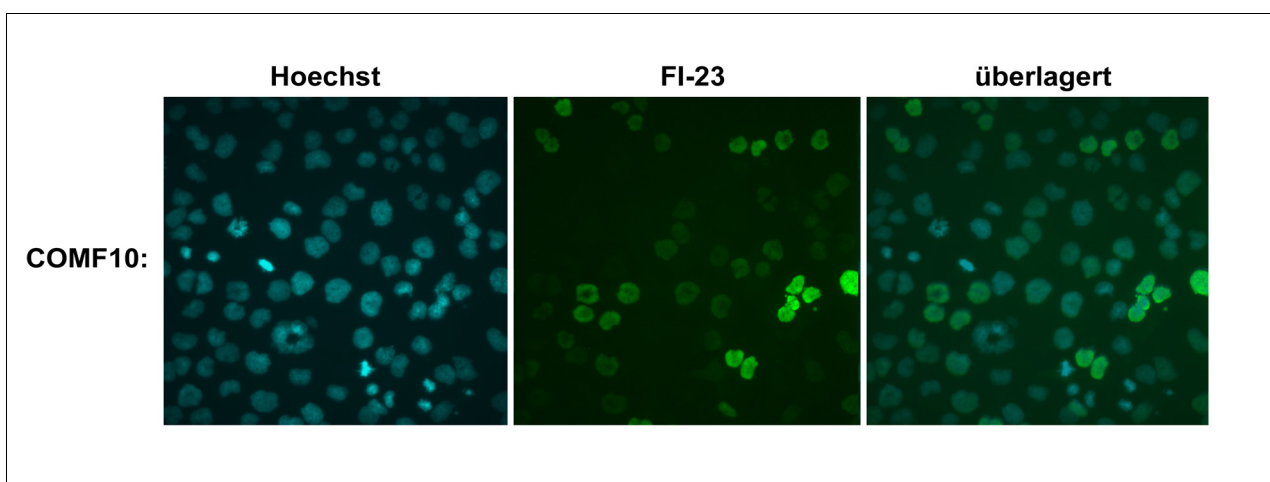


Abbildung 8: Detektion der PARP-1 Expression mittels Immunofluoreszenz in COMF10-Zellen mit dem AK FI-23. Zellen wurden 24 h vor der Fixierung mit 5×10^{-8} M Dexamethason induziert

Da FI-23 nur die humane PARP-1 erkennt, sieht man in Zellen ohne Dexamethason-Behandlung kein Signal (Daten nicht gezeigt). In beiden Zelllinien wird das Transgen exprimiert. Für die COM3 Zellen musste vorher noch eine Subklonierung durchgeführt werden, da nach dem Auftauen der Zellen, die Transgenexpression unter 10 % lag. In den COM3-Zellen lag die Expressionsrate nach der Subklonierung bei über 90 %, auch wenn die DBD nicht homogen exprimiert wird. Bei den COMF10-Zellen liegt die Rate bei 60 %. Um eine möglichst hohe Transgenexpression zu erhalten, wurden die Zellen unter ständigem Selektionsdruck gehalten, und nur bei Experimenten (24 h davor) wurde dieser abgesetzt.

4.2 Nachweis der endogenen PARP-1

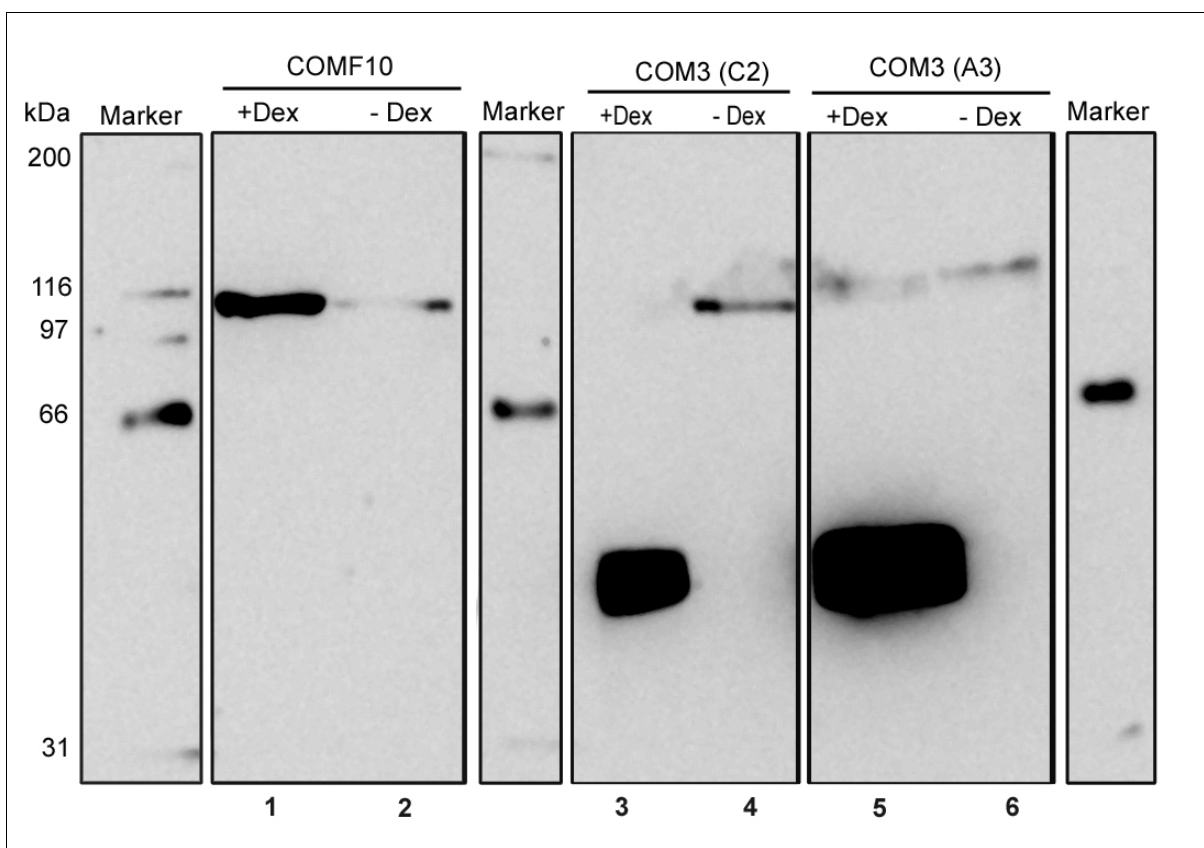


Abbildung 9: Western-Blot mit anti-PARP1 Antikörper CII-10. Die Zellen wurden mit Dexamethason induziert (Reihe 1, 3 und 5 oder blieben unbehandelt (Reihe 2, 4 und 6). Man sieht Banden bei 113 kDa (PARP-1) und 46 kDa (DBD).

Da mit der Expression der DBD in COM3-Zellen eine dominant negative Inhibition der PARP-1 erzielt werden sollte, wurden die Zellen auf endogene PARP-1 getestet. Der dazu verwendete Antikörper CII-10 erkennt die Menschen-, sowie die Hamster-PARP-1. Beide Zelllinien zeigen eine deutliche Expression der endogenen PARP-1 (Abb. 9, Reihe 2, 4, 5 und 6). Nach Induktion mit

Dexamethason ist in COMF10-Zellen eine deutliche Überexpression der PARP-1 (Abb. 9, Reihe 1) sowie bei COM3- Zellen der DBD (Abb. 9, Reihe 3 und 5), zu sehen. Die Bande der endogenen PARP-1 in dem COM3-Klon-C2 (Abb. 9, Reihe 3) ist im Blot nicht erkennbar, wahrscheinlich aufgrund unterschiedlicher Beladung des Gels. Alle Banden befanden sich auf der richtigen Höhe (PARP1 = 113 kDa, DBD = 46 kDa)

4.3 Toxizität von Bleomycin

Zur Untersuchung der Toxizität von Bleomycin in COM3 Zellen wurde ein AlamarBlue-Assay durchgeführt. Dieser sollte Aufschluss darüber geben, welche Konzentration für die Mikrokern-induktion genutzt werden kann. Die verwendeten Konzentrationen, die in der Literatur benutzt werden, variieren zwischen 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Bleomycin, und reichen teilweise sogar bis zu 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Bleomycin [30][31][32][22]. Die Zellen zeigen keine Beeinflussung der Überlebensrate nach Bleomycinbehandlung (Abb. 10). Dies konnte auch morphologisch unter dem Mikroskop bestätigt werden.

In einem weiteren Versuch sollte durch Elektroporation der Zellen, in Anwesenheit von Bleomycin überprüft werden, ob der Grund für die geringe Toxizität durch ausbleibende Aufnahme in das Zellinnere bedingt ist. Unter sonst gleichen Versuchsbedingungen, nur durch zusätzliche Elektroporation, verursacht Bleomycin schon ab einer Konzentration von 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ einen Abfall der Überlebensrate auf unter 10 % (Abb.11).

Dies zeigt, dass Bleomycin nach Aufnahme in die Zelle hoch-toxisch wirkt. Das ausbleibende Zellsterben der untersuchten Zelllinien, bei den getesteten Konzentrationen, ist wahrscheinlich auf den notwendigen aktiven Transport ins Zellinnere zurückzuführen.

