**Einfluss toxischer Metallionen auf die Funktion von
Zinkfinger-DNA-Reparaturproteinen**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Fachbereich 2

Biologie / Chemie

der Universität Bremen

von

Monika Asmuß

Bremen 2000

Gutachter der Dissertation:

- 1. Gutachterin: Prof. Dr. Andrea Hartwig**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Detmar Beyersmann**

Berichte aus der Biologie

Monika Asmuss

**Einfluss toxischer Metallionen auf die Funktion
von Zinkfinger-DNA-Reparaturproteinen**

D 46 (Diss. Universität Bremen)

Shaker Verlag
Aachen 2001

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Asmuss, Monika:

Einfluss toxischer Metallionen auf die Funktion von
Zinkfinger-DNA-Reparaturproteinen / Monika Asmuss.

Aachen : Shaker, 2001

(Berichte aus der Biologie)

Zugl.: Bremen, Univ., Diss., 2000

ISBN 3-8265-8404-X

Copyright Shaker Verlag 2001

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen
oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungs-
anlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8265-8404-X

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Andrea Hartwig für die freundliche Betreuung und Unterstützung während der ganzen Zeit der Promotion. Ihre Bereitschaft zu Diskussionen, ihr Wissen und ihre Kenntnisse haben mir ausserordentlich geholfen.

Für die gute Arbeitsatmosphäre im ersten Jahr der Promotion danke ich Prof. Dr. Detmar Beyersmann und seiner Arbeitsgruppe in Bremen.

Den Kolleginnen und Kollegen im Institut für Lebensmittelchemie der Universität Karlsruhe danke ich für die Möglichkeit, meine Promotion in angenehmer und freundlicher Atmosphäre in Karlsruhe fortzusetzen. Hier gilt mein besonderer Dank Ingo Ehleben und Tanja Schwerdtle, die mir in vielfältiger Weise geholfen haben, sowie unserer technischen Mitarbeiterin Anke Pelzer für die Mitarbeit bei den PARP-Versuchen.

Prof. Dr. Bernd Epe und seiner Arbeitsgruppe in Mainz danke ich für die Unterstützung bei der PM2-Präparation.

Bei Herrn Prof. Dr. Serge Boiteux bedanke ich mich für die Überlassung des Fpg-Proteins und bei Herrn Dr. André Eker für die Überlassung des XPA-Proteins.

Der Hans-Böckler-Stiftung danke ich dafür, dass sie diese Promotion materiell durch die Gewährung eines Promotionsstipendiums ermöglicht und darüberhinaus sehr anregende interdisziplinäre Begegnungen und Diskussionen gefördert hat.

Inhalt		I
1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	3
2.1.	Thematische Einführung	3
2.2.	Charakteristik der untersuchten Metalle	4
2.2.1.	Physikalisch-chemische Eigenschaften	4
2.2.2.	Toxische, mutagene und cancerogene Eigenschaften	5
2.3.	Einfluss der untersuchten Metallionen auf DNA-Reparaturprozesse	11
2.4.	Metallionen und Zinkfingerproteine	13
2.5.	Die Basen-Exzisionsreparatur und die Aufgaben der Zinkfingerproteine Fpg und XPA	16
2.5.1.	Die Basen-Exzisionsreparatur in E. coli und in Säugerzellen	16
2.5.2.	Die Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase (Fpg-Protein) und ihre Funktionen innerhalb der Basen-Exzisionsreparatur in E. coli	18
2.5.3.	Die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) und ihre Funktionen innerhalb der Basen-Exzisionsreparatur in Säugerzellen	20
2.6.	Die Nukleotid-Exzisionsreparatur in Säugerzellen und die Aufgaben des XPA-Proteins	23
2.6.1.	Die Nukleotid-Exzisionsreparatur in Säugerzellen	23
2.6.2.	Das XPA-Protein und seine Funktionen innerhalb der Nukleotid-Exzisionsreparatur in Säugerzellen	24
3.	Fragestellung	27
4.	Material und Methoden	29
4.1.	Material	29
4.2.	Methoden	29
4.2.1	Präparation der PM2-DNA	29

