

# **Untersuchungen zum Einfluss von Sulforaphan auf die DNA-Einzelstrangbruch- und Nukleotidexzisionsreparatur**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Lebensmittelchemikerin

Ann Liza Piberger

aus

Berlin

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky

Referentin: Prof. Dr. Andrea Hartwig

Korreferent: Prof. Dr. Holger Puchta

Tag der mündlichen Prüfung: 14.04.2014



## **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Darüber hinaus erkläre ich, dass die Arbeit nicht anderweitig als Prüfungsarbeit oder als Dissertation bei einer anderen Fakultät verwendet wird oder wurde.

Karlsruhe, 13.02.2014

Ann Liza Piberger



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
2.1 SULFORAPHAN .....	3
2.1.1 Vorkommen und Exposition .....	3
2.1.2 Resorption, Metabolismus und Bioverfügbarkeit .....	5
2.1.3 Thiolreaktivität und Interaktion mit Keap1 .....	9
2.2 DNA-SCHÄDIGUNGEN UND DEREN REPARATUR.....	11
2.2.1 Wasserstoffperoxid .....	13
2.2.2 Benzo[a]pyren .....	15
2.2.3 Die DNA-Einzelstrangbruchreparatur.....	16
2.2.3.1 Poly(ADP-Ribose)-Polymerase und Poly(ADP-Ribosyl)ierung .....	19
2.2.4 Die Nukleotidexzisionsreparatur.....	22
2.2.4.1 Das Xeroderma Pigmentosum A-Protein .....	25
2.2.4.2 p53 und die Nukleotidexzisionsreparatur .....	27
<b>3. FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>28</b>
<b>4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>30</b>
4.1 ZYTOTOXIZITÄT .....	30
4.1.1 Einfluss von Sulforaphan auf die Viabilität von HCT 116-Zellen.....	30
4.1.2 Einfluss von Sulforaphan auf die Viabilität in Kombination mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und (+)-anti-BPDE .....	31
4.2 BIOVERFÜGBARKEIT UND INTRAZELLULÄRES METABOLITENMUSTER.....	33
4.2.1 Bioverfügbarkeit von Sulforaphan.....	34
4.2.2 Intrazelluläres Metabolitenmuster von Sulforaphan.....	36
4.3 BEEINFLUSSUNG DES ZELLULÄREN GLUTATHIONHAUSHALTS DURCH SULFORAPHAN .....	40
4.3.1 Gesamtglutathionstatus .....	41
4.3.2 Genexpression von $\gamma$ -Glutamylcysteinylase und Glutathionreduktase .....	43
4.4 BEEINFLUSSUNG DER DNA-EINZELSTRANGBRUCHREPARATUR DURCH SULFORAPHAN.....	45
4.4.1 Induktion von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -vermittelten DNA-Strangbrüchen.....	45
4.4.1.1 Anzahl der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierten DNA-Strangbrüche .....	45
4.4.1.2 Enzymaktivität von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -detoxifizierenden Enzymen .....	49
4.4.1.3 Genexpression von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -detoxifizierenden Enzymen .....	50
4.4.2 Reparatur von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierten DNA-Strangbrüchen.....	51
4.4.3 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung .....	53
4.4.3.1 Untersuchungen in HeLa S3-Zellen .....	53
4.4.3.2 Untersuchungen an isolierter PARP-1 .....	55
4.5 BEEINFLUSSUNG DER NUKLEOTIDEXZISIONSREPARATUR DURCH SULFORAPHAN .....	59
4.5.1 Schadensinduktion von (+)-anti-BPDE-vermittelten DNA-Addukten .....	59
4.5.2 Reparatur von (+)-anti-BPDE-induzierten DNA-Addukten .....	61

4.5.3	<i>Beeinflussung der Genexpression von Nukleotidexzisionsreparatur-assoziierten Genen</i> .....	63
4.5.4	<i>Interaktion von Sulforaphan mit XPA</i> .....	65
4.5.4.1	Beeinflussung der Zink-bindenden Struktur von XPA (XPAzf) .....	65
4.5.4.2	Rolle des XPA-Status bei der Beeinflussung der BPDE-induzierten Zytotoxizität durch Sulforaphan .....	66
4.5.5	<i>Einfluss des p53-Status auf die Sulforaphan-induzierte Inhibition der Nukleotidexzisionsreparatur</i> .....	69
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION</b> .....	<b>73</b>
<b>6.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>81</b>
6.1	ZELLKULTUR .....	81
6.1.1	<i>Zellkulturen und deren Kultivierung</i> .....	81
6.1.2	<i>Transfektion der XP12RO-Zelllinie</i> .....	82
6.1.3	<i>Inkubationen</i> .....	82
6.1.4	<i>Koloniebildungsfähigkeit</i> .....	83
6.2	ZELLULÄRE BIOVERFÜGBARKEIT UND INTRAZELLULÄRES METABOLITENMUSTER .....	83
6.3	BESTIMMUNG DES GESAMTGLUTATHIONGEHALTS NACH TIETZE .....	84
6.4	BESTIMMUNG DER ENZYMAKTIVITÄT VON H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -DETOXIFIZIERENDEN ENZYMEN .....	86
6.5	BESTIMMUNG DER GENEXPRESSION .....	87
6.6	QUANTIFIZIERUNG VON DNA-STRANGBRÜCHEN .....	90
6.7	QUANTIFIZIERUNG VON BPDE-INDUZIERTEN DNA-ADDUKTEN.....	92
6.8	QUANTIFIZIERUNG DER ZELLULÄREN POLY(ADP-RIBOSYL)IERUNG .....	94
6.9	BESTIMMUNG DER PARP-1-VERMITTELTEN POLY(ADP-RIBOSYL)IERUNG <i>IN VITRO</i> .....	94
6.10	ZINK-FREISETZUNG AUS XPAZF.....	95
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>97</b>
<b>8.</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>118</b>
8.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	118
8.2	VERWENDETE CHEMIKALIEN .....	122
8.3	LÖSUNGEN UND PUFFER.....	125
8.4	VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	127
8.5	VERWENDETE GERÄTE.....	128
8.6	ERGÄNZENDE DATEN.....	130
8.6.1	<i>HPLC-Analyse der BPDE-DNA-Addukte als Tetrol I-1</i> .....	130
8.6.1.1	Analyseparameter .....	130
8.6.1.2	Externe Kalibrierung .....	131
8.6.2	<i>LC-ESI-MS/MS-Analyse der Sulforaphan-Metaboliten</i> .....	132
8.6.2.1	Analyseparameter .....	132
8.6.2.2	Externe Kalibrierung .....	133
8.6.3	<i>Beeinflussung der Genexpression durch Sulforaphan</i> .....	134
8.6.3.1	PCR-Primer.....	134

8.6.3.2	Temperaturprogramme .....	134
8.6.3.3	Beeinflussung der Genexpression der <i>GSTP1</i> -, <i>ABCB1</i> - und <i>ABCC1</i> -Gene.....	135
8.6.4	<i>Beeinflussung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermittelten Schadensinduktion in HeLa S3-Zellen durch Sulforaphan.....</i>	<i>136</i>
8.6.5	<i>Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Sulforaphan .....</i>	<i>136</i>
8.6.6	<i>Beeinflussung der rekombinanten PARP-1 durch die späten Metaboliten von Sulforaphan in vitro .....</i>	<i>137</i>
8.6.7	<i>Beeinflussung der Nukleotidexzisionsreparatur von (+)-anti-BPDE-induzierten DNA-Addukten durch Sulforaphan.....</i>	<i>137</i>
<b>PUBLIKATIONSLISTE .....</b>		<b>139</b>
<b>LEBENS LAUF.....</b>		<b>143</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>		<b>144</b>



## 1. Zusammenfassung

Dem vor allem in Broccoli vorkommenden Isothiocyanat Sulforaphan werden krebsprotektive Eigenschaften zugesprochen, welche in erster Linie aus der Aktivierung des Transkriptionsfaktors nrf2 und einer damit einhergehenden Hochregulation von Fremdstoff-metabolisierenden Phase-II-Enzymen abgeleitet werden. Aus diesem Grund sind Broccoli-basierte Nahrungsergänzungsmittel weit verbreitet und eine stetig steigende Exposition gegenüber Sulforaphan kann vermutet werden. Nichtsdestotrotz fehlen systematische Risikoabschätzungen und toxikologische Bewertungen solcher Supplemente bis dato völlig und vor allem im Bereich von potentiell adversen Beeinflussungen zellulärer Prozesse durch Sulforaphan ist großer Forschungsbedarf vorhanden. Die vorliegende Arbeit leistet in diesem Zusammenhang erstmalig einen kritischen Beitrag zur Auswirkung des Isothiocyanates auf essentielle DNA-Reparaturvorgänge. Ausgangspunkt der Untersuchungen war eine in der Literatur beschriebene, mit der nrf2-Aktivierung assoziierte Zink-Freisetzung aus dem regulatorischen Metalloprotein Keap1, die durch eine Thiolreaktivität von Sulforaphan induziert wird. Es stellte sich die Frage, ob Zink-bindende DNA-Reparaturproteine und die durch sie koordinierten Reparaturprozesse in diesem Sinne gleichfalls durch Sulforaphan beeinflusst werden können. Im Weiteren erfolgte eine thematische Fokussierung auf die DNA-Einzelstrangbruch- und Nukleotidexzisionsreparatur. Während die DNA-Einzelstrangbruchreparatur DNA-Strangbrüche beseitigt und von der Zink-bindenden Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) abhängig ist, entfernt die Nukleotidexzisionsreparatur unter Beteiligung des Zinkfinger-Proteins Xeroderma Pigmentosum A (XPA) eine Vielzahl sperriger, vorrangig exogen induzierter DNA-Läsionen. Als DNA-schädigende Agenzien zur Induktion von entsprechenden Modellläsionen dienten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowie der reaktive Metabolit von Benzo[a]pyren, (+)-*anti*-BPDE. Eine Kombinationsbehandlung von Zellkulturen mit Sulforaphan gab Aufschluss über die Beeinflussung der beiden DNA-Reparaturwege.

Subzelluläre Untersuchungen an der rekombinanten PARP-1 und einem XPAzf-Peptid, das der Zinkfinger-Domäne von XPA entspricht, verdeutlichen die generelle *in vitro*-Fähigkeit von Sulforaphan, mit Zink-bindenden Strukturen von essentiellen DNA-Reparaturproteinen zu interagieren. Dementsprechend setzte Sulforaphan konzentrationsabhängig Zink aus XPAzf frei und verminderte die PARP-1-Enzymaktivität in Form seiner frühen Metaboliten, den GSH-Addukten Sulforaphan- und Erucin-GSH, in einem Thiol-abhängigen Mechanismus. Bioverfügbarkeitsuntersuchungen bestätigten ferner die zelluläre Interkonversion des Sulfoxides

Sulforaphan zu dessen Thioether-Analogen Erucin sowie die Relevanz der subzellulär eingesetzten Konzentrationen.

Erste Anzeichen für eine zelluläre Störung der PARP-1- und XPA-kooordinierten Reparaturprozesse zeigten sich anhand einer synergistischen Zunahme der Zytotoxizität der DNA-schädigenden Agenzien in Kombination mit Sulforaphan in Zellkulturen. Im Einklang damit wurden sowohl die Ligation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Einzelstrangbrüchen als auch die Exzision von (+)-*anti*-BPDE-induzierten DNA-Addukten signifikant durch nicht-zytotoxische Konzentrationen von Sulforaphan verlangsamt. In diesem Kontext trat die Verzögerung der DNA-Einzelstrangbruchreparatur bei mikromolaren Sulforaphan-Konzentrationen auf und wurde trotz einer erhöhten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermittelten Schadensinduktion von einer Abnahme der Poly(ADP-Ribosyl)ierung begleitet. Dies verdeutlichte eine potentielle Beteiligung der PARP-1 an der zellulären Interferenz von Sulforaphan mit der DNA-Einzelstrangbruchreparatur. Die Nukleotidexzisionsreparatur wurde dahingegen bereits bei vergleichsweise niedrigeren Expositionskonzentrationen selektiv, p53-unabhängig in der frühen Reparaturphase inhibiert. Ein signifikanter Effekt des XPA-Status auf die Beeinflussung der (+)-*anti*-BPDE-induzierten Zytotoxizität durch Sulforaphan bestätigte hierbei eine zelluläre Beteiligung von XPA an der Inhibition der Nukleotidexzisionsreparatur. Demgemäß reagierten XPA- und Nukleotidexzisionsreparaturprofiziente Zellen erheblich sensitiver gegenüber der Kombinationsbehandlung, obwohl weitere Mechanismen von Relevanz zu sein scheinen. Die Nukleotidexzisionsreparatur wurde des Weiteren nicht auf Ebene der Transkription von zentralen Reparaturfaktoren beeinflusst, wie Genexpressionsanalysen nach Sulforaphan-Inkubation zeigten.

Anhand der präsentierten Ergebnisse wird eine zelluläre Interferenz von Sulforaphan mit essentiellen DNA-Reparaturprozessen nachgewiesen, die vermutlich durch direkte Wechselwirkungen des Isothiocyanates oder seiner Metaboliten mit Zinkbindenden DNA-Reparaturproteinen wie PARP-1 oder XPA vermittelt wird. DNA-Reparaturprozesse sind allerdings unabdingbare Mechanismen zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität und die Gesamtheit der Resultate impliziert, dass die tägliche Aufnahme von Broccoli-basierten Nahrungsergänzungsmitteln vielmehr mit einer Gefährdung als einer Stabilisierung der Genomintegrität assoziiert ist.

## 2. Einleitung

### 2.1 Sulforaphan

Epidemiologische Studien zeigen einen inversen Zusammenhang zwischen dem *Brassica*-Gemüseverzehr und der Krebsinzidenz in mehreren Zielorganen (zusammengefasst in Verhoeven *et al.* 1996, Higdon *et al.* 2007). Dieser Effekt wird auf eine nur in diesen Gemüsen vorkommende Gruppe von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen namens Glucosinolate zurückgeführt und deren enzymatischen Hydrolyseprodukte werden als zugrunde liegende, bioaktive Substanzen postuliert. Glucosinolate werden im Sekundärstoffwechsel aus Aminosäuren gebildet und sind (Z)-N-Hydroximosulfatester, die neben einer Schwefel-gebundenen  $\beta$ -D-Glucopyranose einen variablen Rest aufweisen (zusammengefasst in Halkier und Gershenzon 2006, Ettliger und Lundeen 1956, Ettliger und Lundeen 1957). Die Hydrolyse der Substanzen erfolgt durch die pflanzeigene Myrosinase, eine  $\beta$ -Thioglucosidase, welche in Myrosinzellen räumlich getrennt von den vakuolär lokalisierten Glucosinolaten vorliegt (Thangstad *et al.* 1991). Im Falle einer Gewebsverletzung durch mechanische Einwirkungen bei der Ernte, Verarbeitung oder Kauen des rohen Gemüses werden die Gewebekompartimente zerstört, so dass Substrat und Enzym in räumliche Nähe zueinander kommen und die bioaktiven Abbauprodukte entstehen. Eines der am häufigsten untersuchten Glucosinolat-Abbauprodukte ist Sulforaphan, dem über verschiedene Mechanismen, wie beispielsweise die Induktion von Phase-II-Enzymen, krebsprotektive Eigenschaften zugeschrieben werden (zusammengefasst in Juge *et al.* 2007).

#### 2.1.1 Vorkommen und Exposition

Als Sulforaphan wird das 1-Isothiocyanato-4-methylsulfinyl-butan bezeichnet, dessen natürliche Expositionsquelle vor allem das *Brassica*-Gemüse Broccoli darstellt (Kushad *et al.* 1999). In diesem kommt Sulforaphan jedoch üblicherweise nicht bioverfügbar vor, sondern muss durch enzymatische Hydrolyse aus dem Glucosinolat Glucoraphanin freigesetzt werden (Abbildung 1). Dabei entsteht als Zwischenprodukt nach enzymatischer Abspaltung der Glucose ein instabiles Thiohydroximat-O-sulfat, das im Folgenden, je nach Reaktionsbedingungen, zu verschiedenen Endprodukten

stabilisiert werden kann. Unter neutralen pH-Bedingungen findet eine spontane Abspaltung des Sulfats mit anschließender Lossen-Umlagerung statt, wobei der aliphatische Rest vom oximischen Kohlenstoff an den benachbarten Stickstoff umgelagert und das Isothiocyanat Sulforaphan gebildet wird.

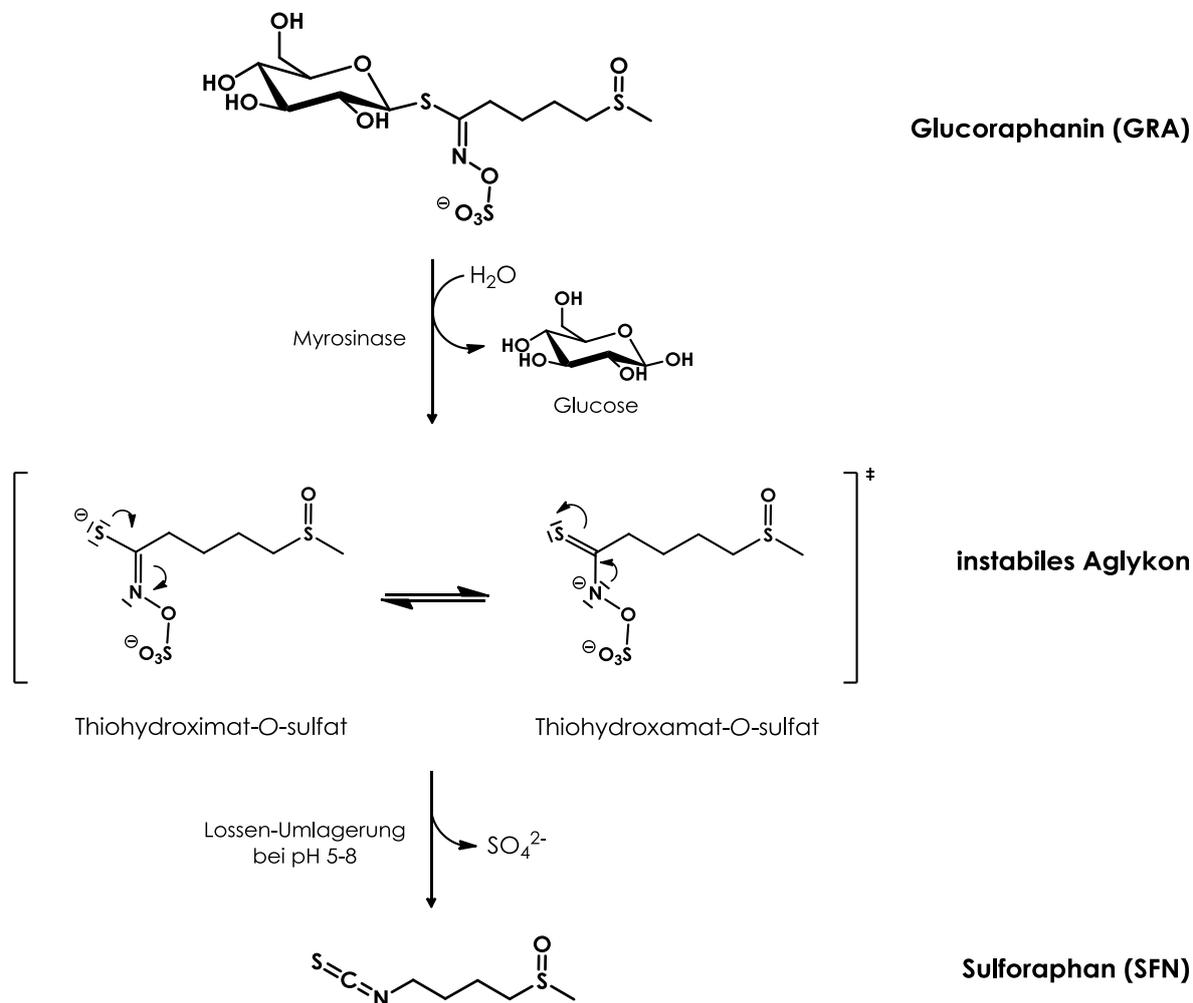


Abbildung 1: Enzymatische Freisetzung von Sulforaphan aus dem Glucosinolat Glucoraphanin

Im sauren pH-Bereich oder in Gegenwart von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen kann aus dem instabilen Aglykon unter Beteiligung des *epithiospecifier protein* auch ein Nitril entstehen (zusammengefasst in Bones und Rossiter 1996, Halkier und Gershenzon 2006), das bei der Autolyse einen großen Anteil der erzeugten Abbauprodukte in Broccoli ausmacht (Matusheski *et al.* 2001). Neben der Spaltung im Lebensmittel wird aus Glucoraphanin darüber hinaus im Kolon Sulforaphan und -nitril durch die assoziierte Mikrobiota freigesetzt (Saha *et al.* 2012). Zugleich variiert der Gehalt des Precursors stark zwischen verschiedenen Broccoli-Sorten (1,5 – 21,5  $\mu\text{mol/g}$  Trockenmasse), mit dem Entwicklungsstadium der Pflanze, den Klimabedingungen und Umweltfaktoren während der Zucht sowie mit den verzehrten Pflanzenorganen (Kushad *et al.* 1999, Fahey *et al.* 2001). Auch die Zubereitung des Gemüses kann etwa durch Auslaugen

in die Kochflüssigkeit und thermische Instabilität des Glucosinolats oder der pflanzeigenen Myrosinase den Glucoraphanin- und daraus freigesetzten Sulforaphan-Gehalt im verzehfertigen Lebensmittel beeinflussen (Goodrich *et al.* 1989, Howard *et al.* 1997). Obwohl eine genaue Bestimmung der Exposition gegenüber Sulforaphan demnach nicht möglich ist, gibt es zumindest für die tägliche Aufnahme des Precursors Glucoraphanin valide Daten aus der EPIC-Heidelberg Kohorten-Studie (Steinbrecher und Linseisen 2009). So werden 10 % der täglich verzehrten Glucosinolat-Gesamtmenge durch Glucoraphanin gestellt und mittlere Expositionswerte von 1,48 bzw. 1,23 mg/d für Männer bzw. Frauen erfasst. Die bedeutendste Expositionsquelle ist mit 19 % das *Brassica*-Gemüse Broccoli, wobei andere Gemüsearten, wie Rosen- und Blumenkohl sowie Rettich, ebenfalls eine signifikante Rolle spielen. Interessanterweise gibt es eine positive Korrelation zwischen Alter sowie Bildungsgrad der Studienteilnehmer\_innen und der täglich verzehrten Glucosinolat-Gesamtmenge, die wiederum negativ mit Rauchen assoziiert ist (Steinbrecher und Linseisen 2009).

Da mehrere Tierversuche implizieren, dass Sulforaphan die chemisch-getriebene Kanzerogenese inhibieren könnte (Zhang *et al.* 1994, Chung *et al.* 2000, Gills *et al.* 2006), sind neben den natürlichen Quellen eine Vielzahl von Broccoli- und *Brassica*-basierten Nahrungsergänzungsmitteln käuflich erwerbbar. Da weder die genaue Zusammensetzung noch die mit der täglichen Einnahme in den Organismus gelangenden Konzentrationen von Sulforaphan oder Glucoraphanin in diesem Kontext bekannt sind, ist der Beitrag dieser Supplemente zur Exposition unklar.

### **2.1.2 Resorption, Metabolismus und Bioverfügbarkeit**

Aus Untersuchungen mittels intestinalen Perfusionstechniken im menschlichen Jejunum ist bekannt, dass Sulforaphan zu etwa 75 % aus Broccoli-Extrakt resorbiert, ein Großteil (bis zu 60 %) jedoch anschließend als Glutathion (GSH)-Konjugat wieder in das Dünndarmlumen ausgeschieden wird. Die Resorption von Sulforaphan erfolgt hierbei vermutlich passiv mit einem Permeabilitätskoeffizienten von  $\sim 18,5 \cdot 10^{-4}$  cm/s (Petri *et al.* 2003). Zellkulturexperimente zeigen dazu passend eine zügige, intrazelluläre Akkumulation des GSH-Konjugats von Sulforaphan (Zhang 2000, Zhang 2001), welches anschließend über *multidrug resistance-related protein* (MRP)-Transporter wie MRP-1 und P-Glycoprotein 1 (Pgp-1) aktiv exportiert wird (Zhang und Callaway 2002). Vergleichbare, aktive Transportmechanismen des Sulforaphan-



auch all deren dithiocarbamatischen Metaboliten als 1,3-Benzodithiol-2-thion nach der Cyclokondensation mit Benzol-1,2-dithiol erfasst, die Unterscheidung der jeweiligen Stoffwechselformen jedoch nicht ermöglicht (Zhang *et al.* 1996). Der konkrete Nachweis der Entstehung jener Metaboliten nach dem Verzehr einer Broccoli-Suppe gelang erstmals 2005 im humanen Urin und Blutplasma unter Nutzung einer LC-MS/MS-Methode (Gasper *et al.* 2005). Darüber hinaus kann das Sulfoxid Sulforaphan im Organismus zu dessen Thioether-Analogon Erucin umgewandelt werden, welches ebenfalls über den Mercaptursäureweg verstoffwechselt und mit Urin und Galle ausgeschieden wird (Kassahun *et al.* 1997, Clarke *et al.* 2011, Saha *et al.* 2012). Die zugrunde liegenden Mechanismen hierfür sind bis heute unklar, doch werden sowohl Mikrobiota-assoziierte Reaktionen im Kolon als auch post-adsorptive Prozesse diskutiert. Abbildung 3 stellt entsprechend des heutigen Literaturstands einen zusammenfassenden Überblick des Metabolismus von Sulforaphan nach der Resorption dar.

Die Bioverfügbarkeit von Sulforaphan wird durch viele Parameter beeinflusst, weshalb verallgemeinernde Aussagen diesbezüglich schwer zu treffen sind. So kann, ähnlich wie bei Betrachtungen zur Exposition, nicht nur die Expositionsquelle, sondern auch die Verarbeitung des Lebensmittels von Bedeutung sein (Conaway *et al.* 2000, Shapiro *et al.* 2001, Rungapamestry *et al.* 2007). Beispielsweise zeigen Bestimmungen der Blutplasmakonzentration aller Sulforaphan-Metaboliten, dass die bereits niedrige Bioverfügbarkeit von Sulforaphan aus rohem Broccoli (37 %) durch Kochen des Gemüses um den Faktor 10 vermindert wird (Vermeulen *et al.* 2008). Ein vergleichbarer Effekt auf die Bioverfügbarkeit tritt des Weiteren nach Verarbeitung des Gemüses zum Nahrungsergänzungsmittel auf (Clarke *et al.* 2011, Cramer und Jeffery 2011). Eine genaue Abschätzung der Bioverfügbarkeit wird zusätzlich durch die Reaktivität von Sulforaphan erschwert, die unter anderem zu einer kovalenten Adduktbildung mit Proteinen führen kann (Mi *et al.* 2007, Kumar und Sabbioni 2010). Zudem können interindividuelle Variabilitäten, wie die Zusammensetzung der Mikrobiota des Kolons oder Polymorphismen in Glutathion-S-Transferase (GST)-Genen, einen signifikanten Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Sulforaphan haben. Epidemiologische Studien zeigen in diesem Kontext, dass GST M1- und T1-Polymorphismen mit einer Erhöhung der durch *Brassica*-Verzehr induzierten Protektion gegenüber der Krebsentstehung in Lunge, Darm und Brust assoziiert sind (zusammengefasst in Seow *et al.* 2005). Es wird postuliert, dass eine mit den Polymorphismen einhergehende, verminderte GST-Aktivität zu einer erhöhten Substanzkonzentration im Organismus führen kann, da die GST-katalysierte Konjugation von Sulforaphan dessen metabolischen Abbau einleitet.

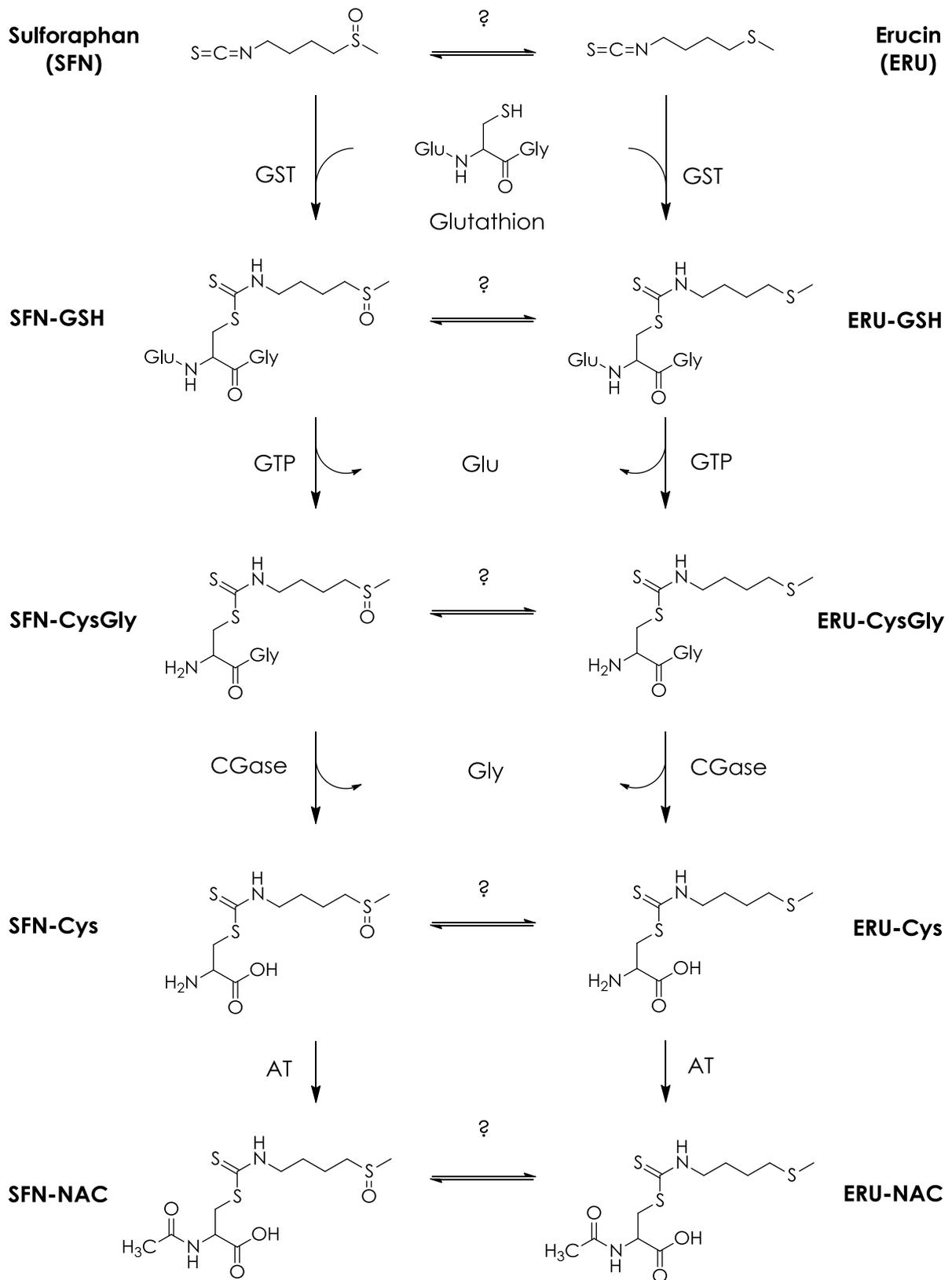


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des Metabolismus von Sulforaphan im Menschen nach der Resorption in den Organismus (modifiziert nach Al Janobi *et al.* 2006) (GST=Glutathion-S-Transferase; GTP= $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase; CGase=Cysteinylglycinase; AT=Acetyltransferase; Glu=Glutaminsäure; Gly=Glycin; Cys=Cystein; NAC=N-Acetylcystein)

Eine generalisierende Aussage ist aber auch hier nicht möglich, da zwar für Proband\_innen mit GST M1 Null-Genotyp eine vergleichsweise erhöhte Bioverfügbarkeit von Sulforaphan gezeigt werden konnte (Gasper *et al.* 2005), dies jedoch nicht reproduzierbar war oder bei einem gleichartigen GST P1-Polymorphismus der Fall zu sein scheint (Clarke *et al.* 2011, Saha *et al.* 2012).

Zusammenfassend ist die Bioverfügbarkeit von Sulforaphan vor allem durch die Quelle der enzymatischen Freisetzung aus dessen Vorläufer Glucoraphanin und dem damit verbundenen Ort der Resorption im Körper beeinflusst (Saha *et al.* 2012). Gelangt das Isothiocyanat nach Freisetzung durch Autolyse im Lebensmittel in den Gastrointestinaltrakt, so wird die Substanz vergleichsweise schnell im Dünndarm aufgenommen. Hierbei wurde die maximale Blutplasmakonzentration innerhalb von 90 min nach der Exposition detektiert und eine relativ hohe Bioverfügbarkeiten von ~ 55 % erreicht. Hat eine vorherige Verarbeitung des Lebensmittels dahingegen die intrinsische Myrosinase inaktiviert, so muss die enzymatische Freisetzung von Sulforaphan durch die Mikrobiota im Kolon stattfinden. Bedingt durch die verzögerte und niedrigere Resorption führt dies zu einer um den Faktor 10 verminderten und signifikant verspäteten Bioverfügbarkeit sowie maximalen Blutplasmakonzentration (Saha *et al.* 2012). Als grober Richtwert kann davon ausgegangen werden, dass nach dem Verzehr von Broccoli oder daraus erzeugten Zubereitungen die maximale Blutplasmakonzentration (Summe aller Sulforaphan-Metaboliten) im niedrigen mikromolaren Bereich liegt, jedoch starken interindividuellen Schwankungen unterworfen ist (Gasper *et al.* 2005, Saha *et al.* 2012).

### **2.1.3 Thiolreaktivität und Interaktion mit Keap1**

Die Reaktivität von Sulforaphan wird in erster Linie durch das elektrophile Kohlenstoffatom der Isothiocyanatgruppe bestimmt. Dieses kann mit biologischen Nucleophilen wie Aminen und Thiolen reagieren, wobei entweder stabile Thioharnstoff-Derivate oder labile Dithiocarbamat-Addukte gebildet werden. Da die Adduktbildung mit Thiolen bis zu 1.000 mal schneller als die mit Aminen abläuft, sind in biologischen Systemen vor allem deprotonierte Thiolat-Anionen mögliche Reaktionspartner. In Proteinen und Peptiden kommen hierfür in erster Linie Cystein-Thiole in Frage, deren  $pK_a$ -Werte durch benachbarte Aminosäuren wie Histidin, Arginin oder Lysin gesenkt werden (zusammengefasst in Brown und Hampton 2011). Des Weiteren kann die Komplexbildung von Zink-Ionen in Zink-bindenden Strukturen zu einer Erniedrigung des  $pK_a$  der koordinierenden Cystein-Thiole führen, was diese zu

empfindlichen Angriffspunkten von thiolreaktiven Agenzien macht (zusammengefasst in Maret 2004, Hartwig 2013).

Eine direkte Addition des elektrophilen Isothiocyanat-Kohlenstoffs von Sulforaphan an die nukleophile Sulfhydrylgruppe von GSH ist essentiell für die metabolische Ausscheidung der Substanz (siehe Kapitel 2.1.2). Diese Dithiocarbamat-Bildung kann enzymatisch, am effektivsten durch die GST P1-1-Isoform katalysiert, aber auch spontan stattfinden (Kolm *et al.* 1995) und ist reversibel (Zhang *et al.* 1995). Das GSH-Konjugat kann darüber hinaus weitere zelluläre Thiole durch eine nicht-enzymatische Thiolaustausch-Reaktion thiocarbamoylieren (Kassahun *et al.* 1997), was zur kovalenten Modifizierung einer Vielzahl von zellulären Proteinen führen kann. Auch für andere Modellverbindungen ist eine solche, direkte Addition von Sulforaphan an Sulfhydrylgruppen im Reagenzglas gezeigt worden. So kann Sulforaphan beispielsweise die Thiofunktionen in bovinen Serumalbumin kovalent modifizieren (Mi *et al.* 2007) und die Anzahl reduzierter Thiofunktionen in *N*-Acetylcystein vermindern (Maydt *et al.* 2013). Systematische Untersuchungen zur Thiolreaktivität von Sulforaphan zeigen ferner, dass die Sulfhydrylgruppe von verschiedenen Cystein-Derivaten zügig kovalent modifiziert und die entsprechenden Dithiocarbamate reversibel gebildet werden (Hanschen *et al.* 2012). Des Weiteren wird auch underivatisiertes Cystein mit einer Geschwindigkeitskonstante von  $6,04 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  an Sulforaphan addiert und ähnliche Thiolreaktivitäten können in der komplexen Lebensmittelmatrix nach endogener Freisetzung von Sulforaphan detektiert werden (Hanschen *et al.* 2012). Neben diesen Modellsubstanzen werden auch zelluläre Proteine kovalent durch Sulforaphan verändert. So ist sowohl für den Rezeptor *toll-like receptor* (TLR) 4 (Youn *et al.* 2010) als auch für das Stützprotein Tubulin (Mi *et al.* 2008) eine Interaktion mit Cysteinen *in vitro* gezeigt, die in Zellkulturen zu einer Unterdrückung der TLR4-Oligomerisierung und Inhibition der Mikrotubuli-Polymerisation durch Sulforaphan führt.

Eine Besonderheit hinsichtlich der Thiolreaktivität von Sulforaphan stellt die Wechselwirkung mit dem zytosolischen Sensorprotein *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1) dar. Keap1 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Transkriptionsfaktors *nuclear factor-E2-related factor 2* (nrf2), der die Expression von *antioxidant/electrophile response element* (ARE)-abhängigen Genen induziert. Unter basalen Bedingungen wird nrf2 durch Bindung an den Keap1-cullin 3 Ubiquitin-Ligase-Komplex im Zytosol gehalten und durch Ubiquitinierung für den proteasomalen Abbau markiert. Durch die Induktoren-vermittelte Anregung des Signalwegs kommt dieser Abbau von nrf2 zum Erliegen, wobei Cysteine in Keap1 als Sensoren dienen. Mehrere dieser in Summe 27 Sulfhydrylgruppen werden hierbei

entweder kovalent oder oxidativ durch Induktoren modifiziert, die demnach in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden können. Darauf folgend kann nrf2 in den Nukleus translokalisieren, dort mit dem *musculoaponeurotic fibrosarcoma protein* heterodimerisieren und so zur Expression von Genen führen, die vor allem für Phase-II-Enzyme und weitere katalytisch-aktive Proteine wie NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase 1 (NQO-1),  $\gamma$ -Glutamylcysteinyligase ( $\gamma$ -GCL) und Glutathionperoxidasen (GPx) codieren (zusammengefasst in Baird und Dinkova-Kostova 2011). Sulforaphan induziert eine solche Translokalisierung von nrf2 (Haack *et al.* 2010) und löst eine starke Hochregulation der Expression von Zielgenen wie beispielsweise NQO-1 aus (Zhang *et al.* 1992), was häufig als zugrunde liegender Mechanismus für krebsprotektive Wirkungen von Sulforaphan postuliert wird. Hierbei wird die Interaktion zwischen Keap1 und der entsprechenden Bindungsdomäne von nrf2 Thiol-abhängig gestört (Dinkova-Kostova *et al.* 2002) und die kovalente Anknüpfung von Sulforaphan an Sensor-Cysteine in Keap1 ist analytisch nachgewiesen (Hong *et al.* 2005). Seit 2005 ist darüber hinaus bekannt, dass Keap1 ein Zink-bindendes Metalloprotein ist, welches das Metall über reaktive Cysteine mit einer Assoziationskonstante von  $1 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}$  komplexiert (Dinkova-Kostova *et al.* 2005). Diese Zink-bindende Struktur scheint maßgeblich an der Sensorfunktion von Keap1 beteiligt zu sein, da die Aktivierung des Signalwegs mit einer Zink-Freisetzung aus dieser einhergeht. Ferner scheint sie strukturgebende Eigenschaften zu haben, da der Verlust des Zinks mit einer Konformationsänderung von Keap1 assoziiert ist. Sulforaphan induziert sowohl die Freisetzung von Zink aus Keap1 als auch die darauf folgende Konformationsänderung des Proteins (Dinkova-Kostova *et al.* 2005); somit ist die Thiolreaktivität von Sulforaphan im Falle von Keap1 erstmals an die Wechselwirkung mit einer Zink-bindenden Struktur geknüpft. Zu beachten ist jedoch, dass 2-3 % aller der durch das menschliche Genom codierten Proteine Zink-bindende Strukturen aufweisen (zusammengefasst in Matthews und Sunde 2002) und weiterführende Untersuchungen zur speziellen Beeinflussung solcher Proteine und von ihnen koordinierter Prozesse durch Sulforaphan bis heute völlig fehlen.

## **2.2 DNA-Schädigungen und deren Reparatur**

Die DNA als Trägerin der genetischen Erbinformation wird unentwegt durch verschiedenste Faktoren angegriffen und beschädigt, wobei eine Vielzahl von sowohl endogen als auch exogen induzierten DNA-Läsionen entstehen kann. Endogene DNA-Schäden werden spontan gebildet und stellen klassischerweise

oxidative oder hydrolytische Veränderungen bzw. Basenfehlpaarungen durch Replikationsfehler dar. Typische Beispiele hierfür sind die Desaminierung von Cytosin zu Uracil oder oxidative Modifizierungen von Guanin wie 8-Hydroxyguanin (8oxoG), sowie die Bildung von AP-Stellen durch Hydrolyse der *N*-glykosidischen Bindung zwischen Base und Zuckerphosphat-Gerüst (zusammengefasst in Friedberg *et al.* 2005). Solche DNA-Läsionen treten vergleichsweise häufig auf; so werden im haploiden Genom täglich etwa 18.000 apurinische Stellen gebildet (Nakamura *et al.* 1998), die teilweise in DNA-Einzelstrangbrüche überführt werden können. Bedeutend seltener sind dahingegen durch exogene Agenzien wie ionisierende und UV-Strahlung oder Chemikalien induzierte DNA-Doppelstrangbrüche oder sperrige, helixverzerrende DNA-Läsionen. Nichtsdestotrotz würde die Summe von DNA-Schädigungen ohne entsprechende, zelluläre Schutzmechanismen zügig zur Veränderung des Erbguts führen. Ein Wechselspiel von DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle und Apoptose sichert daher die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität. Das Ausmaß an DNA-Läsionen wird vor allem durch DNA-Reparaturprozesse gering gehalten, die sich in nebeneinander arbeitende, schadensspezifische Reparaturwege unterteilen lassen (Abbildung 4).

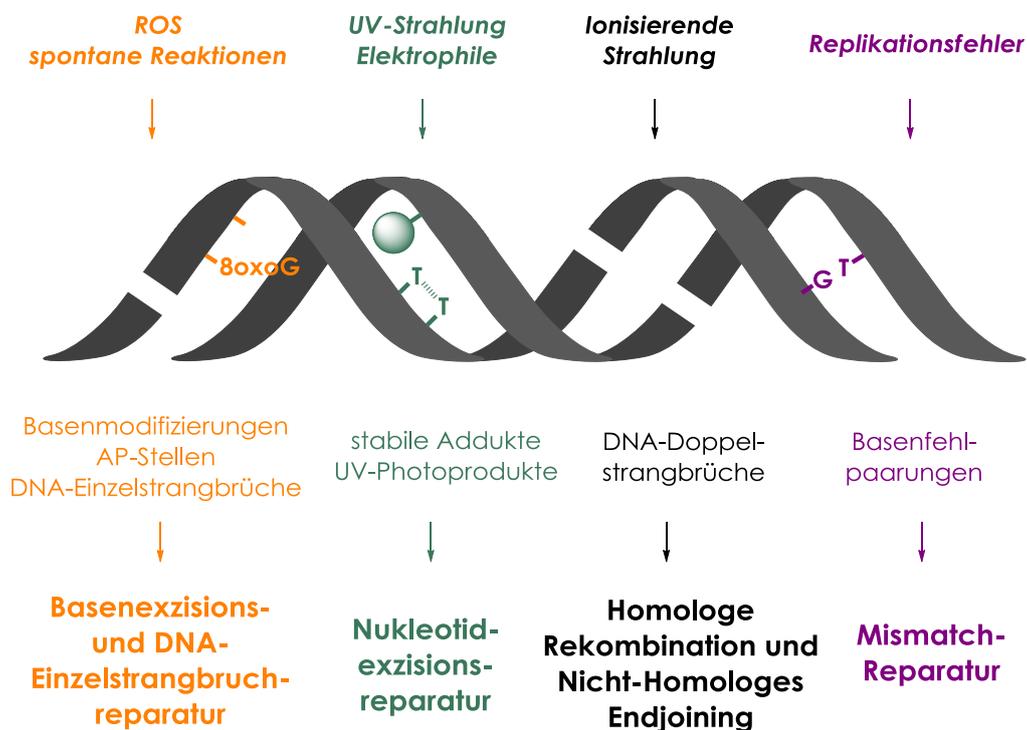


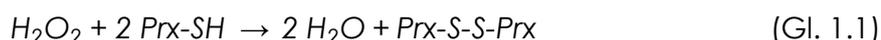
Abbildung 4: Schematische Darstellung von exemplarischen DNA-Schädigungen und deren Reparatur (modifiziert nach Hoeijmakers 2001)

Kleine chemische Veränderungen der DNA-Basen und AP-Stellen werden sehr spezifisch durch die Basenexzisionsreparatur beseitigt, wobei die DNA-Einzelstrangbruchreparatur als Spezialfall dieses Reparaturwegs verstanden werden kann. Die

Nukleotidexzisionsreparatur entfernt dahingegen weniger spezifisch eine große Klasse sperriger, DNA-helixverzerrender Läsionen, die vor allem exogen induziert werden. Zytotoxischer DNA-Doppelstrangbrüche nehmen sich entweder die Homologe Rekombination oder das Nicht-Homologe Endjoining an und durch Replikationsfehler erzeugte Basenfehlpaarungen werden durch die Mismatch-Reparatur entfernt (zusammengefasst in Hoeijmakers 2001).

### 2.2.1 Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) entsteht vor allem endogen im Rahmen des oxidativen Metabolismus, der Zellatmung oder als Signalmolekül in der Zelle, kann jedoch auch aus exogenen Quellen aufgenommen werden. Da die Verbindung selbst ein vergleichsweise stabiles Oxidans darstellt, geht von ihr keine direkte, DNA-schädigende Wirkung aus (Dizdaroglu *et al.* 1991). Darüber hinaus gibt es eine Reihe von detoxifizierenden Mechanismen, die die zelluläre Konzentration von  $H_2O_2$  regulieren. In diesem Zusammenhang sind vor allem enzymatische Systeme zu nennen, die über Peroxiredoxine (Prx), Glutathionperoxidasen (GPx) oder die Katalase katalysiert werden. Die ersten beiden Enzymgruppen sind abundant, vorrangig bei niedrigen intrazellulären  $H_2O_2$ -Konzentrationen von Bedeutung und koppeln die Reduktion der Substanz zu Wasser an den Thioredoxin- bzw. GSH-Zyklus (Gleichung 1.1, 1.2 und 2).



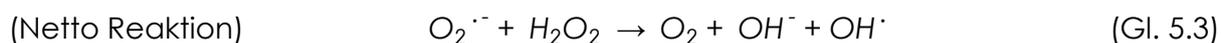
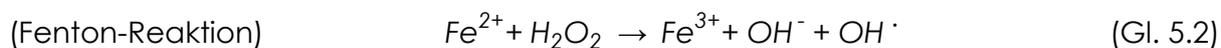
Katalase (CAT) ist dahingegen eine ausschließlich in Peroxisomen vorkommende Dismutase, die bei hohen Substratkonzentrationen zur Bildung von Wasser und elementarem Sauerstoff führt (Gleichung 3) (zusammengefasst in Rhee *et al.* 2005).



Ungeachtet dessen kann aus  $H_2O_2$  jedoch in Gegenwart von Übergangsmetallionen wie solchen von Kupfer und Eisen durch Fenton- und Fenton-ähnliche Reaktionen das hoch reaktive Hydroxylradikal freigesetzt werden (Gleichung 4) (zusammengefasst in Imlay und Linn 1988).



Da die Lebensdauer eines solchen Hydroxylradikals mit  $4 \cdot 10^{-9}$  sek und die daraus berechnete Diffusionsstrecke von 6 nm vergleichsweise gering sind (Roots und Okada 1975), muss dieser Prozess in direkter Nähe zur DNA stattfinden, um schädigend zu wirken. An Chromatin gebundenes Eisen scheint dabei von Bedeutung zu sein (Mello und Meneghini 1984) und dient als zellulärer Katalysator für die zyklische Haber-Weiss-Reaktion (Gleichung 5.1 - 5.3), in der bereits kleine Mengen an  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen zu einer starken Produktion von Hydroxylradikalen führen kann (Haber und Weiss 1934).