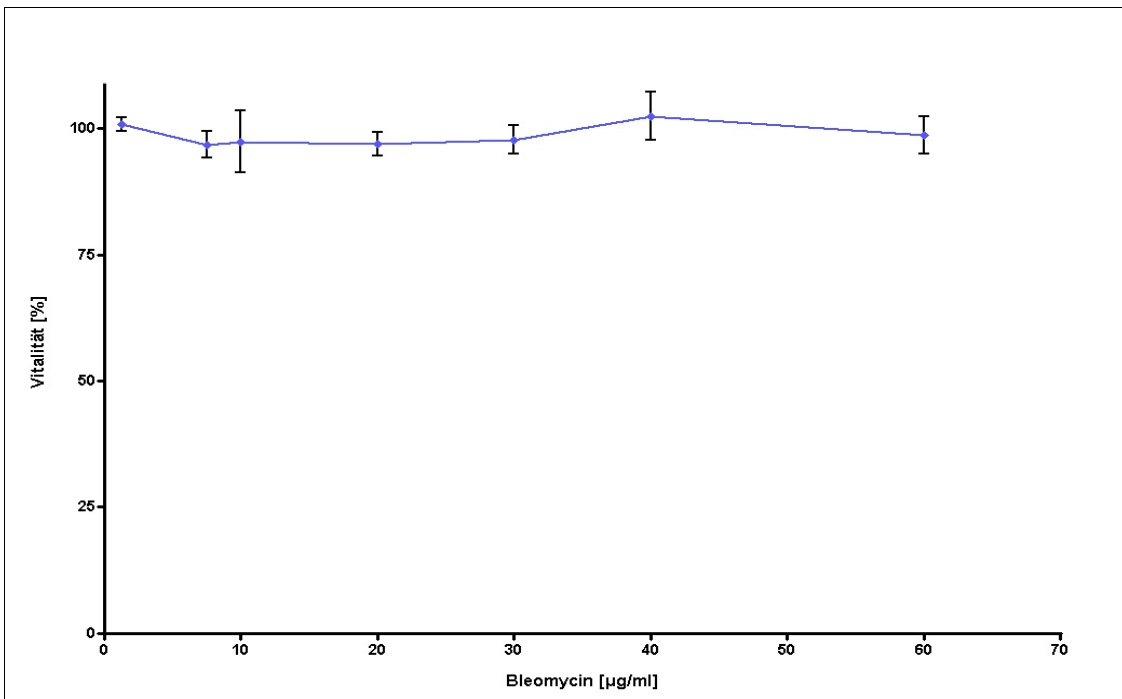


Abbildung 10: AlamarBlue-Assay von COM3-Zellen, die mit Bleomycin für 1 h behandelt wurden. Die Punkte stellen den Mittelwert einer 3-fach Messung dar, nach 30 h Inkubation bei 37° C.

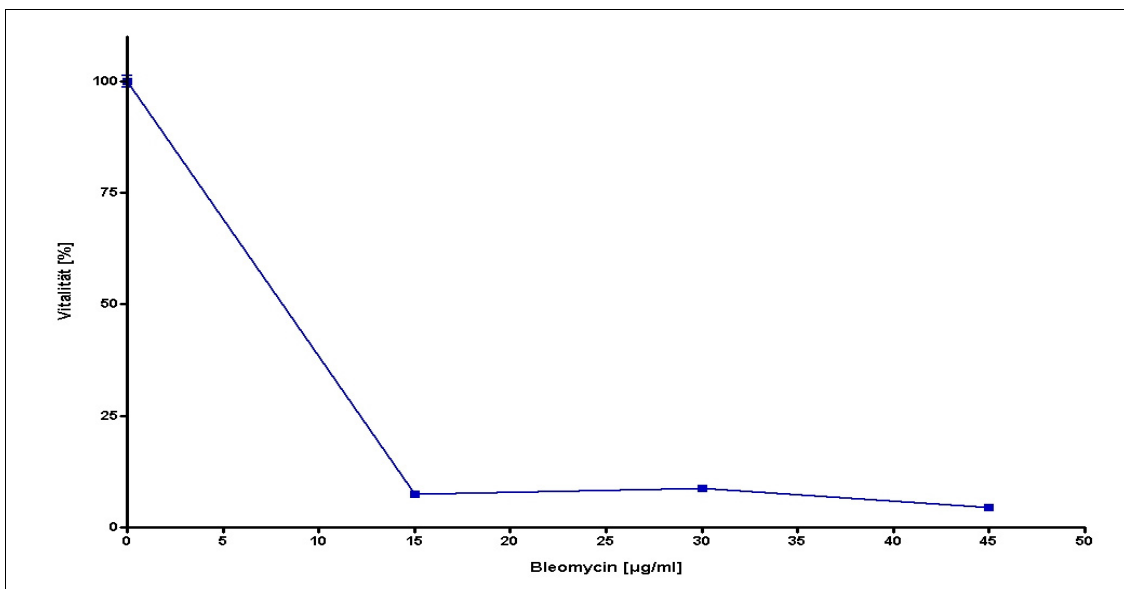


Abbildung 11: AlamarBlue-Assay von COM3-Zellen nach Elektroporation in bleomycinhaltigem Medium. Die Punkte stellen den Mittelwert einer 3-fach Messung nach 72h inkubation dar..

4.4 Mikrokernrate in COM3-Zellen nach DBD Expression

Nach Induktion von COM3-Zellen mit Dexamethason wird das DBD-Transgen exprimiert. Die DBD-Expression führt zu einer dominant negativen Inhibition der PARP-1. Ob diese Inhibition einen Einfluss auf die Reparatur von DNA-Schäden hat, wurde hier anhand der Induktion von Mikrokernen untersucht. In Zellen aus PARP knockout Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine Schädigung der DNA zu einer Erhöhung der Schwester-Chromatid-Austauschrates und zu Chromatidbrüchen führt [33][34].

4.4.1 Einfluss von Bleomycin

Zur Schädigung der DNA wurde Bleomycin verwendet, was zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen führt. COM3-Zellen zeigten ein basales Mikrokernlevel um 2 % (Abb.12), welches durch die Transgenexpression nur wenig signifikant erhöht wurde ($P = 0,25$). Nach Schädigung mit Bleomycin wiesen die Zellen mit überexprimierter DBD eine 2-fach höhere Mikrokernrate auf ($P < 0,0001$) als die uninduzierten Zellen, die mit einer Mikrokernrate von 4,47 % einen signifikanten Anstieg ($P < 0,001$) um das 2,7-fache des Basalniveaus verzeichneten.

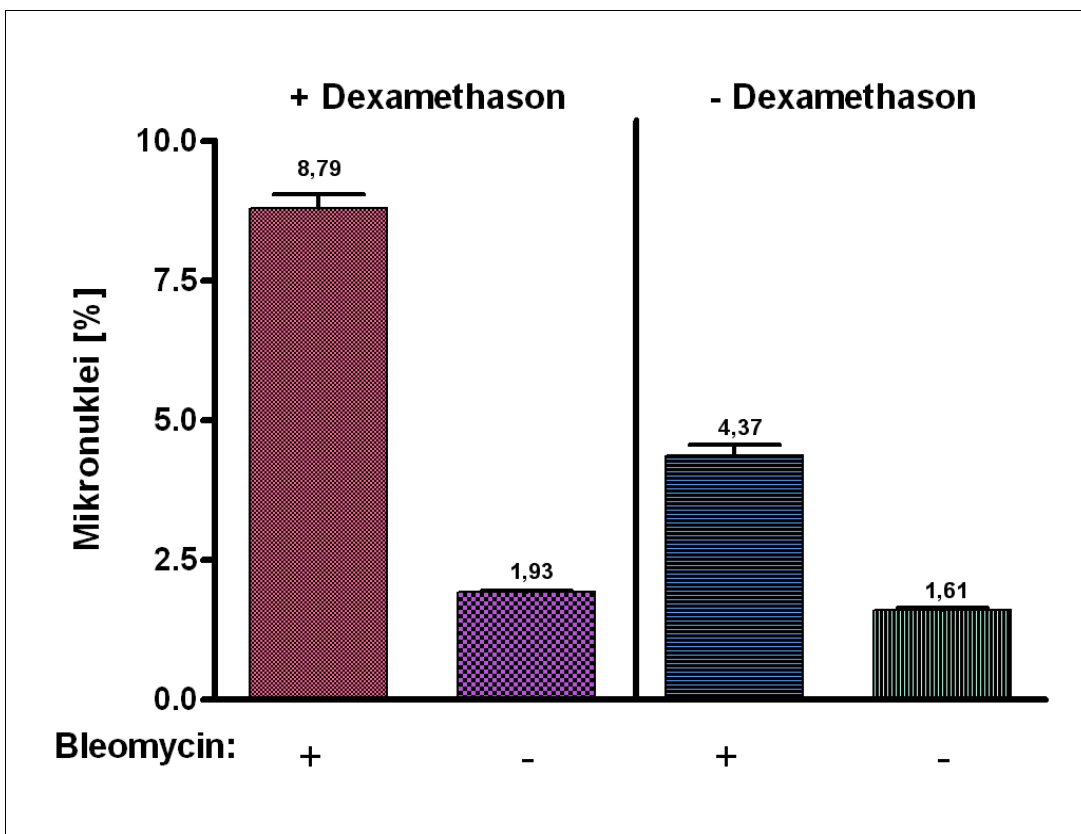


Abbildung 12: Induktion der Mikrokernfrequenz in COM3-Zellen nach 1 Stunde Schädigung mit Bleomycin [$10 \mu\text{g}/\text{ml}$]. Mikrokernfrequenz wurde in Zellen +/- Dexamethason, sowie +/- Bleomycin nach 30 h Inkubation erfasst.

4.5 Mikrokernrate in COMF10-Zellen nach PARP-1-Expression

Durch Zugabe von Dexamethason wird in COMF10-Zellen die humane PARP-1 überexprimiert. Dieses System verstärkt die Wirkung der endogen-vorliegenden Hamster-PARP-1 und ermöglicht auf diese Weise die Untersuchung der Funktion von PARP-1 in der Zelle. Meyer *et. al.* konnte in seiner Arbeit zeigen, dass die Überexpression von PARP-1 in diesen Zellen zu einer verringerten Schwester-Chromatid-Austauschrate führt.

4.5.1 Einfluss von Bleomycin

Bleomycin wurde in verschiedenen Konzentrationen benutzt, um Strangbrüche in der DNA zu generieren. In Abhängigkeit der zugesetzten Bleomycinkonzentration wurde ein Anstieg der Mikrokernrate beobachtet, die bei den PARP-1-exprimierenden Zellen deutlich geringer war (Abb.13): Bei 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ um den Faktor 1,65 ($p = 0,01$), bei 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ um den Faktor 2,57 ($p < 0,001$). Der Unterschied in den Basalniveaus ist in diesem Versuch signifikant ($p = 0,013$), konnte aber bei einem weiteren Experiment nicht bestätigt werden (Abb.14). Aber auch bei diesem Versuch nahm die Mikrokernrate nach 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Bleomycin Behandlung um den Faktor 1,67 ($p < 0,001$) ab.