Inhalt		II
4.2.1.1.	Reaktivierung der Phagen	30
4.2.1.2.	Plaque-Test	30
4.2.1.3.	PM2-Präparation	31
4.2.2.	PM2-Assay zur Bestimmung der Aktivität des Fpg-Proteins	33
4.2.2.1.	Schädigung der PM2-DNA mit Methylenblau/Licht	34
4.2.2.2.	Detektion der Enzym-Aktivität	34
4.2.2.3.	Quantifizierung der Enzym-Aktivität	35
4.2.3.	Gelshift-Assay mit XPA	36
4.2.3.1.	Prinzip des Gelshift-Assays	36
4.2.3.2.	Versuchsdurchführung	38
4.2.4.	Detektion von poly(ADP-Ribose) in HeLa-Zellen mittels Immunofluoreszenz	41
4.2.4.1.	Zellkultur	41
4.2.4.2.	Metallinkubation und Strangbruchinduktion mit H ₂ O ₂	42
4.2.4.3.	Detektion	42
4.2.4.4.	DAPI-Färbung und Aufbewahrung der Präparate	43
4.2.4.5.	Auswertung	44
5.	Ergebnisse	45
5.1.	Einfluss von Metallionen auf die Aktivität des Fpg-Proteins	45
5.1.1.	PM2-Präparation	45
5.1.2.	Schadensinduktion	45
5.1.3.	Einfluss von Ni(II), Pb(II), As(III) und Co(II) auf die Aktivität des Fpg-Proteins	47
5.1.4.	Einfluss von Cd(II), Cu(II) und Hg(II) auf die Aktivität des Fpg-Proteins	49
5.1.5.	Einfluss von Zn(II) auf die Hemmung der Aktivität des Fpg-Proteins durch Cd(II), Cu(II) und Hg(II)	50

Inhalt	III	
5.1.6.	Einfluss von Glutathion auf die Hemmung der Aktivität des Fpg-Proteins durch Cd(II), Cu(II) und Hg(II)	54
5.2.	Einfluss von Metallionen auf die DNA-Bindungsfähigkeit des XPA-Proteins	57
5.2.1.	Optimierung der Versuchsbedingungen	57
5.2.2.	Einfluss von As(III), Pb(II) und Hg(II) auf die DNA-Bindungsfähigkeit des XPA-Proteins	59
5.2.3.	Einfluss von Cd(II), Cu(II), Co(II) und Ni(II) auf die DNA-Bindungsfähigkeit des XPA-Proteins	61
5.2.4.	Einfluss von Zn(II) auf die Hemmung der DNA-Bindungsfähigkeit des XPA-Proteins durch Cd(II), Cu(II), Co(II) und Ni(II)	64
5.3.	Einfluss von Cd(II), Ni(II) und As(III) auf die Aktivität der PARP in HeLa-Zellen	69
5.3.1.	PARP-Aktivität ohne Inkubation mit Metallen	69
5.3.2.	Einfluss von Cd(II) auf die Aktivität der PARP	72
5.3.3.	Einfluss von Ni(II) auf die Aktivität der PARP	74
5.3.4.	Einfluss von As(II) auf die Aktivität der PARP	78
6.	Diskussion	81
6.1.	Einfluss toxischer und cancerogener Metallverbindungen auf die Aktivität des bakteriellen Fpg-Proteins	81
6.1.1.	Einfluss von Ni(II), Pb(II), As(III) und Co(II) auf die Funktion des Fpg-Protein	81
6.1.2.	Einfluss von Hg(II), Cu(II) und Cd(II) auf die Funktion des Fpg-Proteins	83
6.2.	Einfluss toxischer und cancerogener Metallverbindungen auf die DNA-Bindungsfähigkeit des Säuger-Reparatur-Proteins XPA	85
6.2.1.	Einfluss von As(III), Pb(II) und Hg(II) auf die DNA-Bindungsfähigkeit des XPA-Proteins	86
6.2.2.	Einfluss von Cd(II), Cu(II), Co(II) und Ni(II) auf die DNA-Bindungsfähigkeit des XPA-Proteins	88
6.3.	Einfluss von Cd(II), Ni(II) und As(III) auf die PARP-Aktivität	93

6.4.	Potentielle biologische Relevanz der Ergebnisse	96
7.	Literaturverzeichnis	101
8.	Anhang	113
8.1.	Liste der verwendeten Chemikalien	113
8.2.	Verwendete Lösungen und Puffer	116
8.3.	Abkürzungen	122