Diese Radikale können nun zum einen an DNA-Basen addieren und dadurch zu diversen, oxidativen Basenveränderungen wie beispielsweise 8oxoG oder 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-Formamidopyrimidin führen (zusammengefasst in Dizdaroglu *et al.* 2002). Zum anderen kann die Abstraktion eines Wasserstoffatoms am Zuckerphosphat-Rückgrat der DNA stattfinden, wobei eine Radikalübertragung auf einen der Desoxyribose-Kohlenstoffe erfolgt (zusammengefasst in Breen und Murphy 1995). Sich anschließende Reaktionen führen zur Freisetzung der DNA-Base und/oder Fragmentierung des Desoxyribose-Rings, woraus DNA-Einzelstrangbrüche entweder durch  $\beta$ -Eliminierung oder direkt als Endprodukt hervorgehen (Rhaese und Freese 1968). Die Wasserstoff-Abstraktion erfolgt hierbei bevorzugt an C<sub>4</sub> und C<sub>5</sub> des Zuckers und scheint vor allem durch die Zugänglichkeit der jeweiligen Position in Lösung bestimmt zu sein (Balasubramanian *et al.* 1998). Untersuchungen an einzelnen Nukleotiden zeigen, dass aus  $\text{H}_2\text{O}_2$  gebildete Hydroxylradikale Pyrimidinbasen in diesem Kontext bevorzugt oxidativ verändern, Purinbasen dahingegen jedoch vermehrt durch  $\beta$ -Eliminierung vom Zuckerphosphat-Rest abgespalten werden (Rhaese *et al.* 1968). Das induzierte Schadenspektrum in doppelsträngiger DNA ist allerdings unabhängig von dessen Nukleotidsequenz und Sekundärstruktur (Rokita und Romero-Fredes 1992). 80 % der durch Hydroxylradikale induzierten DNA-Läsionen sind oxidative Basenmodifizierungen, während die verbleibenden 20 % durch DNA-Einzelstrangbrüche gestellt werden (Rokita und Romero-Fredes 1992). Auf Grund der Vielfalt der induzierten Basenläsionen können DNA-Einzelstrangbrüche als Hauptschaden nach einer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Exposition bezeichnet werden und dienen in dieser

Arbeit als Modellläsion für die Untersuchungen zur Beeinflussung der DNA-Einzelstrangbruchreparatur durch Sulforaphan.

### 2.2.2 Benzo[a]pyren

Benzo[a]pyren (B[a]P) ist ein polyzyklischer, aromatischer Kohlenwasserstoff, der durch die unvollständige Verbrennung organischer Materialien entsteht und von der *International Agency for Research on Cancer (IARC)* als Humankarzinogen (Gruppe 1) eingestuft ist (IARC 2010, IARC 2012). Neben der Arbeitsplatz-bezogenen Exposition wird die Verbindung vor allem durch Zigarettenrauch und die Nahrung aufgenommen, wobei Zerealien, Öle sowie geräucherte bzw. gegrillte Fleisch- und Fischprodukte von besonderer Bedeutung sind (zusammengefasst in Phillips 1999, Srogi 2007). B[a]P wird auf Grund seiner hohen Lipophilie schnell in den Organismus aufgenommen, ist selbst jedoch wenig reaktiv und wird erst durch Cytochrom-P450-Oxidoreduktasen aktiviert. Im Folgenden bilden sich eine Vielzahl von Metaboliten, die zur DNA-schädigenden Wirkung der Verbindung beitragen (Abbildung 5) (zusammengefasst in Miller und Ramos 2001). Als ultimatives Karzinogen gilt ein B[a]P-diolepoxid (BPDE), das (+)-*anti*-B[a]P-7,8-diol-9,10-epoxid, welches durch ein 3-phasiges Reaktionsschema über die Zwischenstufen von B[a]P-epoxid und B[a]P-dihydrodiol neben drei weiteren Stereoisomeren als Hauptmetabolit gebildet wird (zusammengefasst in Conney *et al.* 1994). Dieser elektrophile Metabolit kann nicht nur in die DNA interkalieren (Geacintov 1986), sondern auch stereoselektiv bevorzugt an die exozyklische N<sup>2</sup>-Position der DNA-Base Guanin binden (Koreeda *et al.* 1978, Meehan und Straub 1979). Das gebildete (+)-*trans-anti*-BPDE-Addukt ist anschließend in der kleinen Furche der DNA lokalisiert, verzerrt die DNA-Helix nur geringfügig und stört weder die Watson-Crick Basenpaarung mit der gegenüberliegenden Base noch die stereochemische Ausrichtung der N-glykosidischen Bindung zwischen Desoxyribose-Residuum und Base (Cosman *et al.* 1992). Es ist jedoch hochgradig prämutagen und -karzinogen, wobei die induzierten Hauptmutationen Basenpaar-Substitutionen, Leserasterverschiebungen und größere Deletionen sind (zusammengefasst in Conney *et al.* 1994). Des Weiteren kann im Metabolismus von B[a]P ein o-Chinon entstehen, das nicht nur instabile DNA-Addukte (McCoull *et al.* 1999, Balu *et al.* 2006), sondern auch durch Redox-Cycling reaktive Sauerstoffspezies (ROS) erzeugen kann (Penning *et al.* 1996). Diese werden wiederum mit der Induktion von oxidativen Basenmodifizierungen und DNA-Einzelstrangbrüchen durch B[a]P in Verbindung gebracht (Park *et al.* 2008, Mangal *et al.* 2009). Darüber hinaus ist die Entstehung eines radikalischen Carbokations beschrieben, das über die Bildung

instabiler DNA-Addukte AP-Stellen im Genom erzeugt (zusammengefasst in Cavalieri und Rogan 1995). Solche AP-Stellen sind jedoch vergleichsweise selten und die Induktion des stabilen BPDE-DNA-Addukts wird als Grundlage der kanzerogenen Wirkung von B[a]P angenommen (Melendez-Colon *et al.* 1999).

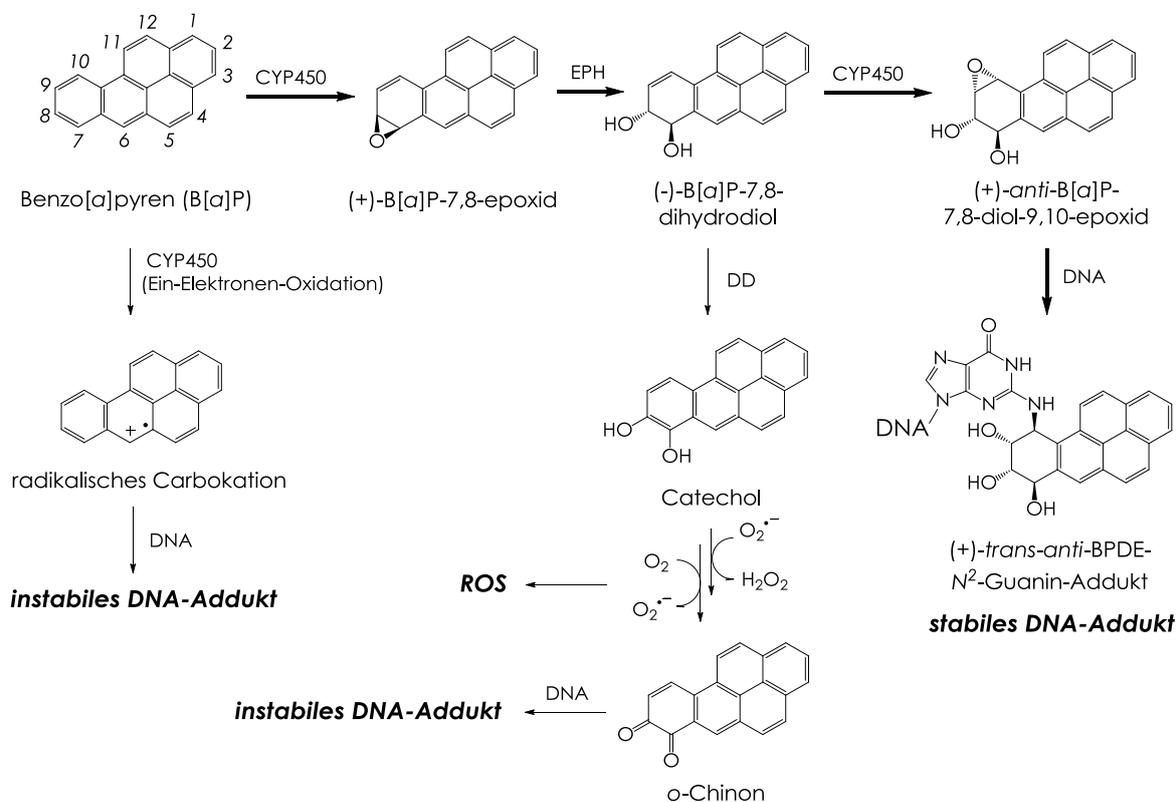


Abbildung 5: Vereinfachter Überblick der metabolischen Aktivierung von Benzo[a]pyren zu dessen DNA-schädigenden Metaboliten (modifiziert nach Conney *et al.* 1994, Cavalieri und Rogan 1995, McCoull *et al.* 1999) (CYP 450=Cytochrom-P450-Oxidoreduktase; DD=Dihydrodiol-Dehydrogenase; EPH=Epoxidhydrolase)

Da das stabile (+)-*anti*-BPDE-DNA-Addukt durch die Nukleotidexzisionsreparatur erkannt und beseitigt wird (Gunz *et al.* 1996), dient es in dieser Arbeit als Modellläsion für die Untersuchungen zur Beeinflussung der Nukleotidexzisionsreparatur durch Sulforaphan. Der reaktive Metabolit (+)-*anti*-BPDE wird hierbei direkt eingesetzt, um eine fehlende Metabolisierungsaktivität der verwendeten HCT 116-Zellen auszugleichen und Sulforaphan-vermittelte Effekte auf Ebene der metabolischen Aktivierung gänzlich auszuschließen.

### 2.2.3 Die DNA-Einzelstrangbruchreparatur

Durch verschiedene Prozesse werden täglich tausende DNA-Einzelstrangbrüche in menschlichen Zellen gebildet, die die Transkription blockieren (Kathe *et al.* 2004) und

im Rahmen der DNA-Replikation in erheblich toxischere DNA-Doppelstrangbrüche überführt werden können (Kuzminov 2001). Da neben exogenen Agenzien vor allem endogene Vorgänge, wie die ROS-induzierte Desoxyribose-Fragmentierung, eine fehlerhafte Topoisomerase-1-Aktivität oder die Basenexzisionsreparatur, zur Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen führen, sind diese ubiquitär und müssen effizient repariert werden. Die DNA-Einzelstrangbruchreparatur (SSBR von *single-strand break repair*) nimmt sich dieser Aufgabe an und beseitigt solche Leerstellen oder Brüche im Zuckerphosphat-Rückgrat der DNA, die häufig von dem Verlust eines Nukleotids und/oder beschädigten 3'- und 5'-Enden begleitet sind (zusammengefasst in Caldecott 2001). Die folgenden Darstellungen konzentrieren sich in diesem Zusammenhang auf die Reparatur von direkt induzierten DNA-Einzelstrangbrüchen, die durch Beschädigungen des Zuckers im Zuckerphosphat-Gerüst entstehen.

Ein Großteil dieser direkten DNA-Einzelstrangbrüche wird innerhalb weniger Minuten durch eine global genomische SSBR repariert, die in vielen Teilen mit der Basenexzisionsreparatur übereinstimmt und über alle Zellzyklusphasen agiert. Der Ablauf dieses Reparaturwegs lässt sich in vier Schritte unterteilen (Abbildung 6). Eingeleitet wird der Prozess durch eine Schadensdetektion via Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen (siehe Kapitel 2.2.3.1), an die sich die Prozessierung der beschädigten DNA-Enden anschließt. In diesem Kontext ist auf Grund der vielfältigen Strukturen dieser DNA-Endmodifizierungen eine Vielzahl von spezialisierten Enzymen beschrieben, die diverse Schädigungen sehr spezifisch beseitigen können. Die häufigsten Modifizierungen bei direkten DNA-Einzelstrangbrüchen sind Phosphat- oder Phosphoglykolat-Reste am 3'-Ende der DNA (zusammengefasst in Imlay und Linn 1988), die von *polynucleotide kinase 3'-phosphatase* (PNKP) (Whitehouse *et al.* 2001) bzw. *apurinic/apyrimidinic endonuclease 1* (APE1) (Winters *et al.* 1994, Izumi *et al.* 2000) bereinigt werden. Durch die Fragmentierung einer oxidierten Desoxyribose kann auch eine aldehydische Struktur am 5'-Ende des DNA-Strangbruches entstehen, dessen weitere Prozessierung jedoch unklar ist (zusammengefasst in Caldecott 2008). Sind die für die DNA-Reparatur-Synthese benötigten 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden wieder hergestellt, füllen DNA-Polymerasen darauf folgend die Basensequenz anhand des zweiten, unbeschädigten DNA-Strangs auf. Dabei kann in einem *short patch*-Mechanismus entweder nur das durch Zuckerfragmentierung fehlende Nukleotid eingefügt oder bei verbleibender Beschädigung des 5'-Endes bis zu 12 Nukleotide in der *flap endonuclease 1* (FEN1)- und *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA)-abhängigen *long patch*-Reparatur ersetzt werden (zusammengefasst in Frosina *et al.* 1996, Klungland und Lindahl 1997, Caldecott 2008).



wie Pol  $\lambda$  (García-Díaz *et al.* 2001) und  $\iota$  (Bebenek *et al.* 2001) werden des Weiteren für den *short patch*-Mechanismus diskutiert. In einem letzten Schritt erfolgt die DNA-Ligation des verbleibenden Bruches im Zuckerphosphat-Gerüst durch DNA-Ligasen (Lig), womit die DNA in ihrer ursprünglichen Integrität wieder hergestellt und der Strangbruch fehlerfrei repariert ist. Die rekrutierten Ligasen unterscheiden sich hierbei je nach Reparaturweg; so ist Lig IIIa, *x-ray repair cross-complementing protein 1* (XRCC1)-abhängig, mit der *short patch*-Reparatur assoziiert und die *long patch*-Reparatur nutzt vor allem, PCNA vermittelt, Lig I (zusammengefasst in Mortusewicz *et al.* 2006, Caldecott 2007, Caldecott 2008).

XRCC1 wird eine besondere Rolle in der SSBR zugesprochen, da es selbst zwar keine enzymatische Aktivität besitzt, dafür aber mit vielen SSBR-Proteinen wie Pol  $\beta$  (Caldecott *et al.* 1996), APE1 (Vidal *et al.* 2001), PARP-1 (Masson *et al.* 1998), PNKP (Whitehouse *et al.* 2001) und Lig IIIa (Caldecott *et al.* 1994) über Protein-Protein-Interaktionen wechselwirken kann. Darüber hinaus bindet XRCC1 frühzeitig an dem Schaden, ist sowohl für die Pol  $\beta$ - als auch PCNA-abhängige Reparatur notwendig und scheint für die Rekrutierung weiterer SSBR-Faktoren verantwortlich zu sein (Lan *et al.* 2004). Aus Untersuchungen an XRCC1-defizienten Zellen ist bekannt, dass das Protein essentiell für eine schnelle Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen in allen Zellzyklusphasen ist, obwohl auch XRCC1-unabhängige Mechanismen zu existieren scheinen (zusammengefasst in Caldecott 2003). Im Einklang mit dieser Theorie wurde gezeigt, dass der Knock-out des Proteins zwar die Ligation von DNA-Einzelstrangbrüchen in der G<sub>1</sub>-, jedoch nicht in der S-Phase verlangsamt (Godon *et al.* 2008). Außerdem wird eine, dem *long patch*-Mechanismus der globalen SSBR ähnliche, replikationsgekoppelte SSBR (RC-SSBR von *replication-coupled single-strand break repair*) diskutiert. Diese RC-SSBR wird dabei als Pol  $\delta/\epsilon$ -PCNA-Lig I-abhängig verstanden und ferner scheinen auch XRCC1-gekoppelte Mechanismen aufzutreten (zusammengefasst in Caldecott 2001, Caldecott 2007, Caldecott 2008).

### **2.2.3.1 Poly(ADP-Ribose)-Polymerase und Poly(ADP-Ribosyl)ierung**

Eines der frühesten Ereignisse nach der Induktion eines DNA-Einzelstrangbruches ist die Schadenserkennung durch Enzyme der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)-Superfamilie, von denen vor allem PARP-1 und PARP-2 an beschädigte DNA binden (Amé *et al.* 1999). Durch diese Anlagerung in ihrer enzymatischen Aktivität um bis zu 500-fach gesteigert, katalysieren die Isoenzyme anschließend die kovalente Anknüpfung eines aus Nicotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>) gebildeten

Mono(ADP-Ribose)-Reste an  $\gamma$ -Carboxylgruppen von Glutaminsäure-Resten verschiedenster Akzeptorproteine. Im weiteren Verlauf der enzymatischen Reaktion werden zusätzliche (ADP-Ribose)-Moleküle kettenförmig aneinander gelagert und bilden ein bis zu 200 Einheiten umfassendes Poly(ADP-Ribose) (PAR)-Polymer, das an jeder zwanzigsten bis fünfzigsten linearen Einheit verzweigt sein kann. Zu den in diesem Sinne post-translational modifizierten Proteinen gehören neben Histonen und dem Tumorsuppressorprotein p53 vor allem die PARPs selbst, deren DNA-Bindungsfähigkeit und somit enzymatische Aktivität durch die Automodifizierung vermindert wird (zusammengefasst in D'Amours *et al.* 1999, Amé *et al.* 2004, Langelier und Pascal 2013). Die Halbwertszeit der kovalent angeknüpften PAR-Einheiten beträgt hierbei weniger als 1 min und wird durch die enzymatische Spaltung via Poly(ADP-Ribose)-Glykohydrolase (PARG) reguliert (zusammengefasst in Davidovic *et al.* 2001). PARG kann auf Grund seiner Endo- und Exoglykosidase-Aktivität die glykosidischen Bindungen zwischen Mono(ADP-Ribose)-Einheiten sowohl innerhalb der linearen Kette als auch an dessen Verzweigungspunkten spalten. Die Entfernung des initialen Monomers benötigt dagegen jedoch eine spezialisierte (ADP-Ribose)-Proteinlyase (Abbildung 7) (zusammengefasst in D'Amours *et al.* 1999). PARP-1 und PARG, jedoch nicht PARP-2, sind essentiell für die SSBR (Fisher *et al.* 2007), da PARP-1 für bis zu 95 % der schadensinduzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung (PARylierung) verantwortlich ist (Amé *et al.* 1999) und der PARG-katalysierte Abbau von PAR die Zugänglichkeit der DNA-Läsion für andere Reparaturfaktoren durch Inaktivierung und Ablösen der automodifizierten PARPs sichert.

PARP-1 (113 kDa) besitzt in seiner Molekülstruktur drei Zink-bindende Domänen, die im DNA-Bindungsbereich lokalisiert sind und verschiedene Funktionen erfüllen. Zwei von diesen Domänen sind homologe Cys<sub>3</sub>His<sub>1</sub>-Zinkfinger (Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>28-30</sub>-His-X<sub>2</sub>-Cys), die in der N-terminalen Region des Enzyms lokalisiert und unabdingbar für dessen Bindung an geschädigte DNA und die PARylierung sind (Gradwohl *et al.* 1990, Ikejima *et al.* 1990). Demzufolge sind diese beiden Zinkfinger wesentlich für die Erkennung von DNA-Einzelstrangbrüchen durch ein PARP-1-Monomer (Eustermann *et al.* 2011) und von DNA-Doppelstrangbrüchen durch ein PARP-1-Dimer (Langelier *et al.* 2011, Ali *et al.* 2012). Die dritte Zink-bindende Domäne weist eine schleifenförmig gefaltete Cys<sub>4</sub>-Struktur auf (Cys<sup>295</sup>-X<sub>2</sub>-Cys<sup>298</sup>-X<sub>12</sub>-Cys<sup>311</sup>-X<sub>9</sub>-Cys<sup>321</sup>), die zwischen den beiden Zinkfingern und der Automodifizierungsdomäne von PARP-1 lokalisiert und nicht für die DNA-Bindungsfähigkeit des Enzyms, sondern für die Interdomänen- und Protein-Protein-Interaktion von Bedeutung ist. Infolgedessen ist diese Struktur essentiell für die Erzeugung des aktiven Status und der DNA-abhängigen Stimulation der Enzymaktivität von PARP-1 (Langelier *et al.* 2008, Tao *et al.* 2008).

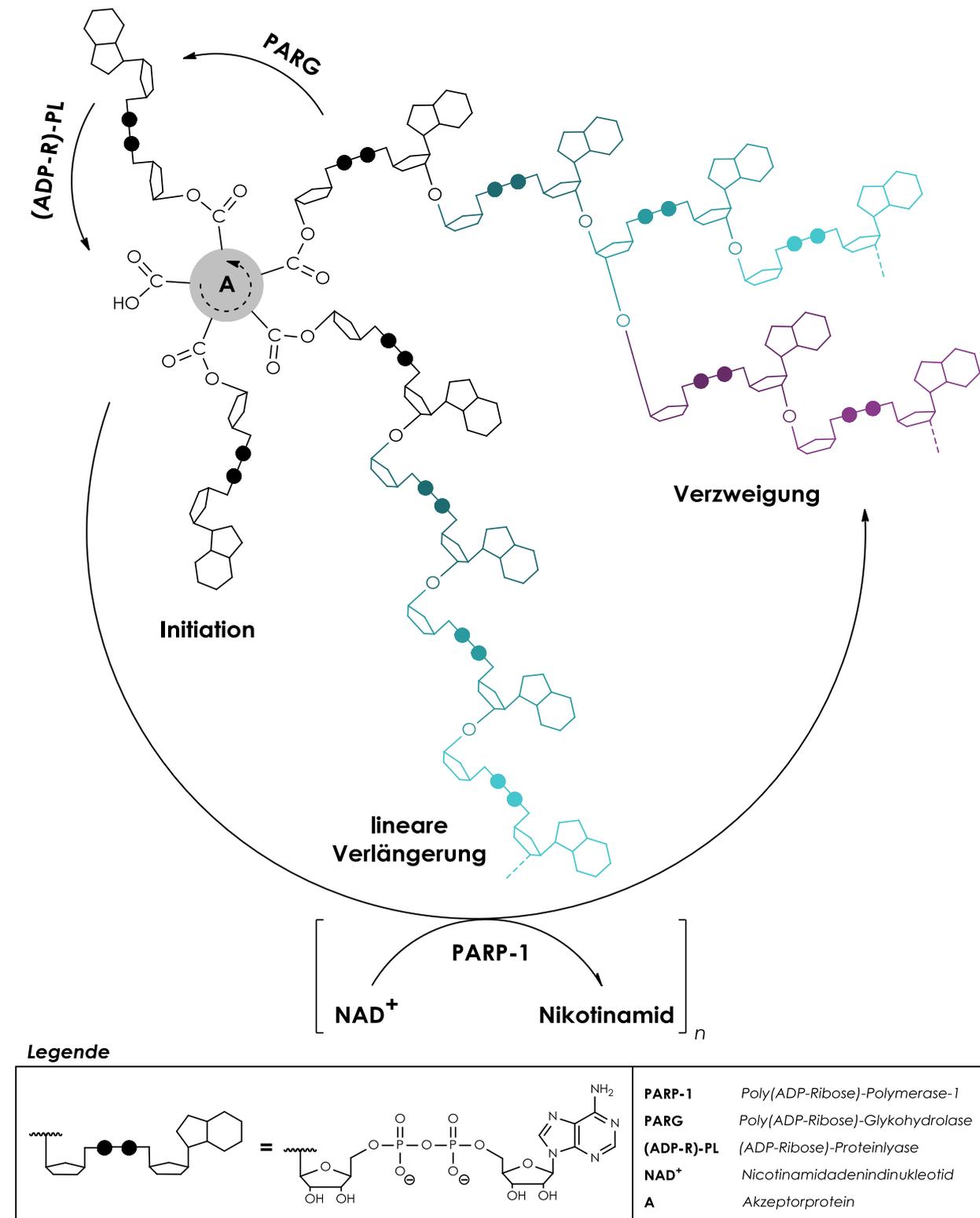


Abbildung 7: Schematische Darstellung des PAR-Metabolismus und der schadensinduzierten PARylierung von Akzeptorproteinen (modifiziert nach D'Amours *et al.* 1999)

Die Integrität jeder der drei Zink-bindenden Strukturen in PARP-1 ist folglich von besonderer Relevanz für die korrekte Ausführung der SSBR, was durch den Verlust der schadensinduzierten Aktivität von PARP-1 nach Austausch von Zink-komplexierenden

Aminosäuren durch gezielte Mutagenese verdeutlicht wird (Gradwohl *et al.* 1990, Ikejima *et al.* 1990, Langelier *et al.* 2008, Tao *et al.* 2008).

Die DNA-Reparatur-assoziierten Funktionen der PARylierung sind vielfältig: So ist PARP-1 Teil des Chromatins (Kim *et al.* 2004) und die Ladungsabstoßung zwischen den stark negativ geladenen PAR-Ketten und dem Zuckerphosphat-Rückgrat lockern die Chromatinstruktur der DNA auf (zusammengefasst in Caldecott 2007). Einen vergleichbaren Effekt auf den Kondensationsgrad der DNA hat die PARylierung von Histonproteinen. Die Bindung von PARP-1 an einen DNA-Strangbruch erhöht zudem dessen Zugänglichkeit, indem die bereits an der Schadstelle geknickte DNA weiter verformt wird (Le Cam *et al.* 1994). Des Weiteren vermitteln automodifizierte PARP-1 und PAR die Rekrutierung von DNA-Reparaturproteinen wie XRCC1 (Masson *et al.* 1998, Fisher *et al.* 2007, Godon *et al.* 2008) und Lig IIIa (Leppard *et al.* 2003) an die Läsion und sind essentiell für eine zügige SSB (Ding *et al.* 1992, Fisher *et al.* 2007, Ström *et al.* 2011). Unter Bedingungen des zellulären ATP-Mangels kann PAR ferner als Energie-Quelle für die DNA-Ligation dienen (Oei und Ziegler 2000) und bei exzessiven DNA-Schäden führt die Überaktivierung von PARPs zum Zelltod. Eine Rolle spielen hierbei vor allem die Depletion von NAD<sup>+</sup> sowie durch PARG freigesetzte PAR-Einheiten, die eine Translokation des mitochondrialen *apoptosis-inducing factor* in den Zellkern stimulieren (zusammengefasst in Heeres und Hergenrother 2007).

### **2.2.4 Die Nukleotidexzisionsreparatur**

Sperrige, helixverzerrende Basenschäden wie UV- und B[a]P-induzierte DNA-Dimere bzw. -Addukte werden durch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) aus dem Genom beseitigt. Dieser DNA-Reparaturweg kann verschiedenste DNA-Schäden erkennen, die vor allem durch exogene Agenzien induziert und im Zuge der Reparatur fehlerfrei entfernt werden. Die von der NER-Maschinerie bearbeiteten Substrate müssen dementsprechend keine gemeinsame chemische Struktur oder Modifizierung der DNA-Basen aufweisen, sondern werden über eine induzierte Verzerrung der DNA-Doppelhelix und Veränderungen der Watson-Crick-Basenpaarung detektiert (zusammengefasst in Dip *et al.* 2004). Für die korrekte Ausführung der NER werden über 30 Proteine benötigt (Aboussekhra *et al.* 1995). Unter diesen befinden sich die XP-Proteine A bis G, deren Bezeichnung sich von der autosomal-rezessiven Erkrankung Xeroderma Pigmentosum (XP) ableitet. Diese Krankheit wird durch Mutationen eines der für die XP-Proteine codierenden Gene verursacht und

betroffene Patient\_innen zeigen eine, mit einer erhöhten Inzidenz von Hautkrebs einhergehende, extreme Sensitivität gegenüber Sonnenlicht (zusammengefasst in Lehmann *et al.* 2011).

Die NER setzt sich aus einer Abfolge von vier Schritten zusammen, die mit den Begriffen Schadensdetektion, Inzision, DNA-Reparatur-Synthese und DNA-Ligation beschrieben werden können. Für die Schadenserkennung gibt es zwei voneinander abweichende Wege, nach denen die NER in verschiedene Mechanismen unterteilt werden kann: Die schnellere, transkriptionsgekoppelte NER (TC-NER von *transcription-coupled NER*), die im transkribierten Strang der DNA stattfindet, sowie die, das gesamte Genom bearbeitende, global genomische NER (GG-NER von *global genomic NER*) (zusammengefasst in Friedberg 2001). Während die TC-NER durch eine schadensinduzierte Blockierung der RNA Polymerase II (RNAPII) unter Beteiligung weiterer Proteine wie CSA, CSB und *XPA-binding protein-2* (XAB2) initiiert wird (zusammengefasst in Hanawalt und Spivak 2008), benötigt die GG-NER zur Erkennung von DNA-Läsionen spezialisierte Proteine wie XPC oder *damaged DNA-binding protein 1* und *2* (DDB1 bzw. DDB2) (Dip *et al.* 2004) (Abbildung 8). Hierbei zeigt XPC alleine nur wenig NER-Aktivität, wird jedoch durch die Komplexbildung mit dem *human homolog of rad23 A* oder *B* (hHR23A bzw. hHR23B) stimuliert und tritt üblicherweise als heterodimerer XPC-hHR23B-Komplex auf (Sugasawa *et al.* 1996, Sugasawa *et al.* 1997). Obwohl dieser Komplex für die Erkennung einer Vielzahl von helixverzerrenden DNA-Schäden ausreicht, scheint für die zügige Reparatur von beispielsweise UV-induzierten Läsionen zusätzlich ein Heterodimer aus DDB1 und DDB2 benötigt zu werden, das jedoch nicht essentiell für die NER ist (zusammengefasst in Friedberg *et al.* 2005, Aboussekhra *et al.* 1995). Die Anlagerung von XPC-hHR23B krümmt die DNA zusätzlich (Janićijević *et al.* 2003) und fördert damit die sequentielle Rekrutierung weiterer Reparaturfaktoren wie *transcription factor IIIH* (TFIIH), XPA, *replication protein A* (RPA) und XPG (zusammengefasst in Park und Choi 2006, Volker *et al.* 2001). In beiden Reparaturmechanismen schließt sich die Bildung eines Präinzisionskomplexes aus diesen Proteinen und dem Heterodimer *excision repair cross-complementing protein 1* (ERCC1)-XPF an, der sich über ein 25-30 Nukleotide langes DNA-Stück erstreckt. Dabei kommt es um den Schaden herum zur ATP-abhängigen, asymmetrischen Entwindung der DNA durch die Helikase-aktiven Untereinheiten von TFIIH, XPD und XPB, die zur vollständigen Öffnung XPC-hHR23B, TFIIH, XPA, RPA und XPG benötigen (Evans *et al.* 1997, Mu *et al.* 1997). XPA und RPA stabilisieren hierbei nicht nur die in der sogenannten "DNA-Reparaturblase" entstehenden einzelsträngigen DNA-Segmente, sondern verdrängen darüber hinaus

auch XPC-hHR23B von der Läsion (You *et al.* 2003) und sind zusammen mit TFIIH für die Schadensverifizierung verantwortlich (zusammengefasst in Dip *et al.* 2004).

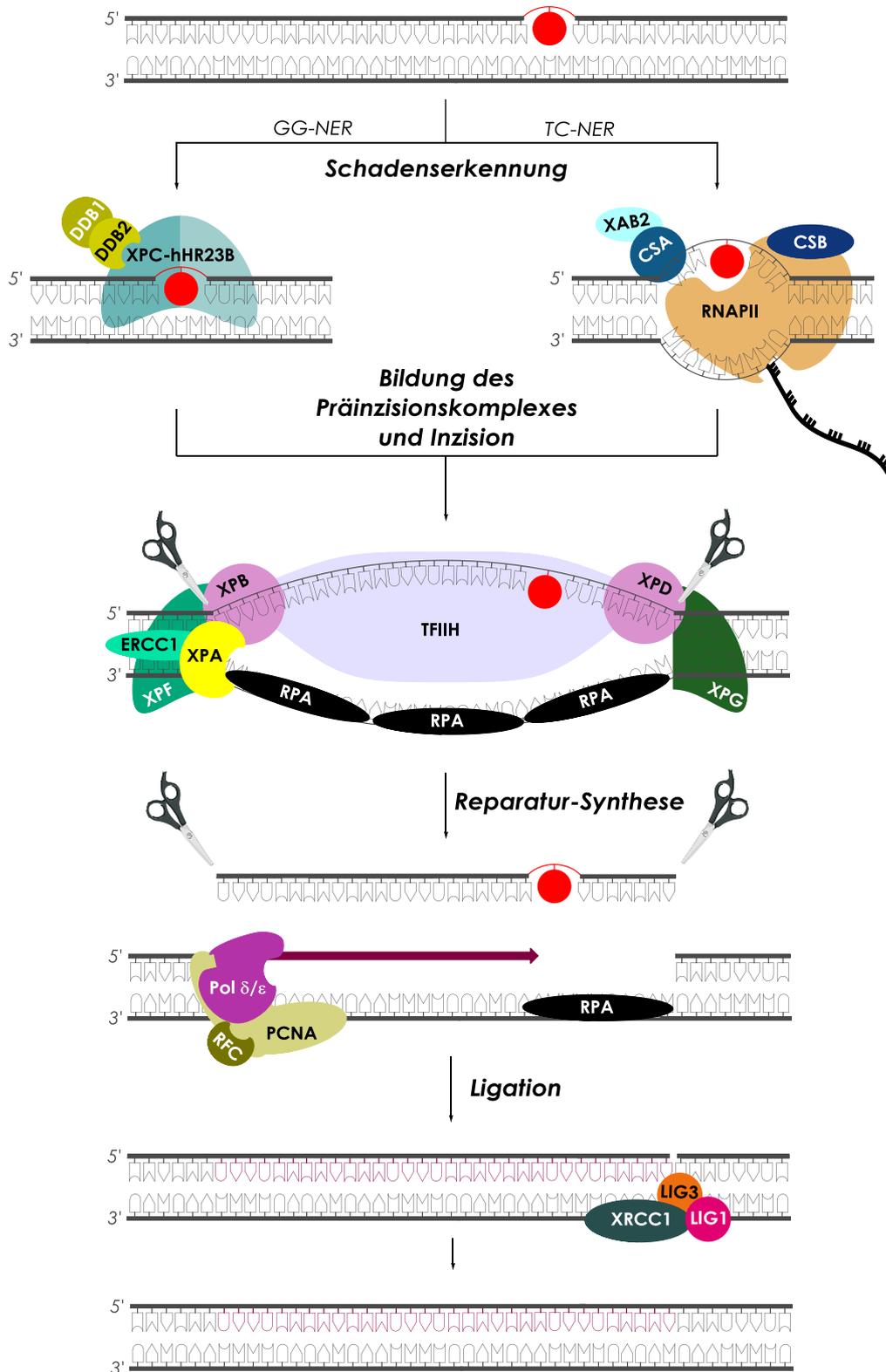


Abbildung 8: Schematische Darstellung der global genomischen und transkriptionsgekoppelten Nucleotidexzisionsreparatur eines sperrigen, helixverzerrenden DNA-Schadens (modifiziert nach Friedberg *et al.* 2005, Hanawalt und Spivak 2008)

Während der Inzision werden die durch die lokale Entwindung entstandenen Übergänge zwischen einzel- und doppelsträngiger DNA 15-24 Nukleotide 5' und 2-8 Nukleotide 3' von der Läsion durch die strukturspezifischen Endonukleasen ERCC1-XPF bzw. XPG unabhängig voneinander erkannt und eingeschnitten (Matsunaga *et al.* 1995, Moggs *et al.* 1996). Vermutlich erfolgt die Inzision hierbei nicht völlig gleichzeitig, sondern leicht versetzt: Der Einschnitt 3' der DNA-Läsion durch XPG findet kurz vor der Aktivität von ERCC1-XPF an der 5'-Seite statt (Mu *et al.* 1996). Die Exzision des den Schaden enthaltenen Oligonukleotids hinterlässt eine 25-30 Nukleotide umfassende Leerstelle, die nach Beladung der DNA mit dem RFC/PCNA-Komplex in der DNA-Reparatur-Synthese RPA-abhängig durch Pol  $\delta$  oder Pol  $\epsilon$  gefüllt wird. Als Template dient dabei der unbeschädigte DNA-Strang, nach dem semikonservativ nachsynthetisiert wird. Als letzter Schritt schließt sich die DNA-Ligation des verbleibenden Strangbruches durch Lig I oder XRCC1-Lig IIIa an (zusammengefasst in Friedberg *et al.* 2005, Foustari und Mullenders 2008), nach der die DNA in ihrer ursprünglichen Integrität wieder hergestellt und fehlerfrei repariert ist.

### **2.2.4.1 Das Xeroderma Pigmentosum A-Protein**

Das Xeroderma Pigmentosum A (XPA)-Protein ist essentiell für die NER. Mutationen in dem codierenden XPA-Gen induzieren durch den Verlust oder die Bildung eines fehlerhaften Genprodukts das Krankheitsbild der XP Gruppe A (Tanaka *et al.* 1990). In älteren Arbeiten wird XPA oft, auf Grund seiner Bindungsfähigkeit an geschädigte DNA, als das schadenerkennende Protein der NER diskutiert (zusammengefasst in Cleaver und States 1997). Neuere Untersuchungen zeigen dagegen jedoch eindeutig, dass der XPC-hHR23B-Komplex die initiale Schadenserkenkung vermittelt und XPA anschließend an die DNA-Läsion rekrutiert wird (Volker *et al.* 2001, Rademakers *et al.* 2003). Demnach wird die Funktion von XPA heutzutage vielmehr in der Verifizierung des DNA-Schadens (zusammengefasst in Thoma und Vasquez 2003, Dip *et al.* 2004) und der korrekten Ausbildung des Präinzisionskomplexes verstanden (Evans *et al.* 1997, Mu *et al.* 1997). Im Kontext dieser Arbeit sind vor allem die verschiedenen Bindungsdomänen des Proteins von Bedeutung, die in Abbildung 9 schematisch zusammengefasst werden.

XPA ist ein 273 Aminosäuren langes Metalloprotein (Tanaka *et al.* 1990), das unter basalen Bedingungen größtenteils zytosolisch vorliegt, im Falle einer DNA-Schädigung jedoch in den Zellkern translokalisiert und dort im Folgenden für die NER zur Verfügung steht (Li *et al.* 2011). Die minimale DNA-Bindungsdomäne von XPA

enthält einen für die Proteinfaltung essentiellen Cys<sub>4</sub>-Zinkfinger (Cys<sup>105</sup>-X<sub>2</sub>-Cys<sup>108</sup>-X<sub>17</sub>-Cys<sup>126</sup>-X<sub>2</sub>-Cys<sup>129</sup>) (Morita *et al.* 1996, Buchko *et al.* 1998, Hess *et al.* 1998), der nicht an der DNA-Bindung, sondern an DNA-Protein-Wechselwirkungen im Reparaturkomplex beteiligt ist (Ikegami *et al.* 1998). Die Integrität dieser Struktur ist von großer Bedeutung für die NER-Aktivität von XPA, wie der Austausch der Zinkkomplexierenden Cysteine gegen Serin oder Glutaminsäure durch gezielte Mutagenese zeigt (Miyamoto *et al.* 1992).

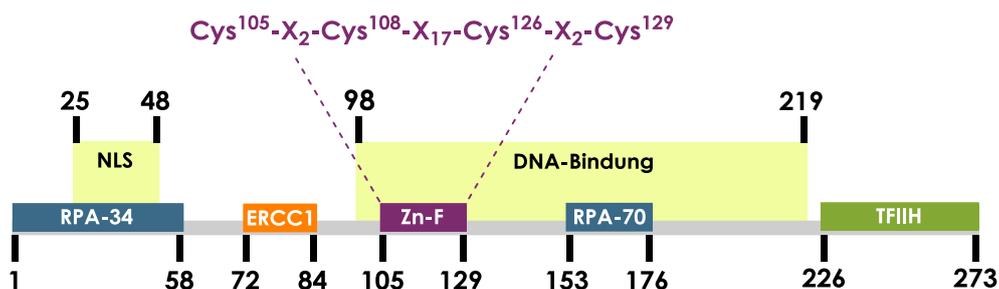


Abbildung 9: Vereinfachter Aufbau des humanen XPA-Proteins mit seinen verschiedenen Bindungsdomänen (modifiziert nach Morita *et al.* 1996, Buchko *et al.* 1998, Dip *et al.* 2004)

Darüber hinaus kann XPA über weitere Bindungsdomänen mit NER-Proteinen wie RPA (He *et al.* 1995, Li *et al.* 1995a, Matsuda *et al.* 1995, Saijo *et al.* 1996), ERCC1 (Li *et al.* 1995b, Nagai *et al.* 1995, Saijo *et al.* 1996) und TFIIH (Park *et al.* 1995, Nocentini *et al.* 1997) wechselwirken, was zur Rekrutierung und korrekten Positionierung dieser im Präzisionskomplex beiträgt. Vor allem die Interaktion mit den 34 und 70 kDa großen Untereinheiten von RPA erhöht die DNA-Bindungsfähigkeit von XPA (He *et al.* 1995, Li *et al.* 1995a, Wang *et al.* 2000) und der Proteinkomplex dient zusammen mit TFIIH der Verifizierung des DNA-Schadens. Diese erfolgt in einem Mechanismus der doppelten Überprüfung, da XPA an Krümmungen des Zuckerphosphat-Rückgrats der DNA und defekte Watson-Crick-Basenpaar-Konformationen bindet, RPA dahingegen vorrangig mit einzelsträngigen DNA-Segmenten in der "DNA-Reparaturblase" interagiert (Buschta-Hedayat *et al.* 1999, Missura *et al.* 2001). Des Weiteren scheint XPA-gebundenes RPA von Bedeutung für die korrekte Positionierung der für die Inzision benötigten Endonukleasen zu sein (de Laat *et al.* 1998) und auch die Wechselwirkung von XPA mit ERCC1 ist essentiell für die NER (Li *et al.* 1995b, Nagai *et al.* 1995). So erfolgt sowohl die Rekrutierung von ERCC1-XPF in den Präzisionskomplex als auch die Aktivierung der Endonuklease-Aktivität des bereits im Präzisionskomplex vorhandenen XPGs XPA-abhängig (Volker *et al.* 2001).

### **2.2.4.2 p53 und die Nukleotidexzisionsreparatur**

Der Tumorsuppressor p53 ist ein Zink-bindendes Metalloprotein, in dem das Metall durch drei Cysteine und ein Histidin (Cys<sup>176</sup>-X<sub>2</sub>-His<sup>179</sup>-X<sub>58</sub>-Cys<sup>238</sup>-X<sub>3</sub>-Cys<sup>242</sup>) komplexiert wird (Cho *et al.* 1994). In Folge einer DNA-Schädigung wird p53 post-translational modifiziert, dadurch stabilisiert und kann anschließend, je nach Ausmaß der Beschädigung, entweder eine Arretierung des Zellzyklus oder Apoptose induzieren. Beide Mechanismen dienen der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität und p53 kann sowohl auf Ebene der Genexpression als Transkriptionsfaktor als auch durch direkte Wechselwirkung mit zellulären Proteinen eine Vielzahl von Prozessen beeinflussen (zusammengefasst in Friedberg *et al.* 2005). So interagiert das Protein ebenfalls mit der NER, die sehr spezifisch nur in dem global genomischen Mechanismus durch die Depletion von p53 gestört wird (Ford und Hanawalt 1995, Ford und Hanawalt 1997, Wani *et al.* 2002). Als ein zugrunde liegender Mechanismus wird die selektive Verminderung der p53-abhängigen, schadensinduzierten Expression von XPC und DDB2 verstanden (Adimoolam und Ford 2002, Amundson *et al.* 2002). Darüber hinaus scheint p53 essentiell für die Rekrutierung der Histonacetyltransferase p300 an Schadstellen und eine globale Chromatin-Relaxation zu sein, die durch Blockierung der RNAPII induziert wird (Rubbi und Milner 2003). Im Einklang hiermit finden unter p53-Defizienz verschlechterte Rekrutierungen von XPC und TFIIH an DNA-Läsionen statt (Wang *et al.* 2003). Eine Inhibition der Helikase-Aktivität von XPD und XPB ist darüber hinaus durch eine direkte Bindung von p53 beschrieben (Wang *et al.* 1995, Léveillard *et al.* 1996) und wird als Regulation der Schadenserkenkung diskutiert. Interessanterweise ist ferner die schadensinduzierte Translokalisierung von XPA in den Zellkern vor allem in der S-Phase p53-abhängig, wobei die Depletion des Tumorsuppressors die nukleäre Konzentration des essentiellen Reparaturfaktors vermindert (Li *et al.* 2011).

### 3. Fragestellung

Epidemiologische Studien zeigen einen inversen Zusammenhang zwischen dem *Brassica*-Gemüseverzehr und der Krebsinzidenz in mehreren Zielorganen (zusammengefasst in Verhoeven *et al.* 1996, Higdon *et al.* 2007). Als zugrunde liegende bioaktive Substanzen werden enzymatische Hydrolyseprodukte von Glucosinolaten postuliert, die eine nur in diesen Gemüsen vorkommende Gruppe von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen darstellen. Ein außergewöhnliches wissenschaftliches Interesse kommt in diesem Kontext dem Isothiocyanat Sulforaphan zu, welches aus dem Glucosinolat Glucoraphanin vor allem in Broccoli gebildet wird. Da in Tierversuchen eine Verminderung der chemisch-getriebenen Kanzerogenese durch Sulforaphan gezeigt wurde (Zhang *et al.* 1994, Chung *et al.* 2000, Gills *et al.* 2006), wird die Substanz als krebsschutzpostuliert und entsprechende Nahrungsergänzungsmittel sind frei verfügbar.

Neben einer Vielzahl von potentiellen Wirkmechanismen ist in erster Linie die nrf2-abhängige Induktion von Fremdstoff-metabolisierenden Phase-II-Enzymen als molekularer Mechanismus für die vermeintlich chemopräventive Wirkung von Sulforaphan anerkannt (zusammengefasst in Juge *et al.* 2007). Interessanterweise findet im Rahmen der Sulforaphan-vermittelten Aktivierung des einschlägigen Signalwegs eine Zink-Freisetzung aus dem Metalloprotein Keap1 statt (Dinkova-Kostova *et al.* 2005), das unter basalen Bedingungen als negativer Regulator des Transkriptionsfaktors nrf2 wirkt. Vergleichbare Zink-bindende Metalloproteine sind jedoch an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt, die in Analogie zur Interferenz mit Keap1 demnach potentielle Angriffspunkte von Sulforaphan darstellen könnten. Im Zusammenhang mit der postulierten Krebsprotektivität von Sulforaphan scheinen insbesondere solche Prozesse von Interesse, die zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität beitragen. Die vorliegende Arbeit nimmt sich im Speziellen DNA-Reparaturvorgängen an. So wird am Beispiel der DNA-Einzelstrangbruch- und Nukleotidexzisionsreparatur der Frage nachgegangen, ob Sulforaphan mit Zink-bindenden DNA-Reparaturproteinen und von ihnen koordinierten DNA-Reparaturprozessen interferieren kann.

Subzelluläre Betrachtungen zur Wechselwirkung von Sulforaphan mit PAPR-1 und einem synthetischen Peptid, das dem Zinkfinger des XPA-Proteins entspricht, sollen eine grundsätzliche Interferenz abklären. Außerdem wird in verschiedenen Untersuchungen einer zellulären Beeinflussung der Induktion und Reparatur von

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generierten DNA-Einzelstrangbrüchen und (+)-*anti*-BPDE-vermittelten DNA-Addukten durch Sulforaphan nachgegangen. Des Weiteren erfolgen vertiefende Analysen zum Einfluss der Substanz auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung sowie zur Rolle des p53-Status im Rahmen der Nukleotidexzisionsreparatur. Genexpressionsuntersuchungen zur Auswirkung von Sulforaphan auf die Transkription von Nukleotidexzisionsreparatur-assoziierten Genen werden als ergänzende Bestimmungen durchgeführt. Darüber hinaus soll ein weiterer Schwerpunkt auf dem zellulären Metabolismus von Sulforaphan und der speziellen Rolle seiner Metaboliten in den vermittelten Effekten liegen. Als vorrangiges Zellkulturmodell wurde die humane Kolonkarzinomzelllinie HCT 116 ausgewählt, um dem primären Expositionsweg über die Nahrung gerecht zu werden und da Darmkrebs-protective Eigenschaften von Sulforaphan immer wieder diskutiert werden. Zusätzlich dient die humane Zervix-Adenokarzinomzelllinie HeLa S3 als experimentelles Modell für die Untersuchungen zur Beeinflussung der DNA-Einzelstrangbruchreparatur durch Sulforaphan. XPA-defiziente Fibroblasten (XP12RO-Zellen) und deren XPA-profizientes Pendant sollen darüber hinaus Aufschluss über die Beteiligung des XPA-Proteins an den Sulforaphan-vermittelten Effekten geben.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

In verschiedenen Versuchen wurde der Einfluss von Sulforaphan auf DNA-Reparaturprozesse beleuchtet, in denen Proteine mit Zink-bindenden Strukturen eine essentielle Rolle spielen. Exemplarisch wurden hierfür die DNA-Einzelstrangbruchreparatur von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen und die Nukleotidexzisionsreparatur von (+)-*anti*-BPDE-induzierten DNA-Addukten ausgewählt, für die die Zink-bindenden Proteine PARP-1 bzw. XPA unabdingbar sind. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im Folgenden präsentiert und kurz diskutiert.