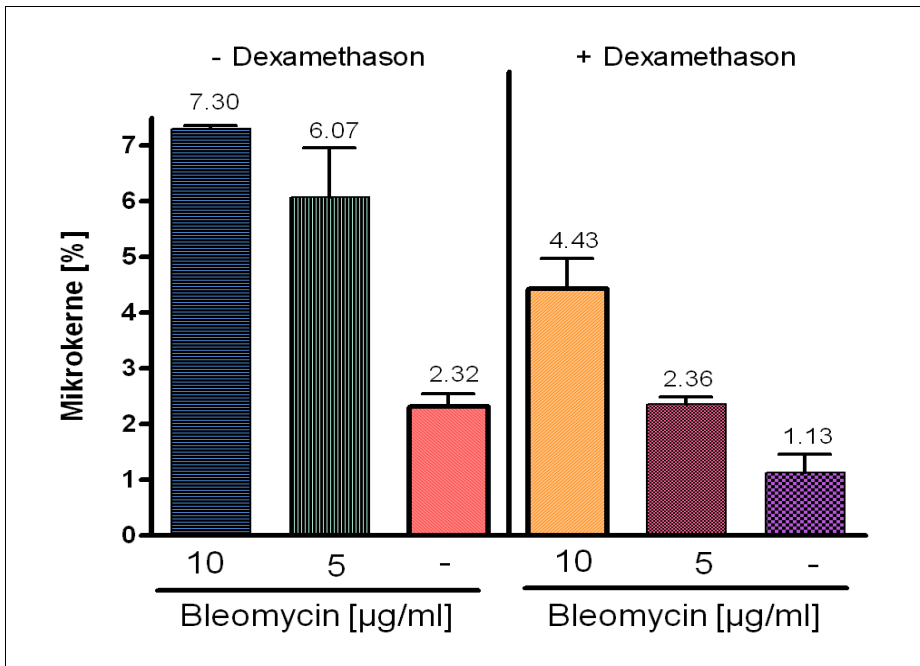


Abbildung 13: Mikrokernrate in COMF10-Zellen nach 1 Stunde Schädigung mit Bleomycin [10 µg/ml] oder [5 µg/ml] Zellen. Mikrokernfrequenz wurde in Zellen +/- Dexamethason sowie +/- Bleomycin nach 30 h Inkubation erfasst.

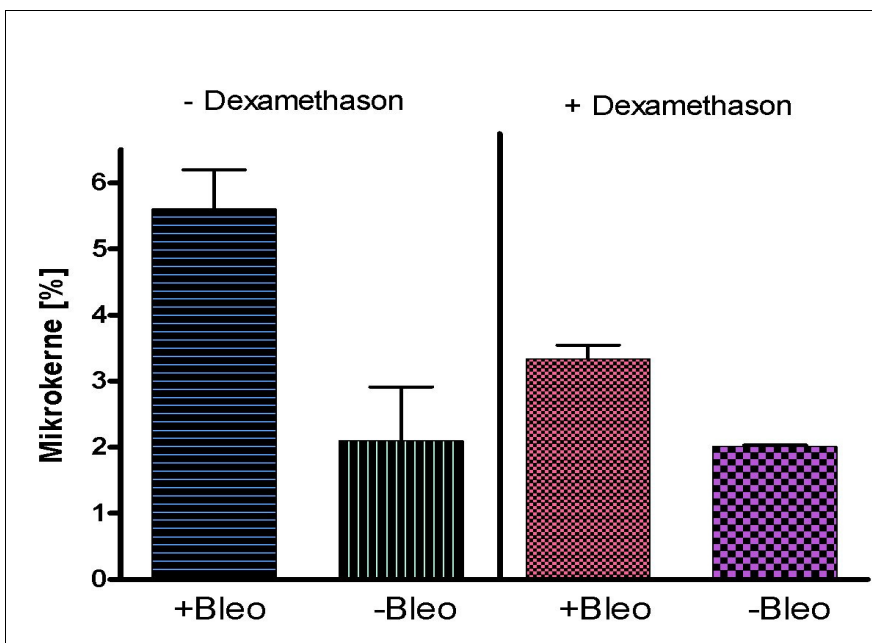


Abbildung 14: Mikrokernrate in COMF10-Zellen nach 1 Stunde Schädigung mit Bleomycin Zellen. Mikrokernfrequenz wurde in Zellen +/- Dexamethason sowie +/- Bleomycin nach 30 h Inkubation erfasst.

4.6 Einfluss von PARP-1 auf Apoptose und Nekrose

Schäden durch MNNG werden durch die BER repariert und MNNG führt zu einer starkern Aktivierung von PARP-1. Fibroblasten aus PARP-1 knock-out-Mäusen zeigen eine erhöhte Resistenz gegenüber hohen Konzentrationen von MNNG. Seong-Woon Yu und Mitarbeiter konnten zeigen, dass dies mit der NAD^+ Konzentrationen korreliert, die in den knock-out Zellen bei konstantem Level blieben, während bei den Wildtyp-Fibroblasten Vorräte völlig erschöpft wurden [35].

Um den Einfluss der kompetitiven Hemmung der PARP-1 auf die Toxizität von MNNG in unserem System zu untersuchen, wurden neben der Vitalität der Zellen nach unterschiedlichen MNNG-Konzentrationen auch die Art des Zelltods erfasst, also ob die Zellen nekrotisch oder apoptotisch waren.

4.6.1 Untersuchung der Toxizität in COM3- bzw. COMF10-Zellen

Die konzentrations-abhängige Abnahme der Vitalität von COM3- und COMF10-Zellen verläuft sigmoidal. Der Kurvenverlauf zeigt keinen nennenswerten Unterschied, wenn man die Dexamethason-behandelten mit den unbehandelten Zellen vergleicht. Bei den COM3-Zellen liegt das obere Plateau bei 90 % und fällt ab 3 μM MNNG stark ab, bis bei Konzentrationen ab 250 μM alle Zellen tot sind (Abb.16). Die Konzentration, bei der die Hälfte aller Zellen tot ist, liegt bei 10,83 μM (IC_{50} ohne Dexamethason), bzw. 13,3 μM (IC_{50} mit Dexamethason). Bei COMF10-Zellen liegt das Plateau bei 100 % und fällt schon früher, bei 1 μM MNNG ab. Die Konzentration, bei der alle Zellen tot waren, lag hier bei 100 μM . Es ergab sich für COMF10-Zellen ein IC_{50} -Wert, der geringer war als der der COM3-Zellen und bei 6,5 μM (IC_{50} mit Dexamethason), bzw. 5,28 μM (IC_{50} ohne Dexamethason) lag (Abb.15). Alle berechneten Kurven hatten ein R-Quadrat (R^2) > 0,97.

4.6.2 Vergleich des apoptotischen und nekrotischen Zelltods

Da der AlamarBlue-Assay keine Aussage über die Art des Zelltods zulässt, wurde des weiteren die Anzahl der apoptotischen und nekrotischen Zellen erfasst, und zusammen mit der Anzahl lebender Zellen grafisch aufgetragen.

COM3-Zellen:

Die Kontrolle sowie die Dexamethason-induzierten COM3-Zellen, zeigten einen Anstieg der apoptotischen Zellen mit einem Maximum. Bei höheren Konzentrationen sank die Anzahl der apoptotischen Zellen zugunsten der exponentiell zunehmenden Menge nekrotischer Zellen (Abb.17). Im Verlauf zeigten die Dexamethason-induzierten Zellen einen früheren Anstieg der apoptotischen Zellen mit einem Maximum bei 3,906 μM MNNG, wohingegen die Kontrollzellen das Maximum bei 15,63 μM MNNG hatten. Diese Daten sind konsistent mit Ergebnissen, die nach 48 Stunden Inkubationszeit gewonnen wurden (Daten nicht gezeigt).

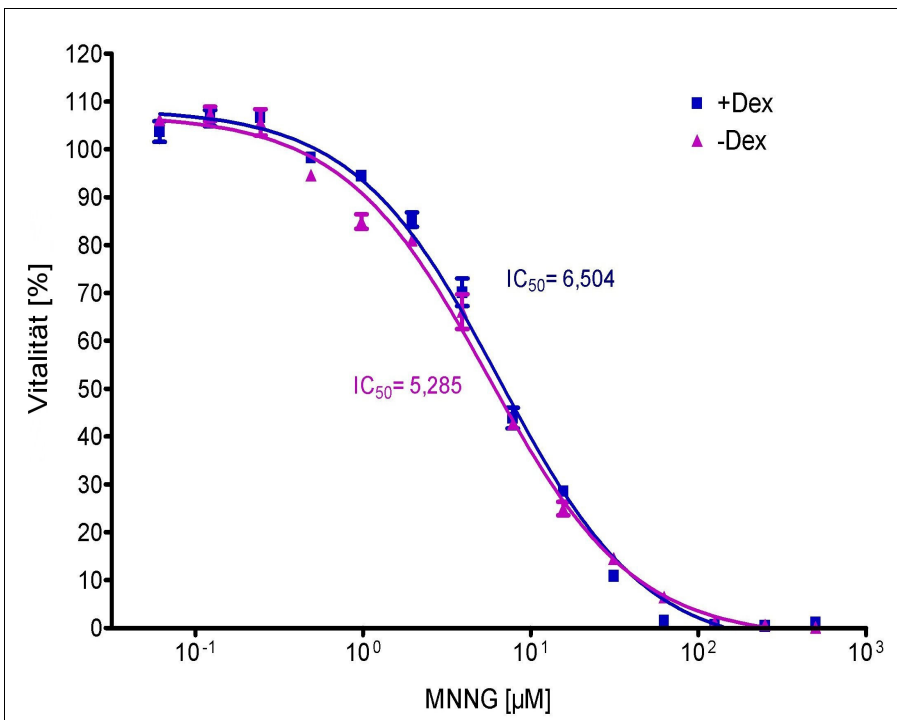


Abbildung 15: COMF10-Zellen wurden mit den angegebenen MNNG-Konzentrationen behandelt. Die Toxizität wurde nach 72 h mittels eines AlmarBlue-Assays erfasst.

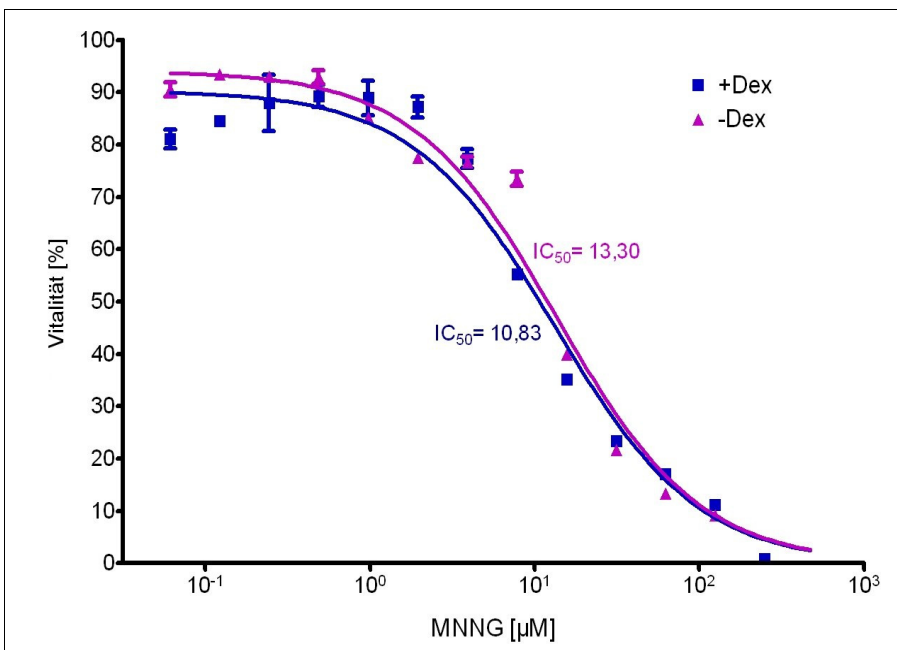


Abbildung 16: COM3-Zellen wurden mit den angegebenen MNNG-Konzentrationen behandelt. Die Toxizität wurde nach 72 h mittels eines AlmarBlue-Assays erfasst.

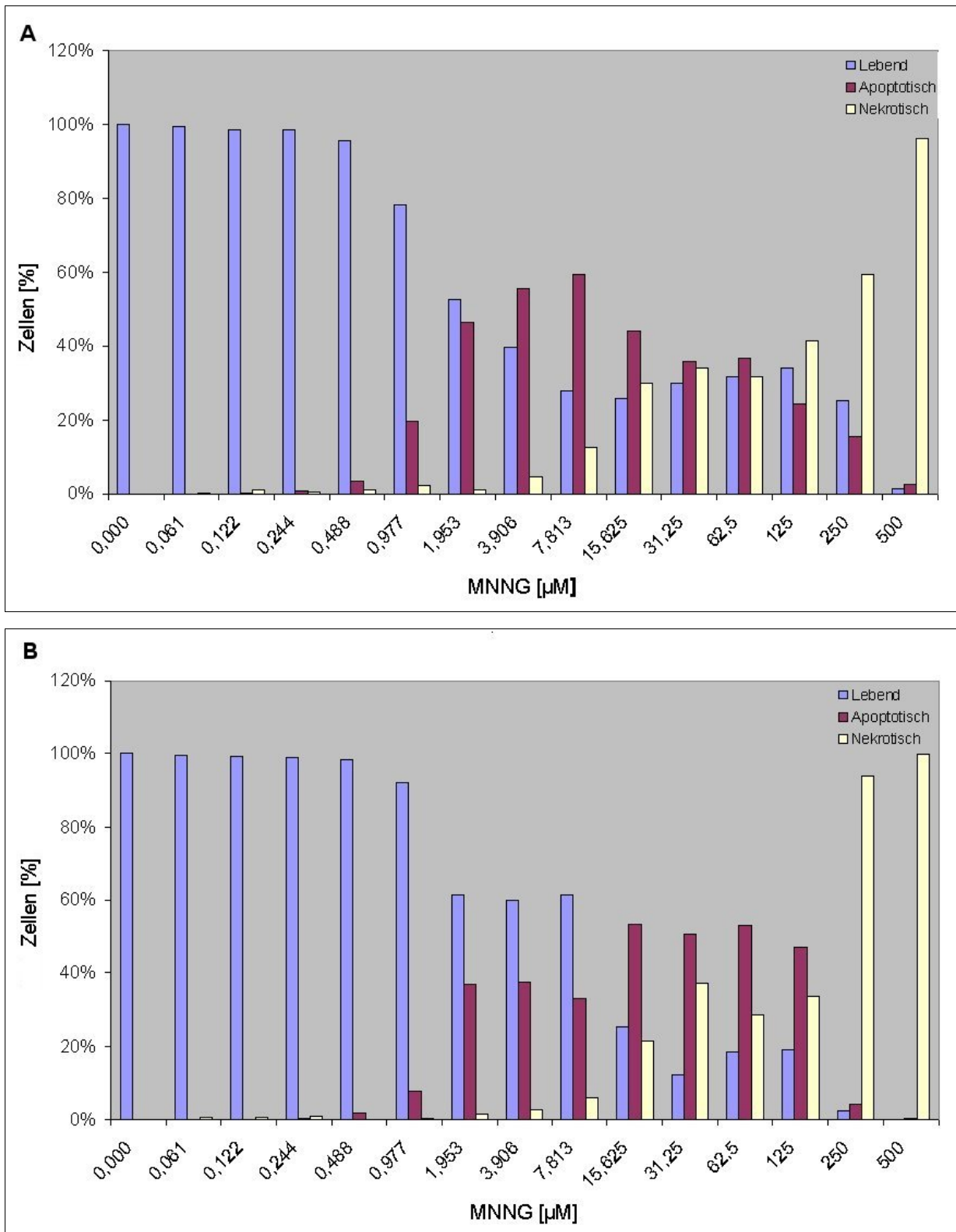


Abbildung 17: Apoptose und Nekrose in COM3-Zellen: 72 h nach Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen an MNNG. (A) Zellen mit Dexamethason behandelt, (B) Zellen unbehandelt.

COMF10-Zellen

Bei niedrigen Konzentrationen von MNNG ($< 4 \mu\text{M}$) zeigte sich bei den apoptotischen COMF10-Zellen kein Unterschied zwischen den Zellen mit- oder ohne-Dexamethason. Darüber hinaus sind Zellen mit Dexamethason jedoch nicht mehr zu einer Steigerung der Apoptoserate in der Lage, wohingegen in uninduzierten Zellen bis $15 \mu\text{M}$ MNNG nochmal deutlich mehr Zellen apoptotisch starben (Abb. 18, blaue Linien). Ab dieser Konzentration starben in Zellen mit Dexamethason wesentlich mehr Zellen durch Nekrose als in den Zellen die keine PARP-1 überexprimierten. Die Nekroserate zeigt hier einen umgekehrten Verlauf als bei niedrigen MNNG-Konzentrationen ($< 10 \mu\text{M}$) bei denen PARP-1 überexprimierende Zellen weniger nekrotische Zellen aufwiesen (Abb. 18, grüne Linien).

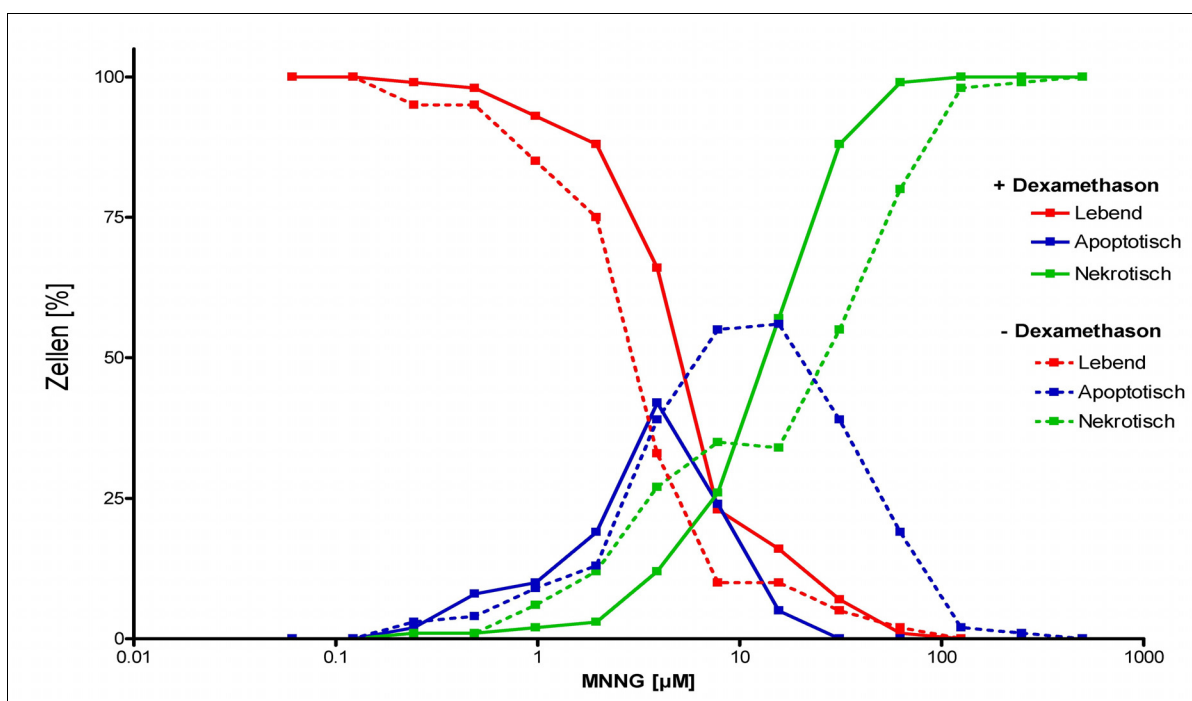


Abbildung 18: COMF10 Zellen mit und ohne Dexamethason zugabe wurden mit den angegebenen MNNG-Konzentrationen behandelt. 72 h danach wurden die Zellen mit Sytox und Hoechst angefärbt und die nekrotischen und apoptotischen Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Es wurden mindestens 500 Zellen pro Konzentration ausgewertet.

4.7 Bildung von pADPr nach DNA-Schädigung

PARP-1 wird aktiviert durch Einzel- oder Doppelstrangbrüchen in der DNA. Als Folge beobachtet man die Bildung von pADPr, welches den Antikörper 10H nachgewiesen werden kann[29]. Dieser sollte benutzt werden, um eine Aktivierung der PARP-1 bei der verwendeten Bleomycin-konzentration nachzuweisen. Während man in der unbehandelten Kontrolle keine Polymerbildung beobachtete (Abb.19, A), lieferte die Behandlung mit 1mM H₂O₂ nach 5 Minuten ein positives Signal in Form einer körnigen Färbung im Kern (Abb.19, B). Bei der Behandlung mit 10 µg/ml Bleomycin war erst nach 60 min ein positives Signal zu beobachten (Abb.19, D). Dieses lag aber nur in wenigen Zellen vor (< 1%), die restlichen Zellen zeigten kein erkennbares Signal (Abb.19, C).