### 4.1 Zytotoxizität

#### 4.1.1 Einfluss von Sulforaphan auf die Viabilität von HCT 116-Zellen

Die Zytotoxizität einer Substanz ist neben der zellulären Bioverfügbarkeit ein essentieller Parameter für Zellkulturexperimente und dient des Weiteren der Abklärung des zu untersuchenden Konzentrationsbereiches. Als Maß für die Viabilität wurden Veränderungen der Zellzahl und der Koloniebildungsfähigkeit der HCT 116-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Sulforaphan erfasst. Hierbei gibt die Zellzahl Auskunft über akut toxische Prozesse, während die Koloniebildungsfähigkeit auch längerfristige Wachstumsverzögerungen widerspiegelt. Abbildung 10 stellt die konzentrationsabhängige Beeinflussung der beiden Parameter durch Sulforaphan dar.

Die Auswirkungen auf Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit waren prinzipiell vergleichbar und zeigten erst in stark zytotoxischen Konzentrationen einen voneinander abweichenden Verlauf. Bis zu einer Konzentration von 10 µM war die Inkubation mit einer Viabilität von 90 % wenig zytotoxisch und erst höhere Expositionskonzentrationen führten zu einer deutlichen Reduktion beider Viabilitätsparameter. Ab 25 µM Sulforaphan war hierbei eine stärkere Beeinträchtigung der Koloniebildungsfähigkeit festzustellen, welche bei 50 µM bis unter 10 % der Kontrolle sank, während die Zellzahl noch immer 35 % betrug. Auf Grundlage dieser Daten wurde der zu untersuchende Konzentrationsbereich für 24-stündige Inkubationen mit Sulforaphan zwischen 1 µM und 25 µM festgelegt.

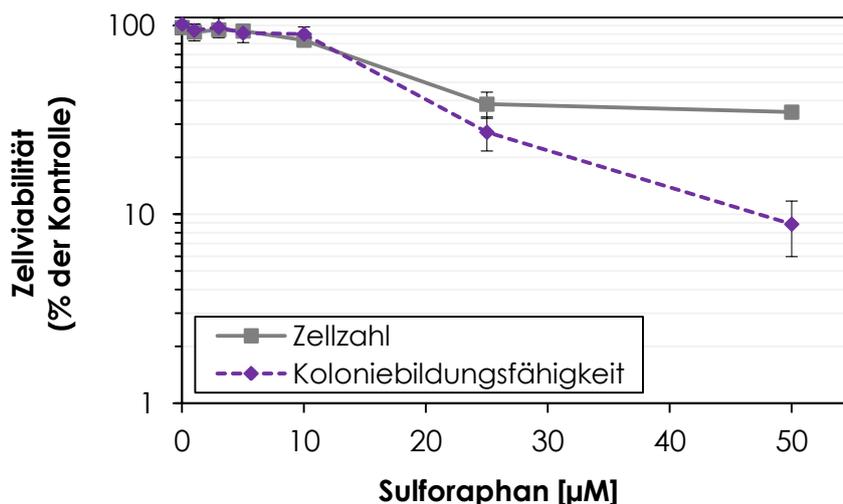


Abbildung 10: Zytotoxizität von Sulforaphan in HCT 116-Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von neun Werten aus drei unabhängigen Versuchen.

#### 4.1.2 Einfluss von Sulforaphan auf die Viabilität in Kombination mit $\text{H}_2\text{O}_2$ und (+)-*anti*-BPDE

Kombinationsuntersuchungen zur Zytotoxizität von Sulforaphan mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  bzw. (+)-*anti*-BPDE sollten erste Hinweise bezüglich einer potentiellen Beeinflussung der Ausbildung und/oder Prozessierung bzw. Reparatur der durch die Agenzien induzierten DNA-Schäden geben. Dazu wird alleinig die Koloniebildungsfähigkeit der HCT 116-Zellen betrachtet, da sich die Zellzahl als wenig sensitiver Parameter für die zu untersuchenden Inkubationsbedingungen herausstellte. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde nicht nur die Sulforaphan-Inkubation auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen, sondern auch die Kombinationsbehandlung auf die alleinige Inkubation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  bzw. (+)-*anti*-BPDE normiert und die Abbildungen somit von additiven Effekten bereinigt. Dargestellt werden demnach nur die effektiven, synergistischen Veränderungen der Koloniebildungsfähigkeit, die eine mögliche Interferenz durch Sulforaphan widerspiegeln. Die gewählten Inkubationen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30  $\mu\text{M}$ , 5 min) und (+)-*anti*-BPDE (50 nM, 1 h) waren selbst nicht zytotoxisch und mit ihnen behandelte HCT 116-Zellen wiesen Koloniebildungsfähigkeiten von 108,3 % bzw. 97,1 % auf.

Abbildung 11 stellt eine 3-stündige Exposition von HCT 116-Zellen mit Sulforaphan im Vergleich zu einer Kombinationsbehandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  dar. Es ist eine signifikante Abweichung zwischen den beiden Inkubationen sichtbar. Obwohl beide Substanzen getrennt voneinander keine Zytotoxizität zeigten, führte die Kombination beider zu einer deutlichen Abnahme der Zellviabilität. So waren ab einer Sulforaphan-

Konzentration von 60  $\mu\text{M}$  erste signifikante Abweichungen der Koloniebildungsfähigkeit zu sehen, die bei der maximal applizierten Sulforaphan-Konzentration von 80  $\mu\text{M}$  30 % betragen.

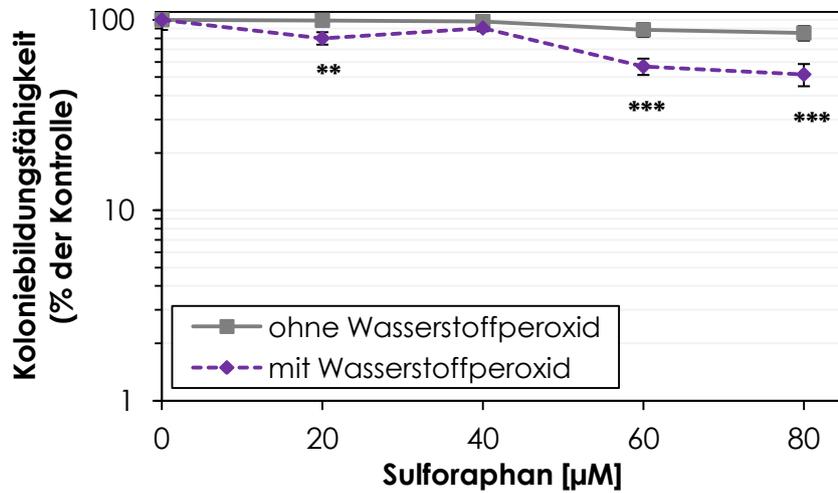


Abbildung 11: Koloniebildungsfähigkeit von HCT 116-Zellen nach 3-stündiger Inkubation mit Sulforaphan, teils gefolgt von einer 5-minütigen Koinkubation mit 30  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von sechs Werten aus zwei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Inkubation ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$  nach ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test: \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Die Beeinflussung der Zytotoxizität einer (+)-anti-BPDE-Inkubation in HCT 116-Zellen durch 2-stündige Vor- und 24-stündige Nachinkubation mit Sulforaphan ist in Abbildung 12 veranschaulicht.

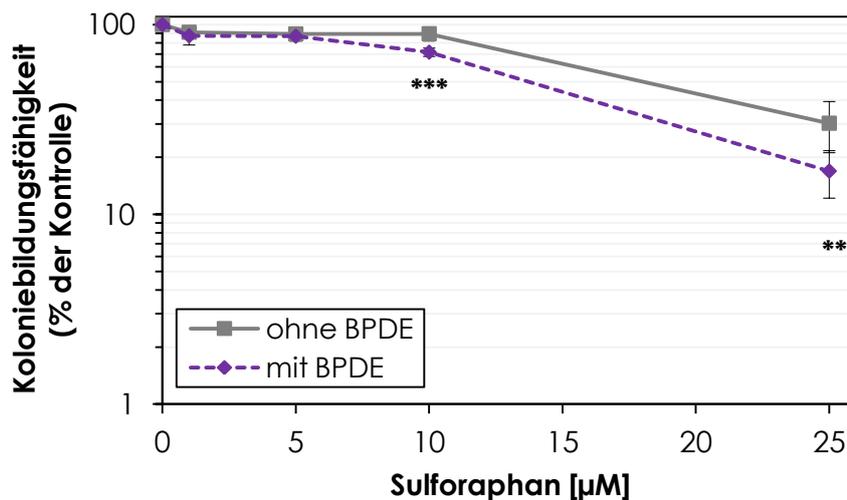


Abbildung 12: Koloniebildungsfähigkeit von HCT 116-Zellen nach 2-stündiger Vorinkubation mit Sulforaphan, teils gefolgt von einer 1-stündigen Koinkubation mit 50 nM (+)-anti-BPDE und einer Reparaturzeit von 24 h in Anwesenheit von Sulforaphan. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von neun Werten aus drei unabhängigen Bestimmungen. Statistisch signifikante Abweichung zur Inkubation ohne (+)-anti-BPDE nach ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test: \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Obwohl die gewählte (+)-*anti*-BPDE-Inkubation nicht zytotoxisch war, führte die Kombinationsbehandlung mit Sulforaphan zu einer deutlichen Abnahme der Zellviabilität. Dieser Effekt war ab einer Sulforaphan-Konzentration von 10 µM erstmals signifikant und die erfasste Koloniebildungsfähigkeit der Kombinationsbehandlung bis zu 20 % niedriger als die der alleinigen Sulforaphan-Inkubation.

Aussagen hinsichtlich des Ursprungs dieser synergistischen Effekte können anhand der Daten nicht getroffen werden. Da jedoch die Zellzahl durch keine der beiden Kombinationsbehandlungen signifikant beeinflusst wurde, scheinen akut zytotoxische Effekte keine Rolle zu spielen. Eine alleinige Beeinflussung der Koloniebildungsfähigkeit spricht vielmehr für eine Interferenz mit der Zellproliferation, die durch viele Ereignisse gestört werden kann. Da sowohl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als auch (+)-*anti*-BPDE DNA-Läsionen induzieren, ist eine Beeinflussung der Schadensinduktion oder -reparatur durch Sulforaphan als zugrunde liegender Mechanismus denkbar und wird im Folgenden näher beleuchtet.

### **4.2 Bioverfügbarkeit und intrazelluläres Metabolitenmuster**

Als weitere Grundlage für die Zellkulturuntersuchungen wurden Daten hinsichtlich der zellulären Bioverfügbarkeit und des intrazellulären Metabolitenmusters von Sulforaphan in Kooperation mit Stefanie Platz und Prof. Dr. Sascha Rohn (Universität Hamburg) erhoben. Da in Modellversuchen gezeigt wurde, dass die Reinsubstanz vergleichsweise schnell mit thiolischen Verbindungen wie Cystein reagiert und in der Regel bereits nach 1 h zu mehr als 80 % konjugiert vorliegt (Hanschen *et al.* 2012), wurde Sulforaphan selbst nicht quantifiziert. Als Maß für die Bioverfügbarkeit wurden vielmehr die Metaboliten von Sulforaphan (siehe Seite 8, Abbildung 3) mittels LC-MS/MS analysiert, was gleichzeitig eine Aussage bezüglich des intrazellulären Metabolitenmusters der Substanz ermöglicht. Aus Gründen der Vereinfachung findet im Folgenden eine Unterscheidung in frühe und späte Metaboliten statt, die sich an die Biotransformation des initialen Glutathion-S-Konjugats zum terminalen N-Acetylcystein-Addukt anlehnt. Als frühe Metaboliten werden hierbei die GSH-Addukte von Sulforaphan (SFN-GSH) und dessen Interkonversionsprodukts Erucin (ERU-GSH) bezeichnet. Alle Zwischen- und Endprodukte des darauf folgenden Abbaus der GSH-Addukte via Mercaptursäureweg werden als späte Metaboliten kategorisiert und umfassen die Cystein-Glycin-Konjugate (SFN-CysGly, ERU-CysGly), die Cystein-Addukte (SFN-Cys, ERU-Cys) und die terminalen Mercaptursäure-Derivate

(SFN-NAC, ERU-NAC). Die Analyse der intrazellulären Metabolitenkonzentrationen erfolgte nach 3- und 24-stündiger Inkubation von HCT 116-Zellen mit Sulforaphan.

#### 4.2.1 Bioverfügbarkeit von Sulforaphan

Die Summe der intrazellulären Konzentrationen aller Sulforaphan-Metaboliten wurde zur Beurteilung der zellulären Bioverfügbarkeit herangezogen und war nach 24-stündiger Inkubation mit bis zu 15  $\mu\text{M}$  Sulforaphan direkt proportional zur extrazellulären Konzentration (Abbildung 13). Die Aufnahme der extrazellulär applizierten Substanz erfolgte dabei gegen den Konzentrationsgradienten mit einem Akkumulationsfaktor von  $\sim 16,5$ , wodurch sich intrazelluläre Konzentrationen im hohen mikromolaren Bereich ergaben. Wie die Detektion vergleichbarer Werte bereits nach 3-stündiger Inkubation zeigt, wird die Substanz zügig in HCT 116-Zellen aufgenommen und ist über 24 h gleichbleibend bioverfügbar (Abbildung 13). In diesem Zusammenhang war die lineare Akkumulation bei bedeutend höheren Inkubationskonzentrationen jedoch nur bis zu einer extrazellulären Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  gegeben (Abbildung 14) und schien anschließend zwar immer noch durch eine steigende Aufnahme, aber einen niedrigeren Akkumulationsfaktor geprägt zu sein.

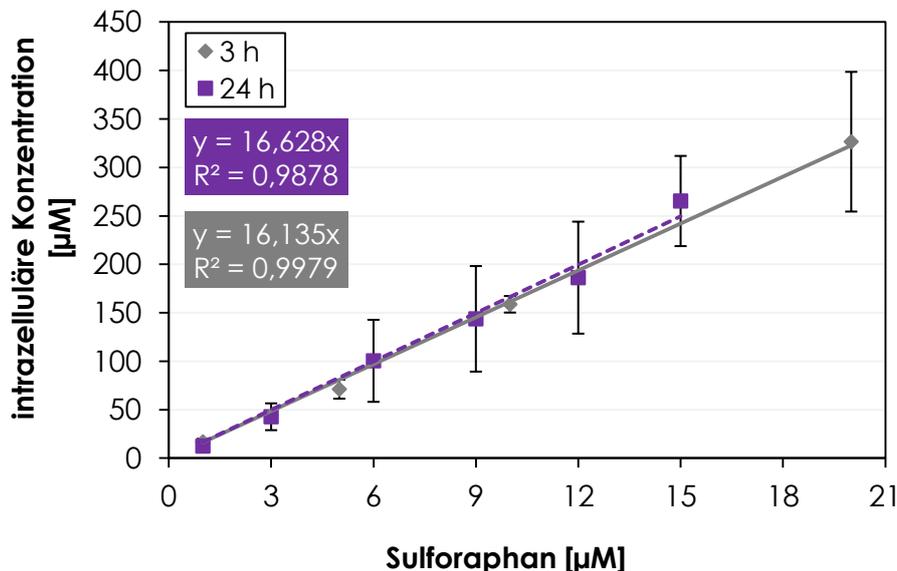


Abbildung 13: Zelluläre Bioverfügbarkeit von Sulforaphan in HCT 116-Zellen nach 3- und 24-stündiger Inkubation mit der Reinsubstanz. Dargestellt sind die Summen der intrazellulären Konzentrationen aller Sulforaphan-Metaboliten nach den entsprechenden Inkubationszeiten als Mittelwerte  $\pm$  SD von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen.

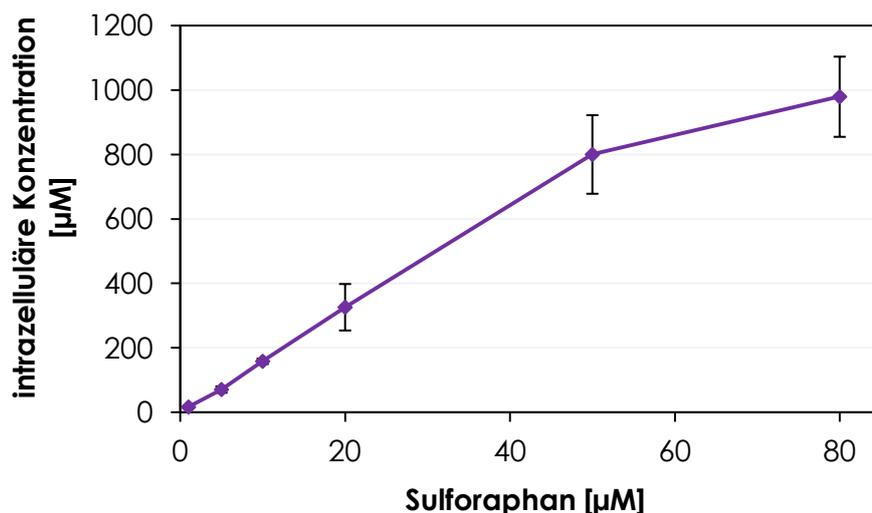


Abbildung 14: Summe der intrazellulären Konzentrationen aller Sulforaphan-Metaboliten nach 3-stündiger Inkubation mit der Reinsubstanz in HCT 116-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen.

Diese Ergebnisse decken sich gut mit Literaturdaten, da sowohl die starke zelluläre Akkumulation von Sulforaphan nach Inkubation im niedrigen mikromolaren Bereich (Zhang und Talalay 1998) als auch die Abnahme des Akkumulationsfaktors bei Inkubation im vergleichsweise höherem millimolaren Bereich (Zhang 2000, Zhang und Callaway 2002) für verschiedene Zelllinien beschrieben sind. Überraschenderweise blieb die intrazelluläre Konzentration der Metaboliten in HCT 116-Zellen jedoch über einen Zeitraum von 24 h konstant, obwohl Kinetiken in anderen Zelllinien, wie beispielsweise Hepa 1c1c7, eine zügige Abnahme nach etwa 4 h zeigten (Zhang und Talalay 1998, Ye und Zhang 2001). Ein möglicher Grund hierfür könnte in einer verschieden starken Akkumulation von Sulforaphan liegen, die in den hier präsentierten Daten um den Faktor 5 schwächer als in oben genannten Studien ausfiel. So ist bekannt, dass die effektive, intrazelluläre Konzentration von Sulforaphan und deren Metaboliten vor allem vom GSH-Status der Zelle abhängt, die Akkumulation in erster Linie als GSH-Addukt erfolgt und eine zelluläre Depletion des Tripeptids die Aufnahme der Substanz vermindert (Zhang und Talalay 1998, Zhang 2000). In einer Art Kreislauf kann das Sulforaphan-GSH-Konjugat jedoch vergleichsweise schnell durch Phase-III-Transporter wie MRP-1 oder Pgp-1 wieder aus der Zelle exportiert werden (Zhang und Callaway 2002), dort teilweise dissoziieren und infolgedessen freigesetztes Sulforaphan erneut für die Resorption zur Verfügung stehen (Zhang 2000). Da mit jedem dieser ausgeschiedenen Sulforaphan-Addukte auch ein GSH-Molekül die Zelle verlässt, kommt es nach Kurzzeit-Inkubation mit Sulforaphan zu einer massiven Depletion des zellulären GSH-Spiegels (Zhang 2000, Ye und Zhang 2001), was wiederum die Rückresorption von Sulforaphan vermindert. Darüber hinaus stört extrazelluläres GSH, welches durch die Dissoziation des

exportierten SFN-GSH entstehen kann, die Akkumulation von Sulforaphan (Zhang 2000). Die intrazelluläre Bioverfügbarkeit nimmt durch Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Resorption und Export mit steigender Expositionszeit dementsprechend üblicherweise ab. Verantwortlich dafür ist vor allem die Sulforaphan-induzierte Depletion von GSH und eine verminderte, initiale Akkumulation könnte demnach mit einer weniger drastischen Beeinflussung des zellulären GSH-Spiegels einhergehen. Damit könnte eine gleichbleibende Resorptionsrate von Sulforaphan assoziiert sein, die zu besagter Abweichung in der Akkumulationskinetik zwischen HCT 116- und Hepa 1c1c7-Zellen führen würde. Ein Vergleich von vertiefenden Analysen bezüglich des GSH-Spiegels der HCT 116-Zellen (siehe Kapitel 4.3) mit Literaturdaten (Zhang 2000, Ye und Zhang 2001) zeigte dazu passend, dass der basale GSH-Level der beiden Zelllinien zwar ähnlich ist, unter Sulforaphan-Inkubation jedoch deutliche Unterschiede in der Beeinflussung auftreten. So wird der zelluläre GSH-Pool in Hepa 1c1c7-Zellen nicht nur zu frühen Zeitpunkten stärker depletiert, sondern nach 24 h auch weniger stark durch Neusynthese erhöht als dies in HCT 116-Zellen der Fall ist. Auf Grund des stets niedrigeren GSH-Spiegels ist eine schwächere Rückresorption von Sulforaphan in Hepa 1c1c7-Zellen wie oben beschrieben denkbar, die zur Abweichungen der Akkumulationskinetik im Vergleich zu HCT 116-Zellen führen könnte.

### **4.2.2 Intrazelluläres Metabolitenmuster von Sulforaphan**

Aussagen bezüglich des intrazellulären Metabolitenmusters von Sulforaphan können anhand einer genaueren Betrachtung der intrazellulären Konzentrationen der jeweiligen Metaboliten getroffen werden. Überraschenderweise konnten in HCT 116-Zellen nach Inkubation mit der Reinsubstanz Sulforaphan stets Metaboliten des Interkonversionsprodukts Erucin nachgewiesen werden, dessen Konjugate bei niedrigen extrazellulären Expositionskonzentrationen sogar die Hauptmetaboliten darstellten. So waren nach 24-stündiger Inkubation beide GSH-Addukte quantifizierbar und die intrazelluläre Konzentration von ERU-GSH betrug mindestens das Doppelte des Sulforaphan-Konjugats (Abbildung 15 A). Neben den frühen GSH-Addukten waren zu diesem Zeitpunkt auch die im Metabolismus später auftretenden Cystein-Konjugate in um den Faktor 100 niedrigeren Konzentrationen nachweisbar (Abbildung 15 B). Prinzipiell waren die Ergebnisse nach 3- und 24-stündiger Inkubation vergleichbar, solange der gleiche extrazelluläre Konzentrationsbereich betrachtet wurde. Bei höheren Konzentrationen zeigte sich jedoch, dass ab einer Sulforaphan-

Konzentration von ~ 20  $\mu\text{M}$  eine Verschiebung des intrazellulären Metabolitenmusters stattfand (Abbildung 16).

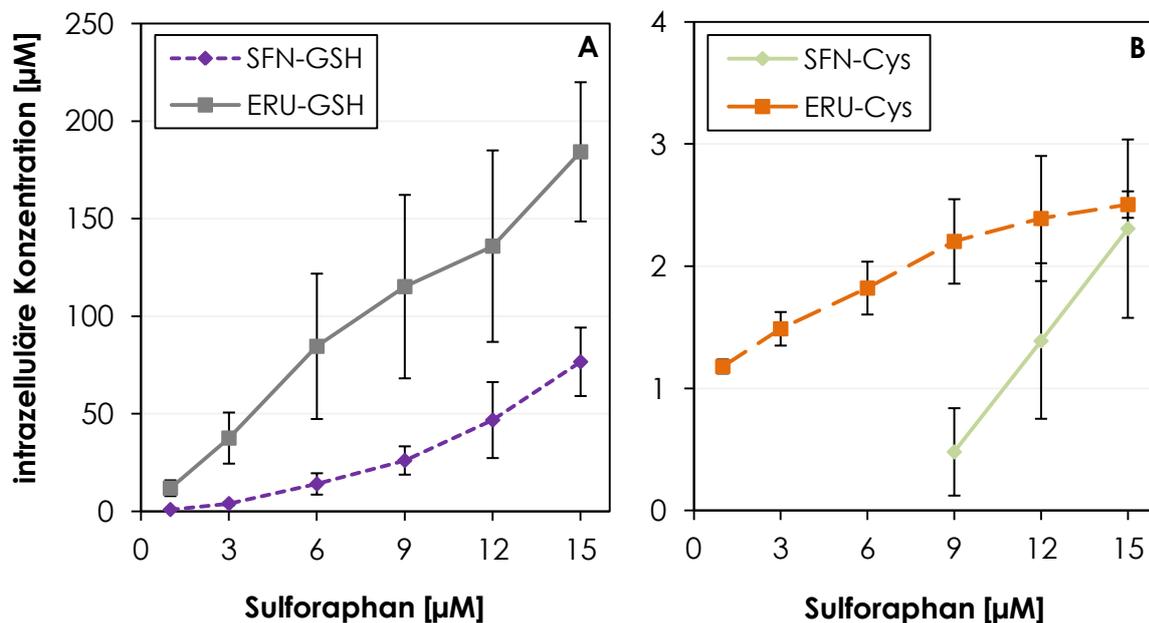


Abbildung 15: Intrazelluläre Konzentration der frühen (A) und späten (B) Metaboliten von Sulforaphan nach 24-stündiger Inkubation mit der Reinsubstanz in HCT 116-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen.

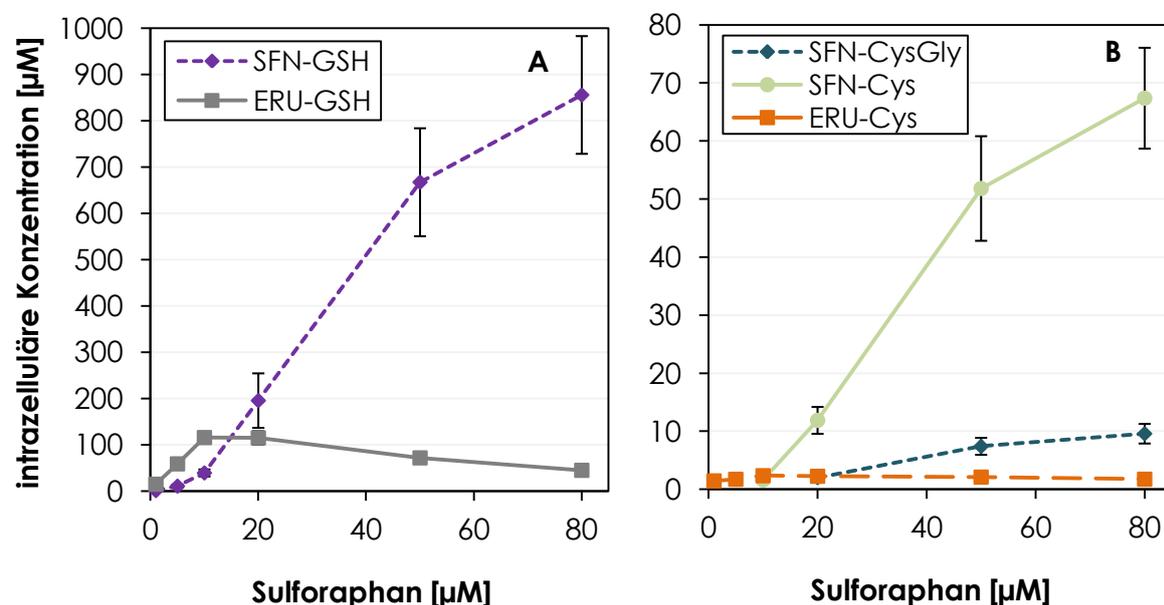


Abbildung 16: Intrazelluläre Konzentration der frühen (A) und späten (B) Metaboliten von Sulforaphan nach 3-stündiger Inkubation mit der Reinsubstanz in HCT 116-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen.

So waren bei hohen, extrazellulären Expositionskonzentrationen die Sulforaphan-Konjugate die Hauptmetaboliten und eine mäßige Abnahme der intrazellulären Konzentration an ERU-GSH war von einer starken Zunahme des Sulforaphan-Addukts

begleitet (Abbildung 16 A). Außerdem war bei solch hohen Konzentrationen nun auch erstmals das Cystein-Glycin-Addukt von Sulforaphan detektierbar (Abbildung 16 B). Bemerkenswert war darüber hinaus, dass die terminalen Mercaptursäure-Derivate zu keinem Zeitpunkt erfasst wurden.

Die Beeinflussung des intrazellulären Metabolitenmusters durch die extrazelluläre Sulforaphan-Konzentration wird in Abbildung 17 dargestellt: Konzentrations-unabhängig lag Sulforaphan grundsätzlich zu mindestens 90 % als GSH-Konjugat in den Zellen vor und die Cystein-Addukte stellten den größten Teil der verbleibenden Metaboliten. Wie bereits oben erwähnt, nahm jedoch mit steigender extrazellulärer Konzentration an Sulforaphan die intrazelluläre, relative Bedeutung des Interkonversionsprodukts Erucin ab und Sulforaphan und dessen Konjugate lagen unter diesen Bedingungen als zelluläre Hauptmetaboliten vor.

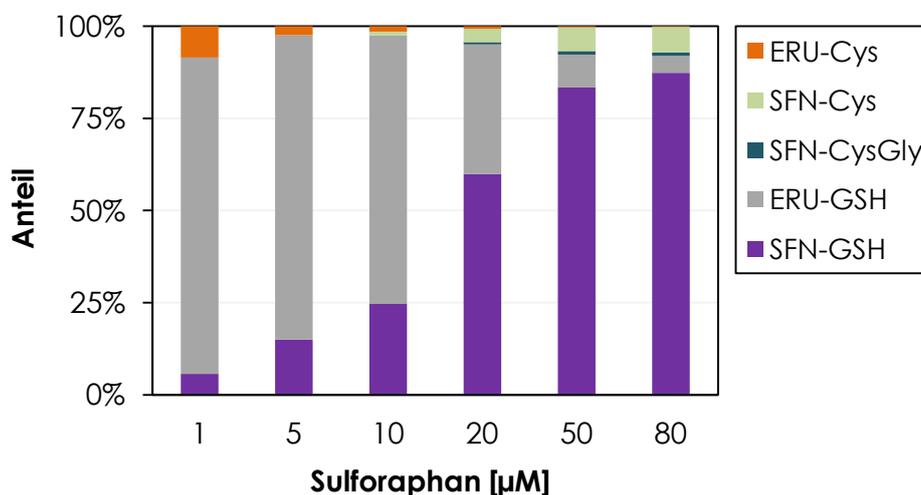


Abbildung 17: Abhängigkeit des intrazellulären Metabolitenmusters von der extrazellulären Konzentration nach 3-stündiger Inkubation von HCT 116-Zellen mit Sulforaphan. Dargestellt sind Mittelwerte von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen als prozentualer Anteil der Summe aller Metaboliten.

Eine *in vivo*-Interkonversion von Sulforaphan zu dessen Thioether-Analogen Erucin wurde bereits in Ratten (Kassahun *et al.* 1997, Bheemreddy und Jeffery 2007), Mäusen (Abbaoui *et al.* 2012) und Menschen (Vermeulen *et al.* 2006, Clarke *et al.* 2011, Saha *et al.* 2012) beschrieben. Diese Interkonversion erfolgte sowohl nach der oralen als auch intraperitonealen Applikation der Reinsubstanzen Sulforaphan (Kassahun *et al.* 1997, Abbaoui *et al.* 2012) oder Glucoraphanin (Bheemreddy und Jeffery 2007) in Versuchstieren und war im gleichen Maße nach dem Verzehr von Broccoli-Produkten (Vermeulen *et al.* 2006) oder der Einnahme von Broccoli-basierten Nahrungsergänzungsmitteln im Menschen nachweisbar (Clarke *et al.* 2011, Saha *et al.* 2012). Die Mehrzahl der genannten Studien führt die *in vivo*-Reduktion des

Sulfoxides Sulforaphan zu dessen Thioether-Analogen Erucin auf die Darm-Mikrobiota zurück. Zugleich wird eine spezielle Rolle des enterohepatischen Kreislaufs der Metaboliten diskutiert. Dahingegen sind Interkonversionsprozesse von Sulforaphan in Zellkulturen bis heute nicht beschrieben und werden hier erstmalig gezeigt. Die mechanistische Grundlage kann in diesem Fall jedoch nicht in einer Bakterien-assoziierten Reaktion liegen, sondern muss postabsorptiv und intrazellulär stattfinden. Da bei niedrigen extrazellulären Konzentrationen der Großteil des applizierten Sulforaphans als Erucin-Metaboliten in den Zellen präsent war, liegt ein enzymatischer Mechanismus nahe. So können weniger spezifische Prozesse auf Grund der fast vollständigen zellulären Reduktion von Sulforaphan zu Erucin bei niedrigen extrazellulären Expositionskonzentrationen ausgeschlossen werden. Des Weiteren kann die mit steigender Konzentration stattfindende Umkehr der Hauptmetaboliten von Erucin zu Sulforaphan als Inhibition oder Sättigung dieser voraussichtlich enzymatischen Reduktion verstanden werden.

Zellulär sind einige Sulfoxid-Reduktasen bekannt, von denen die Methioninsulfoxid-Reduktase prinzipiell in der Lage sein könnte, eine Interkonversion von Sulforaphan zu Erucin enzymatisch herbeizuführen. Dieses Enzym ist zellulär für die Reparatur von oxidativ geschädigten Proteinen zuständig, indem es die Rückreduktion von modifizierten Methioninresten katalysiert. Konkret kann durch milde Oxidation des in dieser Aminosäure enthaltenen Schwefelatoms ein Sulfoxid entstehen, dessen Reduktion zum ursprünglichen Thioether durch die Methioninsulfoxid-Reduktase bewerkstelligt wird. Da potentielle Substrate alleinig durch eine Sulfoxid-Struktur gekennzeichnet sein müssen, die von jeweils einer Methyl- bzw. Methylenfunktion benachbart ist (zusammengefasst in Boschi-Muller *et al.* 2008), könnte Sulforaphan durchaus ein solches Substrat darstellen. Wie bereits erwähnt, kann auch die Verschiebung im Metabolitenmuster mit steigender Konzentration in diesem Kontext theoretisch erklärt werden. Da eine steigende extrazelluläre Konzentration mit einer Abnahme der intrazellulären Konzentration der Erucin-Metaboliten verbunden ist, scheint eine Sättigung der enzymatischen Reaktion jedoch wenig plausibel. Eine solche Sättigung der enzymatischen Reduktion würde vielmehr zu einer Stagnation als zu einer Abnahme der intrazellulären Erucin-Konzentration führen und eine Inhibition des katalysierenden Prozesses durch Sulforaphan scheint somit mechanistisch wahrscheinlicher. Von besonderem Interesse im Rahmen dieser Arbeit ist hierbei, dass einige der humanen Methioninsulfoxid-Reduktasen Zink-bindend sind (Kim und Gladyshev 2004) und ein Austausch jedes einzelnen der vier Zink-koordinierenden Cysteinreste durch gezielte Mutagenese zu einem Verlust der Metall-Bindungsfähigkeit und katalytischen Aktivität des Proteins in *Drosophila* führte

(Kumar *et al.* 2002). Eine Interferenz von Sulforaphan oder dessen Metaboliten mit dieser Struktur könnte demnach eine potentielle Inhibition der enzymatischen Interkonversion von Sulforaphan zu Erucin erklären.

Aus Mensch und Tier ist des Weiteren bekannt, dass Sulforaphan über den Mercaptursäureweg metabolisiert und das terminale Mercaptursäure-Derivat mit dem Urin ausgeschieden wird (z.B. Kassahun *et al.* 1997, Shapiro *et al.* 2001, Vermeulen *et al.* 2006). Da dieser Prozess jedoch eine Reihe komplexer Metabolisierungs- und Transportschritte benötigt, sind Zelllinien meist nicht zur kompletten Biotransformation in der Lage. Die Biosynthese der Mercaptursäure-Derivate aus einem Glutathion-S-Konjugat ist demnach nur für wenige Zelllinien, wie z.B. HepG2-Zellen, beschrieben (Rebbeor *et al.* 1998). Die hier dargestellten Daten zeigen, dass HCT 116-Zellen Sulforaphan zwar über den Mercaptursäureweg metabolisieren, das *N*-Acetylcystein-Konjugat jedoch nicht detektiert werden kann. Obwohl das Cystein-Glycin-Konjugat im ersten Schritt der Biotransformation des GSH-Addukts zum Mercaptursäure-Derivat entsteht, scheint dieses zügig zum Cystein-Addukt gespalten zu werden und ist erst ab hohen extrazellulären Inkubationskonzentrationen als vermeintliches Zwischenprodukt in den Zellen detektierbar. Alternativ könnte ein Großteil des bei der Inkubation mit niedrigen extrazellulären Sulforaphan-Konzentrationen intrazellulär detektierten SFN-Cys durch eine direkte Addition an zelluläres Cystein und nicht metabolisch aus dem GSH-Addukt entstehen. Eine Unterscheidung dieser beiden Mechanismen ist allerdings nicht möglich und erschwert die Aussage hinsichtlich des Metabolismus des Interkonversionsprodukts Erucin. Für dieses wurden in HCT 116-Zellen lediglich die GSH- und Cystein-Addukte nachgewiesen, die beide nicht nur spezifisch im Mercaptursäureweg, sondern auch spontan entstehen können.

### **4.3 Beeinflussung des zellulären Glutathionhaushalts durch Sulforaphan**

Glutathion spielt nicht nur im Redox-Haushalt der Zelle eine wichtige Rolle, sondern ist auch essentiell für die Akkumulation und den Metabolismus von Sulforaphan. Somit sollten die Analysen zum zellulären Glutathionhaushalt sowohl die Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Sulforaphan ergänzen als auch Auskunft über potentielle Interferenzen mit dem Redox-Haushalt der Zelle geben. Hierzu wurden der zelluläre Gesamtglutathiongehalt und die Genexpression zweier bedeutender Enzyme im

Kontext der GSH-Synthese und GSH-Reduktion nach Sulforaphan-Inkubation in HCT 116-Zellen bestimmt.

### 4.3.1 Gesamtglutathionstatus

Untersuchungen zur Auswirkung von Sulforaphan auf den Gesamtglutathiongehalt der HCT 116-Zellen erfolgten nach 3- und 24-stündiger Inkubation mittels der Methode nach Tietze (Tietze 1969). Dabei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Verminderung der zellulären GSH-Konzentration nach 3-stündiger Inkubation mit Sulforaphan. Ein statistisch signifikanter Effekt war erstmals ab einer Expositionskonzentration von 20  $\mu\text{M}$  zu detektieren, während die maximale Konzentration von 80  $\mu\text{M}$  den basalen GSH-Spiegel von 8,6 mM um 50 % auf 4,5 mM reduzierte (Abbildung 18 A). Eine massive Zunahme der zellulären GSH-Konzentration wurde dahingegen nach 24-stündiger Inkubation mit Sulforaphan in HCT 116-Zellen bestimmt. Dabei wurde der basale GSH-Spiegel unabhängig von der extrazellulären Expositionskonzentration auf über 20 mM erhöht (Abbildung 18 B).

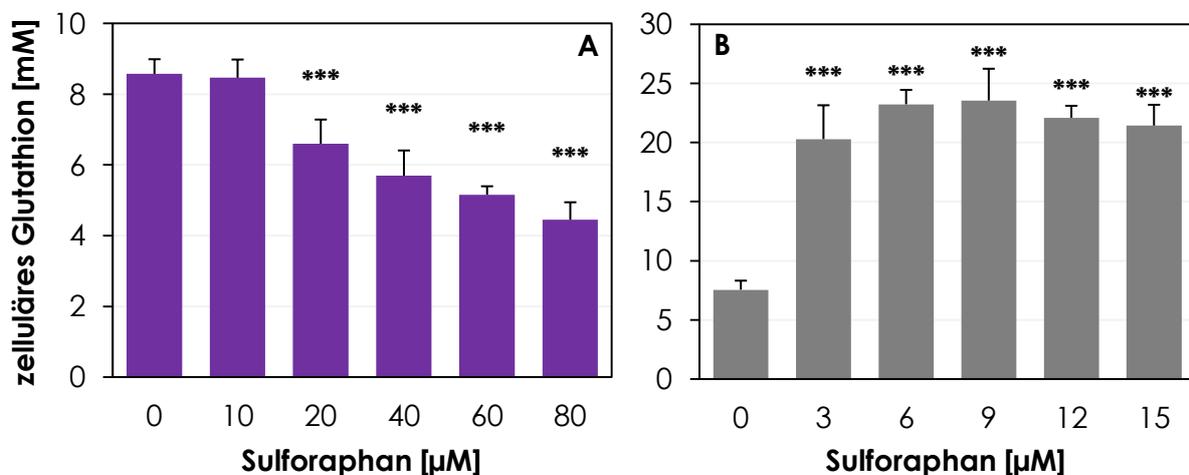


Abbildung 18: Einfluss einer Inkubation mit Sulforaphan für 3 h (A) bzw. 24 h (B) auf den zellulären Glutathionstatus von HCT 116-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von acht Werten aus zwei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test: \*\*\*  $p < 0,001$ .

Wie weitere Untersuchungen zur Kinetik der Sulforaphan-induzierten GSH-Depletion verdeutlichen, war eine statistisch signifikante Abnahme des zellulären Gesamtglutathiongehalts bereits nach 30-minütiger Inkubation detektierbar und prägte sich über einen Zeitraum von 180 min stetig weiter aus (Abbildung 19). Zusammenfassend ergibt sich also eine zeitabhängige Beeinflussung des zellulären GSH-Status durch

Sulforaphan, die über eine Depletion innerhalb der ersten 3 h zu einer Erhöhung des GSH-Spiegels nach 24 h führt.

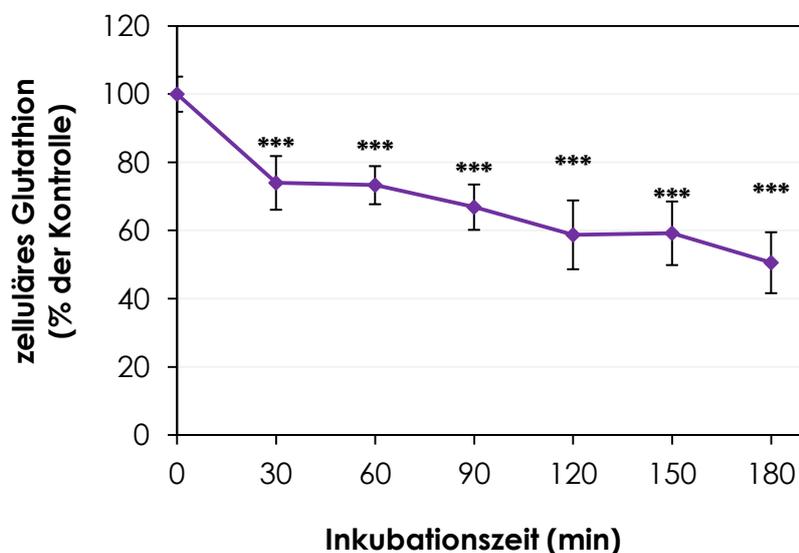


Abbildung 19: Kinetik der zellulären Glutathion-Depletion in HCT 116-Zellen nach Inkubation mit 60  $\mu$ M Sulforaphan. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von acht Werten aus zwei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test: \*\*\*  $p < 0,001$ .

Diese Zeitabhängigkeit wurde bereits in anderen Zelllinien beschrieben (Kim *et al.* 2003, Pappa *et al.* 2007, Liu *et al.* 2008) und könnte mit der anfänglichen, GSH-verbrauchenden Akkumulation von Sulforaphan und der anschließenden Hyperkompensation durch Neusynthese des vorher depletierten GSH erklärt werden. Eine dauerhafte Akkumulation von Sulforaphan als GSH-Addukt wurde auch im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen (siehe Kapitel 4.2), so dass die Konjugation von GSH als mechanistische Grundlage für die Depletion des Tripeptids in Frage kommen könnte. Die intrazelluläre Konzentration der GSH-Konjugate im hohen mikromolaren Bereich ist jedoch selbst unter Berücksichtigung des zügigen Exports dieser Metaboliten aus der Zelle (Zhang und Callaway 2002) und einer damit verbundenen Erhöhung der effektiv verbrauchten GSH-Menge nicht ausreichend für die hier beschriebene, massive Verminderung des zellulären GSH-Spiegels um millimolare Mengen. Demnach müssen für die GSH-Depletion weitere Mechanismen von Relevanz sein. In diesem Kontext könnte beispielsweise eine Sulforaphan-vermittelte Induktion von ROS (Xiao *et al.* 2009) zur Bildung des oxidierten Glutathion-Disulfids (GSSG) führen. Dieses würde dann zur Aufrechterhaltung des zytosolischen GSH/GSSG-Verhältnisses über MRPs aus der Zelle exportiert (Hirrlinger *et al.* 2001), was einen zusätzlichen Beitrag zur zellulären GSH-Depletion leisten könnte.

Die Erhöhung des zellulären GSH-Spiegels nach 24-stündiger Inkubation mit Sulforaphan könnte dahingegen tatsächlich durch Neusynthese von GSH induziert worden sein. So war zu diesem Zeitpunkt die intrazelluläre Konzentration der GSH-Konjugate zwar mit der nach 3-stündiger Inkubation identisch (siehe Kapitel 4.2), jedoch nicht von einer GSH-Depletion begleitet. Eine Hyperkompensation durch Neusynthese des Tripeptids käme als Erklärung in Frage. Darüber hinaus können auch weitere Prozesse wie beispielsweise eine verstärkte Reduktion von GSSG zu GSH von Bedeutung sein, die vor einem GSH-Export in Form des oxidierten GSSG schützen würde. Da ein klassischer Wirkmechanismus von Sulforaphan die Beeinflussung von Genexpressionsprozessen ist, wurde im Folgenden die Expression der katalytischen Untereinheit der GSH-synthetisierenden  $\gamma$ -Glutamylcysteinyligase und der GSH-reduzierenden Glutathionreduktase nach 24-stündiger Inkubation mit Sulforaphan in HCT 116-Zellen bestimmt.

### **4.3.2 Genexpression von $\gamma$ -Glutamylcysteinyligase und Glutathionreduktase**

Untersuchungen zur Expression des *GCLC*- und *GSR*-Genes, die für die katalytische Untereinheit der  $\gamma$ -Glutamylcysteinyligase bzw. die Glutathionreduktase codieren, sollten vertiefende Informationen zu einer Beeinflussung des zellulären Glutathionhaushalts auf Ebene der Transkription liefern. Die beiden Enzyme könnten des Weiteren vor allem für die Erhöhung des zellulären GSH-Status der HCT 116-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Sulforaphan von Relevanz sein. So wäre eine vermehrte Synthese oder Reduktion des Tripeptids als mechanistische Grundlage für die Zunahme der intrazellulären Glutathionkonzentration denkbar, weshalb eine potentielle Beeinflussung der Enzyme auf Transkriptionsebene näher untersucht wurde.

Wie in Abbildung 20 zu sehen, führte eine 24-stündige Sulforaphan-Inkubation zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der relativen Genexpression beider Gene in HCT 116-Zellen. Ab einer Sulforaphan-Konzentration von 1  $\mu$ M waren erstmals statistisch signifikante Effekte zu vermerken und auch die im Rahmen dieser Arbeit als biologisch relevant festgelegte Grenze einer Verdopplung der Transkriptmenge wurde für beide Gene überschritten. Konkret zeigte sich, dass die relative Genexpression des *GCLC*-Genes durch die Sulforaphan-Inkubation um bis zu 4-fach, die des *GSR*-Genes bis zu 3-fach erhöht wurde.

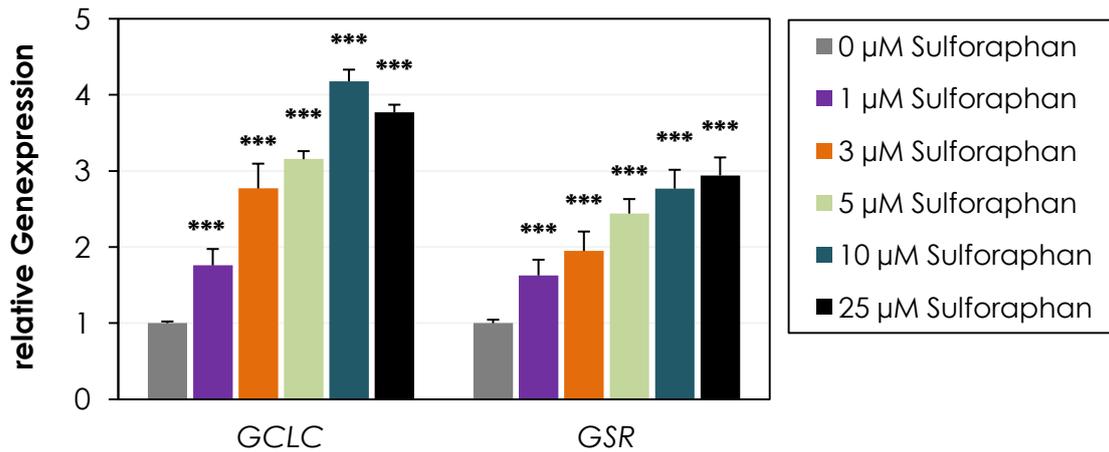


Abbildung 20: Beeinflussung der Genexpression des  $\gamma$ -Glutamylcysteinilgase (*GCLC*)- und Glutathionreduktase (*GSR*)-Genes nach 24-stündiger Inkubation mit Sulforaphan in HCT 116-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von acht Werten aus zwei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test: \*\*\*  $p < 0,001$ .