4.8 Bildung von Doppelstrangbrüchen nach DNA-Schädigung

Da die Affinität von PARP-1 für DNA-Strangbrüche sehr hoch ist, wäre ein positiver Nachweis von Doppelstrangbrüchen als ein sicherer Aktivator von PARP-1 zu werten. Aus diesem Grunde wurde ein spezifischer Antikörper (γ -H2AX) gegen phosphoryliertes Histon H2AX eingesetzt. Das Auftreten dieser Phosphorylierung korreliert mit der Anzahl von Doppelstrangbrüchen unter physiologischen Bedingungen [36]. Des weiteren sollte untersucht werden, ob PARP-1 einen Einfluss auf die Bildung dieses distinkten Phosphorylierungsmusters hat.

Die Auswertung zeigte keinen sichtbaren Unterschied zwischen Kontrollzellen und mit 2,5 µM, bzw. 1 µM MNNG behandelten Zellen. Ebenso wurde kein Unterschied zwischen Dexamethason-induzierten und unbehandelten Zellen gesehen. In allen Proben findet man negative Zellen (Abb. 20, A), die nur eine leichte Hintergrundfärbung aufweisen. Des weiteren sah man Zellen mit deutlicher Färbung im Kern (Abb. 20, C). Diese zeigt eine homogene Verteilung mit Aussparungen der Nukleoli. Eine dritte Variante zeigt distinkte Fozi, die sich auf den Zellkern beschränken (Abb. 20, B). Die Fozi heben sich deutlich von der Hintergrundfärbung ab und haben eine stärkere Färbung als die in Abbildung 20, C beschriebene.

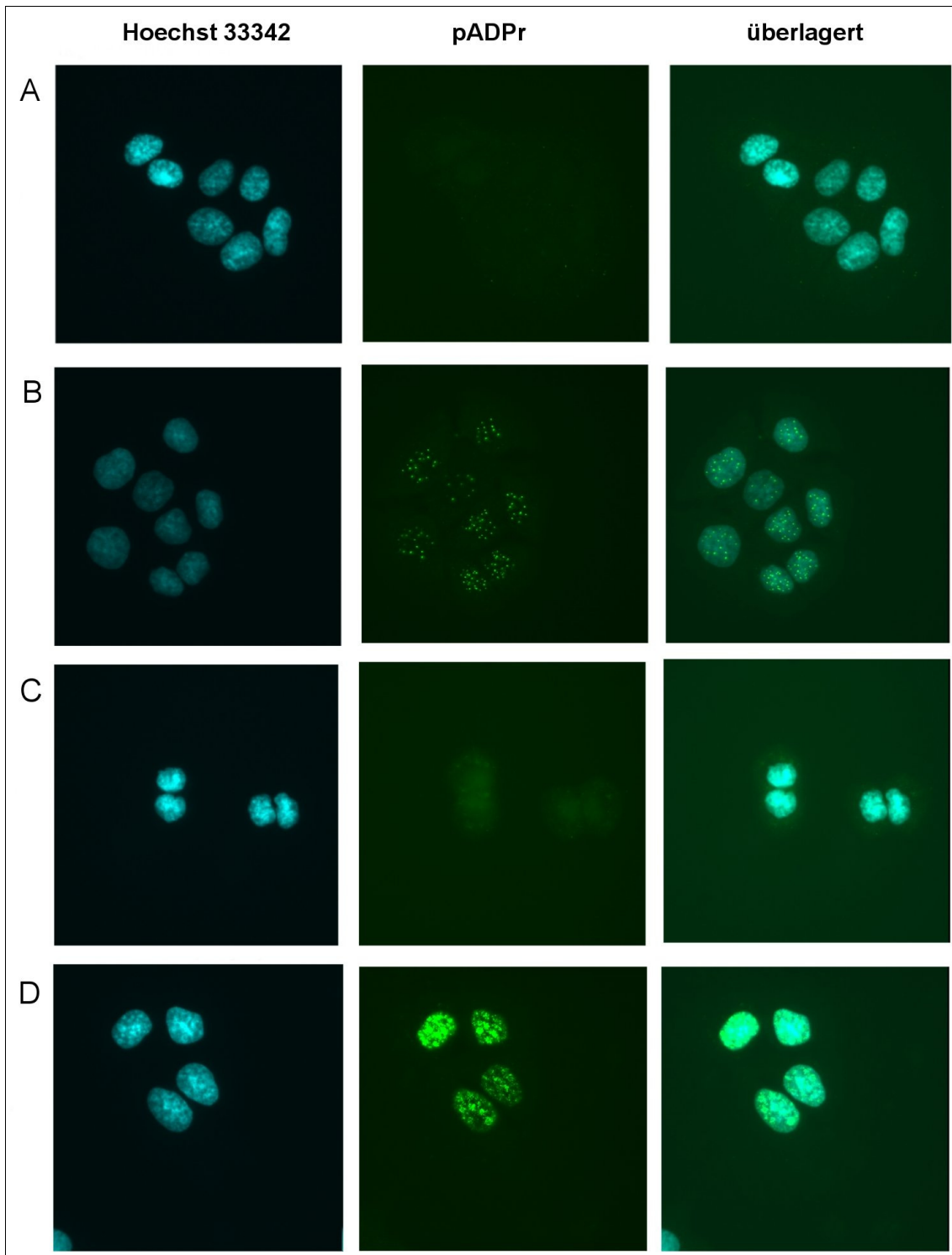


Abbildung 19: COMF-10 Zellen angefärbt mit Hoechst 33342 (links), Antikörper 10H gegen pADPr (mitte), Überlagerung der Bilder (rechts). A.) unbehandelte Kontrolle B.) behandelt mit 1 mM H₂O₂ für 5 min C, D.) behandelt mit 10 µg/ml Bleomycin für 1 h

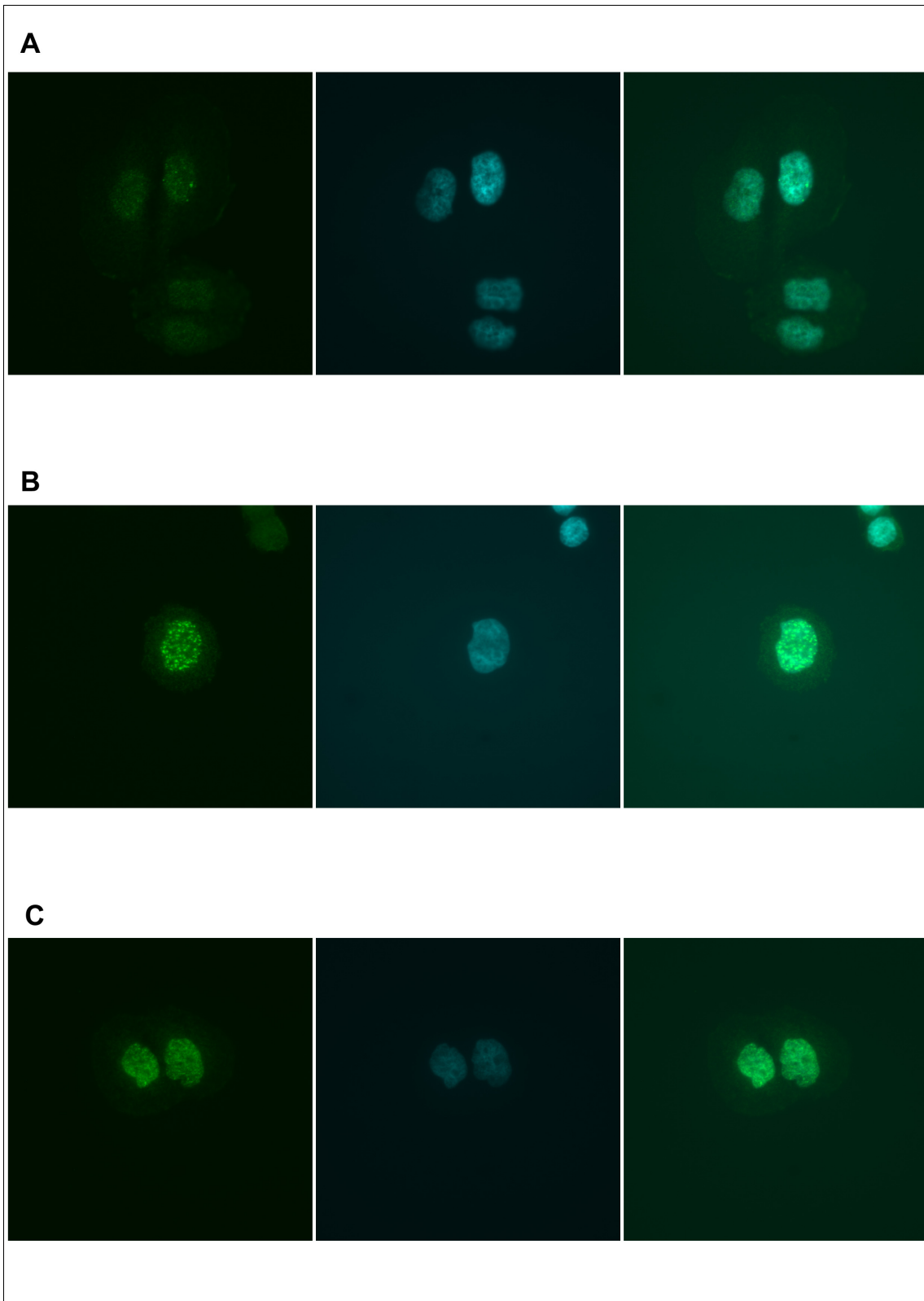


Abbildung 20: Immunofluoreszenz in COM3-Zellen mit Antikörper gegen phosphoryliertes Histon H2AX (linke Spalte), Hoechst-Färbung (mittlere Spalte) und überlagertem Bild (rechte Spalte)

5 Diskussion

In dieser Arbeit konnte ein Einfluß von PARP-1 für die genomische Stabilität nach Bleomycin-Behandlung in COM3- und COMF10-Zellen gezeigt werden. Der Einfluß war im positiven Sinne bei PARP-1 Überexpression und im negativen Sinne bei PARP-1 Inhibition.

Weitere Untersuchungen zeigten eine erhöhte Apoptoserate nach MNNG-Schädigung im niedrigen Konzentrationsbereich in DBD-exprimierenden COM3-Zellen, aber keine Protektion bei PARP-1 Überexpression in COMF10-Zellen. Diese zeigten bei höheren MNNG-Konzentrationen eine erhöhte Nekroserate im Vergleich zu normal-exprimierenden COMF10-Zellen.

5.1 Zelllinien mit Dexamethason-induzierbarem Transgen

Es wurden zwei induzierbare Zellsysteme benutzt, um den Einfluß von PARP-1 auf die genomische Stabilität zu untersuchen. Die COM3- und die COMF10-Zelllinie.

COM3:

Die COM3 Zellen die von J. Heiner Küpper hergestellt wurden, exprimieren als Transgen die DNA-bindende Domäne von PARP-1. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der DBD zu einer dominant negativen Hemmung von PARP-1 führt, und die Bildung von pADPr nach DNA-Schädigung mit MNNG stark inhibiert war [19]. Dieser Effekt konnte erst durch massive Schädigung der DNA, verursacht durch hohe MNNG Konzentrationen (>1 mM) oder γ -Strahlung, aufgehoben werden. Dies deutet darauf hin, dass es sich hier um eine Konkurrenz um die Bindung an DNA-Strangbrüche handelt. In den Zellen konnte eine starke Sensitivierung der Zellen auf γ -Strahlung festgestellt werden. Desweiteren konnte Rudat *et al.* eine fast vollständige Inhibition der schnellen Komponente der Doppelstrangbruch-Reparatur durch ionisierende Strahlung feststellen, wenn er COM3-Zellen zuvor mit Dexamethason induzierte [13].

Überraschenderweise konnte in diesen Zellen, trotz Hemmung, ein hoher NAD⁺-Verbrauch festgestellt werden, der aber nicht in der Bildung von Polymer resultierte. Als mögliche Erklärung wurde hier die Funktionsweise von PARP-1 als katalytisches Dimer gesehen, auf die die Kinetik der pADPr-Bildung hindeutet [3]. Wahrscheinlich handelt es sich um eine Heterodimerbildung, mit der an die DNA gebundenen DBD. Die dadurch verursachte katalytische Aktivität der PARP-1 erfolgt wegen des fehlenden Akzeptors jedoch in einer Hydrolysereaktion mit Wasser.

COMF10:

Die COMF10-Zellen wurden von Ralf G. Meyer 1998 am DKFZ hergestellt und resultieren aus den gleichen Vorläuferzellen (COR) wie die COM3-Zellen. Sie enthalten als Transgen die codierende cDNA der humanen PARP-1. Bildet man den Quotienten der pADPr Menge aus induzierten- und nichtinduzierten-Zellen kann man nach γ -Bestrahlung von COR-Zellen mit steigender Dosis nur eine leichte Schwankung der pADPr-Quotienten um eins sehen. Stattdessen beobachtet man in

COMF10-Zellen eine dosisabhängige Zunahme des pADPr-Quotienten [26]. Eine Überexpression von PARP-1 resultiert also neben einer 7- 9-fach gestiegenen Proteinmenge, sondern auch in einer vergrößerten Syntheseleistung an Polymer. Dies jedoch nur, wenn es soviel DNA-Strangbrüche gibt, dass die PARP-1 Proteinmenge der limitierende Faktor ist. Nach MNNG-Behandlung konnte bei Dexamethason-induzierten Transgen-Expression in COMF10-Zellen eine Verringerung der Schwerster-Chromatid-Austauschrate gesehen werden [26].

5.2 Nachweis der Transgen-Expression in COM3- und COMF10-Zellen

Da die Zellen anfänglich nur geringe Mengen an Transgen exprimierten, wurden durch Subklonierung die Expressionsrate verbessert, und dieses danach mittels Immunofluoreszenz nachgewiesen. Zur Bestätigung, dass in beiden Zelllinien das Transgen exprimiert wird, wurde das Vorhandensein des Proteins per Western-Blot nachgewiesen. Zusätzlich wurde das Expressionsmuster der Zellen per Immunofluoreszenz ermittelt. Der im Western-Blot verwendete CII10-Antikörper erkennt hierbei sowohl die endogene Hamster PARP-1, sowie die humane PARP-1 und deren DBD. So ist beim Vergleich zwischen uninduzierten und induzierten Zellen (Abb. 9) eine sehr starke Zunahme des Transgenprodukts zu beobachten. Durch den Nachweis immuno-reaktiver Banden bei 113 kDa (PARP-1) und 46 kDa (DBD) konnte die Transgen-Expression bestätigt werden. Um den Prozentsatz der exprimierenden Zellen genauer zu untersuchen, wurde der Antikörper FI-23 gewählt, der spezifisch nur die humane PARP-1 und deren DBD erkennt. Etwa 90 % der COM3- Zellen exprimierten das Transgen. In COMF10-Zellen waren 60 % der Zellen positiv. Während die COM3 Zellen eine homogene Färbung aufwiesen, war in COM10-Zellen, selbst nach Subklonierung immer ein gewisser Grad an Inhomogenität sichtbar. Um einer Verschlechterung des Expressionsverhaltens der Zellen entgegenzuwirken, wurden die Zellen zwischen den Versuchen in Selektionsmedium mit Hygromycin und G418 gehalten. Durch die Tests konnte gezeigt werden, dass ein hoher Prozentsatz der Zellen das jeweilige Transgen exprimieren.

5.3 Einfluss der Intrinsischen, und extrinsischen Toxizität von Bleomycin.

Um Mikrokerne in den oben beschriebenen Zellen zu induzieren, wurde Bleomycin verwendet. Dieser starke Induktor wird bei Mikrokern-Untersuchung anderer Chemikalien als Positiv-Kontrolle benutzt [22].

Da die Literaturangaben zu den verwendeten Konzentrationen von Bleomycin schwanken [22][30][31][32][37], sollte durch einen Toxizitäts-Assay eine geeignete Konzentration ermittelt werden (Abb. 10). Als Vorgabe diente der Bericht der „In vitro assay working group“, der eine Toxizität mit maximal 60 % Zellsterblichkeit vorsieht [22]. Der hier verwendeten Konzentrationsbereich deckt alle gefundenen Konzentrationen in der Literatur ab. Das Ergebnis zeigte jedoch eine hohe Resistenz der Zellen auf Bleomycinbehandlung (Abb.10). Ein entsprechendes Kontrollexperiment (Abb. 11) bei dem durch Elektroporation die Aufnahme von Bleomycin in die Zelle erreicht werden

sollte, zeigte ein Absterben der Zellen 72 h nach der Behandlung. Dies zeigt, dass die verwendete Charge an Bleomycin chemisch wirksam ist, und in diesem Fall eine Limitation der Toxizität durch verringerte Aufnahme in die Zelle vorlag. Dies deckt sich mit Literaturangaben, die für Bleomycin eine noch nicht geklärte Aufnahme durch aktiven Transport vermuten [25][31]. Zwar konnte aus dem Versuch nicht geklärt werden welche Bleomycinkonzentration für den Mikrokernversuch zu benutzen ist, jedoch hat sich gezeigt, dass über einen hohen Konzentrationsbereich eine Proliferation der Zellen gewährleistet werden kann, womit die Bedingung der Zellteilung für den Mikrokerntest erfüllt wurde.

Für weitere Studien wurde -bei verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten-, die Mikrokerninduktion direkt durch Auszählung mittels Mikroskopie erfasst. Dabei erwiesen sich anfängliche Bedingungen mit nur 15 minütiger Behandlung als unbrauchbar. Durch Erhöhung auf 1 h konnte die Induktion verbessert werden. Bei 1 µg/ml Bleomycin beobachtete man eine Induktion um 2,53 % im Vergleich zur Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Bei 5 µg/ml und 10 µg/ml Bleomycin erwies sich die Zunahme der Mikrokern gegenüber der Kontrolle als hoch genug um einen Einfluß der PARP-1 untersuchen zu können (Abb. 12 und 13).

5.4 PARP-1 Aktivität hat Einfluss auf die Mikrokernrate

Mikrokern sind ein Zeichen für den Verlust von Chromosomenfragmenten. Sie stellen damit einen dramatischen Schaden für die Zelle dar, die zur Entartung und damit Krebsentstehung führen kann. Bei COM3 Zellen wurde eine geringe Toxizität von Bleomycin beobachtet (siehe oben), wiewohl diese Konzentrationen schon zur Induktion von Mikrokernen im Bereich zwischen 4-8 % führte. Erklären läßt sich diese Diskrepanz durch die beim AlamarBlue-Assay definierte Vitalität der Zellen. Die gewonnenen Daten eines AlamarBlue-Assays sagen nur etwas über die momentanen metabolischen Vorgänge in der Zelle aus. Sie erfassen aber nicht, ob und wie oft sich eine Zelle danach noch teilen kann. Dies hätte man durch einen Klonogenitätstest, der die Fähigkeit zur Koloniebildung einer einzelnen Zelle über mehrere Tage erfasst feststellen können. Der hier verwendete Test und der Beobachtungszeitraum von 72 h scheint aber nicht geeignet zu sein um die Auswirkungen einer Chromosomenabberation zu erfassen. Hingegen stellt das Ereignis der Mikrokernbildung einen sensitiven Nachweis von Schäden nach genotoxischer Behandlung dar.

Die Messung der Mikrokern in Zellen, die mit Cytochalasin behandelt wurden, ist heute eine der gängigsten Methoden [21]. Sie hat dazu geführt, dass Probleme im Zusammenhang mit einer Verdünnung der Mikrokern durch Teilung oder einer Verzögerung der Mitose ausgeschlossen werden konnten. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass Cytochalasin-B keine verstärkende oder abschwächende Wirkung auf Bleomycin hat und auch nicht selber zur Mikrokernbildung führt [38]. Dass PARP-1 einen direkten Einfluß auf die Bildung von Mikrokernen hat, konnte in dieser Arbeit deutlich gezeigt werden. Zum einen führte eine dominant-negative Hemmung von PARP-1 durch DBD-Überexpression zu einer Verdopplung der Mikrokernrate (Abb.12), zum anderen konnte bei Überexpression von PARP-1 unter gleichen Versuchsbedingungen eine 1,7-fache Reduktion der

Mikrokernrate beobachtet werden (Abb. 13 und 14). Bisherige Versuche, die den Einfluß einer Hemmung von PARP-1 untersuchten, benutzten Inhibitoren oder von knock-out Mäusen gewonnene Zellen. Hier wurde ebenfalls ein Anstieg der Mikrokernfrequenz beobachtet, oft einhergehend mit einem Anstieg der Schwester-Chromatid-Austauschrate [33][39]. Bei einer Überexpression von PARP-1 konnte bisher jedoch kein [40], oder nur ein geringer, protektiver Schutz [41] von Zellen nach oxidativem Stress oder alkylierenden Bedingungen beobachtet werden.