Die vermehrte Transkription des *GCLC*- und *GSR*-Genes nach Sulforaphan-Inkubation ist aus der Literatur bekannt und scheint vor allem von dem Transkriptionsfaktor *nrf2* abhängig zu sein (Thimmulappa *et al.* 2002). Die  $\gamma$ -Glutamylcysteinilgase katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der GSH-Biosynthese und das *GCLC*-Gen codiert für die katalytische Untereinheit des Enzyms. Studien zeigen, dass die Überexpression dieser Untereinheit und eine Stimulation der Transkription des *GCLC*-Genes von einer vermehrten GSH-Synthese begleitet sind (zusammengefasst in Lu 2013). Somit scheint die beobachtete Genexpressionserhöhung als eine mechanistische Grundlage für die Sulforaphan-vermittelte Zunahme der zellulären GSH-Konzentration plausibel. Des Weiteren wäre auch ein Einfluss der Glutathionreduktase möglich, die das Recycling von GSSG zu GSH katalysiert. So wird GSSG zügig durch MRPs aus der Zelle exportiert (Hirrlinger *et al.* 2001) oder in zellulären Kompartimenten zwischengelagert (Morgan *et al.* 2013), um das zytosolische GSH/GSSG-Verhältnis aufrecht zu erhalten. Eine beschleunigte, Glutathionreduktase-vermittelte Rückreduktion von GSSG zu GSH könnte somit vor dem Export schützen. Die präsentierten Daten zeigten im Einklang mit dieser Theorie eine signifikante Zunahme der Genexpression des *GSR*-Genes unter Sulforaphan-Inkubation. Eine Abklärung der zellulären Relevanz der präsentierten Beeinflussungen des GSH-Haushalts auf Transkriptionsebene wäre durch vertiefende Analysen der Proteinmengen und Enzymaktivitäten der beiden Enzyme möglich gewesen, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt wurden.

## **4.4 Beeinflussung der DNA-Einzelstrangbruchreparatur durch Sulforaphan**

Die vorliegende Arbeit wurde vor allem durch die Frage vorangetrieben, ob Sulforaphan mit Zink-bindenden DNA-Reparaturproteinen und von ihnen koordinierten DNA-Reparaturprozessen interagieren kann. Exemplarisch für einen solchen DNA-Reparaturprozess wurde die DNA-Einzelstrangbruchreparatur, in der Zink-bindende Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen eine essentielle Rolle spielen, auf eine Wechselwirkung mit Sulforaphan untersucht. Hierzu wurden in verschiedenen Versuchen die Induktion und Ligation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermittelten DNA-Einzelstrangbrüchen in HCT 116- und HeLa S3-Zellen nach Sulforaphan-Exposition bestimmt. Des Weiteren erfolgten tiefergehende Analysen zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung und Beeinflussungen der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1.

### **4.4.1 Induktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermittelten DNA-Strangbrüchen**

Als Ausgangspunkt für die Reparaturuntersuchungen wurde die Beeinflussung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermittelten Schadensinduktion durch Sulforaphan analysiert. Hierzu erfolgte neben der direkten Erfassung der Anzahl von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen auch eine Untersuchung der Enzymaktivität und Genexpression der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-detoxifizierenden Enzyme Katalase und Glutathionperoxidase.

#### **4.4.1.1 Anzahl der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüche**

Zur Analyse eines potentiellen Einflusses von Sulforaphan auf die Ausbildung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüche wurden HCT 116-Zellen 3 h mit Sulforaphan vorbehandelt und die DNA-Läsionen anschließend durch eine 5-minütige Inkubation mit 30 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> initiiert. Die Quantifizierung der induzierten DNA-Einzelstrangbrüche erfolgte mittels Alkalischer Entwindung.

Obwohl eine 3-stündige Inkubation mit Sulforaphan nur zu einer vernachlässigbaren Induktion von DNA-Strangbrüchen in HCT 116-Zellen führte, nahm die Anzahl an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Strangbrüchen unter diesen Bedingungen signifikant zu (Abbildung 21). Die Anzahl an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen in HCT 116-Zellen war beispielsweise durch eine Vorinkubation mit der nicht-zytotoxischen Sulforaphan-

Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  mehr als verdoppelt und von 2,2 auf 4,7 Läsionen pro  $10^6$  Basenpaare erhöht. Dieser synergistische Effekt war konzentrationsabhängig bis 60  $\mu\text{M}$  Sulforaphan, stagnierte jedoch bei höheren Expositionskonzentrationen. Da der Anteil doppelsträngiger DNA unter diesen Bedingungen jedoch nur noch  $\sim 10\%$  betrug, kann die Stagnation allerdings vermutlich auf eine Sättigung des Testsystems zurückgeführt werden. Des Weiteren war eine ähnliche Zunahme der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten Schadensinduktion ebenfalls in HeLa S3-Zellen zu detektieren (siehe Anhang 8.6.4).

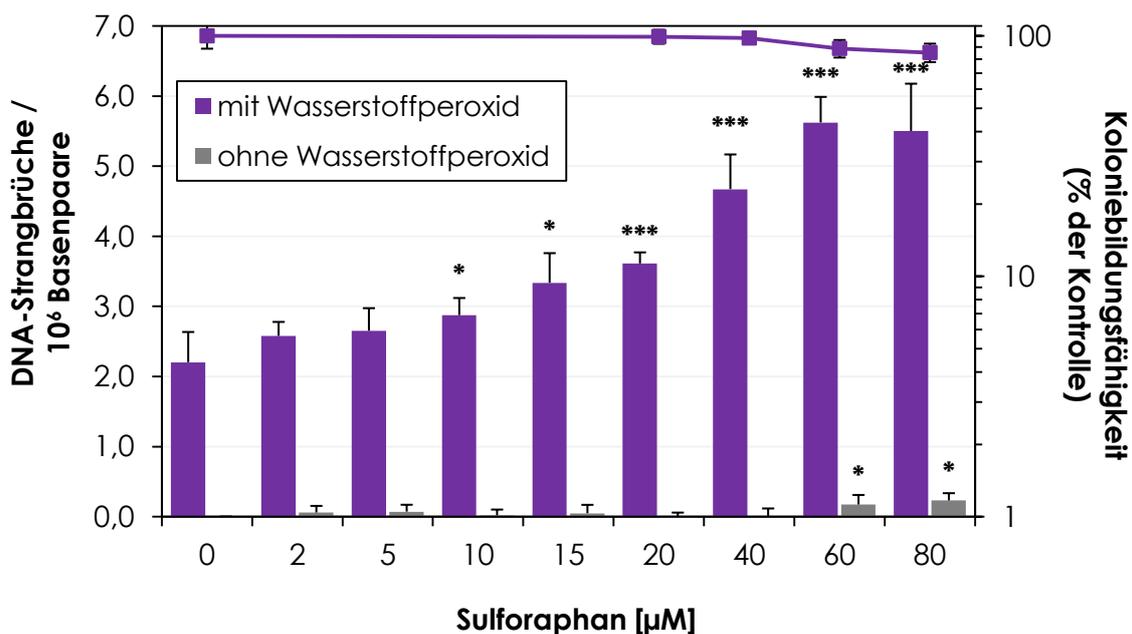


Abbildung 21: Einfluss einer 3-stündigen Vorinkubation mit Sulforaphan auf die Anzahl von  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbrüchen in HCT 116-Zellen. Die Schadensinduktion erfolgte mit 30  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  für 5 min und als Maß für die Zytotoxizität wurde die Koloniebildungsfähigkeit ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von neun Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test: \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Vergleichende Untersuchungen nach 24-stündiger Sulforaphan-Inkubation der HCT 116-Zellen sollten darüber hinaus abklären, ob die Inkubationszeit einen signifikanten Einfluss auf den vermittelten Effekt hat. Sulforaphan selbst erzeugte unter diesen Expositionsbedingungen erst in stark zytotoxischen Konzentrationen DNA-Strangbrüche in HCT 116-Zellen (siehe Anhang 8.6.5). Bei 24-stündiger Vorinkubation mit nicht-zytotoxischen Sulforaphan-Konzentrationen kam es dahingegen zu einer signifikanten Verminderung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -vermittelten Schadensinduktion. Dieser Effekt war überraschenderweise invers mit der Konzentration assoziiert (Abbildung 22), so dass die Protektion mit steigender Sulforaphan-Exposition abnahm. Nichtsdestotrotz blieb eine Protektion gegenüber der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -vermittelten Strangbruchinduktion bis zur höchsten Sulforaphan-Konzentration von 12  $\mu\text{M}$  erhalten.

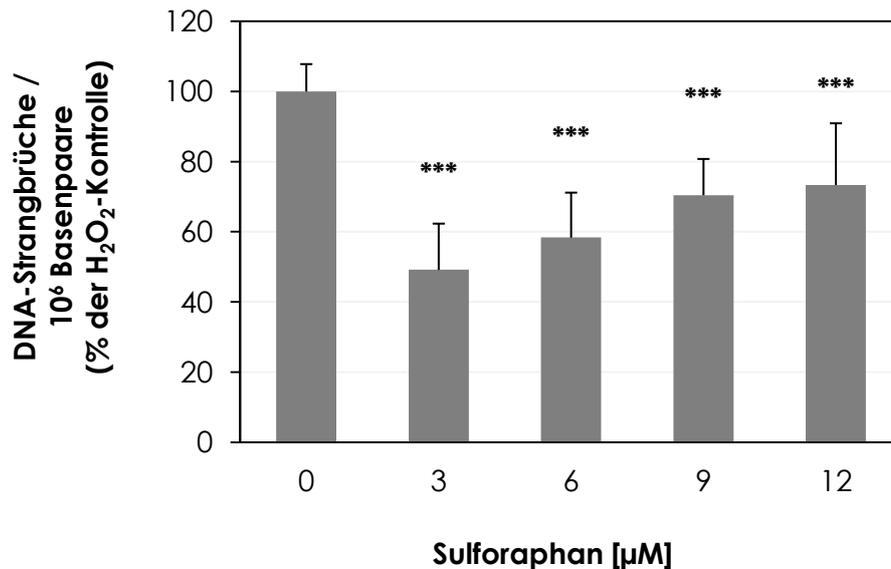


Abbildung 22: Einfluss einer 24-stündigen Vorinkubation mit Sulforaphan auf die Anzahl von  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbrüchen in HCT 116-Zellen. Die Schadensinduktion erfolgte mit  $30 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  für 5 min. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von 12 Werten aus vier unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test: \*\*\*  $p < 0,001$ .

Die signifikante Erhöhung der Schadensinduktion nach 3-stündiger Vorinkubation mit Sulforaphan könnte sowohl durch eine Interferenz mit der Detoxifizierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  als auch mit einer verlangsamten Reparatur der induzierten DNA-Strangbrüche erklärt werden. Da die Auswirkung von Sulforaphan auf die DNA-Einzelstrangbruchreparatur jedoch in Kapitel 4.4.2 noch ausführlich diskutiert wird, werden hier ausschließlich Überlegungen zur Interferenz mit der Detoxifizierung angestellt. Diese erfolgt größtenteils enzymatisch über Katalase und/oder Glutathionperoxidasen (Fisher *et al.* 2007, Schumacher *et al.* 2013), wobei letztere reduziertes GSH als Kofaktor benötigen und dadurch an das NADPH-abhängige Recycling von GSSG zu GSH durch Glutathionreduktasen gebunden sind. Die Geschwindigkeit der Detoxifizierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist somit unter bestimmten Bedingungen von der zellulären GSH-Konzentration abhängig (Quintana-Cabrera und Bolanos 2013) und dessen Depletion könnte mit einer verminderten Elimination von  $\text{H}_2\text{O}_2$  assoziiert sein. Demgemäß könnte Sulforaphan die Detoxifizierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  sowohl über eine Inhibition der katalytischen Aktivität von Katalase und/oder Glutathionperoxidasen als auch über eine Depletion des zellulären GSH-Spiegels vermitteln. Diesen beiden Möglichkeiten wurde darauf aufbauend nachgegangen: Eine signifikante Beeinflussung der intrinsischen Enzymaktivitäten der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -detoxifizierenden Enzyme durch Sulforaphan fand, wie in Kapitel 4.4.1.2 genauer dargestellt und diskutiert, nicht statt. Eine 3-stündige Sulforaphan-Inkubation führte jedoch zu einer signifikanten Depletion des zellulären GSH-Spiegels (siehe Kapitel 4.3.1), welche über verschiedene

Mechanismen die zelluläre Detoxifizierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  verschlechtern könnte. Einerseits kann reduziertes GSH als Kofaktor für Glutathionperoxidasen fehlen, andererseits wird ein prooxidativer Status in den Zellen etabliert.

Die Protektion gegenüber der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -vermittelten Schadensinduktion nach 24-stündigen Vorinkubation mit Sulforaphan könnte demzufolge durch eine verbesserte, zelluläre Detoxifizierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  erklärt werden. Klassischerweise wird eine solche Protektion von Sulforaphan auf Änderungen in der Genexpression über den Keap1-nrf2-ARE-Signalweg zurückgeführt und eine vertiefende Analyse dieses Parameters erfolgt für das CAT- und GPX1-Gen in Kapitel 4.4.1.3. Die Untersuchungen zeigten allerdings keine biologisch relevante Beeinflussung durch Sulforaphan und eventuell spielt vielmehr der reduzierte Kofaktor der Glutathionperoxidasen, GSH, abermals eine Rolle bei der Vermittlung des beschriebenen Effekts. So führte eine 24-stündige Inkubation mit Sulforaphan zu einer Erhöhung des zellulären GSH-Spiegels um bis zu 300 % (siehe Kapitel 4.3.1), die von einer gesteigerten Expression der Glutathionreduktase begleitet war (siehe Kapitel 4.3.2). Diese Ereignisse könnten theoretisch zu einer verbesserten Detoxifizierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  führen. Der inverse Zusammenhang zwischen Konzentration und Protektion verdeutlicht jedoch, dass weitere Prozesse für die komplexe Regulation der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -vermittelten Schadensinduktion nach 24-stündiger Sulforaphan-Exposition von Bedeutung sein müssen.

Nur wenige publizierte Daten sind hinsichtlich einer Beeinflussung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -vermittelten Schadensinduktion durch Sulforaphan bekannt, zeigen jedoch stets eine Protektion oder keine Beeinflussung des Prozesses. So wurde in der humanen Kolonkrebszelllinie LS-174 eine nur marginale Protektion gegenüber der Schadensinduktion nach 24-stündiger Vorinkubation mit Sulforaphan detektiert (Bonnesen *et al.* 2001), während eine konzentrationsabhängige Verminderung der Anzahl von  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Einzelstrangbrüchen unter gleichen Bedingungen in murinen Hepa 1c1c7-Zellen gezeigt wurde (Keck und Finley 2006). Nach Kurzzeit-Vorinkubation war entweder kein Effekt (Keck und Finley 2006) oder aber ein signifikanter Schutz durch Sulforaphan in humanen Lymphozyten zu sehen (Topè und Rogers 2009). Warum die hier präsentierten Daten von den in der Literatur beschriebenen Effekten abweichen, ist unklar, könnte jedoch prinzipiell durch die Wahl verschiedener Zelllinien erklärt werden. Auch die zur Schadensinduktion genutzte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration kann von Bedeutung für den erzielten Effekt sein, solange der zugrunde liegende Mechanismus tatsächlich eine Interferenz mit der zellulären Detoxifizierung durch Beeinflussung des GSH-Spiegels der Zelle ist. In diesem Kontext wurde in humanen Fibroblasten gezeigt, dass Glutathionperoxidasen GSH-abhängig nur bei niedrigen Expositionskonzentrationen der Detoxifizierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$

dienen und bei höheren Konzentrationen stattdessen Katalase diese Aufgabe GSH-unabhängig übernimmt (Maydt *et al.* 2013). Demnach wäre eine Beeinflussung der Schadensinduktion durch Depletion von GSH nur für niedrige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen gegeben und die im Rahmen dieser Arbeit genutzten Induktionsbedingungen (30 µM, 5 min) liegen in der Tat deutlich unter den in der Literatur beschriebenen 30-minütigen Expositionen mit 50 µM (Keck und Finley 2006) oder aber sogar 100 mM (Topè und Rogers 2009) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### **4.4.1.2 Enzymaktivität von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-detoxifizierenden Enzymen**

Nach Kurzzeit-Inkubation von HCT 116-Zellen mit Sulforaphan war, wie in Kapitel 4.4.1.1 beschrieben, eine signifikante Zunahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermittelten Schadensinduktion zu detektieren. Hierbei stellte sich die Frage, ob dieser Effekt durch eine verminderte Enzymaktivität der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-detoxifizierenden Enzyme Katalase oder Glutathionperoxidase vermittelt wurde. Die Bestimmungen der jeweiligen Enzymaktivitäten erfolgten darauf aufbauend in Kooperation mit Dr. Karlis Briviba (Max Rubner-Institut, Karlsruhe) nach 3-stündiger Inkubation in HCT 116-Zellen. Vor allem eine potentielle Interferenz mit den zellulären Glutathionperoxidasen war von Interesse, da diese in ihrem aktiven Zentrum ein Selenocystein enthalten, das direkt an der katalytischen Reduktion von Peroxiden beteiligt ist (zusammengefasst in Arteel und Sies 2001). Solche Selenocysteine weisen auf Grund des Selenatoms einen niedrigeren pK<sub>a</sub> als Cysteine auf und sind somit leichter zu oxidieren als das entsprechende Schwefelanalogon. Ein durch Sulforaphan induzierter, prooxidativer Status der Zellen könnte folglich mit einer selektiven Oxidation dieser essentiellen Selenocysteine in Glutathionperoxidasen assoziiert sein, was von einer verminderten katalytischen Aktivität des Enzyms begleitet wäre.

Wie die Untersuchungen allerdings zeigen, werden weder die Enzymaktivitäten von Glutathionperoxidasen noch die der Katalase durch eine 3-stündige Sulforaphan-Inkubation von HCT 116-Zellen beeinflusst (Abbildung 23). So scheint sich Sulforaphan weder durch direkte Interaktion noch durch oxidative Prozesse auf den katalytisch bedeutenden Selenocysteinrest des aktiven Zentrums der Glutathionperoxidasen auszuwirken. Da die Bestimmung der Enzymaktivität unter Zugabe des reduzierten Kofaktors GSH erfolgte, kann eine Beeinträchtigung der Glutathionperoxidase-Aktivität im zellulären Kontext durch GSH-Depletion jedoch nicht ausgeschlossen werden. Da auch die Aktivität der Katalase nicht beeinflusst wurde, scheint eine direkte Inaktivierung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-detoxifizierenden Enzyme als zugrunde liegender

Wirkmechanismus für die Zunahme der Schadensinduktion nach Kurzzeit-Inkubation mit Sulforaphan wenig plausibel.

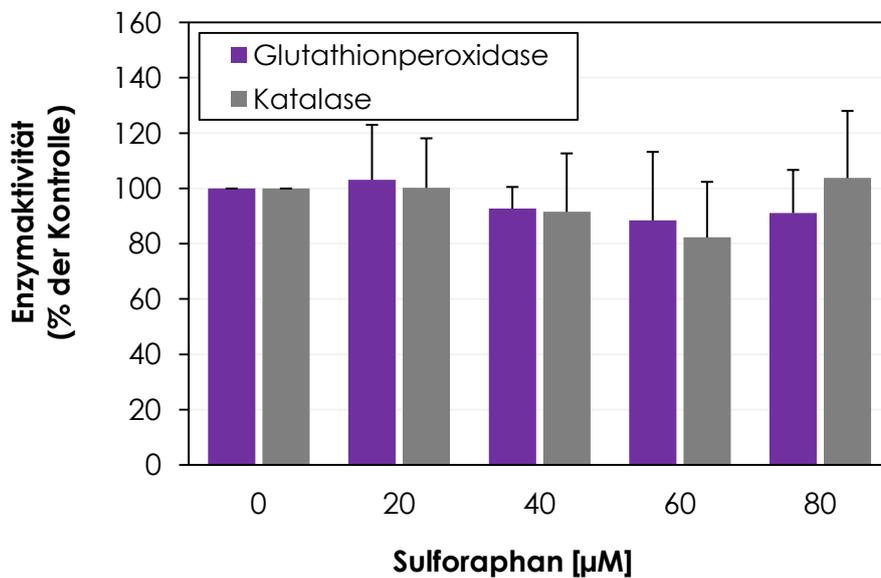


Abbildung 23: Zelluläre Beeinflussung der Enzymaktivität von Katalase und Glutathionperoxidasen durch Sulforaphan. HCT 116-Zellen wurden 3 h mit Sulforaphan inkubiert, bevor die zellulären Enzymaktivitäten bestimmt wurden. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen.

#### 4.4.1.3 Genexpression von $\text{H}_2\text{O}_2$ -detoxifizierenden Enzymen

Nach Langzeit-Inkubation von HCT 116-Zellen mit Sulforaphan war, wie in Kapitel 4.4.1.1 beschrieben, eine Protektion gegenüber der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -vermittelten Schadensinduktion zu detektieren. Um der Frage nachzugehen, ob eine vermehrte Transkription der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -detoxifizierenden Enzyme diesen Effekt vermittelte, wurden Genexpressionsanalysen des *CAT*- und *GPX1*-Genes durchgeführt. Hierzu wurden HCT 116-Zellen 24 h mit Sulforaphan inkubiert und die relative Expression der beiden Gene bestimmt.

Es zeigte sich, dass Sulforaphan die relative Transkriptmenge des *GPX1*-Genes nicht beeinflusste. Die Expression des *CAT*-Genes nahm dahingegen zwar statistisch signifikant ab, die Ausprägung des Effekts ist jedoch nicht als biologisch relevant anzusehen (Abbildung 24). So scheinen in der Literatur beschriebene, nrf2-abhängige Steigerungen der Genexpression von vor allem Glutathionperoxidasen durch Sulforaphan (zusammengefasst in Brigelius-Flohé 2006, Thimmulappa *et al.* 2002) nicht für die Protektion gegenüber der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -vermittelten Schadensinduktion von Relevanz zu sein. Die mechanistische Grundlage der protektiven Wirkung von

Sulforaphan bleibt demzufolge ungeklärt, könnte jedoch mit der Erhöhung des zellulären GSH-Spiegels und der vermehrten Expression der Glutathionreduktase assoziiert sein (siehe Kapitel 4.3).

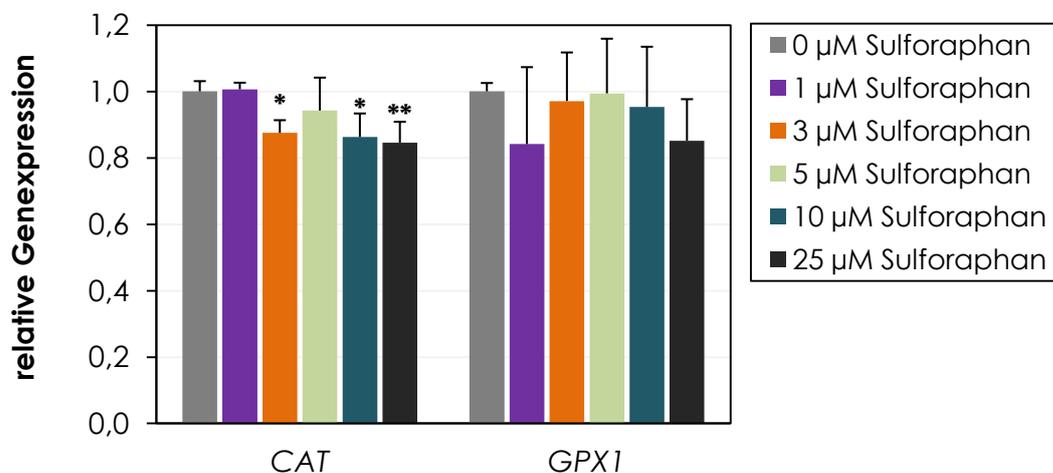


Abbildung 24: Beeinflussung der Genexpression des CAT- und GPX1-Genes nach 24-stündiger Inkubation mit Sulforaphan in HCT 116-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von acht Werten aus zwei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

#### 4.4.2 Reparatur von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen

Um den Einfluss von Sulforaphan auf die DNA-Einzelstrangbruchreparatur in HCT 116- und HeLa S3-Zellen zu beurteilen, wurden diese 3 h mit Sulforaphan vorinkubiert, die Läsionen durch 5-minütige Inkubation mit 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erzeugt und deren Abnahme über einen Zeitraum von 30 min mittels Alkalischer Entwindung erfasst. Um die so erhaltenen Reparaturkinetiken trotz erhöhter Schadensinduktion nach Sulforaphan-Vorinkubation besser vergleichen zu können, wurde auf die jeweilige Induktionskontrolle normiert, so dass die Darstellungen demnach nur eine effektive Beeinflussung der Reparaturgeschwindigkeit widerspiegeln.

Bereits frühzeitig war eine signifikante Verlangsamung der Reparatur von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Einzelstrangbrüchen in beiden Zelllinien nach 3-stündiger Vorinkubation mit Sulforaphan zu beobachten, die über den gesamten Zeitraum erhalten blieb (Abbildung 25). Dies wurde von einer signifikanten Zunahme der Halbwertszeit  $t_{1/2}$  des induzierten Schadens in den Zellen begleitet (Tabelle 1), wobei beide Zelllinien im gleichen Maße beeinflusst waren, obwohl die Reparatur in HeLa S3-Zellen signifikant langsamer verlief.

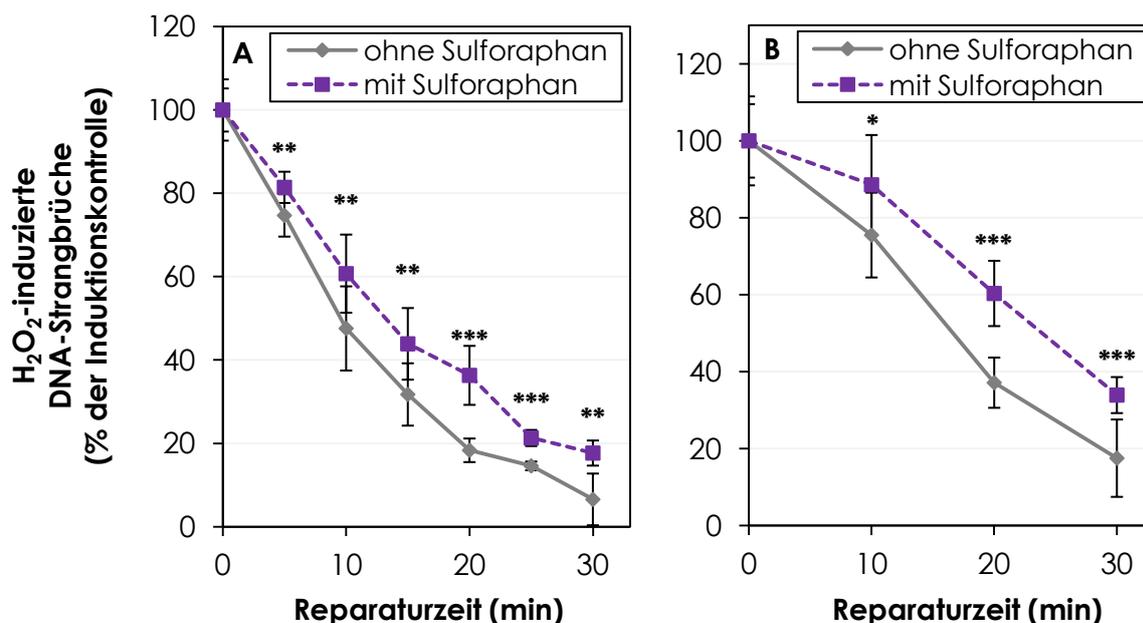


Abbildung 25: Einfluss einer 3-stündigen Vorinkubation mit 40 µM (A) bzw. 25 µM (B) Sulforaphan auf die Reparatur von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen in HCT 116- (A) bzw. HeLa S3- (B) Zellen. Die Schadensinduktion erfolgte jeweils mit 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 5 min. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von sechs Werten aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Reparatur ohne Sulforaphan-Inkubation nach ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test: \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

Tabelle 1: Halbwertszeit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Strangbrüchen nach 3-stündiger Vorinkubation mit Sulforaphan.

Zelllinie	SFN [µM]	t <sub>1/2</sub> (min) <sup>a</sup>
HCT 116	0	10,4 ± 0,8
	40	13,3 ± 1,9 *
HeLa S3	0	17,8 ± 2,4
	25	24,2 ± 2,0 *

<sup>a</sup> Mittelwerte von vier Werten aus mindestens zwei Versuchen ± SD

\* Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle \* p < 0,05

Auswirkungen von Sulforaphan auf die DNA-Einzelstrangbruchreparatur sind in der Literatur bis dato noch nicht beschrieben und werden hier erstmalig gezeigt. Eine Vielzahl von Mechanismen ist als molekulare Grundlage denkbar. So könnte eine Interferenz sowohl auf Ebene der Schadenserkennung, als auch der weiteren Prozessierung der Strangenden, der Reparatur-Synthese oder der Ligation stattfinden. Es ist jedoch bekannt, dass im Besonderen die PARP-vermittelte Schadenserkennung limitierend für eine zügige Reparatur von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Einzelstrangbrüchen ist und ein Knock-out von PARP-1 zu einer signifikanten Verlangsamung der DNA-Einzelstrangbruchreparatur führt (Fisher *et al.* 2007). Demnach wurde in folgenden Experimenten der Fokus auf den Einfluss von Sulforaphan auf die schadensinduzierte

PARylierung und PARP-1 gelegt, zumal deren Zink-bindenden Strukturen auf Grund der Thiolreaktivität von Sulforaphan potentielle Angriffspunkte darstellen könnten.

#### **4.4.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung**

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, ist eines der frühesten Ereignisse während der DNA-Einzelstrangbruchreparatur die Schadenserkennung durch PARPs und eine schadensinduzierte PARylierung verschiedener Akzeptorproteine. Im Falle von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Einzelstrangbrüchen wird dieser Prozess in erster Linie durch die Zink-bindende PARP-1 vermittelt, die geschwindigkeitsbestimmend für die Reparatur der Läsionen ist (Fisher *et al.* 2007). Eine potentielle Beeinflussung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten PARylierung durch Sulforaphan wurde sowohl im zellulären System als auch an der isolierten PARP-1 untersucht und die Ergebnisse der Analysen werden im Folgenden vorgestellt.

##### **4.4.3.1 Untersuchungen in HeLa S3-Zellen**

Zur Untersuchung einer potentiellen Beeinflussung der schadensinduzierten PARylierung im zellulären System wurden HeLa S3-Zellen 3 h mit Sulforaphan inkubiert, bevor die Induktion der DNA-Einzelstrangbrüche mit 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 5 min erfolgte. Die Menge an gebildeten PAR-Polymeren wurde anschließend immunofluorimetrisch quantifiziert und relativ zur Kontrolle angegeben.

Weder in Kontrollzellen noch in Sulforaphan-behandelten HeLa S3-Zellen war eine signifikante PARylierung zu detektieren (Daten nicht dargestellt). Die 5-minütige Induktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte dahingegen jedoch zu einer massiven Bildung von PAR-Polymeren, deren Ausmaß durch eine Vorinkubation mit Sulforaphan deutlich vermindert wurde (Abbildung 26). Eine quantitative Auswertung des Fluoreszenz-Signals im Zellkern zeigte eine signifikante Abnahme der schadensinduzierten PARylierung unter Sulforaphan-Inkubation, die bereits im nicht-zytotoxischen Konzentrationsbereich auftrat (Abbildung 27). Hierbei war die Abnahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten PARylierung bis 15 µM konzentrationsabhängig, erreichte anschließend jedoch ein Plateau bei ~ 40 % PARylierungsaktivität der Kontrolle und wurde durch höhere Sulforaphan-Konzentrationen nicht weiter beeinflusst.

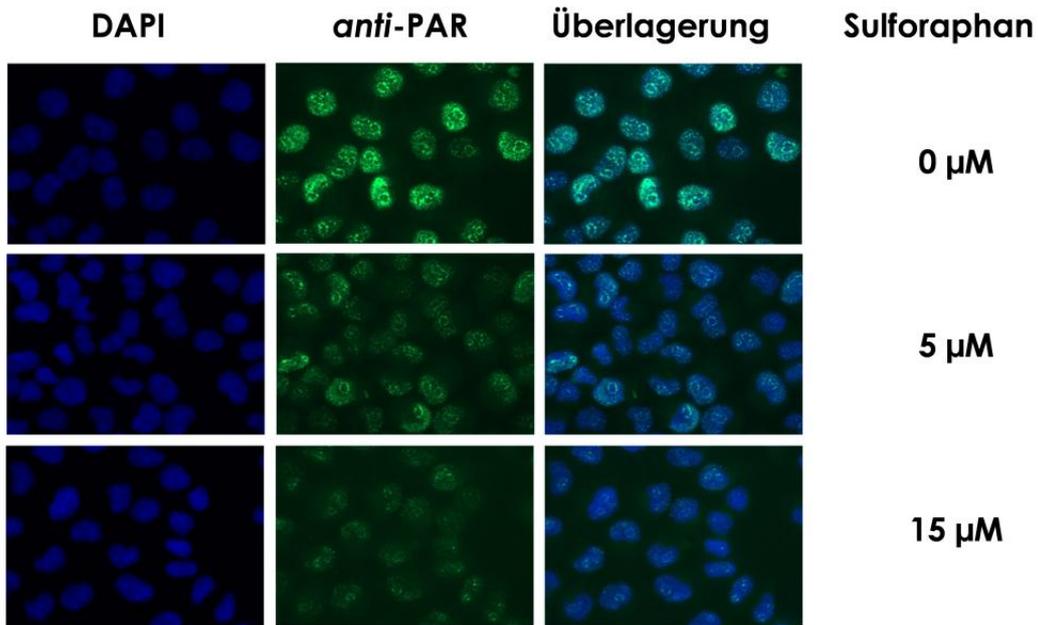


Abbildung 26: Immunofluorimetrische Analyse des Einflusses einer 3-stündigen Vorinkubation mit Sulforaphan auf die  $H_2O_2$ -induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung in HeLa S3-Zellen. Die Schadensinduktion erfolgte mit  $100 \mu M H_2O_2$  für 5 min. Dargestellt sind exemplarische Aufnahmen eines Versuches nach der Vorinkubation mit Lösungsmittel und  $5 \mu M$  bzw.  $10 \mu M$  Sulforaphan.

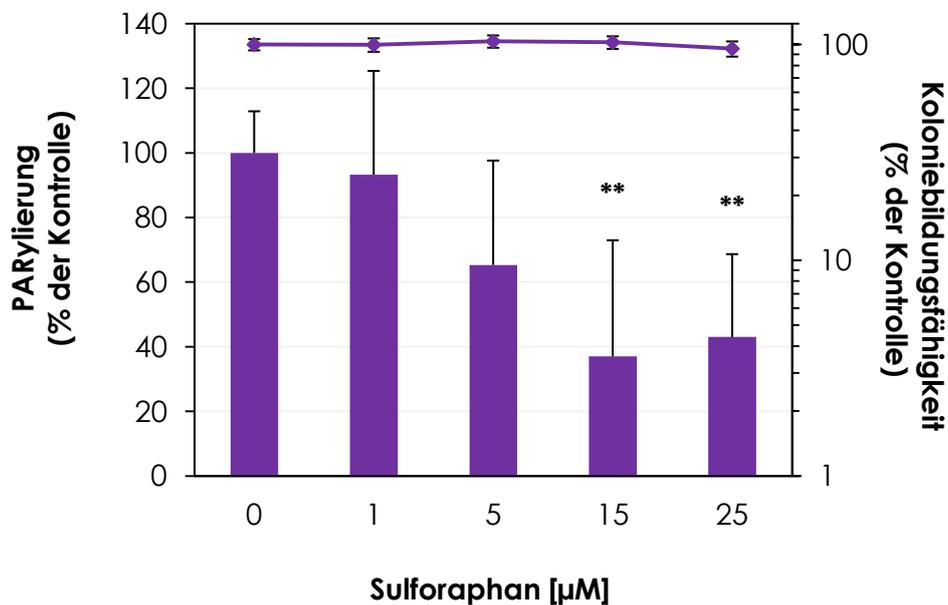


Abbildung 27: Einfluss einer 3-stündigen Vorinkubation mit Sulforaphan auf die  $H_2O_2$ -induzierte Poly(ADP-Ribosyl)ierung in HeLa S3-Zellen. Die Schadensinduktion erfolgte mittels 5-minütiger Inkubation mit  $100 \mu M H_2O_2$  und als Maß für die Zytotoxizität wurde die Koloniebildungsfähigkeit ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test: \*\*  $p < 0,01$ .

Die zelluläre Inhibition der  $H_2O_2$ -induzierten PARYlierung durch Sulforaphan wird in dieser Arbeit erstmalig gezeigt und ist in der Literatur noch nicht beschrieben. Einige

Arbeiten beschäftigen sich jedoch mit der Sulforaphan-vermittelten Spaltung der PARP-1 (Singh *et al.* 2004, Fimognari *et al.* 2005, Pappa *et al.* 2006), die im Zuge einer Apoptose-Induktion stattfinden kann. Eine solche PARP-Spaltung könnte zwar prinzipiell zu der hier gezeigten Abnahme der schadensinduzierten PARylierung führen, scheint jedoch auf Grund der nicht-zytotoxischen Konzentrationen von Sulforaphan für den beschriebenen Effekt nicht relevant. Darüber hinaus gibt es mehrere potentielle Angriffspunkte, durch die Sulforaphan eine Inhibition der schadensinduzierten PARylierung hervorrufen könnte. Vor allem eine Beeinflussung der PARP oder PARG über Inhibition bzw. Aktivierung der jeweiligen Enzymaktivitäten sind hierbei neben einer potentiellen Depletion des zellulären NAD<sup>+</sup>-Spiegels zu nennen. Da sich die vorliegende Arbeit im Speziellen mit der Beeinflussung von Zink-bindenden Proteinen durch Sulforaphan auseinandersetzt, wurden vertiefende Untersuchungen zur Beeinflussung der rekombinanten PARP-1 *in vitro* angestellt.

#### **4.4.3.2 Untersuchungen an isolierter PARP-1**

Da die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte PARylierung im zellulären System durch verschiedenste Mechanismen beeinflusst werden kann, wurden vergleichende Untersuchungen an isolierter PARP-1 in Kooperation mit Dr. Claudia Keil (TU Berlin) durchgeführt. Dazu wurde das rekombinante Protein für 30 min mit Sulforaphan inkubiert, bevor die PARylierung in Gegenwart von <sup>32</sup>P-NAD<sup>+</sup> erfolgte. Die eingebaute Menge an <sup>32</sup>P-ADP-Ribose wurde anschließend mittels Cerenkov-Messung quantifiziert und dient als Maß für die Beeinflussung der PARP-1-Enzymaktivität.

Wie in Abbildung 28 dargestellt, beeinflusste eine Vorinkubation des Enzyms mit der Reinsubstanz Sulforaphan die *in vitro*-PARylierungskapazität der rekombinanten PARP-1 nicht. Die Exposition mit den frühen Metaboliten von Sulforaphan, den GSH-Konjugaten von Sulforaphan und Erucin, führte demgegenüber jedoch zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme des Einbaus radioaktiv-markierter ADP-Ribose durch PARP-1 (Abbildung 28). Das Ausmaß der PARP-1-Inhibition war dabei für beide Metaboliten gleich stark ausgeprägt und ab Konzentrationen von 100 µM statistisch signifikant. Die maximal applizierten Konzentrationen von 250 µM führten hierbei zu Inhibitionen der PARP-1-vermittelten PARylierung um ~ 50 %. Neben diesen frühen Metaboliten von Sulforaphan und Erucin wurden ebenfalls die Cystein-Addukte und terminalen Mercaptursäure-Derivate hinsichtlich der Beeinflussung der *in vitro*-PARylierung untersucht, zeigten jedoch wie die Reinsubstanz Sulforaphan keinen Effekt (siehe Anhang 8.6.6).

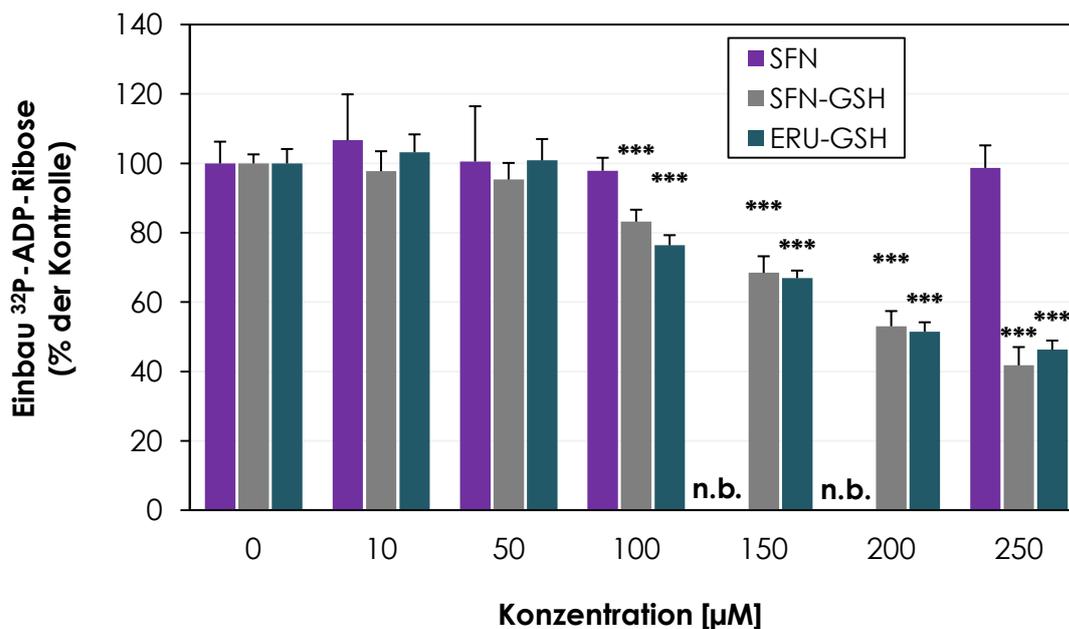


Abbildung 28: Beeinflussung des PARP-1-vermittelten Einbaus von  $^{32}\text{P}$ -ADP-Ribose durch Sulforaphan und dessen frühen Metaboliten. Rekombinante PARP-1 wurde 30 min mit dem jeweiligen Metaboliten oder Sulforaphan inkubiert, bevor die Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch die Zugabe von sonifizierter Lachsspermien-DNA gestartet wurde und in Gegenwart von  $^{32}\text{P}$ -NAD<sup>+</sup> für 30 min erfolgte. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von sechs Werten aus zwei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test: \*\*\*  $p < 0,001$ . (n.b. nicht bestimmt)

Um weitere Informationen hinsichtlich des zugrunde liegenden Mechanismus dieser Inhibition der PARP-1-vermittelten PARylation durch die GSH-Addukte von Sulforaphan und Erucin zu erhalten, wurden Protektionsversuche durchgeführt. Bei diesen zeigte sich, dass thiolische Reagenzien wie Dithiothreitol (DTT), GSH und Cystein (Cys) signifikant vor der Metaboliten-induzierten PARP-1-Inhibition schützten. Die Aminosäure Glycin, welche keine Thiofunktion aufweist, zeigte dahingegen keinen Effekt (Abbildung 29). Die Protektion gegenüber der PARP-1-Inhibition war darüber hinaus für beide GSH-Addukte gleich ausgeprägt und unterschied sich auch zwischen den drei Thiolreagenzien nicht signifikant. So war das Ausmaß der induzierten Inhibition im Mittel ~ 50 % niedriger, wenn die rekombinante PARP-1 mit DTT, GSH oder Cys vorinkubiert wurde. Wie Abbildung 30 am Beispiel von DTT zeigt, hatte der Zeitpunkt der Zugabe des Thiolreagenzes allerdings einen signifikanten Einfluss auf dessen protektive Wirkung. Demnach war die Protektion signifikant niedriger, wenn die Zugabe der thiolischen Substanz nach der Inkubation des PARP-1-Proteins mit den Sulforaphan-Metaboliten stattfand. Die Vor- und Koinkubationen der PARP-1 mit DTT wichen dahingegen nicht signifikant voneinander ab und zeigten vergleichbare Protektionen gegenüber der Metaboliten-induzierten Hemmung der PARylation.

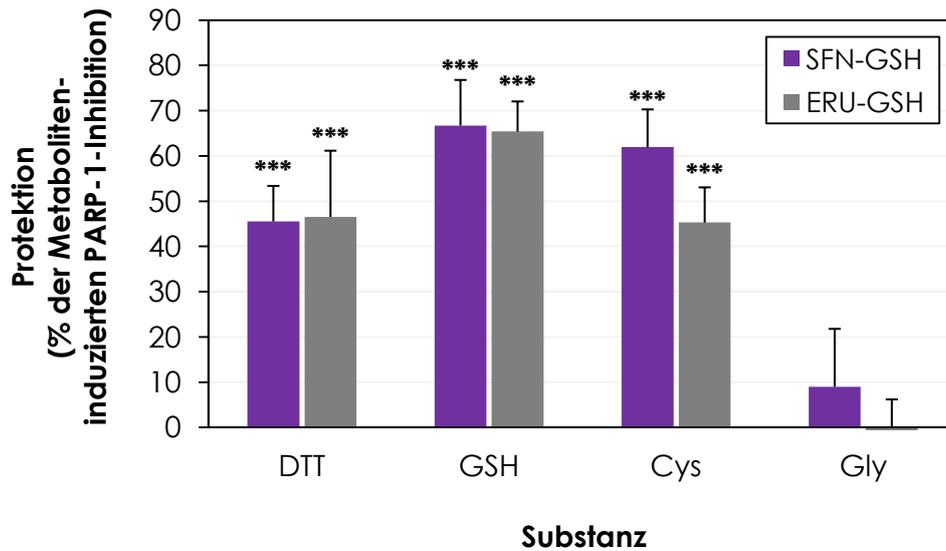


Abbildung 29: Protektion von Thiolreagenzien und Glycin vor der Metaboliten-induzierten PARP-1-Inhibition. Rekombinante PARP-1 wurde 15 min mit 200  $\mu\text{M}$  der jeweiligen Substanz inkubiert, bevor 200  $\mu\text{M}$  der Metaboliten für weitere 15 min hinzugegeben wurden. Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung wurde anschließend durch Zugabe von sonifizierter Lachsspermien-DNA gestartet und erfolgte für 30 min in Gegenwart von  $^{32}\text{P-NAD}^+$ . Glycin weist keine Thiolfunktion auf und dient als Negativkontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von sechs Werten aus zwei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Metaboliten-induzierten PARP-1-Inhibition in der Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test: \*\*\*  $p < 0,001$ .

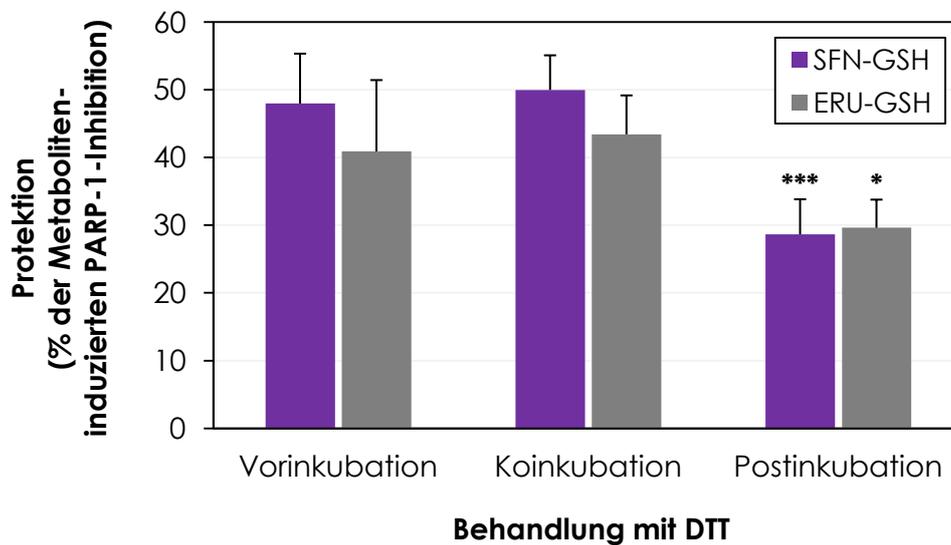


Abbildung 30: Einfluss des Zeitpunkts der Zugabe von DTT auf die Protektion gegenüber der Metaboliten-induzierten PARP-1-Inhibition. Rekombinante PARP-1 wurde in Summe 30 min inkubiert, wobei entweder 15 min mit 200  $\mu\text{M}$  DTT vor- oder nachinkubiert bzw. die komplette Zeit koinkubiert wurde. Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung wurde anschließend durch Zugabe von sonifizierter Lachsspermien-DNA gestartet und erfolgte für 30 min in Gegenwart von  $^{32}\text{P-NAD}^+$ . Dargestellt sind Mittelwerte + SD von sechs Werten aus zwei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Vorinkubation nach ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test: \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Auf Grund der einheitlichen Ausprägung der PARP-1-Inhibition durch beide GSH-Addukte lässt sich ein vergleichbarer, zugrunde liegender Reaktionsmechanismus für die Metaboliten vermuten. Wie die Protektion durch DTT, GSH und Cys darüber hinaus zeigt, scheint im Besonderen die Thiolreaktivität der Metaboliten von Bedeutung zu sein. Für SFN-GSH ist in diesem Kontext die Fähigkeit zur Thiolaustauschreaktion mit Cystein gezeigt (Kassahun *et al.* 1997), die für den präsentierten Effekt von Relevanz sein könnte. Eine gleichartige Reaktivität sollte für ERU-GSH möglich sein, da es dem GSH-Addukt von Sulforaphan strukturell sehr ähnlich ist. Potentielle Angriffspunkte in der PARP-1-Struktur wären demnach reaktive Cysteine. Solche liegen vor allem in den drei Zink-bindenden Domänen des Proteins vor, deren Integritäten essentiell für die PARylierungsaktivität des Enzyms sind (Gradwohl *et al.* 1990, Ikejima *et al.* 1990, Langelier *et al.* 2008, Tao *et al.* 2008). Des Weiteren ist für Übergangs- und Semimetalle wie Platin, Ruthenium, Gold und Arsenit gezeigt, dass der Austausch des komplexierten Zinks von einer Hemmung der PARylierung begleitet wird (Mendes *et al.* 2011, Zhou *et al.* 2011). Eine vergleichbare, kovalente Anknüpfung der Thionoacyl-Reste der GSH-Addukte an Cysteine der Zink-bindenden Strukturen von PARP-1 ist in Analogie dazu als zugrunde liegender Mechanismus denkbar. Sensitive Cysteine sind des Weiteren nicht nur in den Zink-bindenden Strukturen der PARP-1, sondern auch in der katalytischen Domäne des Proteins beschrieben (Rolli *et al.* 1997, Trucco *et al.* 1999). Diese sind essentiell für die katalytische Enzymaktivität, welche bei Austausch der Aminosäuren gegen Arginin massiv vermindert wird. So ist aus mutanten PARP-1-Proteinen bekannt, dass der Austausch von beispielsweise Cys<sup>908</sup> (Rolli *et al.* 1997) oder Cys<sup>972</sup> (Trucco *et al.* 1999) durch zufällige Mutagenese von einer solchen Abnahme der Enzymaktivität begleitet ist. Eine Wechselwirkung von Sulforaphan-Metaboliten mit diesen Cysteinen könnte demnach ebenfalls als mechanistische Grundlage zur Erklärung der PARP-1-Hemmung herangezogen werden.