5.5 Untersuchung von COM3-Zellen auf pADPr-Bildung

Das durch PARP synthetisierte pADPr kann durch mehrere Methoden nachgewiesen werden. Häufig wird der Einbau von ^{32}P -markiertem NAD^+ ins Polymer, oder eine Quantifizierung mittels HPLC benutzt. Eine weitaus einfachere Methode ist der Nachweis durch Immunohistochemie. Dafür sind verschiedene Antikörper kommerziell erhältlich. Einer davon - der monoklonale Antikörper 10H - wird standartmäßig für die Erkennung von pADPr benutzt [42][43]. Auch wenn Rajae-Bebahani *et al.* eine Polymerbildung nach Behandlung von Lymphozyten mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Bleomycin gesehen hat, konnte in dieser Arbeit in COM3 Zellen kein Nachweis dafür erbracht werden (Abb.19). Auffällig war, dass etwa 1 % der Zellen ein stark positives Signal zeigten, wohingegen die restlichen Zellen negativ waren (Abb. 19 D). Im untersuchten Zeitfenster von 10 min bis 90 min trat dieser Befund erst nach 60 min Bleomycinbehandlung auf, was nicht für eine Akkumulation der Schäden oder von pADPr durch, z.B. gestörten Bleomycin- oder pADPr-Abbau, schließen läßt. Für eine genauere Untersuchung der gebildeten Polymermenge in COM3-Zellen nach Bleomycin-Behandlung muss man andere Methoden, als z.B. die oben erwähnten, benutzen, da der Nachweis mittels Immunohistochemie in COM3 Zellen nicht ausreichend sensitiv war.

5.6 Untersuchung von COMF10- und COM3-Zellen auf Doppelstrangbrüche

Eine weitere Methode, indirekt die Wirkung von Bleomycin zu belegen, ist der Nachweis von Doppelstrangbrüchen. Hierzu wurde ein Antikörper gegen phosphoryliertes-Histon-2AX benutzt. Es wurde gezeigt, dass diese Modifikation positiv mit dem Auftreten von Doppelstrangbrüchen korreliert [36]. Mit dieser Methode ließe sich gleichzeitig feststellen, ob die Histon-Modifikation durch pADPr verändert würde. Dies wäre der Fall, wenn das gebildete Polymer den Zugang zum Strangbruch verhindern würde, oder eine Interaktion von anderen Enzymen mit dem Polymer notwendig für die Phosphorylierung wäre. COMF10- sowie COM3-Zellen zeigen sowohl mit als auch ohne Behandlung mit MNNG (2,5 μM bzw. 1 μM) ein positives Fluoreszenz-Signal nach Anfärbung mit H2AX (Abb.20 B und C), welches zwei verschiedene Muster aufwies. Eine Unterscheidung zwischen Kontrolle und behandelte Probe war nicht möglich. Beide beobachteten Muster zeigten eine auf den Kern beschränkte Färbung. Das Signal in Abb.20, B zeigte jedoch eine Fozibildung, wohingegen die Färbung in Abb. 20 C ein gleichmäßiges Muster besaß. Mechanistisch gesehen würde man eine Fozibildung erwarten, aufgrund einer starken Phosphorylierung der Histone an Orten mit DNA-Doppelstrangbrüchen. Bei geeigneter Konzentration sollte so eine Auszählung einzelner Doppelstrangbrüche möglich sein, wie sie auch zur Quantifizierung durch

Rothkamm *et al.* benutzt wurde. Ein Grund für die Färbung in der unbehandelten Kontrolle ist nicht ersichtlich. Generell zeigen COR-Zellen und auch COM3- und COMF10-Zellen, eine erhöhte genetische Instabilität die auf die Immortalisierung zurückzuführen ist, und sich durch eine erhöhte basale Schwester-Chromatid-Austauschrate ausdrückt. Ein Auftreten von Doppelstrangbrüchen in einem Maße, dass das der MNNG- Behandlung übersteigt, ist als eher unwahrscheinlich zu erachten

5.7 Untersuchung des Zelltods nach MNNG-Behandlung

Die Untersuchung der Art des Zelltods (apoptotisch oder nekrotisch) wurde in COM-3- und COMF-10 Zellen bei steigenden Konzentrationen von MNNG durchgeführt. 72 h nach der MNNG-Behandlung wurden die apoptotischen und nekrotischen Zellen ausgezählt. Das hierzu verwendete Unterscheidungs-Kriterium war eine Anfärbung der DNA nekrotischer Zellen durch einen nicht-membran-permeablen fluoreszierenden Farbstoff (Sytox), und für apoptotische Zellen eine sichtbarmachung der Fragmentation und Kondensation des Kerns mittels Hoechst 33342. Diese Methode ist einfach und kostengünstig und wird häufig benutzt, um die Art des Zelltods zu untersuchen [44][45]. Während die letztere Methode nur eine „ja- oder nein-Entscheidung“ zulässt, wurde mit dem zusätzlich verwendeten AlamarBlue-Assay die Vitalität der Zellen erfasst. So konnte noch ein allgemeineres Bild über den Zustand der Zellen gewonnen werden.

Bei der Betrachtung der Vitalität der Zellen konnte bei beiden Zelllinien kein Unterschied zwischen Dexamethason-induzierten und uninduzierten Zellen festgestellt werden. Die angepasste Sigmoidal-Kurve ergab auch hinsichtlich des daraus errechneten IC_{50} -Werts nur geringe Unterschiede (Abb.16 und 15). Der um mehr als den Faktor-2x, abweichende IC_{50} -Wert zwischen COM3- und COMF10-Zellen könnte durch die klonale-Variabilität bedingt sein, durch die sich COM3- von COMF10-Zellen voneinander unterscheiden. Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass während des Versuchablaufs unterschiedliche Zeiten bis zur MNNG-Behandlung der Proben auftraten. Da sich MNNG nach Zugabe in Medium schnell zersetzt, könnte sich eine Variabilität zwischen Experimenten an verschiedenen Tagen ergeben haben. Der Vergleich zwischen induzierten und uninduzierten Zellen eines Experiments konnte aber durch gemeinsames Ansetzen der Verdünnungsreihe und simultane Zugabe der jeweiligen Konzentration zu den Zellen gewährleistet werden.

Bei differenzierter Betrachtung der Art des Zelltods konnte man bei COM3-Zellen mit exprimierter DBD und nach Behandlung mit niedrigen MNNG Konzentrationen ein früherer Anstieg der apoptotischen Zellen festgestellt werden. Hinsichtlich des nekrotischen Zelltods konnten keine Unterschiede zwischen den Zellen mit und ohne Dexamethson festgestellt werden (Abb.17). Diese Ergebnisse zeigen einen protektiven Schutz durch PARP-1 gegen Apoptose bei geringen MNNG Konzentrationen. Dies könnte durch eine verbesserte Reparatur der DNA-Schäden in Anwesenheit der PARP-1 bedingt sein, durch die der Effekt von DNA-schädigenden Substanzen limitiert wird. Eine erhöhte Sensitivität nach MNNG-Behandlung konnte auch von Küpper *et al.* [28] in COM3-Zellen, und einer erhöhte chromosomale Instabilität in DBD-überexprimierenden HeLa-Zellen von

Schreiber *et al.* [27] gezeigt werden. Diese Resultate gehen Hand in Hand mit den hier gefundenen Ergebnissen.

Wurden die Versuche der MNNG-Behandlung, mit anschließender Erfassung der Nekrose und Apoptose, in PARP-1 überexprimierenden COMF10-Zellen gemacht, so zeigte sich bei niedrigen MNNG-Konzentrationen ($< 4 \mu\text{M}$) kein Unterschied im apoptotischen Verhalten der Zellen, wohingegen die nekrotischen Zellen ohne Dexamethason-Zugabe einen früheren Anstieg zeigten. Bei höheren MNNG-Konzentrationen ($> 4 \mu\text{M}$) zeigte sich jedoch, dass durch die überexprimierte PARP-1 ein Abfall der Apoptose- und ein gleichzeitiger Anstieg der Nekrose-Rate erfolgte (Abb.18). In COMF10-Zellen zeigte sich kein Schutz vor Apoptose durch Überexpression, sondern dies führte bei höheren MNNG-Konzentrationen zu einem sprunghaftem Anstieg der Nekrose-Rate im Vergleich zu PARP-1 normal exprimierenden-, uninduzierten-Zellen. Dies ist konsistent mit den Ergebnissen anderer Publikationen. Van Gool *et al.* [46] konnten in PARP-1 überexprimierenden CO60-Zellen (COCF) nach γ -Strahlen-Behandlung sogar eine Sensitivierung, aber keine Protektion der Zellen beobachten. Das gleiche konnten Bernges *et al.* [40] nach MNNG-Behandlung in Ratten-Zellen zeigen. Dass PARP-1 zum Zelltod durch Nekrose über Depletion der NAD^+ - und ATP-Level führen kann, wurde schon früher gezeigt [9]. In PARP-1^{-/-} Fibroblasten verursachte eine PARP-1-Deletionsmutante, die nicht mehr durch Caspasen gespalten werden konnte, eine gesteigerte Zellsterblichkeit [47], was die negativen Folgen einer PARP-1 Überaktivität in Zellen mit exzessiver DNA-Schädigung zeigt.