Aus den Protektionsversuchen lässt sich des Weiteren schließen, dass die Metaboliten eine hohe Affinität zu PARP-1 besitzen. Dementsprechend kann selbst eine äquimolare Konzentration der Thiolreagenzien nicht vollständig vor der Wechselwirkung der GSH-Konjugate mit der in sehr viel niedrigeren Konzentrationen vorliegenden PARP-1 schützen. Obwohl neben den GSH-Konjugaten auch Sulforaphan selbst durch direkte Addition zur Bildung von Thionoacyl-Addukten, beispielsweise in Keap1 (Hong *et al.* 2005), führen kann, scheint dieser Mechanismus für die Wechselwirkung mit PARP-1 nicht von Relevanz zu sein.

## 4.5 Beeinflussung der Nukleotidexzisionsreparatur durch Sulforaphan

Die Nukleotidexzisionsreparatur wurde im Rahmen dieser Arbeit als zweiter DNA-Reparaturprozess ausgewählt, bei dem ein Zink-bindendes DNA-Reparaturprotein von erheblicher Bedeutung ist. So ist das Zinkfinger-Protein XPA essentiell für die korrekte Ausbildung des Präinziptionskomplexes (Evans *et al.* 1997, Mu *et al.* 1997) und der Verlust oder die funktionelle Inaktivierung des Reparaturfaktors führt zum Erliegen der Nukleotidexzisionsreparatur-Kapazität. Um eine potentielle Wechselwirkung von Sulforaphan mit diesem Reparaturweg zu überprüfen, wurde die Induktion und der Ausschnitt von (+)-*anti*-BPDE-vermittelten DNA-Addukten nach Sulforaphan-Inkubation in HCT 116-Zellen untersucht. Eine potentielle Interferenz mit dem Zink-bindenden XPA-Protein wurde sowohl *in vitro* als auch im zellulären System bestimmt. Die Analysen erfolgten an einem synthetischen Peptid, welches der Zinkfinger-Struktur von XPA entspricht, oder in XPA-profizienten bzw. -defizienten XP12RO-Zellen. Des Weiteren wurden vertiefende Untersuchungen zur Genexpression von Nukleotidexzisionsreparatur-assoziierten Genen und zum Einfluss des Zink-bindenden p53-Proteins auf die Reparaturkapazität in Abhängigkeit von Sulforaphan durchgeführt. Die Ergebnisse zur Beeinflussung der Nukleotidexzisionsreparatur durch Sulforaphan sind bereits im Rahmen einer Publikation veröffentlicht und ausführlich diskutiert (Piberger *et al.* 2014).

### 4.5.1 Schadensinduktion von (+)-*anti*-BPDE-vermittelten DNA-Addukten

Die Schadensinduktion erfolgte mit (+)-*anti*-BPDE, dessen DNA-Addukt nach saurer Hydrolyse in Form des freigesetzten Tetrols mittels HPLC analysiert werden kann (Schwerdtle *et al.* 2002). Um den Einfluss von Sulforaphan auf die Schadensinduktion beurteilen zu können, wurden HCT 116-Zellen 2 h bzw. 24 h mit Sulforaphan vorinkubiert, die DNA-Läsionen durch 1-stündige Koinkubation mit 50 nM (+)-*anti*-BPDE induziert und die Anzahl der gebildeten DNA-Addukte anschließend nach erfolgter HPLC-Trennung mittels Fluoreszenzdetektion relativ zur Kontrolle quantifiziert.

Die Analysen zeigten, dass weder eine 2- noch eine 24-stündige Vorinkubation mit Sulforaphan einen signifikanten Einfluss auf die Ausbildung von (+)-*anti*-BPDE-induzierten DNA-Addukten hatten (Abbildung 31). Dies schien anfänglich überraschend, da für Sulforaphan eine Erhöhung von Phase-II-Enzymen wie GSTs

(McWalter *et al.* 2004) und Phase-III-Transportern wie MRP1 und MRP2 (Harris und Jeffery 2008) auf Genexpressions- und Proteinebene beschrieben wurde, die prinzipiell vor der Induktion von BPDE-DNA-Addukten schützen sollte. Ein solcher Effekt tritt hier allerdings nicht auf und Genexpressionsuntersuchungen in HCT 116-Zellen zeigten im Einklang damit keine biologisch relevante Beeinflussung der Expression der entsprechenden *GSTP1*-, *ABCB* (Pgp-1)- und *ABCC1* (MRP1)-Gene nach 24-stündiger Exposition mit nicht-zytotoxischen Sulforaphan-Konzentrationen (siehe Anhang 8.6.3.3). Da keine Auswirkung der Kurzzeit-Vorinkubation auf die Schadensinduktion zu sehen war, kann eine Detoxifizierung durch direkte Reaktion von Sulforaphan mit (+)-*anti*-BPDE ebenfalls ausgeschlossen werden. Demnach wird gefolgert, dass Sulforaphan keinen Effekt auf die Detoxifizierung von (+)-*anti*-BPDE unter den hier gewählten Bedingungen zeigt.

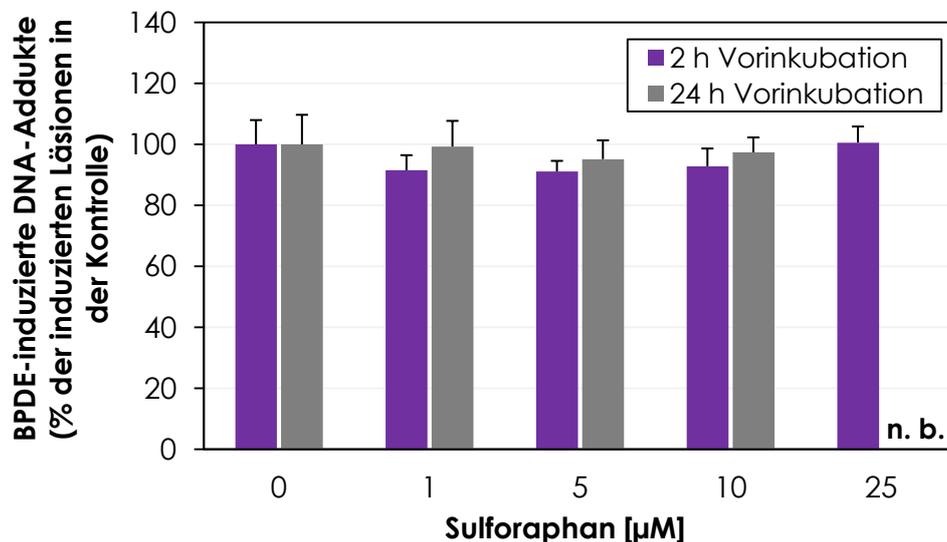


Abbildung 31: Auswirkung einer Vorinkubation mit Sulforaphan auf die Anzahl von (+)-*anti*-BPDE-induzierten DNA-Addukten in HCT 116-Zellen. Die Schadensinduktion erfolgte mit 50 nM (+)-*anti*-BPDE für 1 h. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von mindestens sechs Werten aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen. (n. b. nicht bestimmt)

Auf den ersten Blick scheint dies allerdings publizierten Studien zu widersprechen, in denen Sulforaphan-Inkubationen zu einer verminderten Anzahl an DNA-Addukten nach Behandlung mit 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridin (PhIP), Aflatoxin B<sub>1</sub> und B[a]P führte (Singletary und MacDonald 2000, Bacon *et al.* 2003, Fiala *et al.* 2011). Diese Genotoxine benötigen jedoch eine metabolische Aktivierung zum ultimativen Kanzerogen, um DNA-schädigend zu sein. Demnach kann die Protektion sowohl durch eine erhöhte Detoxifizierung oder Reparatur der Läsionen als auch durch eine verminderte, metabolische Aktivierung der Substanzen in Gegenwart von Sulforaphan eintreten. Die direkte Nutzung des reaktiven Metaboliten von B[a]P schließt in den hier durchgeführten Analysen eine Interaktion

auf Ebene der metabolischen Aktivierung allerdings aus, wodurch Abweichungen zu oben genannten Studien erklärt werden könnten.

#### 4.5.2 Reparatur von (+)-*anti*-BPDE-induzierten DNA-Addukten

Zur Beurteilung des Einflusses von Sulforaphan auf die Reparatur von (+)-*anti*-BPDE-induzierten DNA-Addukten wurden HCT 116-Zellen 2 h bzw. 24 h mit Sulforaphan inkubiert, bevor die Läsionen durch 1-stündige Koinkubation mit 50 nM (+)-*anti*-BPDE erzeugt wurden. Anschließend erfolgte eine Nachinkubation der Zellen mit Sulforaphan in Abwesenheit von (+)-*anti*-BPDE und die Menge an verbliebenen DNA-Läsionen wurde nach Ablauf verschiedener Reparaturzeiten mittels Fluoreszenzdetektion quantifiziert.

Sowohl eine 2- als auch eine 24-stündige Vorinkubation mit Sulforaphan induzierten eine konzentrationsabhängige Inhibition der Reparatur von (+)-*anti*-BPDE-vermittelten DNA-Addukten nach 8-stündiger Nachinkubation (Abbildung 32). Diese Inhibition der frühen Reparaturphase war bereits ab der niedrigsten, nicht-zytotoxischen Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Sulforaphan detektierbar und zeigte eine maximale Ausprägung von etwa 50 % bei 25  $\mu\text{M}$  Sulforaphan.

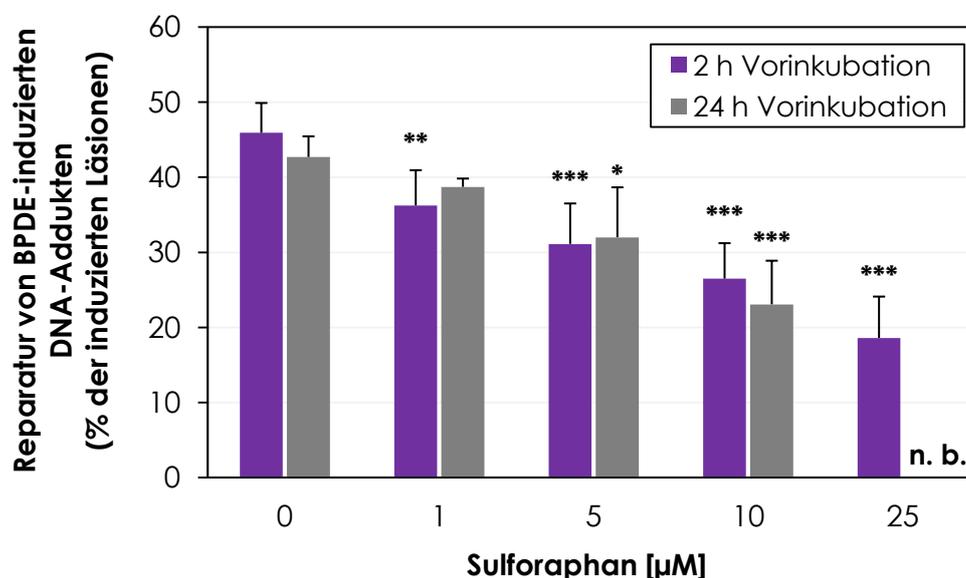


Abbildung 32: Effekt einer Vor- und Nachinkubation mit Sulforaphan auf die frühe Phase der Reparatur von (+)-*anti*-BPDE-induzierten DNA-Addukten nach 8 h in HCT 116-Zellen. Die Schadensinduktion erfolgte mit 50 nM (+)-*anti*-BPDE für 1 h. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von mindestens vier Werten aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . (n. b. nicht bestimmt)

Die späte Phase der Nukleotidexzisionsreparatur nach 24 h wurde dahingegen nicht durch Sulforaphan beeinflusst (siehe Anhang 8.6.7). Um weitere Informationen über die Zeitabhängigkeit der Reparaturinhibition zu erhalten, wurden HCT 116-Zellen 2 h mit 10  $\mu\text{M}$  Sulforaphan vorinkubiert und verschiedene Nachinkubationszeiten im Vergleich zur Kontrolle untersucht. Wie an der Reparaturkinetik zu sehen ist, führte Sulforaphan zu einer deutlichen Verlangsamung der Exzision der DNA-Läsionen bis zu 12 h nach der Schadensinduktion (Abbildung 33). Zu späteren Zeitpunkten wiesen die Zellen eine mit der Kontrolle vergleichbare Reparaturkapazität auf, was durch eine vergleichsweise schnelle Exkretion von Sulforaphan erklärt werden könnte.

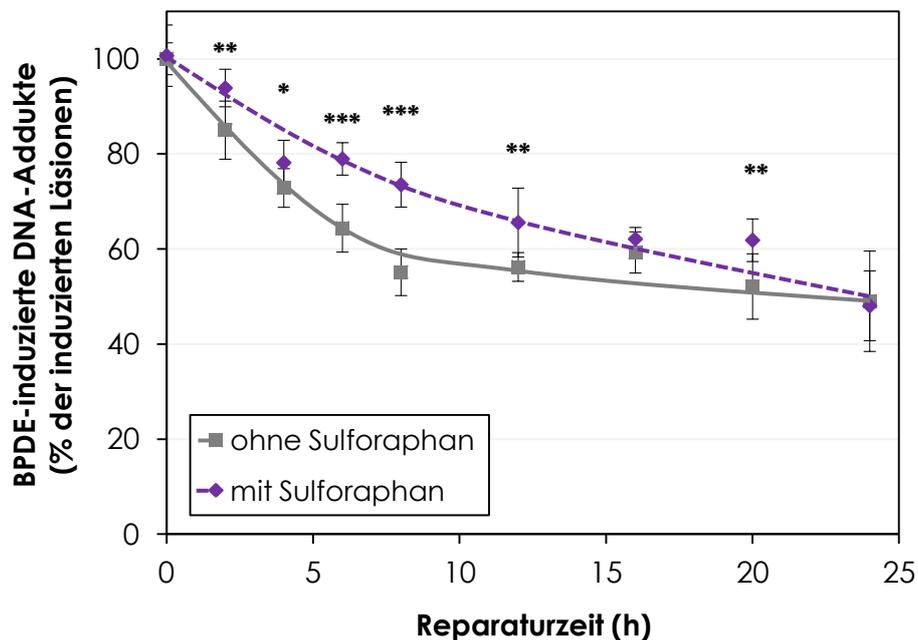


Abbildung 33: Auswirkung von Sulforaphan auf die Kinetik der Reparatur von (+)-*anti*-BPDE-induzierten DNA-Addukten in HCT 116-Zellen. Die Zellen wurden wo angegeben 2 h mit 10  $\mu\text{M}$  Sulforaphan vorinkubiert, 50 nM (+)-*anti*-BPDE für 1 h hinzugegeben und teils mit Sulforaphan nachinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zwischen der Kontrolle und der Sulforaphan-behandelten Probe zu einem Zeitpunkt nach ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Um diese Hypothese zu testen, wurde die Nachinkubation entweder mit einer Einzelgabe von 10  $\mu\text{M}$  Sulforaphan oder mit zweifacher Gabe von je 5  $\mu\text{M}$  Sulforaphan direkt nach der (+)-*anti*-BPDE-Behandlung und 12 h später ausgeführt. Es war jedoch kein Unterschied zwischen den beiden Applikationen zu sehen und die Reparaturkapazitäten waren vergleichbar (siehe Anhang 8.6.7). Dementsprechend induziert Sulforaphan vielmehr eine selektive Inhibition der frühen Nukleotidexzisionsreparatur-Phase als eine generelle Verzögerung der Reparatur von (+)-*anti*-BPDE-Addukten.

Prinzipiell können verschiedene Mechanismen für die beobachtete Reparaturinhibition verantwortlich sein: So könnten sowohl Änderungen in der Genexpression von DNA-Reparaturproteinen als auch eine direkte Interaktion von Sulforaphan oder seinen Metaboliten mit den entsprechenden Proteinen von Bedeutung sein. Beeinflussungen der Expression von Nukleotidexzisionsreparatur-assoziierten Genen sind in Kapitel 4.5.3 genauer dargestellt und diskutiert, scheinen jedoch auf Grund der selektiven Inhibition der frühen Reparaturphase wenig plausibel. Die präsentierten Daten zur Reparaturinhibition implizieren vielmehr einen für die Nukleotidexzisionsreparatur wichtigen, zellulären Angriffspunkt, der direkt durch Sulforaphan oder einen seiner Metaboliten modifiziert oder gestört wird. Da der verwendete HPLC-Assay die DNA-Läsionen vor deren Exzision im Reparaturprozess quantifiziert, scheint der zelluläre Angriffspunkt von Sulforaphan im Schadenserkennungs- oder Exzisionsschritt der Nukleotidexzisionsreparatur zu liegen und von besonderer Bedeutung für frühe Reparaturereignisse zu sein. Das Zinkbindende DNA-Reparaturprotein XPA erschien in diesem Kontext besonders interessant, weshalb sich Kapitel 4.5.4 genauer mit der Wechselwirkung von Sulforaphan mit XPA beschäftigt.

### **4.5.3 Beeinflussung der Genexpression von Nukleotidexzisionsreparatur-assoziierten Genen**

Um eine potentielle Beteiligung von Sulforaphan-induzierten Effekten auf Ebene der Transkription von Nukleotidexzisionsreparatur-assoziierten Proteinen ausführlicher zu untersuchen, wurde die relative Genexpression verschiedener Gene bestimmt. Hierbei wurden mit *DDB1*, *ERCC1*, *ERCC5* (XPG), *XPA*, *XPC*, *ERCC2* (XPB) und *ERCC4* (XPF) einerseits sieben Gene ausgewählt, die für Proteine codieren, welche essentiell für die Exzision der DNA-Läsion sind. Andererseits fanden Analysen zu den *POLD1* (Pol  $\delta$ )- und *LIG1* (Lig I)-Genen statt, die von Bedeutung für die DNA-Reparatur-Synthese bzw. DNA-Ligation von Reparatur-induzierten DNA-Strangbrüchen sind. Die Analysen fanden nach 24-stündiger Inkubation von HCT 116-Zellen mit Sulforaphan statt und die statistisch signifikanten Beeinflussungen der relativen Genexpressionen sind in Abbildung 34 dargestellt.

Interessanterweise war ein spezifisches Muster zu erkennen: So wurden Gene, die mit der Exzision des DNA-Schadens assoziiert sind, in ihrer Expression tendenziell erhöht, wohingegen die der DNA-Reparatur-Synthese und DNA-Ligation vermindert wurden.

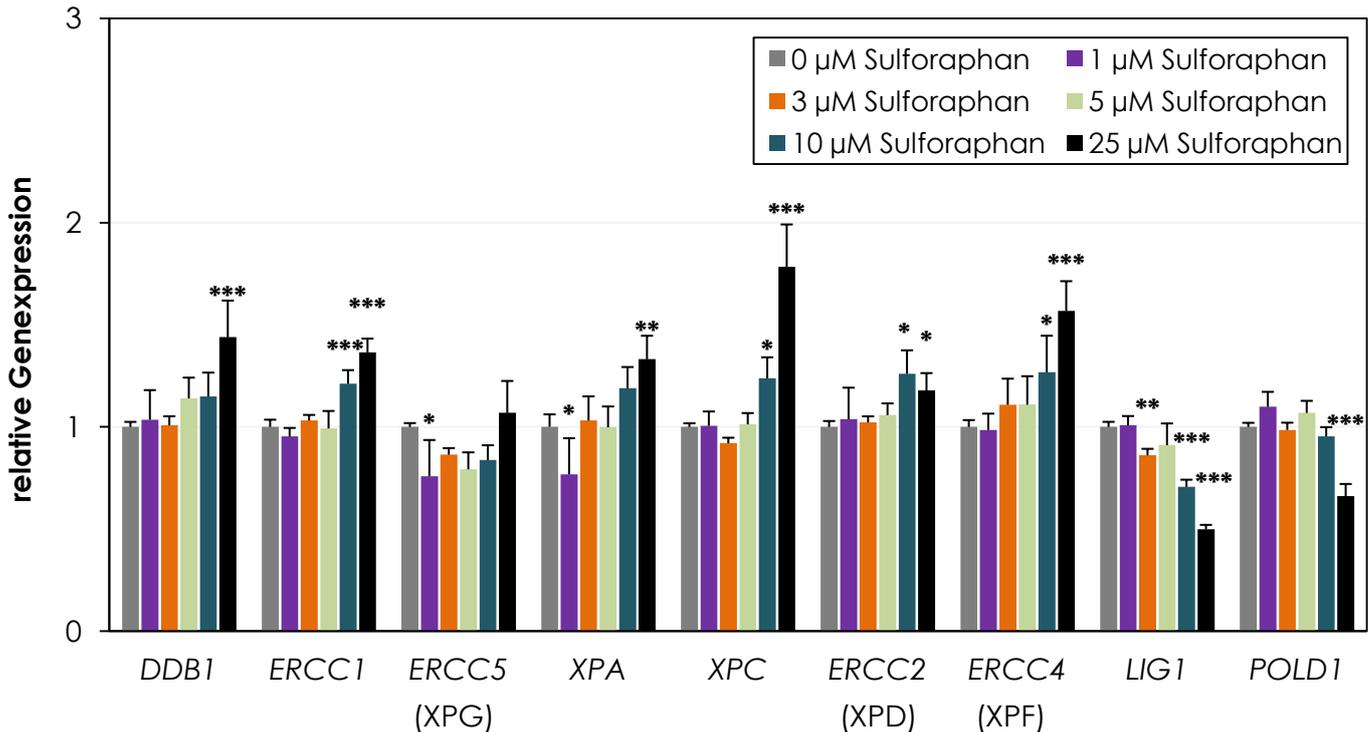


Abbildung 34: Beeinflussung der Genexpression von Nukleotidexzisionsreparatur-assoziierten Genen nach 24-stündiger Inkubation mit Sulforaphan in HCT 116-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von acht Werten aus zwei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Da jedoch erst eine Zunahme der relativen Genexpression um den Faktor zwei als biologisch relevant verstanden wird, können die Auswirkungen auf *DDB1*, *ERCC1*, *ERCC5* (XPG), *XPA*, *XPC*, *ERCC2* (XPD) und *ERCC4* (XPF) als vernachlässigbar bezeichnet werden. Somit beeinflusste Sulforaphan den Exzisionsschritt der Nukleotidexzisionsreparatur nicht auf Ebene der Genexpression. Da im Rahmen dieser Arbeit der Ausschnitt der Modellläsion allerdings als Maß für die Reparaturkapazität genutzt wurde, kann dementsprechend auch die selektive Inhibition der frühen Nukleotidexzisionsreparatur-Phase nicht durch eine Sulforaphan-vermittelte Hochregulation von relevanten Reparaturfaktoren zu späteren Zeitpunkten erklärt werden. Zusammenfassend stützen die präsentierten Genexpressionsdaten somit die These, dass Sulforaphan oder einer seiner Metaboliten einen zellulären Angriffspunkt direkt modifizieren oder stören. Die verminderten Expressionen der *LIG1*- und *POLD1*-Gene implizieren des Weiteren, dass auch potentielle Interferenzen auf Ebene der DNA-Reparatur-Synthese oder DNA-Ligation des verbleibenden DNA-Strangbruches nach Exzision möglich sein könnten. Diese Prozesse wurden allerdings nicht genauer untersucht und eventuelle Wechselwirkungen bleiben ungeklärt.

#### **4.5.4 Interaktion von Sulforaphan mit XPA**

Ein wichtiges, Zink-bindendes DNA-Reparaturprotein in der Nukleotidexzisionsreparatur ist das Xeroderma Pigmentosum A (XPA)-Protein, welches essentiell für die korrekte Ausbildung des Präinzisionskomplexes ist. Ein Verlust oder eine funktionelle Inaktivierung des Proteins geht mit dem Erliegen der Nukleotidexzisionsreparaturkapazität einher und für toxische Metalle und Semimetalle wie Cadmium, Arsenit und Nickel ist eine Inhibition der Nukleotidexzisionsreparatur mit einer Störung der Zink-bindenden Struktur des Proteins assoziiert (zusammengefasst in Hartwig 2000). Ein ähnlicher Mechanismus wäre für Sulforaphan denkbar und Untersuchungen zur Zink-Freisetzung aus der Zinkfinger-Domäne von XPA sowie der (+)-*anti*-BPDE-induzierten Zytotoxizität in Abhängigkeit des XPA-Status wurden herangezogen, um eine zelluläre Beteiligung von XPA zu überprüfen.

##### **4.5.4.1 Beeinflussung der Zink-bindenden Struktur von XPA (XPAzf)**

Um eine mögliche Wechselwirkung von Sulforaphan mit der Zink-bindenden Struktur von XPA zu untersuchen, wurde ein 37 Aminosäuren umfassendes Peptid genutzt (Bal *et al.* 2003). Im Folgenden diente eine Zink-Freisetzung aus diesem, dem Zinkfinger von XPA entsprechenden Peptid als Maß für eine potentielle Interferenz. Die Menge an löslichem Zink wird hierbei spektrophotometrisch nach der Komplexbildung mit 4-(2-Pyridylazo)resorcinol relativ zur vollständigen Oxidation der Zink-bindenden Thiole durch  $H_2O_2$  quantifiziert.

Eine 30-minütige Inkubation des Peptids mit Sulforaphan führte zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme des freien Zinks, die bei der maximalen Sulforaphan-Konzentration von 500  $\mu M$  25 % der  $H_2O_2$ -Kontrolle betrug (Abbildung 35). Bei einer Konzentration von 50  $\mu M$ , was einem Peptid : Sulforaphan-Verhältnis von 1 : 2,5 entspricht, war dieser Effekt erstmals statistisch signifikant.

Für den zugrunde liegenden Mechanismus dieser Zink-Freisetzung aus der Zink-bindenden Struktur von XPA könnte die Thiolreaktivität von Sulforaphan relevant sein, bei der eine kovalente Addition des elektrophilen Isothiocyanat-Kohlenstoffs an nukleophile Cysteine erfolgt. Diese Adduktbildung ist für Keap1 (Hong *et al.* 2005), Cystein (Hanschen *et al.* 2012) und andere zelluläre Proteine wie TLR 4 (Youn *et al.* 2010) bzw. Tubulin (Mi *et al.* 2008) gezeigt worden und könnte in dieser *in vitro*-Situation ebenfalls auftreten. Eine derartige, kovalente Modifizierung eines oder

mehrerer der Zink-bindenden Cysteine von XPAzf wäre von einer Zink-Freisetzung begleitet und würde den beobachteten Effekt erklären. Des Weiteren verdeutlichen diese *in vitro*-Untersuchungen, dass Sulforaphan tatsächlich mit Zink-bindenden Strukturen von essentiellen DNA-Reparaturproteinen wie beispielsweise der von XPA wechselwirken kann.

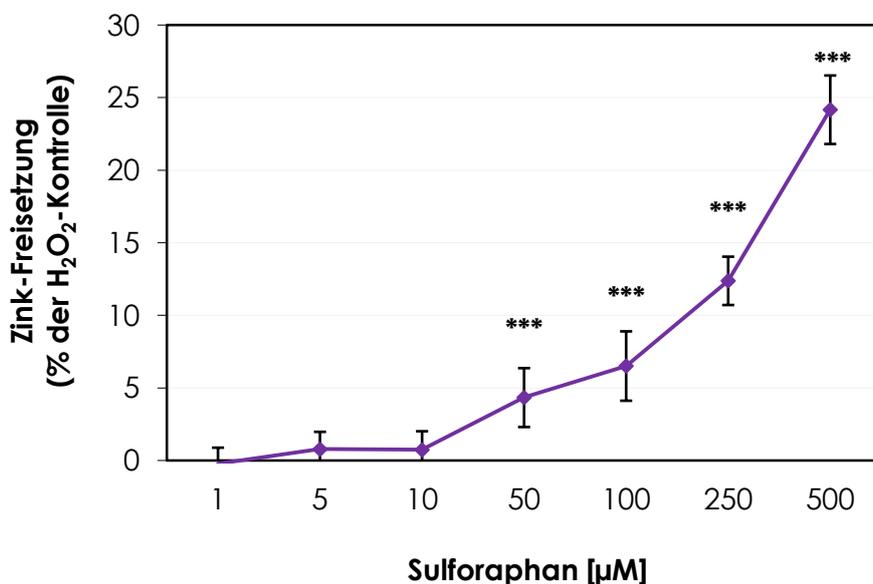


Abbildung 35: Sulforaphan-vermittelte Zink-Freisetzung aus XPAzf. Die Zink-Freisetzung bezieht sich auf eine vollständige Oxidation der Cysteine durch 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test: \*\*\* p < 0,001.

#### 4.5.4.2 Rolle des XPA-Status bei der Beeinflussung der BPDE-induzierten Zytotoxizität durch Sulforaphan

Um eine zelluläre Interferenz von Sulforaphan mit XPA nachzuweisen, wurde die Rolle des XPA-Status bei der Beeinflussung der (+)-*anti*-BPDE-induzierten Zytotoxizität durch Sulforaphan näher untersucht. Hierzu wurden Koloniebildungsfähigkeiten von XPA- und Nukleotidexzisionsreparatur-defizienten XP12RO-Zellen und deren durch Transfektion von Dr. Beate Köberle (KIT, Karlsruhe) erzeugten, XPA- und Nukleotidexzisionsreparatur-profizienten Subzelllinie nach 1-stündiger Inkubation mit (+)-*anti*-BPDE bestimmt. Die Auswirkung einer 2-stündigen Vor- und 24-stündigen Nachinkubation mit Sulforaphan wurde des Weiteren näher analysiert, wobei die alleinige Sulforaphan-Inkubation eine Koloniebildungsfähigkeit von 80 % zeigte. Zur besseren Vergleichbarkeit der Effekte wurde diese jedoch für die Koinkubation mit

(+)-*anti*-BPDE auf 100 % gesetzt und die Darstellungen spiegeln somit nur effektive Beeinflussungen des Kurvenverlaufs wider.

Im Zuge der Untersuchungen zeigte sich, dass XPA-defiziente XP12RO-Zellen signifikant empfindlicher gegenüber einer Behandlung mit (+)-*anti*-BPDE waren. So wurden um den Faktor 4 höhere Konzentrationen für die Detektion einer vergleichbaren Zytotoxizität in der XPA-profizienten Subzelllinie benötigt (Abbildung 36).

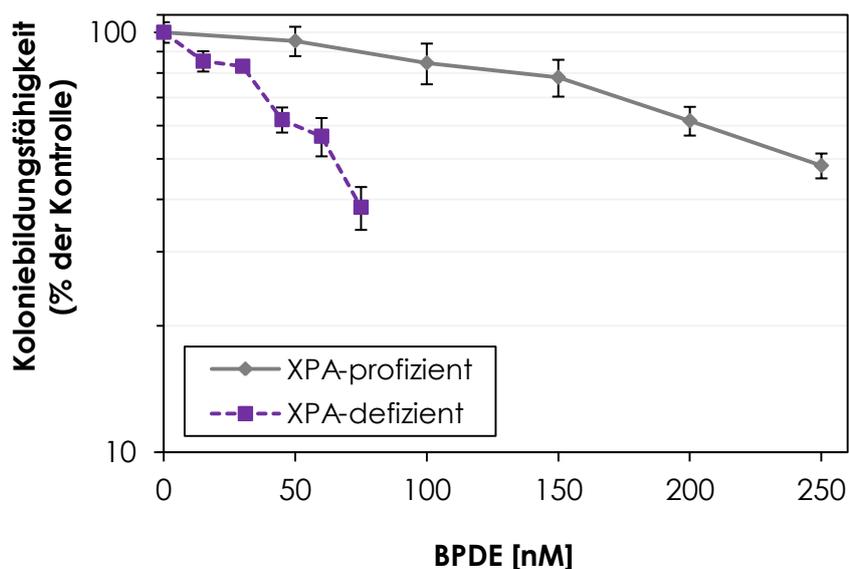


Abbildung 36: Einfluss des XPA-Status der Zellen auf die Zytotoxizität von (+)-*anti*-BPDE. Die beiden XP12RO-Zelllinien wurden je 1 h mit (+)-*anti*-BPDE inkubiert bevor die Koloniebildungsfähigkeiten bestimmt wurden. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von mindestens sechs Werten aus zwei unabhängigen Versuchen.

Des Weiteren wurde die Zytotoxizität von (+)-*anti*-BPDE durch die Koinkubation mit Sulforaphan in beiden Zelllinien verstärkt, obwohl XPA-profiziente Zellen sensibler reagierten (Abbildung 37). Die Koloniebildungsfähigkeit der XPA- und Nukleotidexzisionsreparatur-profizienten Zellen wurde dementsprechend bereits frühzeitig stark durch die Koexposition mit Sulforaphan vermindert (Abbildung 37 A), während das XPA- und Nukleotidexzisionsreparatur-defiziente Pendant erst sehr viel später beeinflusst wurde (Abbildung 37 B). Tabelle 2 fasst die  $IC_{50}$ -Werte der 1-stündigen Inkubation mit (+)-*anti*-BPDE in Abhängigkeit der Sulforaphan-Koinkubation zusammen. Ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem XPA-Status der Zellen und der synergistischen Zunahme der Zytotoxizität ist sichtbar: Konkret senkte die Koinkubation mit 5  $\mu$ M Sulforaphan den  $IC_{50}$ -Wert in XPA-profizienten Zellen um  $\sim$  70 %, während in XPA-defizienten Zellen nur eine Verminderung um  $\sim$  40 % stattfand.

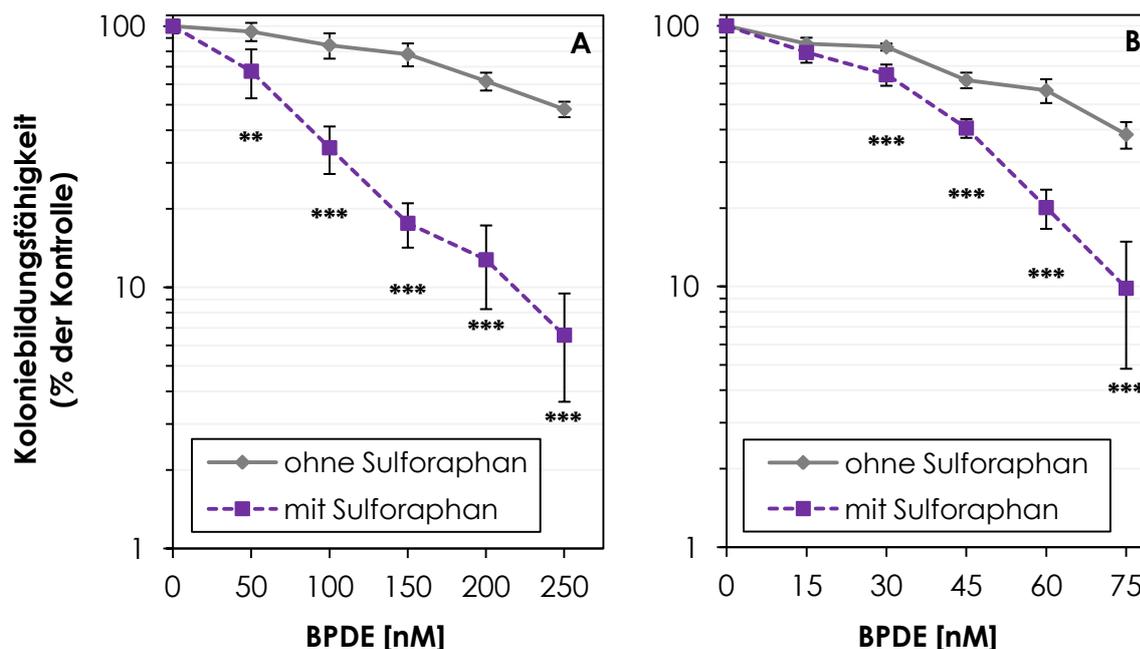


Abbildung 37: Einfluss von Sulforaphan auf die (+)-anti-BPDE-induzierte Zytotoxizität in XPA-profizienten (A) und XPA-defizienten (B) Zellen. Die XP12RO-Zelllinien wurden je 2 h mit 5  $\mu$ M Sulforaphan inkubiert, 1 h mit ansteigenden Konzentrationen an (+)-anti-BPDE koinkubiert und für 24 h mit 5  $\mu$ M Sulforaphan nachinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von sechs Werten aus zwei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur jeweiligen Behandlung ohne Sulforaphan nach ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test: \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Tabelle 2: IC<sub>50</sub>-Werte der Koloniebildungsfähigkeit nach 1-stündiger Inkubation mit (+)-anti-BPDE.

XPA-Status	SFN [ $\mu$ M]	IC <sub>50</sub> [nM] <sup>a</sup>	Bereich [nM]
Profizient	0	258,5	248,6 - 268,4
	5	83,6 *	74,4 - 92,8
Defizient	0	63,8	63,4 - 64,2
	5	36,9 *	35,3 - 38,5

<sup>a</sup> Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen

\* Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle \*  $p < 0,001$

Eine erhöhte Sensitivität der XPA-defizienten Zelllinie gegenüber der alleinigen Inkubation mit (+)-anti-BPDE war auf Grund der fehlenden Nukleotid-exzisionsreparatur-Kapazität zu erwarten und wurde bereits früher für die ( $\pm$ )-BPDE- (Porter *et al.* 2005) und UV-induzierte (Tanaka *et al.* 1990, Cleaver *et al.* 1995, Mellon *et al.* 2002, Köberle *et al.* 2006) Zytotoxizität in der Literatur beschrieben. Die synergistische Zunahme der (+)-anti-BPDE-vermittelten Zytotoxizität nach Koinkubation mit Sulforaphan scheint dahingegen durch verschiedene Mechanismen beeinflusst zu sein. So zeigen die Versuche deutlich, dass eine Störung des XPA-Proteins oder der Nukleotidexzisionsreparatur-Kapazität für den Effekt von

Bedeutung ist. Interessanterweise sind XPA-profiziente Zellen nach Sulforaphan-Inkubation in ihrer Sensitivität gegenüber (+)-anti-BPDE mit XPA-defizienten Zellen vergleichbar. Demnach scheint die Sulforaphan-induzierte, temporäre Inhibition der Nukleotidexzisionsreparatur nicht nur den Reparaturprozess zu verlangsamen, sondern einen signifikanten, adversen Effekt auf die Zellen und deren Lebensfähigkeit zu haben. Da allerdings beide Zelllinien eine deutliche Zunahme der Zytotoxizität unter Sulforaphan-Koinkubation zeigten, müssen weitere, bis jetzt unbekannte Mechanismen darüber hinaus von Relevanz sein. Theoretisch können hierfür zwei Prozesse in Frage kommen, die neben der Reparatur des DNA-Schadens Einfluss auf die (+)-anti-BPDE-induzierte Zytotoxizität haben könnten. Sowohl eine Beeinträchtigung der Transläsionssynthese von BPDE-induzierten DNA-Addukten als auch eine Erhöhung der (+)-anti-BPDE-induzierten Apoptose durch Sulforaphan sind als mechanistische Grundlagen denkbar. Zum einen ist demzufolge ein Verlust entsprechender Transläsionspolymerasen wie Rev1, Rev3, Pol  $\eta$  und Pol  $\kappa$  mit einer erhöhten BPDE-vermittelten Zytotoxizität assoziiert (Temviriyankul *et al.* 2012). Wechselwirkungen von Sulforaphan mit Transläsionspolymerasen sind jedoch bis dato nicht näher untersucht. Zum anderen könnte Sulforaphan mit der BPDE-induzierten Apoptose interagieren, die einen wichtigen Mechanismus der Substanz-vermittelten Zytotoxizität darstellt. Obwohl aus HCT 116-Zellen bekannt ist, dass bei der BPDE-induzierten Apoptose sowohl der intrinsische als auch extrinsische Signalweg beteiligt ist (Donauer *et al.* 2012), wird auf Grund einer SV-40-Transformation der hier benutzten Zellen vor allem der extrinsische, p53-unabhängige Signalweg von Bedeutung sein. So ist bekannt, dass die SV-40-Transformation mit einer funktionellen Inaktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 einhergeht (zusammengefasst in Levine 2009). Infolgedessen könnte eine Verstärkung des extrinsischen Apoptose-Signalwegs die Erhöhung der (+)-anti-BPDE-induzierten Zytotoxizität erklären und für nicht-zytotoxische Konzentrationen von Sulforaphan ist beispielsweise in Hep3B- (Kim *et al.* 2006) und A549- (Jin *et al.* 2007) Zellen eine Verstärkung der *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL)-vermittelten Apoptose gezeigt worden.

#### **4.5.5 Einfluss des p53-Status auf die Sulforaphan-induzierte Inhibition der Nukleotidexzisionsreparatur**

Die selektive Inhibition der frühen Phase der Reparatur könnte darüber hinaus prinzipiell auch durch eine Interferenz von Sulforaphan mit dem Tumorsuppressor-

protein p53 erklärt werden. So besitzt p53 eine Zink-bindende Struktur, die essentiell für die korrekte Faltung und Funktionalität des Proteins ist und ebenfalls durch Sulforaphan angegriffen werden könnte. Aus Studien ist des Weiteren bekannt, dass p53 die Nukleotidexzisionsreparatur auf Ebene der Genexpression als Transkriptionsfaktor beeinflussen kann (Adimoolam und Ford 2002, Amundson *et al.* 2003). Eine direkte Interaktion des Tumorsuppressorproteins mit der Histonacetyltransferase p300 kann sich darüber hinaus auf die Zugänglichkeit der DNA-Läsionen und die schadensinduzierte Chromatin-Relaxation auswirken (Rubbi und Milner 2003). Um die Rolle von p53 bei der Sulforaphan-induzierten Inhibition der Nukleotidexzisionsreparatur genauer zu beleuchten, wurden vergleichende Untersuchungen mit p53-profizienten HCT 116 p53<sup>+/+</sup> Zellen und deren p53-defizienten Pendant HCT 116 p53<sup>-/-</sup> durchgeführt. Es wurden sowohl die basalen Reparaturkapazitäten der beiden Zelllinien als auch das Ausmaß der Reparaturinhibition nach 8-stündiger Sulforaphan-Inkubation bestimmt.

Es zeigte sich, dass die frühe Phase der Reparatur in p53-defizienten Zellen in Abwesenheit von Sulforaphan signifikant verlangsamt war (Abbildung 38). Die Sulforaphan-induzierte Reparaturinhibition wurde dahingegen jedoch nicht durch den p53-Status der Zellen beeinflusst (Abbildung 39) und die Reparaturkapazitäten der beiden Zelllinien nach 8-stündiger Nachinkubationszeit wichen nicht signifikant voneinander ab.

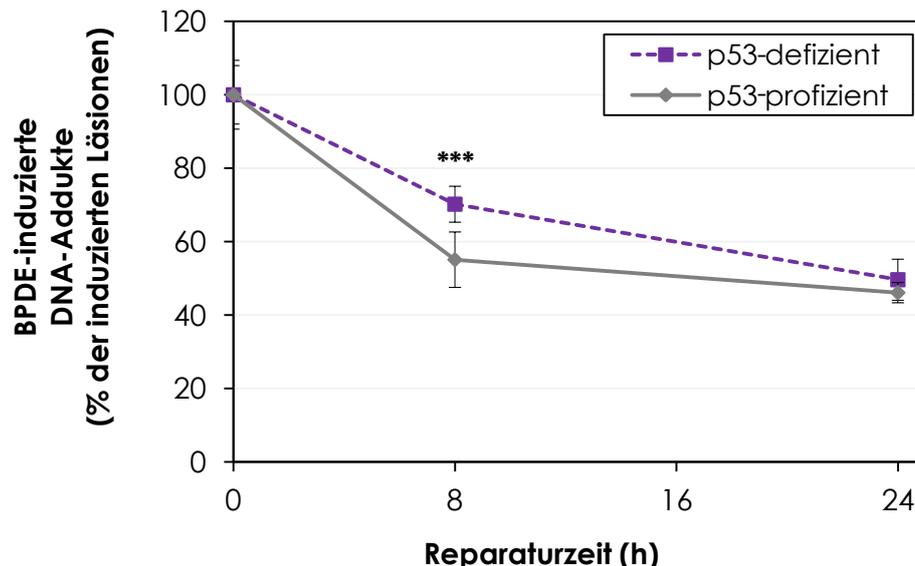


Abbildung 38: Beeinflussung der Reparaturkinetik von (+)-anti-BPDE-induzierten DNA-Addukten in Abhängigkeit des p53-Status der Zellen. HCT 116 p53-profiziente und p53-defiziente Zellen wurden je 1 h mit 50 nM (+)-anti-BPDE inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von vier Werten aus zwei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zum Wert in der p53-profizienten Zelllinie nach ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test: \*\*\*  $p < 0,001$ .

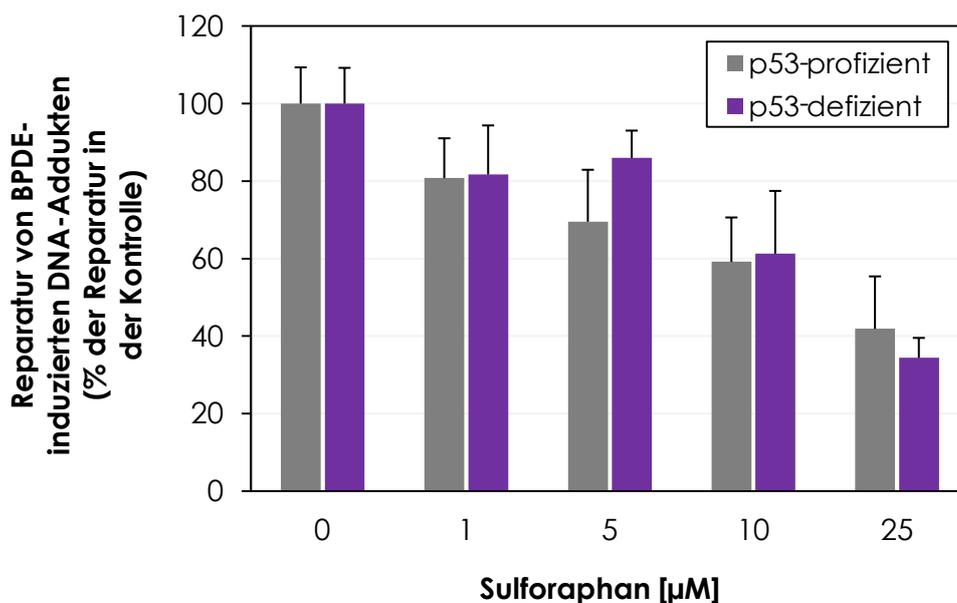


Abbildung 39: Einfluss des p53-Status der Zelle auf die Sulforaphan-vermittelte Reparaturinhibition von (+)-*anti*-BPDE-induzierten DNA-Addukten. HCT 116 p53-profiziente und p53-defiziente Zellen wurden für 2 h mit Sulforaphan inkubiert und 50 nM (+)-*anti*-BPDE für 1 h hinzugefügt. Die Quantifizierung der DNA-Addukte fand nach 8-stündiger Nachinkubation in Anwesenheit von Sulforaphan statt. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von mindestens vier Werten aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen.

Die Verzögerung der frühen Phase der Reparatur von (+)-*anti*-BPDE-induzierten DNA-Addukten bei p53-Defizienz ist in Übereinstimmung mit Literaturdaten. So ist ein Verlust von p53 mit einer verlangsamten GG-NER assoziiert, da die Reparatur von ( $\pm$ )-*anti*-BPDE-induzierten DNA-Läsionen in dem nicht-transkribierten Strang der DNA reduziert wird (Wani *et al.* 2000, Wani *et al.* 2002). Wird dabei eine bestimmte Schadensmenge überschritten ( $\sim 300$  Läsionen pro  $10^8$  Nukleotide), so ist ausschließlich die frühe Phase der Reparatur beeinträchtigt (Lloyd und Hanawalt 2000). Des Weiteren besitzt p53 eine Cys<sub>3</sub>His<sub>1</sub>-Zink-bindende Struktur (Cho *et al.* 1994), die essentiell für die Faltung und DNA-Bindungsfähigkeit des Proteins ist. Für das Schwermetall Cadmium ist in diesem Zusammenhang exemplarisch gezeigt, dass eine Interferenz mit dieser Zink-bindenden Domäne von einer funktionellen Inaktivierung des Proteins begleitet sein kann (zusammengefasst in Hartwig 2013) und ein vergleichbarer Mechanismus wäre für Sulforaphan denkbar. So könnte das Isothiocyanat oder einer seiner Metaboliten durch seine Thiolreaktivität mit den sensitiven Cysteinen der Domäne interagieren und so eventuell auch die Nukleotidexzisionsreparatur wie oben beschrieben beeinflussen. Da der p53-Status der Zellen jedoch keinen Einfluss auf die Sulforaphan-induzierte Reparaturinhibition hatte, scheint eine funktionelle Inaktivierung von p53 nicht der Ursprung der beobachteten selektiven Inhibition der Nukleotidexzisionsreparatur zu sein. Eine

Interferenz von Sulforaphan mit der Zink-bindenden Struktur von p53 kann anhand dieser Daten zwar nicht vollständig ausgeschlossen werden, scheint im zellulären System jedoch nicht von Relevanz zu sein.

## 5. Zusammenfassende Diskussion

Ein wesentlicher Beitrag von DNA-Reparaturprozessen zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität wird eingängig durch humane Reparaturdefekte, wie beispielsweise Xeroderma Pigmentosum, verdeutlicht, die mit einer erhöhten Krebsinzidenz assoziiert sind (zusammengefasst in Friedberg 2001, Hoeijmakers 2001, Ishikawa *et al.* 2004). Die Essentialität dieser Prozesse wird zusätzlich dadurch akzentuiert, dass die Kanzerogenität einiger Chemikalien mitunter auf eine Störung verschiedener DNA-Reparaturvorgänge zurückgeführt werden kann. Vor allem Metalle sind in diesem Kontext zu nennen (zusammengefasst in Hartwig 2000, Hartwig *et al.* 2002) und eine Wechselwirkung mit Zink-bindenden Proteinen, die in erster Linie durch die Thiolreaktivität der Substanzen induziert wird, hat sich als einer der zugrunde liegenden Mechanismen herauskristallisiert (zusammengefasst in Hartwig 2013). Das Isothiocyanat Sulforaphan, welches nicht nur durch den Verzehr von *Brassica*-Gemüsen wie Broccoli, sondern auch über Nahrungsergänzungsmittel in den Organismus aufgenommen wird, zeigt eine vergleichbare Reaktivität gegenüber Sulfhydrylgruppen. Diese Thiolreaktivität von Sulforaphan ist beispielsweise für die nrf2-abhängige Induktion von Phase-II-Enzymen verantwortlich, die als mechanistische Grundlage für eine postulierte Chemopräventivität des Isothiocyanates angesehen wird. So findet hierbei eine Zink-Freisetzung aus dem regulatorischen Protein Keap1 statt (Dinkova-Kostova *et al.* 2005), die durch eine kovalente Anknüpfung von Sulforaphan an Metall-komplexierende Cysteine vermittelt wird (Hong *et al.* 2005). Vergleichbare Wechselwirkungen von Sulforaphan mit weiteren Zink-bindenden Proteinen sind demnach allerdings ebenso denkbar und müssen für die Bewertung der als krebisprotektiv postulierten Nahrungsergänzungsmittel genauer untersucht werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dies anhand Zink-bindender DNA-Reparaturproteine sowie der von ihnen koordinierten DNA-Reparaturprozesse durchgeführt. Es erfolgte eine Fokussierung auf die DNA-Einzelstrangbruch- und Nukleotidexzisionsreparatur, für die die Zink-bindenden Proteine PARP-1 bzw. XPA von essentieller Bedeutung sind.

Wie Untersuchungen an der isolierten PARP-1 und dem XPAzf-Peptid zeigten, kann Sulforaphan tatsächlich *in vitro* mit den Zink-bindenden Strukturen von zentralen DNA-Reparaturproteinen interagieren. Dementsprechend fanden eine Thiol-abhängige Inhibition der PARP-1-Enzymaktivität und eine Zink-Freisetzung aus XPAzf durch Sulforaphan statt. Interessanterweise waren für die Interferenz mit PARP-1 die frühen Metaboliten von Sulforaphan, SFN-GSH und ERU-GSH, entscheidend, während

die Wechselwirkung mit der Zink-bindenden Struktur von XPA bereits durch Sulforaphan selbst induziert wurde. Da vergleichende Analysen zur Auswirkung der Sulforaphan-Metaboliten auf XPAzf leider fehlen, kann keine verallgemeinernde Schlussfolgerung hinsichtlich deren Reaktivität im Vergleich zu Sulforaphan getroffen werden. Es ist jedoch denkbar, dass die GSH-Addukte entweder generell eine höhere Affinität gegenüber Zink-bindenden Strukturen aufweisen oder aber die Art und der räumliche Aufbau der Zink-bindenden Domäne für die selektive Reaktivität von Sulforaphan respektive seiner Metaboliten von Relevanz sind. So weist XPA einen klassischen Cys<sub>4</sub>-Zinkfinger mit  $\alpha$ -helikalen und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen auf, während PARP-1 eine schleifenförmig gefaltete Cys<sub>4</sub>- sowie zwei homologe Cys<sub>3</sub>His<sub>1</sub>-Zink-bindende Domänen besitzt. Für Arsenit ist in diesem Kontext beispielsweise bekannt, dass eine selektive, kovalente Interaktion mit Cys<sub>3</sub>His<sub>1</sub>-, jedoch nicht mit Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>-Zinkfingern stattfindet (Zhou *et al.* 2011). Insgesamt ist die Thiolreaktivität von Sulforaphan bzw. dessen Metaboliten als zugrunde liegender Mechanismus plausibel, durch den Sulforaphan gegebenenfalls direkt an nukleophile Cysteine von DNA-Reparaturproteinen addieren oder diese über Thiolaustausch unter Beteiligung der GSH-Addukte thiocarbamoylieren kann. Wie bereits in der Einleitung erörtert, sind die Integritäten der Zink-bindenden Strukturen von XPA und PARP-1 allerdings essentiell für deren Reparaturaktivitäten und Störungen können von verminderten Nukleotidexzisionsreparatur- oder DNA-Einzelstrangbruchreparatur-Kapazitäten begleitet sein.

In einem nächsten Schritt wurde die zelluläre Relevanz dieser *in vitro*-Ergebnisse anhand des Einflusses nicht-zytotoxischer Sulforaphan-Konzentrationen auf die entsprechenden DNA-Reparaturprozesse untersucht. Als Modellläsionen dienten hierbei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte DNA-Einzelstrangbrüche, deren Ligation in HeLa S3-Zellen zur Beurteilung der DNA-Einzelstrangbruchreparatur herangezogen wurde. Des Weiteren erfolgten vertiefende Analysen zur Beeinflussung der schadensinduzierten Poly(ADP-Ribosyl)ierung (PARylierung) durch Sulforaphan. Die Auswirkungen auf die Nukleotidexzisionsreparatur wurden dahingegen anhand des Ausschnitts (+)-*anti*-BPDE-induzierter DNA-Addukte in HCT 116-Zellen beurteilt. Ferner fanden Untersuchungen zur Rolle des zellulären XPA-Status bei der Sulforaphan-vermittelten Beeinflussung der (+)-*anti*-BPDE-induzierten Zytotoxizität statt. Die Gesamtheit der Daten verdeutlicht hierbei eine eindeutige Inhibition beider DNA-Reparaturprozesse durch Sulforaphan.

Im Rahmen der Untersuchungen zur Beeinflussung der DNA-Einzelstrangbruchreparatur zeigte sich, dass eine Kurzzeit-Vorinkubation mit Sulforaphan zu einer synergistischen Zunahme der Schadensinduktion führte. Diese war zwar nicht auf

eine direkte Störung der Enzymaktivität von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-detoxifizierenden Enzymen zurückzuführen, wurde jedoch von einer signifikanten Depletion des zellulären GSH-Spiegels begleitet. Eine solche Depletion kann nicht nur zur Etablierung eines prooxidativen Status in Zellen führen, sondern auch durch Mangel des reduzierten Kofaktors mit einer verschlechterten Detoxifizierung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> via Glutathionperoxidase assoziiert sein. Darüber hinaus könnte zusätzlich eine Sulforaphan-vermittelte Inhibition der Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen im Rahmen der 5-minütigen Induktionsphase der Läsionen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die erhöhte Schadensmenge erklären. Obwohl somit im zellulären System eine vermehrte Anzahl von DNA-Einzelstrangbrüchen nach Sulforaphan-Inkubation vorlag, war die weitere Prozessierung der Läsionen durch PARPs signifikant vermindert. Konkret war nach einer 3-stündigen Vorinkubation mit 15 µM Sulforaphan zwar die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermittelte Schadensinduktion auf ~150 % der Kontrolle erhöht, das Ausmaß der PARylierung in HeLa S3-Zellen jedoch um 60 % vermindert. Da die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte PARylierung zu 95 % durch PARP-1 katalysiert wird (Amé *et al.* 1999), ist eine zelluläre Interferenz mit PARP-1 als mechanistische Grundlage für diese Sulforaphan-vermittelte Verminderung der PARylierung denkbar. Im Einklang mit den *in vitro*-Untersuchungen könnten die frühen Metaboliten von Sulforaphan, SFN-GSH und ERU-GSH, den Effekt induzieren. Deren intrazelluläre Konzentrationen lagen in den Zellkulturen mit ~ 300 µM im relevanten Expositionsbereich der subzellulären Analysen. Sulforaphan könnte im zellulären Rahmen des Weiteren nicht nur über eine Thiolaustausch-Reaktion der GSH-Addukte mit empfindlichen Sulfhydrylgruppen der PARP-1 interagieren, sondern diese auch selektiv oxidativ verändern. So weisen entsprechende Cysteine häufig erhöhte Redox-Sensitivitäten auf, da beispielsweise eine Metall-Komplexierung in Zink-bindenden Strukturen deren pK<sub>a</sub> senkt. Infolgedessen können diese Aminosäuren bevorzugt durch ROS oxidativ verändert werden und Sulforaphan führt nicht nur durch die Hemmung mehrerer Enzyme der mitochondrialen Atmungskette zur Entstehung von ROS (Xiao *et al.* 2009), sondern erzeugt auch durch die Depletion von GSH einen prooxidativen Status in Zellen. Eine selektive Interferenz von Sulforaphan mit den jeweiligen Zink-bindenden Domänen bzw. sensitiven Cysteinen der PARP-1 hätte des Weiteren verschiedene Auswirkungen auf das Enzym. Die zwei homologen Cys<sub>3</sub>His<sub>1</sub>-Zinkfinger in der N-terminalen Region der DNA-Bindungsdomäne von PARP-1 sind in erster Linie für die schadensinduzierte DNA-Bindungsfähigkeit des Proteins verantwortlich (Gradwohl *et al.* 1990, Ikejima *et al.* 1990) und eine Sulforaphan-vermittelte Störung dieser Strukturen würde zu einer verminderten DNA-Assoziation der PARP-1 führen. Wechselwirkt Sulforaphan dahingegen jedoch mit der schleifenförmig gefalteten Cys<sub>4</sub>-Zink-bindenden Domäne oder mit sensitiven Cysteinen wie Cys<sup>972</sup> oder Cys<sup>908</sup> im katalytischen Zentrum des

Enzyms, so wäre vor allem die katalytische Aktivität beeinträchtigt (Rolli *et al.* 1997, Trucco *et al.* 1999, Langelier *et al.* 2008, Tao *et al.* 2008). Eine solche funktionelle Störung der PARP-1 ist von einer verlangsamten Automodifizierung (Langelier *et al.* 2010) und verlängerten DNA-Bindung (Godon *et al.* 2008) des Proteins begleitet. Folglich könnte Sulforaphan entweder die DNA-Assoziation oder DNA-Dissoziation der PARP-1 hemmen, wobei beide Mechanismen zu einer verminderten PARylierung und verlangsamten Ligation von DNA-Strangbrüchen führen würden. Mittels Alkalischer Entwindung wurde diese Ligation anschließend verfolgt und es zeigte sich, dass sie nach Vorinkubation mit Sulforaphan signifikant verlangsamt ablief. Diese verzögerte Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen kann direkt mit der verminderten PARylierung in Zusammenhang gebracht werden. So ist bekannt, dass eine Depletion der PARP-1 zu einer reduzierten DNA-Einzelstrangbruchreparatur-Kapazität führt (Ding *et al.* 1992, Fisher *et al.* 2007). Eine zelluläre Beeinflussung der PARP-1 durch Sulforaphan wird ferner durch die synergistische Zunahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Zytotoxizität nahe gelegt, die im vergleichbaren Maße bei siRNA-vermittelter Depletion von PARP-1 zu sehen ist (Fisher *et al.* 2007). Eine signifikante Erhöhung der Zytotoxizität von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verdeutlicht des Weiteren die zelluläre Relevanz der verzögerten DNA-Einzelstrangbruchreparatur. Demnach wirkt sich die gemäßigte Verlangsamung zuletzt nicht nur auf die Halbwertszeit der DNA-Läsionen aus, sondern beeinflusst die Überlebensfähigkeit der Zellen deutlich. Dies kann sowohl durch die erhöhte Schadensinduktion nach Sulforaphan-Inkubation als auch durch das weitere Schicksal der unreparierten DNA-Einzelstrangbrüche bedingt sein. So können solche im Zuge der DNA-Replikation durch Kollision mit Replikationsgabeln in potentiell klastogene DNA-Doppelstrangbrüche überführt werden (Kuzminov 2001). DNA-Doppelstrangbrüche müssen allerdings durch erheblich komplexere Prozesse aus dem Genom beseitigt werden, die fehlerbehaftet sein können. Diese Situation wird dadurch zugespitzt, dass Sulforaphan die beiden Hauptmechanismen der DNA-Doppelstrangbruchreparatur, die Homologe Rekombination und das Nicht-Homologe Endjoining, inhibiert (Yu *et al.* 2009). Alternative Nicht-Homologe Endjoining-Mechanismen sind ferner ebenfalls PARP-1-abhängig (Wang *et al.* 2006) und infolgedessen potentiell durch Sulforaphan gefährdet.

Neben der DNA-Einzelstrangbruchreparatur wurde des Weiteren die Beeinflussung der Nukleotidexzisionsreparatur von (+)-*anti*-BPDE-induzierten DNA-Addukten durch Sulforaphan untersucht. Hierbei zeigte Sulforaphan zwar keine Auswirkungen auf die Schadensinduktion, jedoch eine selektive Inhibition der frühen Reparaturphase bereits im niedrigen mikromolaren Konzentrationsbereich. Eine sehr empfindliche zelluläre Interferenz von Sulforaphan mit XPA, im Einklang mit der Zink-Freisetzung aus

XPAzf *in vitro*, könnte eine solche Inhibition erklären. Das Zink-bindende DNA-Reparaturprotein XPA ist allerdings essentiell für die korrekte Ausbildung des Präinziptionskomplexes in der Nukleotidexzisionsreparatur und demnach unabdingbar zur Ausführung des Reparaturprozesses. Eine Wechselwirkung von Sulforaphan mit Zink-komplexierenden Cysteinen von XPA im zellulären System ist in diesem Kontext durch zwei Mechanismen denkbar: So könnte Sulforaphan entweder durch direkte Addition bzw. Thiolaustausch-Reaktionen der frühen Metaboliten, SFN-GSH und ERU-GSH, an sensitive Sulfhydrylgruppen binden oder diese durch die Induktion von ROS (Xiao *et al.* 2009) selektiv oxidieren. Für die Reparatur von UV-induzierten DNA-Läsionen ist XPA des Weiteren ein geschwindigkeitsbestimmender Faktor (Köberle *et al.* 2006, Kang *et al.* 2010), der PARP-1-abhängig an geschädigtes Chromatin rekrutiert wird (King *et al.* 2012). Auch XPC lagert, vermittelt durch eine schadensinduzierte PARylierung von DDB2, an UV-Schäden an (Robu *et al.* 2013), so dass deren Reparatur durch eine PARP-1-Inhibition verlangsamt wird. Zur PARP-1-Abhängigkeit der Reparatur von BPDE-induzierten DNA-Addukten ist zwar bislang nichts bekannt, ein solcher Mechanismus könnte jedoch durch die Sulforaphan-induzierte PARP-1-Inhibition eine weitere Erklärung für die Reparaturverlangsamung sein. Die selektive Inhibition der Nukleotidexzisionsreparatur von (+)-*anti*-BPDE-induzierten DNA-Addukten innerhalb der ersten 12 h nach Ausbildung des Schadens war, wie Bioverfügbarkeitsuntersuchungen und Variationen der Nachinkubationsbedingungen zeigten, nicht durch eine verminderte zelluläre Präsenz von Sulforaphan oder dessen Metaboliten bedingt. Zudem war auch die Genexpression von Nukleotidexzisionsreparatur-assoziierten DNA-Reparaturproteinen zu späteren Zeitpunkten nicht signifikant erhöht. Als mechanistische Grundlage der selektiven Inhibition der frühen Reparaturphase wäre ebenfalls eine funktionelle Inaktivierung von p53 denkbar. So ist das Tumorsuppressorprotein Zink-bindend, essentiell für die GG-NER und beeinflusst unter bestimmten Bedingungen nur die frühe Phase der Reparatur von *anti*-BPDE-induzierten DNA-Läsionen. Eine zelluläre Interferenz von Sulforaphan mit der Zink-bindenden Struktur von p53 könnte infolgedessen zu der beobachteten Limitation der Reparaturinhibition führen. Untersuchungen zum Einfluss des p53-Status der Zellen auf die Sulforaphan-vermittelte Inhibition der frühen Nukleotidexzisionsreparatur schlossen einen solchen Mechanismus jedoch ebenfalls aus. Eine mögliche Erklärung könnte jedoch mit der Kinetik des DNA-Reparaturwegs assoziiert sein. So ist bekannt, dass sich die Exzision von ( $\pm$ )-BPDE-induzierten DNA-Addukten aus einer schnellen Komponente in transkriptionell aktiven Regionen und einer langsameren im globalen Genom zusammensetzt. Ferner ist die Reparatur des transkribierten Strangs gegenüber der des nicht-transkribierten Bereiches eines aktiven Genlokus durch die TC-NER bevorzugt (Chen *et al.* 1992). Die Kinetik der

Nukleotidexzisionsreparatur-abhängigen Entfernung eines DNA-Schadens aus dem kompletten Genom setzt sich als Folge dessen aus zwei Reaktionen erster Ordnung zusammen (Kantor und Hull 1984). Die Geschwindigkeit der frühen Reparaturphase ist vor allem durch die TC-NER beeinflusst, während für spätere Zeitpunkte dahingegen die GG-NER ausschlaggebend ist. Außerdem induziert (+)-*anti*-BPDE eine vergleichsweise höhere Anzahl an DNA-Läsionen in transkriptionell aktiven als in inaktiven Regionen des Genoms (Chen *et al.* 1992), die innerhalb von ~ 20 h durch TC- und GG-NER vollständig repariert werden. Die Entfernung der verbleibenden, in inaktiven Regionen des Genoms lokalisierten Schäden benötigt mehrere Tage (Chen *et al.* 1992). Als Folge dessen finden innerhalb der ersten 20 h nach Schadensinduktion signifikant mehr Nukleotidexzisionsreparatur-Ereignisse als zu späteren Zeitpunkten statt und eine vergleichsweise höhere Anzahl an XPA-Molekülen wird für eine effektive Reparatur benötigt. Somit könnte eine partielle Inaktivierung des zellulären XPA-Pools durch Sulforaphan zu einer selektiven Inhibition der frühen Phase der Nukleotidexzisionsreparatur führen, da für die spätere Periode im Gegensatz eine niedrigere Menge an funktionellem XPA ausreichend ist. Genexpressions- und Western Blot-Analysen (Daten nicht dargestellt) zeigten dazu passend, dass weder auf Transkriptions- noch auf Translationsebene XPA-Protein nachsynthetisiert wurde. Wie die synergistische Zunahme der (+)-*anti*-BPDE-induzierten Zytotoxizität durch Sulforaphan des Weiteren verdeutlicht, war die Verzögerung der Nukleotidexzisionsreparatur für die Überlebensfähigkeit der Zellen von Relevanz. In diesem Kontext zeigte sich eine eindeutige Abhängigkeit zwischen Beeinflussung von XPA bzw. der Nukleotidexzisionsreparatur durch Sulforaphan und dem Ausmaß der Zytotoxizität. So erhöhte Sulforaphan die (+)-*anti*-BPDE-induzierte Zytotoxizität in XPA- und Nukleotidexzisionsreparatur-profizienten Zellen signifikant stärker. Dies kann als Hinweis auf eine selektive Inhibition der bevorzugten Reparatur von transkriptionsblockierenden Läsionen durch Sulforaphan verstanden werden. Im Einklang damit ist bekannt, dass BPDE-induzierte DNA-Addukte zur Arretierung von Transkriptions- (McGregor *et al.* 1997, Perlow *et al.* 2002) und Replikationsgabeln (Temviriyankul *et al.* 2012) führen, die bei fehlender Reparatur bzw. Transläsionssynthese stark zytotoxische Wirkungen entfalten können. Wie vertiefende Genexpressionsuntersuchungen in HCT 116-Zellen des Weiteren zeigen, vermindert Sulforaphan darüber hinaus die Expression von Pol  $\delta$  und Lig I. Eine Interferenz mit der Reparatur-Synthese oder der Ligation des verbleibenden DNA-Strangbruches nach Exzision der DNA-Läsion ist dementsprechend denkbar, wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht genauer untersucht.

Wie die Gesamtheit der präsentierten Daten zeigt, kann Sulforaphan sowohl mit der DNA-Einzelstrangbruchreparatur als auch mit der Nukleotidexzisionsreparatur interagieren und zu einer signifikant verlangsamten Entfernung der jeweiligen Modellläsionen aus dem Genom führen. Als eine mechanistische Grundlage wurden subzelluläre Interferenzen mit den essentiellen Zink-bindenden DNA-Reparaturproteinen PARP-1 und XPA nachgewiesen, die vermutlich durch die Thiolreaktivität von Sulforaphan oder dessen frühe Metaboliten bestimmt sind. Die Relevanz der Sulforaphan-vermittelten Reparaturverzögerungen wird des Weiteren durch eine synergistische Zunahme der Zytotoxizität der zwei DNA-schädigenden Agenzien H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. (+)-*anti*-BPDE verdeutlicht. Ferner kann aus dem Vergleich der für die jeweilige Reparaturinhibition benötigten Sulforaphan-Konzentrationen eine Hierarchisierung der Prozesse hinsichtlich der zellulären Beeinflussung erfolgen: Demzufolge sind vergleichsweise hohe Konzentrationen für eine Interferenz mit DNA-Einzelstrangbruchreparatur-assoziierten Prozessen von Nöten, während bereits bei 20-fach niedrigeren, nach Broccoli-Verzehr systemisch relevanten Konzentrationen eine Beeinträchtigung der Nukleotidexzisionsreparatur zu sehen ist. Außerdem sind die als *advers* aufzufassenden Effekte zumeist frühzeitig im Expositionszeitraum zu verzeichnen und gehen mit zunehmender Dauer verloren. Gerade im Zusammenhang mit dem jeweiligen Substratspektrum der beiden DNA-Reparaturwege und der damit assoziierten Auswirkung auf die genomische Stabilität im Falle von genetischen Reparaturdefekten wird jedoch klar, dass eine solche Hierarchisierung alarmierend ist. So können zellulär sehr häufig auftretende DNA-Einzelstrangbrüche im Rahmen der Replikation zwar zu potentiell klastogenen DNA-Doppelstrangbrüchen überführt werden, in dieser Form jedoch alternativ durch homologe Rekombinationsereignisse repariert oder via Template-Switching Mechanismen bzw. Replikationsgabel-Regression toleriert werden (zusammengefasst in Friedberg 2005). Nichtsdestotrotz sind Mutationen in DNA-Einzelstrangbruchreparatur-assoziierten Genen häufig nicht mit dem Leben vereinbar, da die replikationsgekoppelten Alternativmechanismen durch die rapide Zellproliferation während der Embryogenese überlastet werden. Allerdings ist des Weiteren bekannt, dass überlebensfähige, erbliche Erkrankungen, die mit verminderten DNA-Einzelstrangbruchreparatur-Kapazitäten einhergehen, üblicherweise nicht von genetischen Instabilitäten begleitet sind (zusammengefasst in Caldecott 2008). Die Nukleotidexzisionsreparatur beseitigt dahingegen eine Vielzahl verschiedener, vor allem exogen induzierter DNA-Läsionen, für die keine alternativen DNA-Reparaturprozesse bekannt sind. Es besteht hierbei zwar die Möglichkeit der Schadenstoleranz via Transläsionspolymerasen, diese können jedoch durch eine fehleranfällige Transläsionssynthese zur vermehrten Induktion von Mutationen führen

(zusammengefasst in Kunz *et al.* 2000). Dementsprechend sind erbliche Reparaturdefekte der Nukleotidexzisionsreparatur, wie beispielsweise Xeroderma Pigmentosum, zwar mit dem Leben vereinbar, jedoch häufig von erhöhten Genom-Instabilitäten sowie Krebsinzidenzen begleitet. Eine verminderte Nukleotidexzisionsreparatur-Kapazität ist des Weiteren mit der Entstehung verschiedener Krebsarten assoziiert (zusammengefasst in Thoms *et al.* 2007, Cleaver *et al.* 2009) und die Sulforaphan-induzierte Hemmung der Nukleotidexzisionsreparatur könnte somit die genomische Stabilität bedrohen. Die Relevanz der Sulforaphan-vermittelten Inhibition der Nukleotidexzisionsreparatur wird zusätzlich durch aktuelle Studien bestärkt, die die Bildung von prämutagenen DNA-Läsionen durch Broccoli-Homogenat und -Saft in einem Myrosinase-abhängigen Mechanismus zeigen (Baasanjav-Gerber *et al.* 2011a). Diese DNA-Läsionen stellen kovalente DNA-Addukte dar, die vorwiegend durch enzymatische Abbauprodukte von indolischen Glucosinolaten, wie Glucobrassicin und Neoglucobrassicin, induziert werden (Baasanjav-Gerber *et al.* 2011b). Eine metabolische Aktivierung durch die humane Sulfotransferase SULT 1A1 erhöht darüber hinaus die Anzahl der gebildeten DNA-Addukte (Glatt *et al.* 2011), welche vermutlich über die Nukleotidexzisionsreparatur aus dem Genom entfernt werden. Eine Sulforaphan-vermittelte Inhibition dieses vielseitigen DNA-Reparaturwegs könnte folglich nach entsprechenden Koexpositionen zu komutagenen Effekten führen. Eine Vielzahl der Broccoli-basierten Nahrungsergänzungsmittel besteht allerdings aus eben solchen Homogenaten oder Extrakten, die anhand der hier präsentierten Daten eher als potentiell gefährdend denn protektiv für die genomische Stabilität verstanden werden müssen. Infolgedessen sollte der Einsatz solcher Nahrungsergänzungsmittel überdacht und eine fundierte, toxikologische Bewertung weiterführend fokussiert werden.

## 6. Material und Methoden

Eine tabellarische Zusammenstellung der verwendeten Lösungen, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte befindet sich im Anhang.

### 6.1 Zellkultur

#### 6.1.1 Zellkulturen und deren Kultivierung

Als Zellkulturmodelle für die Untersuchungen dienten verschiedene, adhärenz Zellen, die unter sterilen Bedingungen bei 37°C in einer 5 %igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre mit 100 % Luftfeuchte kultiviert wurden. Die humane Kolonkarzinomzelllinie HCT 116 und dessen isogene p53-Knock-out-Variante (Bunz *et al.* 1998) wurden ursprünglich von Prof. Dr. Bert Vogelstein (John Hopkins Universität, Baltimore, USA) etabliert und freundlicherweise von Prof. Dr. Gilbert Schönfelder (Charité, Universitätsmedizin, Berlin) zu Verfügung gestellt. SV-40-transformierte, XPA-defiziente XP12RO-Fibroblasten, die einem XP-A Patienten mit homozygoter nonsense-Mutation des Arg<sup>207</sup>-Codons entstammen (McDowell *et al.* 1993), wurden freundlicherweise durch Dr. James Cleaver (UCSF, San Francisco, USA) bereitgestellt. Die humane Zervix-Adenokarzinomzelllinie HeLa S3 wurde dahingegen von der *American Type Culture Collection* (ATCC) käuflich erworben (ATCC-Nummer CCL-2.2). Beide HCT 116-Zelllinien sowie die HeLa S3-Zellen wuchsen in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), welches zusätzlich mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS), 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin versetzt war. Die XP12RO-Zellen und dessen durch stabile Transfektion erzeugtes XPA-Knock-in-Pendant wurden dahingegen in RPMI-Medium kultiviert, dem 10 % FKS, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin sowie 650 µg/mL Geneticin G418 zugesetzt waren. Die längerfristige Lagerung der Zelllinien erfolgte in Einfriermedium der Zusammensetzung 90 % FKS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) über flüssigem Stickstoff bei -196°C. Bei laufenden Kulturen erfolgte alle 2 bis 3 Tage eine Subkultivierung der Zellen durch Ausdünnen. Hierzu wurden alle benötigten Lösungen auf 37°C vorgewärmt und die Zellen mikroskopisch begutachtet. Zum Ablösen der Zellen wurden diese zweimal für jeweils ~ 30 sek mit 0,25 % Trypsinlösung gewaschen und nach Entfernen der Waschlösung für ~ 1,5 – 2 min im Brutschrank belassen. Darauf folgend wurden die Zellen mit frischem Medium abgelöst, resuspendiert und mit Hilfe eines elektronischen Zellzählgeräts gezählt. Die zur Quantifizierung der Zellzahlen genutzten Größenbereiche lagen für HCT 116-Zellen zwischen 9 – 30 µm und für die XP12RO- und HeLa S3-Zellen zwischen 11,4 – 40,0 µm. Ein entsprechender Anteil der Zellen wurde in ein neues Zellkulturgefäß überführt, wobei mit einer mittleren Verdopplungszeit von 24 h für alle Zelllinien gerechnet wurde.

### 6.1.2 Transfektion der XP12RO-Zelllinie

Der XPA-Knock-in der XPA- und NER-defizienten XP12RO-Zellen erfolgte durch Dr. Beate Köberle (KIT, Karlsruhe) via Transfektion mit der kompletten humanen cDNA des XPA-Genlokus. Diese cDNA wurde durch Restriktionsverdau des Plasmids pET15b/XPA (Jones und Wood 1993) mit den Restriktionsenzymen XbaI und XhoI erhalten. Anschließend wurde die XPA-cDNA in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+), der mit NheI und XhoI geschnitten wurde, ligiert. XPA-defiziente XP12RO-Zellen (McDowell *et al.* 1993) wurden mit 10 µg des pcDNA3.1(XPA)- oder pcDNA3.1(Leer/Kontrolle)-Vektors mittels Calcium-Phosphat-Technik transfiziert. Die Isolierung der stabilen Klone erfolgte in RPMI-Medium, das mit 750 µg/mL Geneticin G418 versetzt war.

### 6.1.3 Inkubationen

In allen Untersuchungen wurde Sulforaphan in seiner racemischen Form mit einer DMSO-Lösungsmittelkonzentration von 0,25 % eingesetzt. Hierzu wurde eine Stammlösung der Konzentration 50 mM in DMSO angesetzt, diese als Aliquote bei -20°C gelagert und frühestens einen Tag vor den Versuchen mit DMSO auf die entsprechenden Analyse-Konzentrationen verdünnt. Zur Berechnung der konkreten Inkubationsvolumina wurde das Mediumvolumen in den Kulturgefäßen mit einer Messpipette bestimmt und die Inkubationslösungen stets mit einem Verdünnungsfaktor von 400 hinzugegeben.

Der reaktive B[a]P-Metabolit (+)-*anti*-BPDE wurde in Aliquoten der Konzentration 0,5 mg/mL in 95 % THF/5 % Triethylamin bei -80°C gelagert und erst kurz vor der Inkubation mit frischem Lösungsmittel der Zusammensetzung 99,5 % THF/0,5 % Triethylamin auf die entsprechenden Inkubationskonzentrationen verdünnt. Nach Bestimmung des Restvolumens der Kulturgefäße erfolgte die Exposition stets mit einem Verdünnungsfaktor von 1000, was zu einer Lösungsmittelkonzentration von 0,1 % führte. Die (+)-*anti*-BPDE-Konzentration für die Schadensinduktion der Reparaturversuche betrug 50 nM, während für die Koloniebildungsfähigkeitsversuche verschiedene Konzentrationen eingesetzt wurden. Nach 1-stündiger Inkubation der Zellkulturen wurde das Medium abgenommen, die Zellen mehrmals mit FKS-freiem Spülmedium gewaschen und für die Nachinkubationen frisches Medium aufgegeben.

Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Inkubationslösungen wurden stets frisch vor den jeweiligen Expositionen aus einer 30 %igen Stammlösung (9,788 M) in bidestilliertem Wasser angesetzt. Die Inkubation erstreckte sich stets über 5 min, während die Konzentrationen je nach Untersuchung variierten.

### 6.1.4 Koloniebildungsfähigkeit

Zur Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit wurden die Zellen nach erfolgter Behandlung trypsinisiert, die Zellzahl mit einem elektronischen Zellzählgerät erfasst und eine definierte Anzahl an Zellen in je drei 60 mm-Zellkulturschalen weitergesetzt. Für beide HCT 116-Zelllinien und HeLa S3-Zellen wurden hierbei 300, für die XP12RO-Zelllinien jeweils 700 Zellen zur Koloniebildungsfähigkeit ausgestreut. Nach 9 Tagen im Brutschrank wurde das Medium abgesaugt, einmal mit kaltem PBS gewaschen und die Kolonien mit eiskaltem 96 % Ethanol fixiert. Anschließend wurden die Kolonien 30 min mit Giemsa gefärbt und nach mehrmaligem Waschen der Schalen mit destilliertem Wasser ausgezählt. Die Koloniebildungsfähigkeiten der Kontrollzellen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Koloniebildungsfähigkeit der Kontrollzellen der jeweiligen Zelllinien

Zelllinie	Koloniebildungsfähigkeit <sup>a</sup> (% der ausgestreuten Zellen)
HCT 116 p53-profizient	73,4 ± 3,4
HCT 116 p53-defizient	62,3 ± 7,0
HeLa S3	93,0 ± 1,7
XP12RO XPA-profizient	44,9 ± 3,8
XP12RO XPA-defizient	55,2 ± 1,7

<sup>a</sup> Mittelwerte von mindestens sechs Werten aus mindestens zwei Versuchen ± SD

## 6.2 Zelluläre Bioverfügbarkeit und intrazelluläres Metabolitenmuster

Die zelluläre Aufnahme von Sulforaphan wurde nach Zellaufschluss anhand der intrazellulären Konzentrationen aller im Marcaptursäureweg entstehenden Metaboliten mittels LC-ESI-MS/MS-Analyse in Kooperation mit Stefanie Platz und Prof. Dr. Sascha Rohn (Universität Hamburg, Hamburg) bestimmt.

### Versuchsansatz

In 150 mm-Zellkulturschalen wurden je  $4,3 \cdot 10^6$  HCT 116-Zellen ausgestreut, mindestens 24 h anwachsen gelassen und anschließend entweder 3 h oder 24 h mit Sulforaphan inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen trypsinisiert, in Medium gezählt und das mittlere Zellvolumen bestimmt. Es schloss sich zur Pelletierung eine 4-minütige Zentrifugation bei 4°C und 1.800 rpm in 15 mL-Röhrchen an, nach der der Überstand abgezogen wurde. Die Pellets wurden darauf folgend in 100 µL eiskaltem PBS resuspendiert und in 1,5 mL-Mikroreaktionsgefäße überführt.

### Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss wurden die Zellen in PBS für mindestens 24 h bei -80°C gelagert, nach dem Auftauen 5 min im Ultraschallbad sonifiziert und anschließend einem zweiten Einfrier-/Auftau-/Sonifizierungs-Zyklus unterworfen. Der entstandene Zellschrott wurde durch 5-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm abgetrennt und das überstehende Zelllysate bei -20°C gelagert.

### Analyse der Sulforaphan-Metaboliten

Nach einer Proteinfällung aus 100 µL der Zelllysate mit 50 µL Acetonitril : Methanol (9 : 1 (v/v)) wurde der Überstand mittels LC-ESI-MS/MS direkt vermessen. Genauere Hinweise zur flüssig-chromatographischen Trennung und MS/MS-Analyse sind im Anhang zu finden (siehe Anhang 8.6.2).

### Berechnung der intrazellulären Konzentrationen

Die Quantifizierung erfolgte mittels externer Kalibrierung anhand spezifischer Massenübergänge. Mit Hilfe der mittleren Zellvolumina wurden die Werte in intrazelluläre Konzentrationen umgerechnet.

## 6.3 Bestimmung des Gesamtglutathiongehalts nach Tietze

Die Quantifizierung der zellulären Gesamtglutathiongehalte erfolgte nach dem Recycling-Assay nach Tietze (Tietze 1969), dessen zugrunde liegenden Reaktionen in Abbildung 40 dargestellt sind.

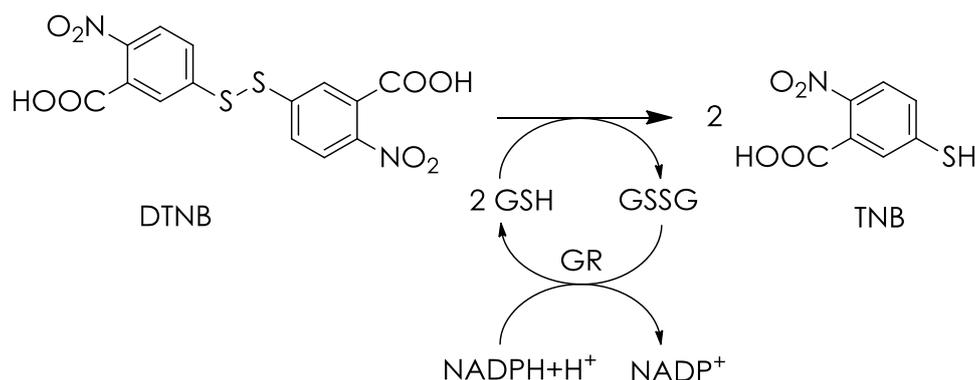


Abbildung 40: Zugrunde liegendes Reaktionsschema der Quantifizierung des Gesamtglutathiongehalts nach Tietze (DTNB=5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure); GR=Glutathionreduktase; TNB=5-Thio-2-nitrobenzoesäure)

Hierbei wird das Ellmans-Reagenz 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) durch GSH zu der gelb gefärbten 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (TNB) reduziert. Das dabei entstehende GSSG wird durch Zugabe von Glutathionreduktase/NADPH rückreduziert und dieses

Glutathionreduktase-getriebene GSSG-Recycling führt zu einer ständigen Zunahme der bei 412 nm quantifizierbaren 5-Thio-2-nitrobenzoesäure. Die Kinetik der Extinktionsänderung ist demnach direkt proportional zur verfügbaren GSH-Menge und kann zur quantitativen Bestimmung des Gesamtglutathiongehalts einer Probe verwendet werden.

### Versuchsansatz

In 50 mm-Zellkulturschalen wurden je  $6,6 \cdot 10^5$  HCT 116-Zellen ausgestreut, mindestens 24 h anwachsen gelassen und anschließend entweder 3 h oder 24 h mit Sulforaphan inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen trypsiniert, in Medium gezählt, das mittlere Zellvolumen bestimmt und ein definiertes Volumen in ein 1,5 mL-Mikroreaktionsgefäß überführt. Darauf folgend wurden die Zellen zur Pelletierung bei 4°C 4 min mit 1.800 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und KP-Puffer hinzugesetzt, so dass eine Lösung der Zellkonzentration  $2,5 \cdot 10^5/120 \mu\text{L}$  vorlag.

### Zellaufschluss und Probenvorbereitung

Für den Zellaufschluss wurden die Zellen in KP-Puffer für mindestens 24 h bei -80°C gelagert, nach dem Auftauen 5 min im Ultraschallbad sonifiziert und anschließend einem zweiten Einfrier-/Auftau-/Sonifizierungs-Zyklus unterworfen. Es schloss sich eine Proteinfällung in 120  $\mu\text{L}$  der Zellysate mit 5-Sulfosalicylsäure (Endkonzentration 1,3 %) an, die nach intensivem Durchmischen der Lösungen für 10 min auf Eis erfolgte. Abschließend wurde das Proteinpräzipitat durch 20-minütige Zentrifugation mit 4.400 rpm bei 4°C abgetrennt und der Überstand direkt für die folgende Analyse eingesetzt.

### Durchführung des Recycling-Assays

Die Messung des Gesamtglutathiongehalts erfolgte in 96-Lochplatten am Tecan-Plattenlesegerät. Hierzu wurden je Kavität 20  $\mu\text{L}$  der vorbereiteten Analyselösungen mit 40  $\mu\text{L}$  KP-Puffer sowie 100  $\mu\text{L}$  2 mM DTNB / 0,3 mM NADPH-Reagenz (in KP-Puffer) vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von 40  $\mu\text{L}$  Glutathionreduktase der Aktivität 4 U/mL gestartet. Die entstehende 5-Thio-2-nitrobenzoesäure wurde darauf folgend bei einer Wellenlänge von 412 nm in 8 Zyklen über eine Reaktionszeit von 4 min erfasst. Als externe Wiederfindung wurde des Weiteren eine 20 mikromolare GSSG-Probe mitgeführt und die Gesamtglutathiongehalte der Proben mittels einer externen Kalibrierung im Konzentrationsbereich von 5 bis 50  $\mu\text{M}$  GSH bestimmt.

### Berechnung der intrazellulären Gesamtglutathiongehalte

Die Auswertung der Daten fand, solange ein stetiger Anstieg der Extinktion über 8 Zyklen gesichert war, anhand Gleichung 6.1 und 6.2 sowie relativ zur externen Kalibrierung statt. Die mittleren Zellvolumina ermöglichten des Weiteren die Umrechnung der Werte in intrazelluläre Gesamtglutathionkonzentrationen.

$$\Delta E = E_{\text{Zyklus 5}} - E_{\text{Zyklus 1}} \quad (\text{Gl. 6.1})$$

$$E = \Delta E_{\text{Probe}} - \Delta E_{\text{Blindwert}} \quad (\text{Gl. 6.2})$$

## 6.4 Bestimmung der Enzymaktivität von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-detoxifizierenden Enzymen

Die Bestimmung der Enzymaktivität von den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-detoxifizierenden Enzymen Katalase und Glutathionperoxidase erfolgte in Kooperation mit Dr. Karlis Briviba (Max Rubner-Institut, Karlsruhe).

### Versuchsansatz und Zellaufschluss

In 100 mm-Zellkulturschalen wurden je 1,7\*10<sup>6</sup> HCT 116-Zellen ausgestreut, 48 h anwachsen gelassen und anschließend 3 h mit Sulforaphan inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen trypsiniert, in Medium gezählt und 4\*10<sup>6</sup> Zellen durch 3-minütige Zentrifugation bei 1.250 rpm und 4°C pelletiert. Zur Zellyse wurden 200 µL Lysepuffer (1 % reduziertes Triton-X 100 in 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0) aufgegeben, bei 14.000 rpm 10 min zentrifugiert und der Überstand direkt zur Bestimmung der Enzymaktivitäten eingesetzt.

### Bestimmung der Katalase-Enzymaktivität

Die Quantifizierung der intrinsischen Katalase-Enzymaktivität erfolgte mittels der Methode nach Aebi (Aebi 1984), die sich der photometrischen Messung des Abbaus von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 240 nm bedient. Hierzu wurden 50 µL der Zellysate in 450 µL 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer mit 500 µL 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ebenfalls in 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer) in Quarzküvetten zusammen gegeben und die Extinktionsänderung bei 240 nm über 1 min verfolgt.

### Berechnung der Katalase-Enzymaktivität

Die Änderung der Extinktion bei 240 nm zwischen 0 und 0,6 min wurde um die Änderung des Blindwertes bereinigt und nach Gleichung 7 in die Enzymaktivität umgerechnet.

$$\text{Enzymaktivität (U)} = \frac{\text{Extinktionsänderung bei 240 nm}}{0,0394 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}} \quad (\text{Gl. 7})$$

Anschließend werden die Enzymaktivitäten relativ zur Kontrolle berechnet und dargestellt.

### Bestimmung der Glutathionperoxidase-Enzymaktivität

Die Quantifizierung der intrinsischen Glutathionperoxidase-Enzymaktivität erfolgte mittels der Methode nach Sharov (Sharov *et al.* 1999), die auf der durch Glutathionperoxidasen katalysierten Reduktion von *tert*-Butylhydroperoxid (*tert*BOOH) beruht. Bei dieser Reduktion wird der reduzierte Kofaktor von Glutathionperoxidasen, GSH, zu GSSG oxidiert, welches wiederum durch Glutathionreduktase unter Verbrauch von NADPH zu GSH rückreduziert wird (Abbildung

41). Zur Quantifizierung der Enzymaktivitäten von Glutathionperoxidasen wurde die Abnahme des reduzierten Kofaktors der Glutathionreduktase, NADPH, bei 340 nm verfolgt. Hierzu wurden 100 µL Reaktionsmix (0,6 mM Diethylentriaminpentaessigsäure, 2 mM Glutathion, 1,2 U/mL Glutathionreduktase in 0,166 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer, pH 7,0) mit 60 µL der Zellysate in Kavitäten einer 96-Lochplatte vermischt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 20 µL einer 1 mM NADPH-Lösung (in bidestilliertem Wasser) hinzugegeben und die Extinktion bei 340 nm in 10 Zyklen über 2 min gemessen, um eine *tert*BOOH-unabhängige NADPH-Abnahme zu überprüfen. Die eigentliche Reaktion wurde anschließend durch die Zugabe von 20 µL einer 12 mM *tert*BOOH-Lösung gestartet und die Extinktion in 30 Zyklen über 10 min bei 340 nm verfolgt.

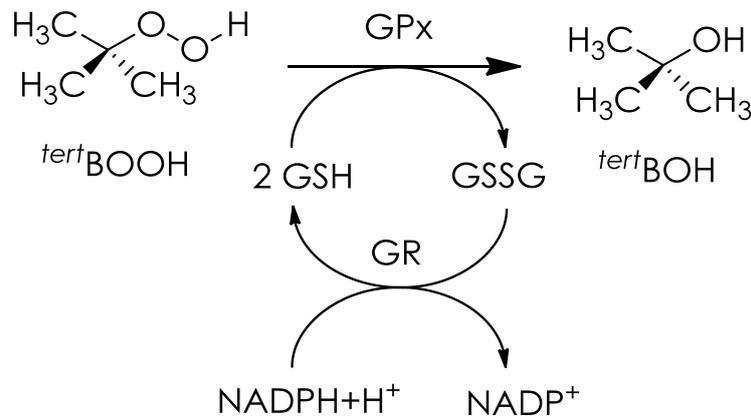


Abbildung 41: Schematische Darstellung der zugrunde liegenden Reaktionen zur Bestimmung der Glutathionperoxidase-Enzymaktivität (GPx=Glutathionperoxidase; GR=Glutathionreduktase; *tert*BOOH=*tert*-Butylhydroperoxid; *tert*BOH=*tert*-Butanol)

#### Berechnung der Glutathionperoxidase-Enzymaktivität

Die Änderung der Extinktion bei 340 nm zwischen Zyklus 13 und 23 wurde um die Änderung des Blindwertes bereinigt und nach Gleichung 8 in die Enzymaktivität umgerechnet.

$$\text{Enzymaktivität (U)} = \frac{1.000 \cdot \text{Extinktionsänderung bei 340 nm}}{3,657 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1}} \quad (\text{Gl. 8})$$

Anschließend werden die Enzymaktivitäten relativ zur Kontrolle berechnet und dargestellt.

## 6.5 Bestimmung der Genexpression

Die Bestimmungen der relativen Genexpressionen wurden mit Hilfe einer Hochdurchsatz-RT-qPCR durchgeführt. Obwohl die Gesamtheit der erhaltenen Daten im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgestellt oder diskutiert wurde, diente die Beeinflussung ausgewählter Gene durch Sulforaphan der ergänzenden Untermauerung potentieller, zellulärer Wirkmechanismen. Eine Liste von ausgewählten Primer-Paar-Sequenzen befindet sich im Anhang 8.6.3.1.