5.8 Ausblick

Die bisher erhaltenen Ergebnisse zeigen einen deutlichen, positiven Zusammenhang zwischen PARP-1-Aktivität und genomischer Stabilität. Die hierbei als Marker benutzte Mikrokernbildung nach DNA-Schädigung ist sehr sensitiv und kostengünstig. Leider hat sich die Auswertung der Versuche als sehr zeitaufwendig herausgestellt, was eine Untersuchung anderer DNA-schädigender Agenzien bei unterschiedlichen Bedingungen in verschiedenen Zelllinien erschwert. Sinnvoll wäre es deswegen, eine Methodik für eine schnellere Verarbeitung der Proben zu etablieren. Hierfür käme eine computerunterstützte, visuelle Auswertung in Frage, oder das Erfassen der Mikrokerns mittels FACS-Technologie [37][22]. Bei zukünftigen Untersuchungen wäre es interessant, neben Inhibitoren von PARP auch siRNA zur Hemmung der PARP-1-Aktivität zu benutzen. Des Weiteren wäre über die siRNA-Technologie eine gezielte Ausschaltung einzelner Mitglieder der PARP-Familie möglich, was eine Untersuchung der jeweiligen Auswirkungen zulassen würde. Die Schädigung mit unterschiedlichen Mikrokern-induzierenden Chemikalien könnte auch neue Erkenntnisse über die notwendige Beteiligung von PARP-1 bei unterschiedlichen Reparatur-Prozessen geben.

Danksagung

Auf der ersten Seite musste ich schreiben das ich diese Diplomarbeit selbstständig verfasst habe und ich alle Hilfsmittel angegeben habe. Aber ein paar „Hilfsmittel“ habe ich noch nicht erwähnt.

Hilfsmittel

(menschlicher und sozialer Natur)

<i>Name</i>	<i>Anwendung</i>	<i>Firma und Preis</i>
Prof. Alexander Bürkle	möglichst wenn man nicht mehr weiter weis und einen guten Rat braucht	AG Bürkle, über den Preis wurde stillschweigen vereinbart
Karin Heine, Malin Hinze und Sascha Beneke	auf Reisen zur Erhöhung des Spaß-Faktors und bei Entzugserscheinungen der deutschen Rechtschreibung	AG Bürkle, 3 Bier oder eine Computer-Reparatur
Katharina Hüttner	bei Verstimmungen jeglicher Art und Laborfragen jeglicher Weise	AG Bürkle, Schokolade und ein Lächeln
Anja, Claudia, Daniela, Elisa, Jens, Jörg, Madleine, Momo, Muriel, Sascha, Thilo, Tine	alleine oder im Multi-Pack, wie Vitamine (man braucht sie fürs tägliche Leben)	AG Bürkle, Preis auf Nachfrage
Charlotte	meist nach der Arbeit in hoher Dosierung	nicht mehr erhältlich, sowieso unbezahlbar
Mama und Papa, Conny	nicht mehr so oft wie früher, aber immer noch unverzichtbar	Family & Home GmbH, war ein Geschenk

Vielen Dank Euch allen !!!

6 Literaturverzeichnis

1. Chambon P.,J. D. Weill and P. Mandel, Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* (1963) **11** :39-43.
2. Bouchard V. J.,M. Rouleau and G. G. Poirier, PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Exp Hematol* (2003) **31** :446-54.
7. De Murcia G, Shall S (eds), Poly(ADP-Ribosylation) Reactions. From DNA damage and stress signalling to cell death. *Oxford University Press* (2000) :.
3. Mendoza-Alvarez H. and R. Alvarez-Gonzalez, Poly(ADP-ribose) polymerase is a catalytic dimer and the automodification reaction is intermolecular. *J Biol Chem* (1993) **268** :22575-80.
4. Burkle A., Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosylation). *Bioessays* (2001) **23** : 795-806.
5. Tong W. M.,M. P. Hande,P. M. Lansdorp and Z. Q. Wang, DNA strand break-sensing molecule poly(ADP-Ribose) polymerase cooperates with p53 in telomere function, chromosome stability, and tumor suppression. *Mol Cell Biol* (2001) **21** :4046-54.
6. Susse S.,C. J. Scholz,A. Burkle and L. Wiesmuller, Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) and p53 independently function in regulating double-strand break repair in primate cells. *Nucleic Acids Res* (2004) **32** :669-80.
8. Grube K. and A. Bürkle, Poly(ADP-ribose) polymerase activity in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-specific life span.. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992) **89** :11759-11763.
9. Virag L. and C. Szabo, The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* (2002) **54** :375-429.
10. Poirier G. G.,G. de Murcia, et al., Poly(ADP-ribosylation) of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1982) **79** :3423-7.
11. Noel G.,N. Giocanti, et al., Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) is not involved in DNA double-strand break recovery. *BMC Cell Biol* (2003) **4** :7.
12. Schultz N.,E. Lopez,N. Saleh-Gohari and T. Helleday, Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) has a controlling role in homologous recombination. *Nucleic Acids Res* (2003) **31** :4959-64.
13. Rudat V.,N. Bachmann,J. H. Kupper and K. J. Weber, Overexpression of the DNA-binding domain of poly(ADP-ribose) polymerase inhibits rejoining of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol* (2001) **77** :303-7.

14. Mendoza-Alvarez H. and R. Alvarez-Gonzalez, The 40 kDa carboxy-terminal domain of poly (ADP-ribose) polymerase-1 forms catalytically competent homo- and heterodimers in the absence of DNA. *J Mol Biol* (2004) **336** :105-14.
15. Ha H. C. and S. H. Snyder, Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999) **96** :13978-82.
16. Cosi C., New inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase and their potential therapeutic targets. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* (2002) **12** :1047-1071.
17. Hassa P. O. and M. O. Hottiger, The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cell Mol Life Sci* (2002) **59** :1534-53.
18. Hassa P. O., C. Buerki, et al., Transcriptional coactivation of nuclear factor-kappaB-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP)-ribose polymerase-1. *J Biol Chem* (2003) **278** :45145-53.
19. Kupper J. H., G. de Murcia and A. Burkle, Inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation by overexpressing the poly(ADP-ribose) polymerase DNA-binding domain in mammalian cells. *J Biol Chem* (1990) **265** :18721-4.
20. Kupper J. H., M. Muller and I. Wolf, NAD(+) consumption in carcinogen-treated hamster cells overexpressing a dominant negative mutant of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem Biophys Res Commun* (1999) **265** :525-9.
21. Zankl H, 25 Jahre Institut für Humangenetik an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes. *Röhrig Universitätsverlag* (1999) **0** :251-288.
22. Kirsch-Volders M., T. Sofuni, et al., Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat Res* (2003) **540** :153-63.
23. Fenech M., The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* (2000) **455** :81-95.
24. Gang Niu, Bleomycin. *Free Radicals in Biology and Medicine* (2003) **77** :0-10.
25. Mir L. M., O. Tounekti and S. Orlowski, Bleomycin: revival of an old drug. *Gen Pharmacol* (1996) **27** :745-8.
26. Meyer R, Negative regulation of alkylation-induced sister-chromatid exchange by poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity. *Int. J. Cancer* (2000) **88** :351-355.
27. Schreiber V., D. Hunting, et al., A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis, and sister chromatid exchange following DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995) **92** :4753-7.
28. Kupper J. H., M. Muller, et al., trans-dominant inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation sensitizes cells against gamma-irradiation and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine but does not limit DNA replication of a polyomavirus replicon. *Mol Cell Biol* (1995) **15** :3154-63.

29. Kawamitsu H., H. Hoshino, et al., Monoclonal antibodies to poly(adenosine diphosphate ribose) recognize different structures. *Biochemistry* (1984) **23** :3771-7.
30. Jones C. B., J. McIntosh, et al., Regulation of bleomycin-induced DNA breakage and chromatin structure in lung endothelial cells by integrins and poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Pharmacol* (2001) **59** :69-75.
31. Poddevin B., S. Orłowski, J. Belehradek, Jr. and L. M. Mir, Very high cytotoxicity of bleomycin introduced into the cytosol of cells in culture. *Biochem Pharmacol* (1991) **0** :S67-75.
32. Snyder R. D. and L. Strekowski, Enhancement of bleomycin-induced micronucleus formation in V79 cells as a rapid and sensitive screen for non-covalent DNA-binding compounds. *Mutat Res* (1999) **444** :181-92.
33. Wang Z. Q., L. Stingl, et al., PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev* (1997) **11** :2347-58.
34. de Murcia J. M., C. Niedergang, et al., Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) **94** :7303-7.
35. Yu S. W., H. Wang, et al., Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* (2002) **297** :259-63.
36. Rothkamm K., I. Krüger, L. H. Thompson and M. Lobrich, Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* (2003) **23** :5706-15.
37. Roman D., F. Locher, et al., Evaluation of a new procedure for the flow cytometric analysis of in vitro, chemically induced micronuclei in V79 cells. *Environ Mol Mutagen* (1998) **32** :387-96.
38. Garriott M. L., J. B. Phelps and W. P. Hoffman, A protocol for the in vitro micronucleus test. I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutat Res* (2002) **517** :123-34.
39. Caria H., A. Quintas, T. Chaveca and J. Rueff, The role of poly(ADP-ribose) polymerase in the induction of sister chromatid exchanges and micronuclei by mitomycin C in Down's syndrome cells as compared to euploid cells. *Mutat Res* (1997) **377** :269-77.
40. Bernges F., A. Burkle, J. H. Kupper and W. J. Zeller, Functional overexpression of human poly(ADP-ribose) polymerase in transfected rat tumor cells. *Carcinogenesis* (1997) **18** :663-8.
41. Fritz G., B. Auer and B. Kaina, Effect of transfection of human poly(ADP-ribose) polymerase in Chinese hamster cells on mutagen resistance. *Mutat Res* (1994) **308** :127-33.
42. Kupper J. H., L. van Gool, M. Müller and A. Burkle, Detection of poly(ADP-ribose) polymerase and its reaction product poly(ADP-ribose) by immunocytochemistry. *Histochem J* (1996) **28** :391-5.

43. Rajaei-Behbahani N.,P. Schmezer,A. Burkle and H. Bartsch, Quantitative assessment of bleomycin-induced poly(ADP-ribosyl)ation in human lymphocytes by immunofluorescence and image analysis. *J Immunol Methods* (2001) **244** :145-51.
44. Hentze H.,I. Schmitz, et al., Glutathione dependence of caspase-8 activation at the death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* (2002) **277** :5588-95.
45. Schwab B. L.,D. Guerini, et al., Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ* (2002) **9** :818-31.
46. Van Gool L.,R. Meyer, et al., Overexpression of human poly(ADP-ribose) polymerase in transfected hamster cells leads to increased poly(ADP-ribosyl)ation and cellular sensitization to gamma irradiation. *Eur J Biochem* (1997) **244** :15-20.
47. Herceg Z. and Z. Q. Wang, Failure of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis. *Mol Cell Biol* (1999) **19** :5124-33.