### Versuchsansatz

In 100 mm-Zellkulturschalen wurden jeweils  $1 \cdot 10^6$  HCT 116-Zellen ausgestreut und 24 h anwachsen gelassen, bevor eine 24-stündige Inkubation mit Sulforaphan erfolgte. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen trypsinisiert, in PBS/10% FKS aufgenommen und durch Zentrifugation pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend mit PBS gewaschen und nach abermaliger Zentrifugation trocken bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### RNA-Isolierung und -Quantifizierung

Zur RNA-Isolierung aus den Zellpellets wurde ein modifiziertes Protokoll des Nucleospin RNA II Kits (Macherey-Nagel) genutzt. Sämtliche Arbeitsschritte wurden auf mit Ethanol gereinigten Flächen und auf Eis durchgeführt. Die Resuspension des Zellpellets erfolgte in 100  $\mu\text{L}$  sterilem PBS, woran sich die Zugabe von 350  $\mu\text{L}$  Lysepuffer (RA1) sowie 3,5  $\mu\text{L}$  Mercaptoethanol anschloss. Nach gründlichem Vortexen der Proben wurden diese mechanisch lysiert, indem sie fünfmal durch eine Kanülenöffnung aufgezogen wurden. Nach Zugabe von 350  $\mu\text{L}$  70 % Ethanol wurde abermals gevortext und 700  $\mu\text{L}$  der Probe auf eine Säule des Kits gegeben. Die Bindung der RNA an diese Säulen erfolgte durch 30-sekündige Zentrifugation bei 9.000 rpm, nach der der Durchgang verworfen wurde. Eine Entsalzung erfolgte durch Zugabe von 350  $\mu\text{L}$  *membran desalting buffer* (MDB)-Puffer und 1-minütiger Zentrifugation bei 11.000 rpm. Ein DNA-Verdau fand durch Zugabe von je 95  $\mu\text{L}$  *DNase reaction mixture* (10  $\mu\text{L}$  DNase + 90  $\mu\text{L}$  *DNase reaction buffer*) für 15 min bei Raumtemperatur auf der Säule statt. Es folgten zwei Waschschrte der RNA mit den im Kit enthaltenen Lösungen (RA2 und RA3). Hierzu wurde nach Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  RA2-Puffer bei 9.000 rpm 30 sek zentrifugiert, der Durchgang verworfen und 250  $\mu\text{L}$  RA3-Puffer hinzugegeben. Nach abermaliger Zentrifugation wurden erneut 250  $\mu\text{L}$  RA3-Puffer hinzugegeben und 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Elution der RNA von der Säule erfolgte durch zweimalige Zugabe von je 50  $\mu\text{L}$  DNase-freiem Wasser und Zentrifugation bei 13.000 rpm. Die RNA-Konzentration der Lösung wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt.

### cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit einem qScript™ cDNA Synthese Kit (BioRad) durchgeführt und jede Probe doppelt umgeschrieben. Hierzu wurde 1  $\mu\text{g}$  RNA mit 1  $\mu\text{L}$  iScript-Reverse-Transkriptase und 4  $\mu\text{L}$  *reaction mix* (5-fach) in PCR-Stripes vermischt. Mit Nuklease-freiem Wasser wurde auf 15  $\mu\text{L}$  Gesamtvolumen aufgefüllt, bevor sich eine cDNA-Synthese im Thermal-Cycler anschloss. Das verwendete Temperaturprogramm ist im Anhang 8.6.3.2 dargestellt. Die umgeschriebenen Proben werden bis zur RT-qPCR-Analyse bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### Präamplifikation (Specific Target Amplifikation)

Um eine ausreichende Menge an cDNA für die RT-qPCR zu garantieren, fand eine Präamplifikation der Proben mit den spezifischen Primern statt. Hierzu wurden jeweils 2,5  $\mu\text{L}$  *TeqMan PreAmp master mix* (2-fach) mit 0,5  $\mu\text{L}$  einer 500 nanomolaren Mischung aller

forward- und reverse-Primer, 0,75 µL Wasser und 1,25 µL der Probe zusammengegeben und im Thermal-Cycler präamplifiziert. Das genutzte Temperaturprogramm ist im Anhang 8.6.3.2 dargestellt. Neben einem externen cDNA-Standard wurden als Kontrolle eine *no template control* (NTC) in Form von Wasser sowie eine nicht umgeschriebene RNA-Probe als *-reverse transcriptase* (-RT)-Kontrolle mitgeführt. Nach der Präamplifikation schloss sich ein Exonukleaseverdau an, der verbleibende, ungebundene Primer-Reste aus den Proben entfernte. Hierzu wurden zu jeder der Proben 2 µL einer Exonuklease-Lösung der Aktivität 4 U/µL gegeben und 40 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Exonuklease durch 15-minütiges Erhitzen auf 80°C inaktiviert, die kompletten Probenansätze 1 : 5 mit TE-Puffer verdünnt und bei -20°C gelagert.

### RT-qPCR

Vor der RT-qPCR-Analyse wurden je 2,25 µL der präamplifizierten Proben mit 2,5 µL eines *SsoFast EvaGreen Supermixes* (2-fach mit *low ROX*) und 0,25 µL *DNA binding dye sample loading reagent* (20-fach) vereint. Des Weiteren wurden eine Verdünnungsreihe des externen cDNA-Standards und eine weitere Wasser-Probe in gleicher Weise behandelt. Die Primerpaare wurden jeweils mit *DNA suspension buffer* (einfach) und *assay loading reagent* (2-fach) so verdünnt, dass Primer-Lösungen der Konzentration 5 µM entstanden. Die finale Primer-Konzentration im Assay betrug dementsprechend 500 nM. Die RT-qPCR-Analyse erfolgte an einem Biomark™-RT-qPCR-Gerät, in dem die Nutzung eines Chips die gleichzeitige Analyse von 96 x 96 unabhängigen PCR-Reaktionen ermöglicht. Hierzu wurde das Dynamic Array des Chips im *integrated fluidic circuits* (IFC) Controller HX mit Kontroll-Fluid gepumpt, um die Kanäle des Dynamic Array zu befüllen. Anschließend werden je 5 µL der Proben bzw. Primerlösungen in die entsprechenden Kavitäten des Chips eingebracht und der Chip am IFC Controller HX mit den Lösungen beladen. In der folgenden RT-qPCR wurde unter Nutzung des im Anhang 8.6.3.2 beschriebenen Temperaturprogramms jede Probe separat mit jedem der 95 Primer-Paare amplifiziert.

### Auswertung

Die Auswertung erfolgte zunächst unter Nutzung der „*Fluidigm Real Time PCR Analysis*“-Software (Fluidigm). Hierbei wurde der passive Referenzfarbstoff ROX zur Überprüfung der korrekten Beladung aller Reaktionskammern genutzt. Die Quantifizierung der Amplifikate erfolgte mit Hilfe des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes *EvaGreen*, wobei die Spezifität der PCR über die Begutachtung der Schmelzkurven überprüft wurde. Die weitere Verarbeitung der  $c_q$ -Werte fand mit Hilfe der „*GenEx*“-Software (MultiD Analyses) statt. Die Normierung der Proben erfolgte auf die Referenzgene *ACTB*, *GUSB* sowie *GAPDH* und die Daten wurden nach der  $\Delta\Delta c_q$ -Methode nach Gleichung 9.1 – 9.3 ausgewertet.

$$\Delta c_q = c_q(\text{Zielgen}) - c_q(\text{Referenzgen}) \quad (\text{Gl. 9.1})$$

$$\Delta\Delta c_q = \Delta c_q(\text{Behandlung}) - \Delta c_q(\text{Kontrolle}) \quad (\text{Gl. 9.2})$$

$$\text{Ratio} = 2^{-(\Delta\Delta c_q)} \quad (\text{Gl. 9.3})$$

## 6.6 Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen

Die Methode der Alkalischen Entwindung wurde zur Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen genutzt (Hartwig *et al.* 1993). Hierbei werden diese Strangbrüche im alkalischen Milieu entwunden und können nach Neutralisation und Sonifizierung in einzelsträngige DNA-Fragmente überführt werden. Eine Quantifizierung der einzel- und doppelsträngigen DNA-Fragmente erfolgt nach säulenchromatographischer Trennung durch photometrische Detektion mit Hilfe eines interkalierenden DNA-Farbstoffes (Abbildung 42).

### Versuchsansatz

In 40 mm-Zellkulturschalen wurden jeweils  $1 \cdot 10^5$  Zellen (HCT 116 oder HeLa S3) ausgestreut, diese mindestens 24 h anwachsen gelassen und anschließend entweder 3 h oder 24 h mit Sulforaphan inkubiert. Für die Beurteilung der Beeinflussung der DNA-Einzelstrangbruchreparatur durch Sulforaphan wurden des Weiteren 5 min mit  $H_2O_2$  koinkubiert und für die entsprechenden Reparaturzeiten mit frischen Sulforaphan-Verdünnungen nachinkubiert. Darauf folgend wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und bis zur Durchführung der Alkalischen Entwindung auf Eis belassen.

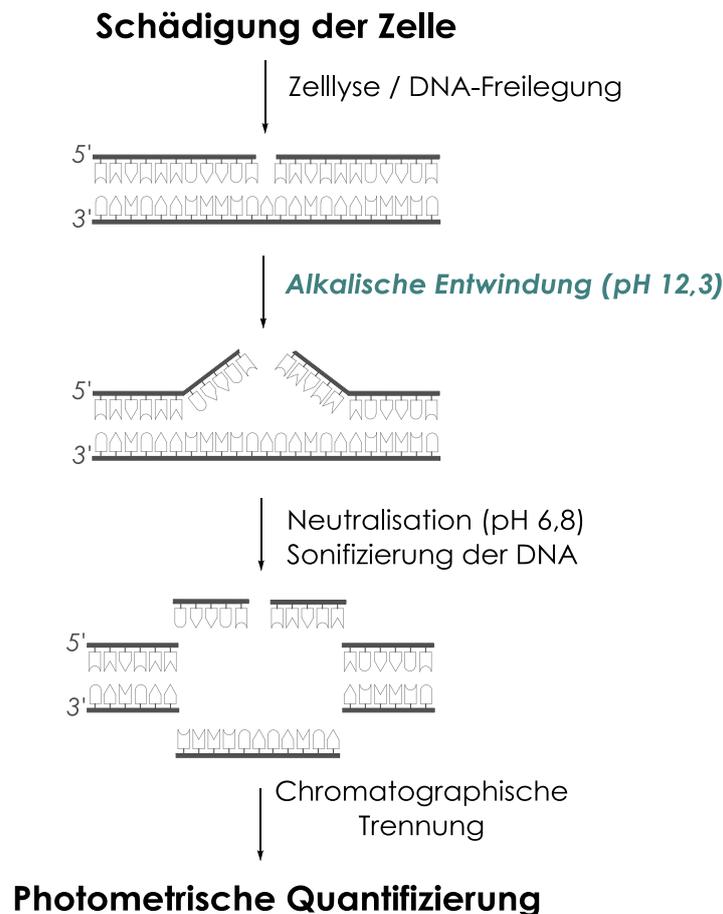


Abbildung 42: Schematische Darstellung des Prinzips der Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen mittels Alkalischer Entwindung

### Durchführung der Alkalischen Entwindung

Die Zellen wurden genau 30 min mit der alkalischen Lösung (pH 12,3) inkubiert, bevor mit 0,1 N HCl auf pH 6,8 neutralisiert wurde. Die lysierten Zellen wurden in Röhrchen überführt, 15 sek auf Eis sonifiziert und abschließend zur Stabilisierung der einzelsträngigen DNA-Fragmente mit 0,05 % SDS versetzt. Die so erhaltenen Proben wurden entweder bei -20°C gelagert oder direkt der säulenchromatographischen Trennung unterzogen.

### Säulenchromatographische Trennung und photometrische Quantifizierung

Die chromatographische Trennung der einzel- und doppelsträngigen DNA-Fragmente erfolgte auf einer Hydroxylapatit-Säule, wobei alle Arbeitsschritte bei 60°C durchgeführt wurden. Zur Säulenpräparation wurde Hydroxylapatit 30 min in NaP-Puffer (c=0,1 g/mL) gequollen, der flüssige Überstand gegen neuen Puffer ausgetauscht und die stationäre Phase in eine als Säule dienende 3 mL-Einwegspritze eingebracht. Hierbei wurde das obere und untere Ende mit einem Glasfaserfilter abgeschlossen, um das Ausspülen der stationären Phase zu vermeiden. Vor der Probenaufnahme wurden die Säulen mit 0,5 M KP-Puffer gewaschen und anschließend mit 0,01 M NaP-Puffer vorkonditioniert. Die Proben wurden komplett auf die Säulen aufgegeben, mit 0,01 M NaP-Puffer gespült und anschließend durch KP-Puffer verschiedener Konzentrationen eluiert. Der einzelsträngige DNA-Anteil wurde hierbei in einem ersten Schritt mit 0,15 M KP-Puffer in 24-Lochplatten eluiert, bevor der doppelsträngige Anteil im zweiten Schritt mittels 0,35 M KP-Puffer von den Säulen gespült wurde. Die DNA-Gehalte der so getrennten einzel- und doppelsträngigen DNA-Anteile wurden nach 30-minütiger Inkubation mit Hoechst 33258 (Endkonzentration  $7,5 \cdot 10^{-7}$  M) anhand der Fluoreszenz ( $\lambda_{Em}=360$  nm;  $\lambda_{Ex}=455$  nm) quantifiziert.

### Berechnung der Anzahl von DNA-Strangbrüchen

Die Anzahl der DNA-Strangbrüche wurde nach Hartwig *et al.* 1993 und Hartwig *et al.* 1996 bestimmt, wobei als erstes der doppelsträngige DNA-Anteil laut Gleichung 10.1 berechnet wurde. Hierbei wurden die Fluoreszenzen (F) um die Extinktion der jeweiligen Blindwerte bereinigt und die Werte für die einzelsträngige ( $F_{ss}$ ) bzw. doppelsträngige ( $F_{ds}$ ) Probe verrechnet.

$$\text{Anteil doppelsträngige DNA} = \frac{F_{ds}}{F_{ds} + 2,1 \cdot F_{ss}} \quad (\text{Gl. 10.1})$$

Die Anzahl der Strangbrüche pro Zelle wurde mittels Gleichung 10.2 bestimmt und durch Division der Resultate durch den Faktor 6.000 wurde die Anzahl in DNA-Strangbrüchen pro  $10^6$  Basenpaare umgerechnet.

$$\text{DNA-Strangbrüche pro Zelle} = -\ln \frac{\text{Anteil doppelsträngige DNA}_{\text{Probe}}}{\text{Anteil doppelsträngige DNA}_{\text{Kontrolle}}} * 16.666 \quad (\text{Gl. 10.2})$$

## 6.7 Quantifizierung von BPDE-induzierten DNA-Addukten

Das DNA-Addukt des reaktiven Metaboliten von B[a]P, (+)-anti-BPDE, wurde mittels HPLC/Fluoreszenz-Detektion quantifiziert. Hierbei wurde nicht das kovalente DNA-Addukt vermessen, sondern ein durch saure Hydrolyse aus isolierter DNA freigesetztes, fluoreszierendes Tetrol I-1. Dieses wurde durch Neutralisation der Hydrolyselösung generiert und spiegelt die Anzahl der ursprünglichen DNA-Addukte direkt wider (Rojas *et al.* 1994, Schwerdtle *et al.* 2002). Eine schematische Darstellung des Versuchsablaufs ist in Abbildung 43 gezeigt.

### Versuchsansatz

In 100 mm-Zellkulturschalen wurden je  $1 \cdot 10^6$  HCT 116-Zellen eingesät, mindestens 24 h anwachsen gelassen und 2 h bzw. 24 h mit Sulforaphan inkubiert. Die Induktion der DNA-Addukte erfolgte durch 1-stündige Koinkubation mit 50 nM (+)-anti-BPDE und nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mindestens einmal mit FKS-freiem Spülmedium gewaschen. Für die Analysen zur Beeinflussung der Nukleotidexzisionsreparatur durch Sulforaphan wurde für die entsprechenden Reparaturzeiten mit frischen Sulforaphan-Verdünnungen nach-inkubiert. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert, in kaltem TBS/10 % FKS aufgenommen und in 15 mL-Röhrchen mittels 5-minütiger Zentrifugation bei 1.800 rpm und 4°C pelletiert. Das Zellpellet wurde einmal mit kaltem TBS gewaschen, in ein 1,5 mL-Mikroreaktionsgefäß überführt und erneut durch 10-minütige Zentrifugation bei 2.000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde abgezogen und die Pellets bei -20°C gelagert.

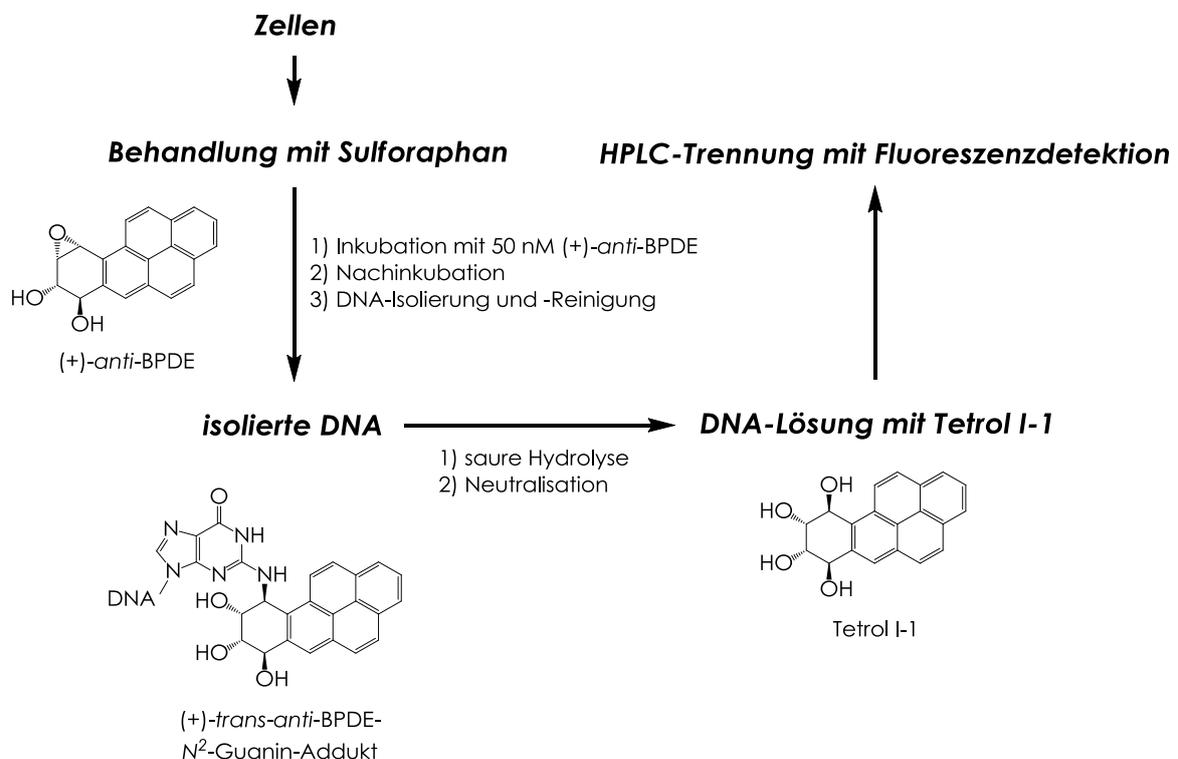


Abbildung 43: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der Quantifizierung der (+)-anti-BPDE-DNA-Addukte

### DNA-Isolierung und -Aufreinigung

Die Zellpellets wurden mit 100 µL TE-Puffer versetzt, in 900 µL Extraktionspuffer resuspendiert und mindestens 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach Zugabe von Proteinase K (Endkonzentration 100 µg/mL) wurde für weitere 3 h bei 50°C schüttelnd inkubiert, woran sich die DNA-Isolierung anschloss. Hierzu wurden die Probelösungen mit 900 µL Rotiphenol (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25 : 24 : 1) versetzt, zur Durchmischung 2 min gevortext und die Phasen durch 5-minütige Zentrifugation bei 12.000 rpm voneinander getrennt. Die wässrige Phase wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und der Extraktionsschritt mit 1 mL Rotiphenol wiederholt. Abschließend wurde die wässrige Phase erneut überführt und in der gleichen Prozedur mit Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1) extrahiert. Die wässrige Phase wurde anschließend mit 25 µL 10 M Ammoniumacetatlösung und 1 mL eiskaltem Ethanol (reinst, absolut) versetzt und die DNA über Nacht bei -20°C gefällt. Die Aufreinigung der DNA erfolgte nach 10-minütiger Zentrifugation bei 9.500 rpm und 4°C. Hierzu wurde das DNA-Pellet mindestens dreimal mit eiskaltem 70 % Ethanol (reinst) gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Eine DNA-Lösung wurde durch schüttelndes Inkubieren des DNA-Pellets in 1 mL bidestilliertem Wasser für ~ 12 h hergestellt, deren DNA-Gehalt photometrisch bei 260 nm quantifiziert wurde. Zur Sicherung der für die HPLC-Analyse benötigten Reinheit der DNA wurden die Extinktionsquotienten bei den Wellenlängen 260/280 (Wert > 1,75) bzw. 260/230 (Wert ± 2,3) bestimmt und die DNA gegebenenfalls erneut gefällt bzw. gewaschen.

### Vorbereitung der HPLC-Proben und HPLC-Analyse

Für die Freisetzung der DNA-Addukte als Tetrol I-1 wurden zwischen 50 und 200 µg der DNA mit 26 µL 4 N HCl (Endkonzentration 0,1 N) versetzt, mit bidestilliertem Wasser in HPLC-Vials auf ein Volumen von 1014 µL aufgefüllt und 4 h bei 90°C erhitzt. Anschließend wurden die abgekühlten Proben mit 4 N NaOH auf pH 7,0 neutralisiert, 300 µL bidestilliertes Wasser hinzugegeben und die HPLC-Analyse gestartet. Hierbei wurden 1,2 mL der Hydrolyselösung in das System injiziert und isokratisch mit 55 % Methanol/45 % Wasser als Fließmittel an einer RP18-Phase getrennt. Zur Aufkonzentrierung der DNA wurde die injizierte Probe zunächst 10 min mit 20 % Methanol/80 % Wasser auf eine kurze RP18-Säule gespült und diese anschließend durch ein Motorsäulenschaltventil mit der RP18-Trennsäule gekoppelt. Genauere Hinweise zur flüssigchromatographischen Trennung sind im Anhang zu finden (siehe Anhang 8.6.1).

### Auswertung

Die Größe des Analytpeaks wurde mit Hilfe der „Chromleon“-Software (Thermo Scientific/Dionex) bestimmt und anschließend unter Berücksichtigung der jeweiligen DNA-Mengen pro Vial relativ zur Kontrolle berechnet. Eine externe Kalibrierung des HPLC-Systems mit Tetrol I-1 erfolgte zwar ebenfalls (siehe Anhang 8.6.1.2), wurde zur weiteren Auswertung der Daten jedoch nicht genutzt.

## 6.8 Quantifizierung der zellulären Poly(ADP-Ribosyl)ierung

Die Detektion der zellulären PARylierung erfolgte in HeLa S3-Zellen mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen PAR. Eine Quantifizierung der zellulären PAR-Menge wurde durch einen FITC-gekoppelten Sekundärantikörper bewerkstelligt, dessen Fluoreszenz-Intensität im Bereich des Zellkerns fluoreszenzmikroskopisch analysiert wurde.

### Versuchsansatz, Induktion der zellulären PARylierung und Fixierung

In 40 mm-Zellkulturschalen wurde jeweils ein Deckgläschen (Ø 12 mm) eingebracht,  $2 \cdot 10^5$  HeLa S3-Zellen eingestreut und diese 48 h anwachsen gelassen. Im Folgenden wurden die Zellen für 3 h mit Sulforaphan inkubiert und zur Induktion der zellulären PARylierung 5 min mit  $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  behandelt. Anschließend wurden die Deckgläschen aus den Zellkulturschalen entfernt, mit kaltem PBS gewaschen und 15 min in eiskalter 10 % (w:v) Trichloressigsäure permeabilisiert. Die Fixierung der Zellen erfolgte als nächstes durch sukzessive Inkubation mit 70 %, 90 % und 96 % eiskaltem Ethanol für jeweils 5 min. Es schloss sich eine Trocknung der Deckgläschen bei Raumtemperatur an.

### Immunolabelling und fluoreszenzmikroskopische Analyse

Die Deckgläschen wurden mit PBS rehydratisiert und 30 min mit dem spezifischen anti-PAR 10H Antikörper (Verdünnung 1 : 30 in PBS/5 % Milchpulver) bei  $37^\circ\text{C}$  in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 5 min wurden die Deckgläschen weitere 30 min mit dem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung 1 : 50 in PBS/5 % Milchpulver) bei  $37^\circ\text{C}$  im Dunkeln belassen. Es erfolgte eine abermalige Waschprozedur, bevor die Deckgläschen mit VECTASHILED Mounting Medium mit DAPI auf Objektträger aufgebracht und mit klarem Lack versiegelt wurden. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse fand darauf folgend oder nach Lagerung der Objektträger bei  $4^\circ\text{C}$  mit Hilfe eines Auflichtmikroskops unter Nutzung der „ZEN“-Software (Carl Zeiss) statt.

### Auswertung

Die Quantifizierung der zellulären PARylierung erfolgte anhand der Begutachtung der kolokalisierten DAPI- und FITC-Fluoreszenzen relativ zur Intensität der Kontrolle mit Hilfe der „AxioVision Rel. 4.8“-Software (Carl Zeiss).

## 6.9 Bestimmung der PARP-1-vermittelten Poly(ADP-Ribosyl)ierung *in vitro*

Die Detektion der subzellulären PARylierungsaktivität erfolgte durch Dr. Claudia Keil (TU Berlin, Berlin) anhand des Einbaus radioaktiv markierter ADP-Ribose durch rekombinante PARP-1 (Keil *et al.* 2004).

### Versuchsansatz

In HEPES-Puffer gelöste, rekombinante PARP-1 (Endkonzentration 17,7 nM) wurde für 30 min mit Sulforaphan bzw. seinen Metaboliten auf Eis inkubiert und die PARylierung anschließend durch Zugabe eines Reaktionsmixes gestartet. Dieser Reaktionsmix setzte sich aus sonifizierter Lachsspermien-DNA (Endkonzentration 480 µg/mL), NAD<sup>+</sup> (Endkonzentration 50 µM) und <sup>32</sup>P-NAD<sup>+</sup> (mindestens in einer Aktivität von 100.000 cpm) in HEPES-Puffer zusammen. Nach 20-minütiger Reaktion bei 30°C wurde <sup>32</sup>P-markiertes Protein durch die Zugabe von 150 µL 40 % (w:v) Trichloressigsäure bei 4°C für 20 min gefällt. Die gesamte Radioaktivität der Ansätze wurde darauf folgend mittels Cerenkov-Messung quantifiziert, woran sich eine 20-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm anschloss. Das erhaltene Präzipitat wurde mit 5 % (w:v) Trichloressigsäure und 70 % Ethanol gewaschen und dessen Radioaktivität stellvertretend für <sup>32</sup>P-markierte Proteine mittels Cerenkov-Messung bestimmt. Für die Protektionsversuche wurde rekombinante PARP-1 entweder 15 min mit 200 µM der Thiolreagenzien vorinkubiert und weitere 15 min mit 200 µM der jeweiligen Sulforaphan-Metaboliten koinkubiert („Vorinkubation“), bevor die Zugabe des Reaktionsmixes erfolgte. Alternativ wurde in der umgekehrten Reihenfolge („Postinkubation“) oder 30 min mit jeweils 200 µM beider Agenzien gleichzeitig exponiert („Koinkubation“). Die DMSO-Lösungsmittelkonzentration betrug bei diesen subzellulären Versuchen, abweichend zu den zellulären Untersuchungen, 0,5 %.

### Auswertung

Die Menge inkorporierter ADP-Ribose wurde anhand des prozentualen Einbaus von <sup>32</sup>P-NAD<sup>+</sup> bestimmt und kann als Maß für die PARP-1-vermittelte PARylierungsaktivität verstanden werden.

## **6.10 Zink-Freisetzung aus XPazf**

Für die Untersuchungen zur Zink-Freisetzung wurde ein 37 Aminosäuren umfassendes Peptid genutzt, das der Zink-bindenden Struktur von XPA nachempfunden ist (Bal *et al.* 2003). Die Quantifizierung des freigesetzten Zinks erfolgt hierbei photometrisch nach Bildung eines Zn-(4-(2-Pyridylazo)resorcinol)<sub>2</sub>-Komplexes.

### Versuchsansatz

Das Peptid wurde in einer äquimolaren Konzentration von 100 µM in Zink-Puffer (100 µM ZnCl<sub>2</sub> in HEPES) gelöst und die Sättigung des Zinkfingers durch Titration mit weiterem Zink-Puffer gegen 4-(2-Pyridylazo)resorcinol abgesichert. Hierdurch wurde die Integrität des Zinkfingers hergestellt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation des Peptids (Endkonzentration 20 µM) bei 37°C mit Sulforaphan in 20 mM HEPES-Puffer. Anschließend wurde der lösliche Zink-Anteil durch Zugabe von 4-(2-Pyridylazo)resorcinol (Endkonzentration 100 µM) bei 492 nm am Tecan-Plattenlesegerät in 384-Lochplatten quantifiziert. Als Positivkontrolle diente eine

Inkubation des Peptids mit 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, die durch Oxidation der Zink-komplexierenden Thiole zur vollständigen Zink-Freisetzung führte. Die DMSO-Lösungsmittelkonzentration dieser subzellulären Versuche lag bei 1 % und wich somit von den zellulär eingesetzten Konzentrationen ab.

### Auswertung

Der Anteil des freigesetzten Zinks wurde relativ zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Positivkontrolle berechnet, die eine Zink-Freisetzung von 100 % darstellte.

## 7. Literaturverzeichnis

**Abbaoui, B., Riedl, K. M., Ralston, R. A., Thomas-Ahner, J. M., Schwartz, S. J., Clinton, S. K. und Mortazavi, A.** (2012). "Inhibition of bladder cancer by broccoli isothiocyanates sulforaphane and erucin: Characterization, metabolism, and interconversion." Mol Nutr Food Res **56**(11): 1675-1687.

**Aboussekhra, A., Biggerstaff, M., Shivji, M. K., Vilpo, J. A., Moncollin, V., Podust, V. N., Protic, M., Hübscher, U., Egly, J. M. und Wood, R. D.** (1995). "Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components." Cell **80**(6): 859-868.

**Adimoolam, S. und Ford, J. M.** (2002). "p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene." P Natl Acad Sci USA **99**(20): 12985-12990.

**Aebi, H.** (1984). "Catalase in vitro." Method Enzymol **105**: 121-126.

**Al Janobi, A. A., Mithen, R. F., Gasper, A. V., Shaw, P. N., Middleton, R. J., Ortori, C. A. und Barrett, D. A.** (2006). "Quantitative measurement of sulforaphane, iberin and their mercapturic acid pathway metabolites in human plasma and urine using liquid chromatography-tandem electrospray ionisation mass spectrometry." J Chromatogr B **844**(2): 223-234.

**Ali, A. A. E., Timinszky, G., Arribas-Bosacoma, R., Kozlowski, M., Hassa, P. O., Hassler, M., Ladurner, A. G., Pearl, L. H. und Oliver, A. W.** (2012). "The zinc-finger domains of PARP1 cooperate to recognize DNA strand breaks." Nat Struct Mol Biol **19**(7): 685-692.

**Amé, J. C., Rolli, V., Schreiber, V., Niedergang, C., Apiou, F., Decker, P., Muller, S., Höger, T., Ménissier-de Murcia, J. und de Murcia, G.** (1999). "PARP-2, a novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase." J Biol Chem **274**(25): 17860-17868.

**Amé, J. C., Spenlehauer, C. und de Murcia, G.** (2004). "The PARP superfamily." Bioessays **26**(8): 882-893.

**Amundson, S. A., Patterson, A., Do, K. T. und Fornace, A. J.** (2002). "A nucleotide excision repair master-switch: p53 regulated coordinate induction of global genomic repair genes." Cancer Biol Ther **1**(2): 145-149.

**Arteel, G. E. und Sies, H.** (2001). "The biochemistry of selenium and the glutathione system." Environ Toxicol Pharmacol **10**(4): 153-158.

**Baasanjav-Gerber, C., Hollnagel, H. M., Brauchmann, J., Iori, R. und Glatt, H.** (2011a). "Detection of genotoxicants in Brassicales using endogenous DNA as a surrogate target and adducts determined by <sup>32</sup>P-postlabelling as an experimental end point." Mutagenesis **26**(3): 407-413.

**Baasanjav-Gerber, C., Monien, B. H., Mewis, I., Schreiner, M., Barillari, J., Iori, R. und Glatt, H.** (2011b). "Identification of glucosinolate congeners able to form DNA adducts and to induce mutations upon activation by myrosinase." Mol Nutr Food Res **55**(5): 783-792.

**Bacon, J. R., Williamson, G., Garner, R. C., Lappin, G., Langouet, S. und Bao, Y.** (2003). "Sulforaphane and quercetin modulate PhIP-DNA adduct formation in human HepG2 cells and hepatocytes." Carcinogenesis **24**(12): 1903-1911.

**Baird, L. und Dinkova-Kostova, A. T.** (2011). "The cytoprotective role of the Keap1-nrf2 pathway." Arch Toxicol **85**(4): 241-272.

**Bal, W., Schwerdtle, T. und Hartwig, A.** (2003). "Mechanism of nickel assault on the zinc finger of DNA repair protein XPA." Chem Res Toxicol **16**(2): 242-248.

**Balasubramanian, B., Pogozelski, W. K. und Tullius, T. D.** (1998). "DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone." P Natl Acad Sci USA **95**(17): 9738-9743.

**Balu, N., Padgett, W. T., Nelson, G. B., Lambert, G. R., Ross, J. A. und Nesnow, S.** (2006). "Benzo[a]pyrene-7,8-quinone-3'-mononucleotide adduct standards for <sup>32</sup>P-postlabeling analyses: Detection of benzo[a]pyrene-7,8-quinone-calf thymus DNA adducts." Anal Biochem **355**(2): 213-223.

**Bebenek, K., Tissier, A., Frank, E. G., McDonald, J. P., Prasad, R., Wilson, S. H., Woodgate, R. und Kunkel, T. A.** (2001). "5'-Deoxyribose phosphate lyase activity of human DNA polymerase *iota* in vitro." Science **291**(5511): 2156-2159.

**Bheemreddy, R. M. und Jeffery, E. H.** (2007). "The metabolic fate of purified glucoraphanin in F344 rats." J Agric Food Chem **55**(8): 2861-2866.

**Bones, A. M. und Rossiter, J. T.** (1996). "The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry." Physiol Plantarum **97**(1): 194-208.

**Bonnesen, C., Eggleston, I. M. und Hayes, J. D.** (2001). "Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines." Cancer Res **61**(16): 6120-6130.

**Boschi-Muller, S., Gand, A. und Branlant, G.** (2008). "The methionine sulfoxide reductases: Catalysis and substrate specificities." Arch Biochem Biophys **474**(2): 266-273.

**Breen, A. P. und Murphy, J. A.** (1995). "Reactions of oxyl radicals with DNA." Free Radic Biol Med **18**(6): 1033-1077.

**Brigelius-Flohé, R.** (2006). "Glutathione peroxidases and redox-regulated transcriptions factors." Biol Chem **387**(10-11): 1329-1335.

**Brown, K. K. und Hampton, M. B.** (2011). "Biological targets of isothiocyanates." Biochim Biophys Acta-Gen Subj **1810**(9): 888-894.

**Brüsewitz, G., Cameron, B. D., Chasseaud, L. F., Görler, K., Hawkins, D. R., Koch, H. und Mennicke, W. H.** (1977). "Metabolites of benzyl isothiocyanate and its cysteine conjugate." Biochem J **162**(1): 99-107.

**Buchko, G. W., Ni, S. S., Thrall, B. D. und Kennedy, M. A.** (1998). "Structural features of the minimal DNA binding domain (M98-F219) of human nucleotide excision repair protein XPA." Nucleic Acids Res **26**(11): 2779-2788.

**Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B.** (1998). "Requirement for p53 and p21 to sustain G(2) arrest after DNA damage." Science **282**(5393): 1497-1501.

**Buschta-Hedayat, N., Buterin, T., Hess, M. T., Missura, M. und Naegeli, H.** (1999). "Recognition of nonhybridizing base pairs during nucleotide excision repair of DNA." P Natl Acad Sci USA **96**(11): 6090-6095.

**Caldecott, K. W.** (2001). "Mammalian DNA single-strand break repair: An x-ra(y)ted affair." Bioessays **23**(5): 447-455.

**Caldecott, K. W.** (2003). "XRCC1 and DNA strand break repair." DNA Repair **2**(9): 955-969.

**Caldecott, K. W.** (2007). "Mammalian single-strand break repair: Mechanisms and links with chromatin." DNA Repair **6**(4): 443-453.

**Caldecott, K. W.** (2008). "Single-strand break repair and genetic disease." Nat Rev Genet **9**(8): 619-631.

**Caldecott, K. W., Aoufouchi, S., Johnson, P. und Shall, S.** (1996). "XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro." Nucleic Acids Res **24**(22): 4387-4394.

**Caldecott, K. W., McKeown, C. K., Tucker, J. D., Ljungquist, S. und Thompson, L. H.** (1994). "An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III." Mol Cell Biol **14**(1): 68-76.

**Cavalieri, E. L. und Rogan, E. G.** (1995). "Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons." Xenobiotica **25**(7): 677-688.

**Chen, R. H., Maher, V. M., Brouwer, J., Vandeputte, P. und McCormick, J. J.** (1992). "Preferential repair and strand-specific repair of benzo[a]pyrene diol epoxide adducts in the HPRT gene of diploide human fibroblasts." P Natl Acad Sci USA **89**(12): 5413-5417.

**Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. D. und Pavletich, N. P.** (1994). "Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: Understanding tumorigenic mutations." Science **265**(5170): 346-355.

**Chung, F.-L., Conaway, C. C., Rao, C. V. und Reddy, B. S.** (2000). "Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci in Fischer rats by sulforaphane and phenethyl isothiocyanate." *Carcinogenesis* **21**(12): 2287-2291.

**Clarke, J. D., Hsu, A., Riedl, K., Bella, D., Schwartz, S. J., Stevens, J. F. und Ho, E.** (2011). "Bioavailability and inter-conversion of sulforaphane and erucin in human subjects consuming broccoli sprouts or broccoli supplement in a cross-over study design." *Pharmacol Res* **64**(5): 456-463.

**Cleaver, J. E., Charles, W. C., McDowell, M. L., Sadinski, W. J. und Mitchell, D. L.** (1995). "Overexpression of the XPA repair gene increases resistance to ultraviolet radiation in human cells by selective repair of DNA damage." *Cancer Res* **55**(24): 6152-6160

**Cleaver, J. E., Lam, E. T. und Revet, I.** (2009). "Disorders of nucleotide excision repair: The genetic and molecular basis of heterogeneity." *Nat Rev Genet* **10**(11): 756-768.

**Cleaver, J. E. und States, J. C.** (1997). "The DNA damage-recognition problem in human and other eukaryotic cells: the XPA damage binding protein." *Biochem J* **328**(1): 1-12.

**Conaway, C. C., Getahun, S. M., Liebes, L. L., Pusateri, D. J., Topham, D. K. W., Botero-Omary, M. und Chung, F.-L.** (2000). "Disposition of glucosinolates and sulforaphane in humans after ingestion of steamed and fresh broccoli." *Nutr Cancer* **38**(2): 168-178.

**Conney, A. H., Chang, R. L., Jerina, D. M. und Wei, S. J. C.** (1994). "Studies on the metabolism of benzo[a]pyrene and dose-dependent differences in the mutagenic profile of its ultimate carcinogenic metabolite." *Drug Metab Rev* **26**(1-2): 125-163.

**Cosman, M., Delossantos, C., Fiala, R., Hingerty, B. E., Singh, S. B., Ibanez, V., Margulis, L. A., Live, D., Geacintov, N. E., Broyde, S. und Patel, D. J.** (1992). "Solution conformation of the major adduct between the carcinogen (+)-anti-benzo[a]pyrene diol epoxide and DNA." *P Natl Acad Sci USA* **89**(5): 1914-1918.

**Cramer, J. M. und Jeffery, E. H.** (2011). "Sulforaphane absorption and excretion following ingestion of a semi-purified broccoli powder rich in glucoraphanin and broccoli sprouts in healthy men." *Nutr Cancer* **63**(2): 196-201.

**D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I. und Poirier, G. G.** (1999). "Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions." *Biochem J* **342**(2): 249-268.

**Davidovic, L., Vodenicharov, M., Affar, E. B. und Poirier, G. G.** (2001). "Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism." *Exp Cell Res* **268**(1): 7-13.

**de Laat, W. L., Appeldoorn, E., Sugawara, K., Weterings, E., Jaspers, N. G. J. und Hoeijmakers, J. H. J.** (1998). "DNA-binding polarity of human replication protein A positions nucleases in nucleotide excision repair." *Gene Dev* **12**(16): 2598-2609.

**Ding, R. C., Pommier, Y., Kang, V. H. und Smulson, M.** (1992). "Depletion of poly(ADP-ribose)polymerase by antisense RNA expression results in a delay in DNA strand break rejoining." J Biol Chem **267**(18): 12804-12812.

**Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Cole, R. N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M. und Talalay, P.** (2002). "Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants." P Natl Acad Sci USA **99**(18): 11908-11913.

**Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D. und Wakabayashi, N.** (2005). "Keap 1, the sensor for electrophiles and oxidants that regulates the phase 2 response, is a zinc metalloprotein." Biochemistry **44**(18): 6889-6899.

**Dip, R., Camenisch, U. und Naegeli, H.** (2004). "Mechanisms of DNA damage recognition and strand discrimination in human nucleotide excision repair." DNA Repair **3**(11): 1409-1423.

**Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M. und Rodriguez, H.** (2002). "Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement." Free Radic Biol Med **32**(11): 1102-1115.

**Dizdaroglu, M., Rao, G., Halliwell, B. und Gajewski, E.** (1991). "Damage to the DNA bases in mammalian chromatin by hydrogen-peroxide in the presence of ferric and cupric ions." Arch Biochem Biophys **285**(2): 317-324.

**Donauer, J., Schreck, I., Liebel, U. und Weiss, C.** (2012). "Role and interaction of p53, BAX and the stress-activated protein kinases p38 and JNK in benzo[a]pyrene-diolepoxide induced apoptosis in human colon carcinoma cells." Arch Toxicol **86**(2): 329-337.

**Ettlinger, M. G. und Lundeen, A. J.** (1956). "The structures of sinigrin and sinalbin; an enzymatic rearrangement." J Am Chem Soc **78**(16): 4172-4173.

**Ettlinger, M. G. und Lundeen, A. J.** (1957). "First synthesis of a mustard oil glucosinolate; the enzymatic Lossen rearrangement." J Am Chem Soc **79**(7): 1764-1765.

**Eustermann, S., Videler, H., Yang, J. C., Cole, P. T., Gruszka, D., Veprintsev, D. und Neuhaus, D.** (2011). "The DNA-binding domain of human PARP-1 interacts with DNA single-strand breaks as a monomer through its second zinc finger." J Mol Biol **407**(1): 149-170.

**Evans, E., Moggs, J. G., Hwang, J. R., Egly, J. M. und Wood, R. D.** (1997). "Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors." EMBO J **16**(21): 6559-6573.

**Fahey, J. W., Zalcmann, A. T. und Talalay, P.** (2001). "The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants." Phytochemistry **56**(1): 5-51.

**Fiala, J. L. A., Egner, P. A., Wiriyachan, N., Ruchirawat, M., Kensler, K. H., Wogan, G. N., Groopman, J. D., Croy, R. G. und Essigmann, J. M.** (2011). "Sulforaphane-mediated reduction of aflatoxin B<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-guanine in rat liver DNA: Impacts of strain and sex." Toxicol Sci **121**(1): 57-62.

**Fimognari, C., Sangiorgi, L., Capponcelli, S., Nusse, M., Fontanesi, S., Berti, F., Soddu, S., Cantelli-Forti, G. und Hrelia, P.** (2005). "A mutated p53 status did not prevent the induction of apoptosis by sulforaphane, a promising anti-cancer drug." Invest New Drugs **23**(3): 195-203.

**Fisher, A. E. O., Hochegger, H., Takeda, S. und Caldecott, K. W.** (2007). "Poly(ADP-ribose) polymerase 1 accelerates single-strand break repair in concert with poly(ADP-ribose) glycohydrolase." Mol Cell Biol **27**(15): 5597-5605.

**Ford, J. M. und Hanawalt, P. C.** (1995). "Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance." P Natl Acad Sci USA **92**(19): 8876-8880.

**Ford, J. M. und Hanawalt, P. C.** (1997). "Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts." J Biol Chem **272**(44): 28073-28080.

**Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., Sobol, R. W., Wilson, S. H. und Dogliotti, E.** (1998). "Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells." Biochemistry **37**(11): 3575-3580.

**Fosterer, M. und Mullenders, L. H.** (2008). "Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: Molecular mechanisms and biological effects." Cell Res **18**(1): 73-84.

**Friedberg, E. C.** (2001). "How nucleotide excision repair protects against cancer." Nat Rev Cancer **1**(1): 22-33.

**Friedberg, E. C.** (2005). "Suffering in silence: The tolerance of DNA damage." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(12): 943-953.

**Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schultz, R. A. und Ellenberger, T.** (2005). "DNA repair and mutagenesis." 2. Auflage, Washington, D.C., ASM Press.

**Frosina, G., Fortini, P., Rossi, O., Carrozzino, F., Raspaglio, G., Cox, L. S., Lane, D. P., Abbondandolo, A. und Dogliotti, E.** (1996). "Two pathways for base excision repair in mammalian cells." J Biol Chem **271**(16): 9573-9578.

**García-Díaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T. A. und Blanco, L.** (2001). "Identification of an intrinsic 5'-deoxyribose-5-phosphate lyase activity in human DNA polymerase  $\lambda$ : A possible role in base excision repair." J Biol Chem **276**(37): 34659-34663.

**Gasper, A. V., Al Janobi, A. A., Smith, J. A., Bacon, J. R., Fortun, P., Atherton, C., Taylor, M. A., Hawkey, C. J., Barrett, D. A. und Mithen, R. F.** (2005). "Glutathione S-transferase M1 polymorphism and metabolism of sulforaphane from standard and high-glucosinolate broccoli." Am J Clin Nutr **82** (6): 1283-1291

**Geacintov, N. E.** (1986). "Is intercalation a critical factor in the covalent binding of mutagenic and tumorigenic polycyclic aromatic diolepoxids to DNA." Carcinogenesis **7**(5): 759-766.

**Gills, J. J., Jeffery, E. H., Matusheski, N. V., Moon, R. C., Lantvit, D. D. und Pezzuto, J. M.** (2006). "Sulforaphane prevents mouse skin tumorigenesis during the stage of promotion." Cancer Lett **236**(1): 72-79.

**Glatt, H., Baasanjav-Gerber, C., Schumacher, F., Monien, B. H., Schreiner, M., Frank, H., Seidel, A. und Engst, W.** (2011). "1-Methoxy-3-indolylmethyl glucosinolate; a potent genotoxicant in bacterial and mammalian cells: Mechanisms of bioactivation." Chem Biol Interact **192**(1-2): 81-86.

**Godon, C., Cordelieres, F. P., Biard, D., Giocanti, N., Megnin-Chanet, F., Hall, J. und Favaudon, V.** (2008). "PARP inhibition versus PARP-1 silencing: Different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility." Nucleic Acids Res **36**(13): 4454-4464.

**Goodrich, R. M., Anderson, J. L. und Stowsand, G. S.** (1989). "Glucosinolate changes in blanched broccoli and brussels sprouts." J Food Process Preserv **13**(4): 275-280.

**Gradwohl, G., Ménissier-de Murcia, J., Molinete, M., Simonin, F., Koken, M., Hoeijmakers, J. H. J. und de Murcia, G.** (1990). "The second zinc-finger domain of poly(ADP-ribose)polymerase determines specificity for single stranded breaks in DNA." P Natl Acad Sci USA **87**(8): 2990-2994.

**Gunz, D., Hess, M. T. und Naegeli, H.** (1996). "Recognition of DNA adducts by human nucleotide excision repair - Evidence for a thermodynamic probing mechanism." J Biol Chem **271**(41): 25089-25098.

**Haack, M., Lowinger, M., Lippmann, D., Kipp, A., Pagnotta, E., Iori, R., Monien, B. H., Glatt, H., Brauer, M. N., Wessjohann, L. A. und Brigelius-Flohé, R.** (2010). "Breakdown products of neoglucobrassicin inhibit activation of nrf2 target genes mediated by myrosinase-derived glucoraphanin hydrolysis products." Biol Chem **391**(11): 1281-1293.

**Haber, F. und Weiss, J.** (1934). "The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts." Proc R Soc London, Ser A **147**(861): 332-351.

**Halkier, B. A. und Gershenzon, J.** (2006). "Biology and biochemistry of glucosinolates." Annu Rev Plant Biol **57**(1): 303-333.

**Hanawalt, P. C. und Spivak, G.** (2008). "Transcription-coupled DNA repair: Two decades of progress and surprises." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(12): 958-970.

**Hanschen, F. S., Brüggemann, N., Brodehl, A., Mewis, I., Schreiner, M., Rohn, S. und Kroh, L. W.** (2012). "Characterization of products from the reaction of glucosinolate-derived isothiocyanates with cysteine and lysine derivatives formed in either model systems or broccoli sprouts." J Agric Food Chem **60**(31): 7735-7745.

**Harris, K. E. und Jeffery, E. H.** (2008). "Sulforaphane and erucin increase MRP1 and MRP2 in human carcinoma cell lines." J Nutr Biochem **19**(4): 246-254.

**Hartwig, A.** (2000). "Recent advances in metal carcinogenicity." Pure Appl Chem **72**(6): 1007-1014.

**Hartwig, A.** (2013). "Metal interaction with redox regulation: An integrating concept in metal carcinogenesis?" Free Radic Biol Med **55**: 63-72.

**Hartwig, A., Asmuss, M., Ehleben, I., Herzer, U., Kostelac, D., Pelzer, A., Schwerdtle, T. und Bürkle, A.** (2002). "Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms." Environ Health Perspect **110**(suppl 5): 797-799.

**Hartwig, A., Dally, H. und Schlepegrell, R.** (1996). "Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: Use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding." Toxicol Lett **88**(1-3): 85-90.

**Hartwig, A., Klyszcznasko, H., Schlepegrell, R. und Beyersmann, D.** (1993). "Cellular-damage by ferric nitrilotriacetate and ferric citrate in V79-cells - Interrelationship between lipid-peroxidation, DNA strand breaks and sister chromatid exchanges." Carcinogenesis **14**(1): 107-112.

**He, Z. G., Henricksen, L. A., Wold, M. S. und Ingles, C. J.** (1995). "RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision-repair." Nature **374**(6522): 566-569.

**Heeres, J. T. und Hergenrother, P. J.** (2007). "Poly(ADP-ribose) makes a date with death." Curr Opin Chem Biol **11**(6): 644-653.

**Hess, N. J., Buchko, G. W., Conradson, S. D., Espinosa, F. J., Ni, S. S., Thrall, B. D. und Kennedy, M. A.** (1998). "Human nucleotide excision repair protein XPA: Extended x-ray absorption fine-structure evidence for a metal-binding domain." Protein Sci **7**(9): 1970-1975.

**Higdon, J. V., Delage, B., Williams, D. E. und Dashwood, R. H.** (2007). "Cruciferous vegetables and human cancer risk: Epidemiologic evidence and mechanistic basis." Pharmacol Res **55**(3): 224-236.

**Hirrlinger, J., König, J., Keppler, D., Lindenau, J., Schulz, J. B. und Dringen, R.** (2001). "The multidrug resistance protein MRP1 mediates the release of glutathione disulfide from rat astrocytes during oxidative stress." J Neurochem **76**(2): 627-636.

**Hoeijmakers, J. H. J.** (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." Nature **411**(6835): 366-374.

**Hong, F., Freeman, M. L. und Liebler, D. C.** (2005). "Identification of sensor cysteines in human Keap 1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane." Chem Res Toxicol **18**(12): 1917-1926.

**Howard, L. A., Jeffery, E. H., Wallig, M. A. und Klein, B. P.** (1997). "Retention of phytochemicals in fresh and processed broccoli." J Food Sci **62**(6): 1098-1104.

**IARC** (2010). "Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures" IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans **92**: 1-868.

**IARC** (2012). "A review of human carcinogens: Chemical agents and related occupations." IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans **100F**: 111-144.

**Ikegami, T., Kuraoka, I., Saijo, M., Kodo, N., Kyogoku, Y., Morikawa, K., Tanaka, K. und Shirakawa, M.** (1998). "Solution structure of the DNA- and RPA-binding domain of the human repair factor XPA." Nat Struct Biol **5**(8): 701-706.

**Ikejima, M., Noguchi, S., Yamashita, R., Ogura, T., Sugimura, T., Gill, D. M. und Miwa, M.** (1990). "The zinc fingers of human poly(ADP-ribose)polymerase are differentially required for the recognition of DNA breaks and nicks and the consequent enzyme activation - Other structures recognize intact DNA." J Biol Chem **265**(35): 21907-21913.

**Imlay, J. A. und Linn, S.** (1988). "DNA damage and oxygen radical toxicity." Science **240**(4857): 1302-1309.

**Ishikawa, T., Zhang, S. S. M., Qin, X. S., Takahashi, Y., Oda, H., Nakatsuru, Y. und Ide, F.** (2004). "DNA repair and cancer: Lessons from mutant mouse models." Cancer Sci **95**(2): 112-117.

**Izumi, T., Hazra, T. K., Boldogh, I., Tomkinson, A. E., Park, M. S., Ikeda, S. und Mitra, S.** (2000). "Requirement for human AP endonuclease 1 for repair of 3'-blocking damage at DNA single-strand breaks induced by reactive oxygen species." Carcinogenesis **21**(7): 1329-1334.

**Janićijević, A., Sugasawa, K., Shimizu, Y., Hanaoka, F., Wijgers, N., Djurica, M., Hoeijmakers, J. H. J. und Wyman, C.** (2003). "DNA bending by the human damage recognition complex XPC-HR23B." DNA Repair **2**(3): 325-336.

**Jin, C. Y., Moon, D. O., Lee, J. D., Heo, M. S., Choi, Y. H., Lee, C. M., Park, Y. M. und Kim, G. Y.** (2007). "Sulforaphane sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis through downregulation of ERK and Akt in lung adenocarcinoma A549 cells." Carcinogenesis **28**(5): 1058-1066.

**Jones, C. J. und Wood, R. D.** (1993). "Preferential binding of the xeroderma pigmentosum group-A complementing protein to damaged DNA." Biochemistry **32**(45): 12096-12104.

**Juge, N., Mithen, R. F. und Traka, M.** (2007). "Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: A comprehensive review." Cell Mol Life Sci **64**(9): 1105-1127.

**Kang, T. H., Reardon, J. T. und Sancar, A.** (2010). "Regulation of nucleotide excision repair activity by transcriptional and post-transcriptional control of the XPA protein." Nucleic Acids Res **39**(8): 3176-3187.

**Kantor, G. J. und Hull, D. R.** (1984). "The rate of removal of pyrimidine dimers in quiescent cultures of normal human and xeroderma pigmentosum-cells." Mutat Res **132**(1-2): 21-31.

**Kassahun, K., Davis, M., Hu, P., Martin, B. und Baillie, T.** (1997). "Biotransformation of the naturally occurring isothiocyanate sulforaphane in the rat: Identification of phase I metabolites and glutathione conjugates." Chem Res Toxicol **10**(11): 1228-1233.

**Kathe, S. D., Shen, G.-P. und Wallace, S. S.** (2004). "Single-stranded breaks in DNA but not oxidative DNA base damages block transcriptional elongation by RNA polymerase II in HeLa cell nuclear extracts." J Biol Chem **279**(18): 18511-18520.

**Keck, A. S. und Finley, J. W.** (2006). "Aqueous extracts of selenium-fertilized broccoli increase selenoprotein activity and inhibit DNA single-strand breaks, but decrease the activity of quinone reductase in Hepa 1c1c7 cells." Food Chem Toxicol **44**(5): 695-703.

**Keil, C., Petermann, E. und Oei, S. L.** (2004). "Tannins elevate the level of poly(ADP-ribose) in HeLa cell extracts." Arch Biochem Biophys **425**(1): 115-121.

**Kim, B.-R., Hu, R., Keum, Y.-S., Hebbar, V., Shen, G., Nair, S. S. und Kong, A.-N. T.** (2003). "Effects of glutathione on antioxidant response element-mediated gene expression and apoptosis elicited by sulforaphane." Cancer Res **63**(21): 7520-7525.

**Kim, H., Kim, E. H., Eom, Y. W., Kim, W. H., Kwon, T. K., Lee, S. J. und Choi, K. S.** (2006). "Sulforaphane sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-resistant hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated up-regulation of DR5." Cancer Res **66**(3): 1740-1750.

**Kim, H. Y. und Gladyshev, V. N.** (2004). "Methionine sulfoxide reduction in mammals: Characterization of methionine-R-sulfoxide reductases." Mol Biol Cell **15**(3): 1055-1064.

**Kim, M. Y., Mauro, S., Gévry, N., Lis, J. T. und Kraus, W. L.** (2004). "NAD<sup>+</sup>-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1." Cell **119**(6): 803-814.

**King, B. S., Cooper, K. L., Liu, K. J. und Hudson, L. G.** (2012). "Poly(ADP-ribose) contributes to an association between poly(ADP-ribose) polymerase-1 and xeroderma pigmentosum complementation group A in nucleotide excision repair." J Biol Chem **287** (47 ): 39824-39833

**Klungland, A. und Lindahl, T.** (1997). "Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: Reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1)." EMBO J **16**(11): 3341-3348.

**Köberle, B., Roginskaya, V. und Wood, R. D.** (2006). "XPA protein as a limiting factor for nucleotide excision repair and UV sensitivity in human cells." DNA Repair **5**(5): 641-648.

**Kolm, R. H., Danielson, U. H., Zhang, Y., Talalay, P. und Mannervik, B.** (1995). "Isothiocyanates as substrates for human glutathione transferases: Structure-activity studies." Biochem J **311**(2): 453-459.

**Koreeda, M., Moore, P. D., Wislocki, P. G., Levin, W., Conney, A. H., Yagi, H. und Jerina, D. M.** (1978). "Binding of benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides to DNA, RNA, and protein of mouse skin occurs with high stereoselectivity." Science **199**(4330): 778-781.

**Kumar, A. und Sabbioni, G.** (2010). "New biomarkers for monitoring the levels of isothiocyanates in humans." Chem Res Toxicol **23**(4): 756-765.

**Kumar, R. A., Koc, A., Cerny, R. L. und Gladyshev, V. N.** (2002). "Reaction mechanism, evolutionary analysis, and role of zinc in *Drosophila* methionine-R-sulfoxide reductase." J Biol Chem **277**(40): 37527-37535.

**Kunz, B. A., Straffon, A. F. L. und Vonarx, E. J.** (2000). "DNA damage-induced mutation: Tolerance via translesion synthesis." Mutat Res-Fundam Mol Mech Mutagen **451**(1-2): 169-185.

**Kushad, M. M., Brown, A. F., Kurilich, A. C., Juvik, J. A., Klein, B. P., Wallig, M. A. und Jeffery, E. H.** (1999). "Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*." J Agric Food Chem **47**(4): 1541-1548.

**Kuzminov, A.** (2001). "Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks." Proc Natl Acad Sci USA **98**(15): 8241-8246.

**Lan, L., Nakajima, S., Oohata, Y., Takao, M., Okano, S., Masutani, M., Wilson, S. H. und Yasui, A.** (2004). "In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells." P Natl Acad Sci USA **101**(38): 13738-13743.

**Langelier, M. F. und Pascal, J. M.** (2013). "PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis." Curr Opin Struct Biol **23**(1): 134-143.

**Langelier, M. F., Planck, J. L., Roy, S. und Pascal, J. M.** (2011). "Crystal structures of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) zinc fingers bound to DNA structural and functional insights into DNA-dependent PARP-1 activity." J Biol Chem **286**(12): 10690-10701.

**Langelier, M. F., Ruhl, D. D., Planck, J. L., Kraus, W. L. und Pascal, J. M.** (2010). "The Zn<sub>3</sub> domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) functions in both DNA-dependent poly(ADP-ribose) synthesis activity and chromatin compaction." J Biol Chem **285**(24): 18877-18887.

**Langelier, M. F., Servent, K. M., Rogers, E. E. und Pascal, J. M.** (2008). "A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation." J Biol Chem **283**(7): 4105-4114.

**Le Cam, E., Fack, F., Ménissier-de Murcia, J., Cogne, J. A. H., Barbin, A., Sarantoglou, V., Révet, B., Delain, E. und de Murcia, G.** (1994). "Conformational analysis of a 139 base-pair DNA fragment containing a single-stranded break and its interaction with human poly(ADP-ribose) polymerase." J Mol Biol **235**(3): 1062-1071.

**Lehmann, A. R., McGibbon, D. und Stefanini, M.** (2011) "Xeroderma pigmentosum." Orphanet J Rare Dis **6**, 70.

**Leppard, J. B., Dong, Z. W., Mackey, Z. B. und Tomkinson, A. E.** (2003). "Physical and functional interaction between DNA ligase III alpha and poly(ADP-ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair." Mol Cell Biol **23**(16): 5919-5927.

**Léveillard, T., Andera, L., Bissonnette, N., Schaeffer, L., Bracco, L., Egly, J. M. und Wasylyk, B.** (1996). "Functional interactions between p53 and the TFIIH complex are affected by tumour-associated mutations." EMBO J **15**(7): 1615-1624.

**Levine, A. J.** (2009). "The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: The inactivation of tumor suppressor gene products: p53." Virology **384**(2): 285-293.

**Li, L., Lu, X. Y., Peterson, C. A. und Legerski, R. J.** (1995a). "An interaction between the DNA-repair factor XPA and replication protein-A appears essential for nucleotide excision-repair." Mol Cell Biol **15**(10): 5396-5402.

**Li, L., Peterson, C. A., Lu, X. Y. und Legerski, R. J.** (1995b). "Mutations in XPA that prevent association with ERCC1 are defective in nucleotide excision-repair." Mol Cell Biol **15**(4): 1993-1998.

**Li, Z. K., Musich, P. R., Serrano, M. A., Dong, Z. P. und Zou, Y.** (2011) "XPA-mediated regulation of global nucleotide excision repair by ATR is p53-dependent and occurs primarily in S-phase." PloS One **6**(12), e28326.

**Liu, Y. C., Hsieh, C. W., Weng, Y. C., Chuang, S. H., Hsieh, C. Y. und Wung, B. S.** (2008). "Sulforaphane inhibition of monocyte adhesion via the suppression of ICAM-1 and NF-kappa B is dependent upon glutathione depletion in endothelial cells." Vasc Pharmacol **48**(1): 54-61.

**Lloyd, D. R. und Hanawalt, P. C.** (2000). "p53-dependent global genomic repair of benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide adducts in human cells." Cancer Res **60**(3): 517-521.

**Lu, S. C.** (2013). "Glutathione synthesis." BBA - Gen Subjects **1830**(5): 3143-3153.

**Mangal, D., Vudathala, D., Park, J. H., Lee, S. H., Penning, T. M. und Blair, I. A.** (2009). "Analysis of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in cellular DNA during oxidative stress." Chem Res Toxicol **22**(5): 788-797.

**Maret, W.** (2004). "Zinc and sulfur: A critical biological partnership." Biochemistry **43**(12): 3301-3309.

**Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Ménissier-de Murcia, J. und de Murcia, G.** (1998). "XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage." Mol Cell Biol **18**(6): 3563-3571.

**Matsuda, T., Saijo, M., Kuraoka, I., Kobayashi, T., Nakatsu, Y., Nagai, A., Enjoji, T., Masutani, C., Sugawara, K., Hanaoka, F., Yasui, A. und Tanaka, K.** (1995). "DNA repair protein XPA binds replication protein A (RPA)." J Biol Chem **270**(8): 4152-4157.

**Matsunaga, T., Mu, D., Park, C. H., Reardon, J. T. und Sancar, A.** (1995). "Human DNA repair excision nuclease - Analysis of the roles of the subunits involved in dual incisions by using anti-XPG and anti-ERCC1 antibodies." J Biol Chem **270**(35): 20862-20869.

**Matthews, J. M. und Sunde, M.** (2002). "Zinc fingers - Folds for many occasions." IUBMB Life **54**(6): 351-355.

**Matusheski, N. V., Wallig, M. A., Juvik, J. A., Klein, B. P., Kushad, M. M. und Jeffery, E. H.** (2001). "Preparative HPLC method for the purification of sulforaphane and sulforaphane nitrile from *Brassica oleracea*." J Agric Food Chem **49**(4): 1867-1872.

**Maydt, D., De Spirt, S., Muschelknautz, C., Stahl, W. und Müller, T. J. J.** (2013). "Chemical reactivity and biological activity of chalcones and other alpha,beta-unsaturated carbonyl compounds." Xenobiotica **43**(8): 711-718.

**McCoull, K. D., Rindgen, D., Blair, I. A. und Penning, T. M.** (1999). "Synthesis and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinone depurinating N<sup>7</sup>-guanine adducts." Chem Res Toxicol **12**(3): 237-246.

**McDowell, M. L., Nguyen, T. und Cleaver, J. E.** (1993). "A single-site mutation in the XPAC gene alters photoproduct recognition." Mutagenesis **8**(2): 155-161.

**McGregor, W. G., Wei, D., Chen, R. H., Maher, V. M. und McCormick, J. J.** (1997). "Relationship between adduct formation, rates of excision repair and the cytotoxic and mutagenic effects of structurally-related polycyclic aromatic carcinogens." Mutat Res-Fundam Mol Mech Mutagen **376**(1-2): 143-152.

**McWalter, G. K., Higgins, L. G., McLellan, L. I., Henderson, C. J., Song, L., Thornalley, P. J., Itoh, K., Yamamoto, M. und Hayes, J. D.** (2004). "Transcription factor nrf2 is essential for induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, glutathione S-transferases, and glutamate cysteine ligase by broccoli seeds and isothiocyanates." J Nutr **134**(12): 3499S-3506S.

**Meehan, T. und Straub, K.** (1979). "Double-stranded DNA stereoselectively binds benzo[a]pyrene diol epoxides." Nature **277**(5695): 410-412.

**Melendez-Colon, V. J., Luch, A., Seidel, A. und Baird, W. M.** (1999). "Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites." Carcinogenesis **20**(10): 1885-1891.

**Mello, A. C. und Meneghini, R.** (1984). "In vivo formation of single-strand breaks in DNA by hydrogen-peroxide is mediated by the Haber-Weiss reaction." Biochim Biophys Acta **781**(1-2): 56-63.

**Mellon, I., Hock, T., Reid, R., Porter, P. C. und States, J. C.** (2002). "Polymorphisms in the human xeroderma pigmentosum group A gene and their impact on cell survival and nucleotide excision repair." DNA Repair **1**(7): 531-546.

**Mendes, F., Groessl, M., Nazarov, A. A., Tsybin, Y. O., Sava, G., Santos, I., Dyson, P. J. und Casini, A.** (2011). "Metal-based inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase - The guardian angel of DNA." *J Med Chem* **54**(7): 2196-2206.

**Mi, L., Wang, X., Govind, S., Hood, B. L., Veenstra, T. D., Conrads, T. P., Saha, D. T., Goldman, R. und Chung, F.-L.** (2007). "The role of protein binding in induction of apoptosis by phenethyl isothiocyanate and sulforaphane in human non-small lung cancer cells." *Cancer Res* **67**(13): 6409-6416.

**Mi, L., Xiao, Z., Hood, B. L., Dakshanamurthy, S., Wang, X., Govind, S., Conrads, T. P., Veenstra, T. D. und Chung, F.-L.** (2008). "Covalent binding to tubulin by isothiocyanates: A mechanism of cell growth arrest and apoptosis." *J Biol Chem* **283**(32): 22136-22146.

**Miller, K. P. und Ramos, K. S.** (2001). "Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons." *Drug Metab Rev* **33**(1): 1-35.

**Missura, M., Buterin, T., Hindges, R., Hübscher, U., Kaspárková, J., Brabec, V. und Naegeli, H.** (2001). "Double-check probing of DNA bending and unwinding by XPA-RPA: An architectural function in DNA repair." *EMBO J* **20**(13): 3554-3564.

**Miyamoto, I., Miura, N., Niwa, H., Miyazaki, J. und Tanaka, K.** (1992). "Mutational analysis of the structure and function of the xeroderma-pigmentosum group-A complementing protein - Identification of essential domains for nuclear-localization and DNA excision repair." *J Biol Chem* **267**(17): 12182-12187.

**Moggs, J. G., Yarema, K. J., Essigmann, J. M. und Wood, R. D.** (1996). "Analysis of incision sites produced by human cell extracts and purified proteins during nucleotide excision repair of a 1,3-intrastrand d(GpTpG)-cisplatin adduct." *J Biol Chem* **271**(12): 7177-7186.

**Morgan, B., Ezerina, D., Amoako, T. N. E., Riemer, J., Seedorf, M. und Dick, T. P.** (2013). "Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis." *Nat Chem Biol* **9**(2): 119-125.

**Morita, E. H., Ohkubo, T., Kuraoka, I., Shirakawa, M., Tanaka, K. und Morikawa, K.** (1996). "Implications of the zinc-finger motif found in the DNA-binding domain of the human XPA protein." *Genes Cells* **1**(5): 437-442.

**Mortusewicz, O., Rothbauer, U., Cardoso, M. C. und Leonhardt, H.** (2006). "Differential recruitment of DNA ligase I and III to DNA repair sites." *Nucleic Acids Res* **34**(12): 3523-3532.

**Mu, D., Hsu, D. S. und Sancar, A.** (1996). "Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease." *J Biol Chem* **271**(14): 8285-8294.

**Mu, D., Wakasugi, M., Hsu, D. S. und Sancar, A.** (1997). "Characterization of reaction intermediates of human excision repair nuclease." *J Biol Chem* **272**(46): 28971-28979.

**Nagai, A., Saijo, M., Kuraoka, I., Matsuda, T., Kodo, N., Nakatsu, Y., Mimaki, T., Mino, M., Biggerstaff, M., Wood, R. D., Sijbers, A., Hoeijmakers, J. H. J. und Tanaka, K.** (1995). "Enhancement of damage-specific DNA binding of XPA by interaction with the ERCC1 DNA repair protein." Biochem Biophys Res Commun **211**(3): 960-966.

**Nakamura, J., Walker, V. E., Upton, P. B., Chiang, S. Y., Kow, Y. W. und Swenberg, J. A.** (1998). "Highly sensitive apurinic/apyrimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions." Cancer Res **58**(2): 222-225.

**Nocentini, S., Coin, F., Saijo, M., Tanaka, K. und Egly, J. M.** (1997). "DNA damage recognition by XPA protein promotes efficient recruitment of transcription factor II H." J Biol Chem **272**(37): 22991-22994.

**Oei, S. L. und Ziegler, M.** (2000). "ATP for the DNA ligation step in base excision repair is generated from poly(ADP-ribose)." J Biol Chem **275**(30): 23234-23239.

**Pappa, G., Bartsch, H. und Gerhäuser, C.** (2007). "Biphasic modulation of cell proliferation by sulforaphane at physiologically relevant exposure times in a human colon cancer cell line." Mol Nutr Food Res **51**(8): 977-984.

**Pappa, G., Lichtenberg, M., Iori, R., Barillari, J., Bartsch, H. und Gerhäuser, C.** (2006). "Comparison of growth inhibition profiles and mechanisms of apoptosis induction in human colon cancer cell lines by isothiocyanates and indoles from Brassicaceae." Mutat Res-Fundam Mol Mech Mutagen **599**(1-2): 76-87.

**Park, C. H., Mu, D., Reardon, J. T. und Sancar, A.** (1995). "The general transcription-repair factor TFIIH is recruited to the excision-repair complex by the XPA protein independent of the TFIIIE transcription factor." J Biol Chem **270**(9): 4896-4902.

**Park, C. J. und Choi, B. S.** (2006). "The protein shuffle - Sequential interactions among components of the human nucleotide excision repair pathway." FEBS J **273**(8): 1600-1608.

**Park, J.-H., Mangal, D., Tacka, K. A., Quinn, A. M., Harvey, R. G., Blair, I. A. und Penning, T. M.** (2008). "Evidence for the aldo-keto reductase pathway of polycyclic aromatic trans-dihydrodiol activation in human lung A549 cells." P Natl Acad Sci USA **105**(19): 6846-6851.

**Penning, T. M., Ohnishi, S. T., Ohnishi, T. und Harvey, R. G.** (1996). "Generation of reactive oxygen species during the enzymatic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase." Chem Res Toxicol **9**(1): 84-92.

**Perlow, R. A., Kolbanovskii, A., Hingerty, B. E., Geacintov, N. E., Broyde, S. und Scicchitano, D. A.** (2002). "DNA adducts from a tumorigenic metabolite of benzo[a]pyrene block human RNA polymerase II elongation in a sequence- and stereochemistry-dependent manner." J Mol Biol **321**(1): 29-47.

**Petri, N., Tannergren, C., Holst, B., Mellon, F. A., Bao, Y., Plumb, G. W., Bacon, J., O'Leary, K. A., Kroon, P. A., Knutson, L., Forsell, P., Eriksson, T., Lennernas, H. und Williamson, G.** (2003). "Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II enzymes, in human jejunum in vivo." Drug Metab Dispos **31**(6): 805-813.

**Phillips, D. H.** (1999). "Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet." Mutat Res-Gen Tox En **443**(1-2): 139-147.

**Piberger, A. L., Köberle, B. und Hartwig, A.** (2014). "The broccoli-born isothiocyanate sulforaphane impairs nucleotide excision repair: XPA as one potential target." Arch Toxicol **88**(3): 647-658.

**Porter, P. C., Mellon, I. und States, J. C.** (2005). "XP-A cells complemented with Arg228Gln and Val234Leu polymorphic XPA alleles repair BPDE-induced DNA damage better than cells complemented with the wild type allele." DNA Repair **4**(3): 341-349.

**Prasad, R., Dianov, G. L., Bohr, V. A. und Wilson, S. H.** (2000). "FEN1 stimulation of DNA polymerase  $\beta$  mediates an excision step in mammalian long patch base excision repair." J Biol Chem **275**(6): 4460-4466.

**Prasad, R., Lavrik, O. I., Kim, S.-J., Kedar, P., Yang, X.-P., Vande Berg, B. J. und Wilson, S. H.** (2001). "DNA polymerase  $\beta$ -mediated long patch base excision repair: Poly(ADP-ribose) polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis." J Biol Chem **276**(35): 32411-32414.

**Quintana-Cabrera, R. und Bolanos, J. P.** (2013). "Glutathione and gamma-glutamylcysteine in hydrogen peroxide detoxification." Method Enzymol **527**: 129-144.

**Rademakers, S., Volker, M., Hoogstraten, D., Nigg, A. L., Moné, M. J., van Zeeland, A. A., Hoeijmakers, J. H. J., Houtsmuller, A. B. und Vermeulen, W.** (2003). "Xeroderma pigmentosum group A protein loads as a separate factor onto DNA lesions." Mol Cell Biol **23**(16): 5755-5767.

**Rebbeor, J. F., Wang, W., Clifton, D. und Ballatori, N.** (1998). "Glutathione S-conjugate formation and metabolism in HepG2 cells: A cell model of mercapturic acid biosynthesis." J Toxicol Environ Health Part A **53**(8): 651-663.

**Rhaese, H. J. und Freese, E.** (1968). "Chemical analysis of DNA alterations I: Base liberation and backbone breakage of DNA and oligodeoxyadenylic acid induced by hydrogen peroxide and hydroxylamine." Biochim Biophys Acta **155**(2): 476-490.

**Rhaese, H. J., Freese, E. und Melzer, M. S.** (1968). "Chemical analysis of DNA alterations 2: Alteration and liberation of bases of deoxynucleotides and deoxynucleosides induced by hydrogen peroxide and hydroxylamine." Biochim Biophys Acta **155**(2): 491-504.

**Rhee, S. G., Yang, K. S., Kang, S. W., Woo, H. A. und Chang, T. S.** (2005). "Controlled elimination of intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification." Antioxid Redox Signal **7**(5-6): 619-626.

**Robu, M., Shah, R. G., Petitclerc, N., Brind'Amour, J., Kandan-Kulangara, F. und Shah, G. M.** (2013). "Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the removal of UV-induced DNA lesions by nucleotide excision repair." P Natl Acad Sci USA **110**(5): 1658-1663

**Rojas, M., Alexandrov, K., van Schooten, F.-J., Hillebrand, M., Kriek, E. und Bartsch, H.** (1994). "Validation of a new fluorometric assay for benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adducts in human white blood cells: Comparisons with <sup>32</sup>P-postlabeling and ELISA." *Carcinogenesis* **15**(3): 557-560

**Rokita, S. E. und Romero-Fredes, L.** (1992). "The ensemble reactions of hydroxyl radical exhibit no specificity for primary or secondary structure of DNA." *Nucleic Acids Res* **20**(12): 3069-3072.

**Rolli, V., O'Farrell, M., Ménissier-de Murcia, J. und de Murcia, G.** (1997). "Random mutagenesis of the poly(ADP-ribose) polymerase catalytic domain reveals amino acids involved in polymer branching." *Biochemistry* **36**(40): 12147-12154.

**Roots, R. und Okada, S.** (1975). "Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in x-ray-induced DNA strand breaks or killing of mammalian-cells." *Radiat Res* **64**(2): 306-320.

**Rubbi, C. P. und Milner, J.** (2003). "p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage." *EMBO J* **22**(4): 975-986.

**Rungapamestry, V., Duncan, A. J., Fuller, Z. und Ratcliffe, B.** (2007). "Effect of meal composition and cooking duration on the fate of sulforaphane following consumption of broccoli by healthy human subjects." *Br J Nutr* **97**(4): 644-652.

**Saha, S., Hollands, W., Teucher, B., Needs, P. W., Narbad, A., Ortori, C. A., Barrett, D. A., Rossiter, J. T., Mithen, R. F. und Kroon, P. A.** (2012). "Isothiocyanate concentrations and interconversion of sulforaphane to erucin in human subjects after consumption of commercial frozen broccoli compared to fresh broccoli." *Mol Nutr Food Res* **56**(12): 1906-1916.

**Saijo, M., Kuraoka, I., Masutani, C., Hanaoka, F. und Tanaka, K.** (1996). "Sequential binding of DNA repair proteins RPA and ERCC1 to XPA in vitro." *Nucleic Acids Res* **24**(23): 4719-4724.

**Schumacher, F., Herrmann, K., Florian, S., Engst, W. und Glaff, H.** (2013). "Optimized enzymatic hydrolysis of DNA for LC-MS/MS analyses of adducts of 1-methoxy-3-indolylmethyl glucosinolate and methyleugenol." *Anal Biochem* **434**(1): 4-11.

**Schwerdtle, T., Seidel, A. und Hartwig, A.** (2002). "Effect of soluble and particulate nickel compounds on the formation and repair of stable benzo[a]pyrene DNA adducts in human lung cells." *Carcinogenesis* **23**(1): 47-53.

**Seow, A., Vainio, H. und Yu, M. C.** (2005). "Effect of glutathione-S-transferase polymorphisms on the cancer preventive potential of isothiocyanates: An epidemiological perspective." *Mutat Res-Fundam Mol Mech Mutagen* **592**(1-2): 58-67.

**Shapiro, T. A., Fahey, J. W., Wade, K. L., Stephenson, K. K. und Talalay, P.** (2001). "Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: Metabolism and excretion in humans." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**(5): 501-508.

**Sharov, V. S., Briviba, K. und Sies, H.** (1999). "Peroxynitrite diminishes gap junctional communication: Protection by selenite supplementation." *IUBMB Life* **48**(4): 379-384.

**Singh, A. V., Xiao, D., Lew, K. L., Dhir, R. und Singh, S. V.** (2004). "Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells and retards growth of PC-3 xenografts in vivo." *Carcinogenesis* **25**(1): 83-90.

**Singletary, K. und MacDonald, C.** (2000). "Inhibition of benzo[a]pyrene- and 1,6-dinitropyrene-DNA adduct formation in human mammary epithelial cells by dibenzoylmethane and sulforaphane." *Cancer Lett* **155**(1): 47-54.

**Srogi, K.** (2007). "Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: A review." *Environ Chem Lett* **5**(4): 169-195.

**Steinbrecher, A. und Linseisen, J.** (2009). "Dietary intake of individual glucosinolates in participants of the EPIC-Heidelberg cohort study." *Ann Nutr Metab* **54**(2): 87-96.

**Ström, C. E., Johansson, F., Uhlen, M., Szgyarto, C. A., Erixon, K. und Helleday, T.** (2011). "Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate." *Nucleic Acids Res* **39**(8): 3166-3175.

**Stucki, M., Pascucci, B., Parlanti, E., Fortini, P., Wilson, S. H., Hübscher, U. und Dogliotti, E.** (1998). "Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon." *Oncogene* **17**(7): 835-843.

**Sugasawa, K., Masutani, C., Uchida, A., Maekawa, T., van der Spek, P. J., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H. J. und Hanaoka, F.** (1996). "hHR23B, a human rad23 homolog, stimulates XPC protein in nucleotide excision repair in vitro." *Mol Cell Biol* **16**(9): 4852-4861.

**Sugasawa, K., Ng, J. M., Masutani, C., Maekawa, T., Uchida, A., van der Spek, P. J., Eker, A. P., Rademakers, S., Visser, C., Aboussekhra, A., Wood, R. D., Hanaoka, F., Bootsma, D. und Hoeijmakers, J. H. J.** (1997). "Two human homologs of rad23 are functionally interchangeable in complex formation and stimulation of XPC repair activity." *Mol Cell Biol* **17**(12): 6924-6931.

**Tanaka, K., Miura, N., Satokata, I., Miyamoto, I., Yoshida, M. C., Satoh, Y., Kondo, S., Yasui, A., Okayama, H. und Okada, Y.** (1990). "Analysis of a human DNA excision repair gene involved in group-A xeroderma-pigmentosum and containing a zinc-finger domain." *Nature* **348**(6296): 73-76.

**Tao, Z. H., Gao, P., Hoffman, D. W. und Liu, H. W.** (2008). "Domain c of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 is important for enzyme activity and contains a novel zinc-ribbon motif." *Biochemistry* **47**(21): 5804-5813.

**Temviriyankul, P., Meijers, M., van Hees-Stuivenberg, S., Boei, J. J. W. A., Delbos, F., Ohmori, H., de Wind, N. und Jansen, J. G.** (2012). "Different sets of translesion synthesis DNA polymerases protect from genome instability induced by distinct food-derived genotoxins." *Toxicol Sci* **127**(1): 130-138.

**Thangstad, O. P., Evjen, K. und Bones, A.** (1991). "Immunogold-EM localization of myrosinase in Brassicaceae." Protoplasma **161**(2): 85-93.

**Thimmulappa, R. K., Mai, K. H., Srisuma, S., Kensler, T. W., Yamamoto, M. und Biswal, S.** (2002). "Identification of *nrf2*-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray." Cancer Res **62**(18): 5196-5203.

**Thoma, B. S. und Vasquez, K. M.** (2003). "Critical DNA damage recognition functions of XPC-hHR23B and XPA-RPA in nucleotide excision repair." Mol Carcinogen **38**(1): 1-13.

**Thoms, K. M., Kuschal, C. und Emmert, S.** (2007). "Lessons learned from DNA repair defective syndromes." Exp Dermatol **16**(6): 532-544.

**Tietze, F.** (1969). "Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues." Anal Biochem **27**(3): 502-522.

**Topè, A. M. und Rogers, P. F.** (2009). "Evaluation of protective effects of sulforaphane on DNA damage caused by exposure to low levels of pesticide mixture using comet assay." J Environ Sci Health, Part B **44**(7): 657 - 662.

**Trucco, C., Rolli, V., Oliver, F. J., Flatter, E., Masson, M., Dantzer, F., Niedergang, C., Dutrillaux, B., Ménissier-de Murcia, J. und de Murcia, G.** (1999). "A dual approach in the study of poly (ADP-ribose) polymerase: In vitro random mutagenesis and generation of deficient mice." Mol Cell Biochem **193**(1-2): 53-60.

**Verhoeven, D. T. H., Goldbohm, R. A., van Poppel, G., Verhagen, H. und van den Brandt, P.** (1996). "Epidemiological studies on Brassica vegetables and cancer risk." Cancer Epidem Biomar **5**: 733-748.

**Vermeulen, M., Klopping-Ketelaars, I. W. A. A., van den Berg, R. und Vaes, W. H. J.** (2008). "Bioavailability and kinetics of sulforaphane in humans after consumption of cooked versus raw broccoli." J Agric Food Chem **56**(22): 10505-10509.

**Vermeulen, M., van den Berg, R., Freidig, A. P., van Bladeren, P. J. und Vaes, W. H. J.** (2006). "Association between consumption of cruciferous vegetables and condiments and excretion in urine of isothiocyanate mercapturic acids." J Agric Food Chem **54**(15): 5350-5358.

**Vidal, A. E., Boiteux, S., Hickson, I. D. und Radicella, J. P.** (2001). "XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions." EMBO J **20**(22): 6530-6539.

**Volker, M., Moné, M. J., Karmakar, P., van Hoffen, A., Schul, W., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J. H. J., van Driel, R., van Zeeland, A. A. und Mullenders, L. H. F.** (2001). "Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo." Mol Cell **8**(1): 213-224.

**Wang, M., Mahrenholz, A. und Lee, S. H.** (2000). "RPA stabilizes the XPA-damaged DNA complex through protein-protein interaction." Biochemistry **39**(21): 6433-6439.

**Wang, M. L., Wu, W. Z., Wu, W. Q., Rosidi, B., Zhang, L. H., Wang, H. C. und Iliakis, G.** (2006). "PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways." *Nucleic Acids Res* **34**(21): 6170-6182.

**Wang, Q. E., Zhu, Q. Z., Wani, M. A., Wani, G., Chen, J. M. und Wani, A. A.** (2003). "Tumor suppressor p53 dependent recruitment of nucleotide excision repair factors XPC and TFIIH to DNA damage." *DNA Repair* **2**(5): 483-499.

**Wang, X. W., Yeh, H., Schaeffer, L., Roy, R., Moncollin, V., Egly, J. M., Wang, Z., Friedberg, E. C., Evans, M. K., Taffe, B. G., Bohr, V. A., Weeda, G., Hoeijmakers, J. H. J., Forrester, K. und Harris, C. C.** (1995). "p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity." *Nat Genet* **10**(2): 188-195.

**Wani, M. A., El-Mahdy, M. A., Hamada, F. M., Wani, G., Zhu, Q. H., Wang, Q. E. und Wani, A. A.** (2002). "Efficient repair of bulky anti-BPDE DNA adducts from non-transcribed DNA strand requires functional p53 but not p21(waf1)/(cip1) and pRb." *Mutat Res-Fundam Mol Mech Mutagen* **505**(1-2): 13-25.

**Wani, M. A., Zhu, Q. Z., El-Mahdy, M., Venkatachalam, S. und Wani, A. A.** (2000). "Enhanced sensitivity to anti-benzo[a]pyrene-diol-epoxide DNA damage correlates with decreased global genomic repair attributable to abrogated p53 function in human cells." *Cancer Res* **60**(8): 2273-2280.

**Whitehouse, C. J., Taylor, R. M., Thistlethwaite, A., Zhang, H., Karimi-Busheri, F., Lasko, D. D., Weinfeld, M. und Caldecott, K. W.** (2001). "XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair." *Cell* **104**(1): 107-117.

**Winters, T. A., Henner, W. D., Russell, P. S., McCullough, A. und Jorgensen, T. J.** (1994). "Removal of 3'-phosphoglycolate from DNA strand-break damage in an oligonucleotide substrate by recombinant human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1." *Nucleic Acids Res* **22**(10): 1866-1873.

**Xiao, D., Powolny, A. A., Antosiewicz, J., Hahm, E. R., Bommarreddy, A., Zeng, Y., Desai, D., Amin, S., Herman-Antosiewicz, A. und Singh, S. V.** (2009). "Cellular responses to cancer chemopreventive agent D,L-sulforaphane in human prostate cancer cells are initiated by mitochondrial reactive oxygen species." *Pharm Res* **26**(7): 1729-1738.

**Ye, L. und Zhang, Y.** (2001). "Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular glutathione and induction of phase 2 detoxification enzymes." *Carcinogenesis* **22**(12): 1987-1992.

**You, J.-S., Wang, M. und Lee, S.-H.** (2003). "Biochemical analysis of the damage recognition process in nucleotide excision repair." *J Biol Chem* **278**(9): 7476-7485.

**Youn, H. S., Kim, Y. S., Park, Z. Y., Kim, S. Y., Choi, N. Y., Joung, S. M., Seo, J. A., Lim, K. M., Kwak, M. K., Hwang, D. H. und Lee, J. Y.** (2010). "Sulforaphane suppresses oligomerization of TLR4 in a thiol-dependent manner." *J Immunol* **184**(1): 411-419.

**Yu, D., Sekine-Suzuki, E., Xue, L., Fujimori, A., Kubota, N. und Okayasu, R.** (2009). "Chemopreventive agent sulforaphane enhances radiosensitivity in human tumor cells." Int J Cancer **125**(5): 1205-1211.

**Zhang, Y. S.** (2000). "Role of glutathione in the accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates and their glutathione conjugates by murine hepatoma cells." Carcinogenesis **21**(6): 1175-1182.

**Zhang, Y. S.** (2001). "Molecular mechanism of rapid cellular accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates." Carcinogenesis **22**(3): 425-431.

**Zhang, Y. S.** (2012). "The molecular basis that unifies the metabolism, cellular uptake and chemopreventive activities of dietary isothiocyanates." Carcinogenesis **33**(1): 2-9.

**Zhang, Y. S. und Callaway, E. C.** (2002). "High cellular accumulation of sulphoraphane, a dietary anticarcinogen, is followed by rapid transporter-mediated export as a glutathione conjugate." Biochem J **364**(1): 301-307.

**Zhang, Y. S., Kensler, T. W., Cho, C.-G., Posner, G. H. und Talalay, P.** (1994). "Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates." P Natl Acad Sci USA **91**(8): 3147-3150.

**Zhang, Y. S., Kolm, R. H., Mannervik, B. und Talalay, P.** (1995). "Reversible conjugation of isothiocyanates with glutathione catalyzed by human glutathione transferases." Biochem Bioph Res Co **206**(2): 748-755.

**Zhang, Y. S. und Talalay, P.** (1998). "Mechanism of differential potencies of isothiocyanates as inducers of anticarcinogenic phase 2 enzymes." Cancer Res **58**(20): 4632-4639.

**Zhang, Y. S., Talalay, P., Cho, C. G. und Posner, G. H.** (1992). "A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli - Isolation and elucidation of structure." P Natl Acad Sci USA **89**(6): 2399-2403.

**Zhang, Y. S., Wade, K. L., Prestera, T. und Talalay, P.** (1996). "Quantitative determination of isothiocyanates, dithiocarbamates, carbon disulfide, and related thiocarbonyl compounds by cyclocondensation with 1,2-benzenedithiol." Anal Biochem **239**(2): 160-167.

**Zhou, X. X., Sun, X., Cooper, K. L., Wang, F., Liu, K. J. und Hudson, L. G.** (2011). "Arsenite interacts selectively with zinc finger proteins containing C3H1 or C4 motifs." J Biol Chem **286**(26): 22855-22863.

## 8. Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

(+)- <i>anti</i> -BPDE	(+)- <i>anti</i> -Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid
(ADP-R)-PL	(ADP-Ribose)-Proteinlyase
8oxoG	8-Hydroxyguanin
ADP	Adenosindiphosphat
AP	apurinisch/apyrimidinisch
APE1	<i>apurinic/apyrimidinic endonuclease 1</i>
ARE	<i>antioxidant/electrophil response element</i>
Arg	Arginin
AT	Acetyltransferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection (Zellbank)</i>
ATP	Adenosintriphosphat
B[a]P	Benzo[a]pyren
bzw.	beziehungsweise
CAT	Katalase
CGase	Cysteinylglycinase
cpm	<i>counts per minute</i>
C <sub>q</sub>	<i>cycle of quantification</i>
CYP 450	Cytochrom-P450-Oxidoreduktase
Cys	Cystein
d	Tag
DD	Dihydrodiol-Dehydrogenase
DDB 1/2	<i>damaged DNA-binding protein 1/2</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPH	Epoxidhydrolase
ERCC-1	<i>excision repair cross-complementing protein-1</i>
ERU	Erucin
ERU-Cys	Cystein-Konjugat von ERU
ERU-CysGly	Cystein-Glycin-Konjugat von ERU
ERU-GSH	GSH-Konjugat von ERU
ERU-NAC	N-Acetylcystein-Konjugat von ERU

## Anhang

---

ESI	Elektrospray-Ionisation
F	Fluoreszenz
FA	Ameisensäure (von <i>formic acid</i> )
FEN1	<i>flap endonuclease 1</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
FKS	fötales Kälberserum
GG-NER	<i>global genomic NER</i>
Gl.	Gleichung
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GRA	Glucoraphanin
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid (oxidierte Form von GSH)
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	$\gamma$ -Glutamyltranspeptidase
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hHR23 A/B	<i>human homolog of rad 23 A/B</i>
His	Histidin
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IFC	<i>integrated fluidic circuits</i>
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
KP-Puffer	Kaliumphosphat-Puffer
LC	<i>liquid chromatography</i>
Lig	DNA-Ligase
M	molar
MDB	<i>membran desalting buffer</i>
min	Minute
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MRP	<i>multidrug resistance-related protein</i>
MS	Massenspektroskopie
N	normal
NAC	N-Acetylcystein
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NaP-Puffer	Natriumphosphat-Puffer
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NLS	<i>nuclear localization signal</i>

## Anhang

---

NQO-1	NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase 1
nrf2	<i>nuclear factor-E2-related factor 2</i>
NTC	<i>no template control</i>
ox	oxidiert
PAR	Poly(ADP-Ribose)
PARG	Poly(ADP-Ribose)-Glykohydrolase
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PARYlierung	Poly(ADP-Ribosyl)ierung
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>proliferation cell nuclear antigen</i>
Pgp-1	P-Glycoprotein 1
PhIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridin
PNKP	<i>polynucleotide kinase 3'-phosphatase</i>
Pol	DNA-Polymerase
Prx	Peroxiredoxin
RC-SSBR	<i>replication-coupled single-strand break repair</i>
red	reduziert
RFC	<i>replication factor C</i>
RNAPII	RNA-Polymerase II
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (von <i>reactive oxygen species</i> )
ROX	Rhodamin-X
RP	<i>reversed phase</i>
RPA	<i>replication protein A</i>
rpm	Umdrehung pro Minute (von <i>revolutions per minute</i> )
RPMI-Medium	<i>Roswell Park Memorial Institute-Medium</i>
-RT	<i>-reverse transcriptase-Kontrolle</i>
RT-qPCR	<i>reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction</i>
SD	Standardabweichung (von <i>standard deviation</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat (von <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
sek	Sekunde
SFN	Sulforaphan
SFN-Cys	Cystein-Konjugat von SFN
SFN-CysGly	Cystein-Glycin-Konjugat von SFN
SFN-GSH	GSH-Konjugat von SFN
SFN-NAC	N-Acetylcystein-Konjugat von SFN
SSBR	<i>single-strand break repair</i>
SULT	Sulfotransferase
t <sub>1/2</sub>	Halbwertszeit
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TC-NER	<i>transcription-coupled NER</i>
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
tertBOH	<i>tert-Butanol</i>

<i>tert</i> BOOH	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
TFIIH	<i>transcription factor IIH</i>
THF	Tetrahydrofuran
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNB	5-Thio-2-nitrobenzoesäure
$t_R$	Retentionszeit
TRAIL	<i>tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
X	beliebige Aminosäure
XAB2	<i>XPA-binding protein 2</i>
XP	Xeroderma Pigmentosum
XPA	Xeroderma Pigmentosum A (Protein)
XRCC1	<i>x-ray repair cross-complementing protein 1</i>
z.B.	zum Beispiel
$\gamma$ -GCL	$\gamma$ -Glutamylcysteinilgase

## 8.2 Verwendete Chemikalien

(+)- <i>anti</i> -BPDE, > 99,8 %	A. Seidel (Grimmer-Stiftung)
1,4-Dithiotreitol, p.A.	Roth
<sup>32</sup> P- Nicotinamidadenindinukleotid, 800 Ci/mmol	Perkin Elmer
4-(2-Pyridylazo)resorcinol, p.A.	Fluka
5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure), ≥ 99 %, p.A.	Roth
5-Sulfosalicylsäure, ≥ 99 %	Roth
Acetonitril, HPLC grade	Acros
Ameisensäure, ≥ 98 %	Roth
Ammoniumacetat, ≥ 96 %, reinst	Roth
<i>Anti</i> -Maus-Antikörper, FITC-gekoppelt (Herkunft: Ziege)	Santa Cruz
<i>Anti</i> -PAR-Antikörper 10H (Herkunft: Maus)	Isolation AK Hartwig
<i>assay loading reagent</i> (2-fach)	Fluidigm
Chloroform, HPLC grade	Roth
di-Kaliumhydrogenphosphat, ≥ 99 %, p.A.	Roth
Dimethylsulfoxid, ≥ 99,9 %	Sigma Aldrich
di-Natriumhydrogenphosphat, ≥ 99 %, p.A.	Roth
DMEM	Sigma Aldrich
<i>DNA binding dye sample loading reagent</i> (20-fach)	Fluidigm
<i>DNA suspension buffer</i>	TEKnova
<i>Ee</i> onuklease- <i>reaction buffer</i>	New England BioLabs
Ethanol, reinst (Rotisol)	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure, ≥ 99 %, p.A.	Roth
Exonuklease I	New England BioLabs
Expressionsvektor pcDNA3.1 (+)	Invitrogen
Fötales Kälberserum	Gibco
<i>gene expression design</i>	Fluidigm
Geneticin G418-Sulfat	Gibco
Giemsa	Roth
Glutathionreduktase aus <i>S. cerevisiae</i>	Sigma Aldrich
HEPES/Na <sup>+</sup>	Roth
Hoechst 33258	Fluka
Hydroxylapatit, high resolution	Calbiochem
Isoamylalkohol	Roth

## Anhang

---

Kaliumchlorid, $\geq 99,5$ %, p.A.	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat, $\geq 99$ %, p.A.	Roth
Lachsspermien-DNA, ultrapur	Invitrogen
L-Cystein, $\geq 98$ %	Roth
L-Glutathion, oxidiert, $\geq 98$ %	Sigma Aldrich
L-Glutathion, reduziert, $\geq 98$ %	Roth
Magnesiumchlorid, $\geq 98,5$ %	Roth
Methanol, HPLC grade	Fluka
Milchpulver, blotting grade	Roth
Natriumchlorid, $\geq 99,5$ %, p.A.	Roth
Natriumdihydrogenphosphat, $\geq 98$ %, p.A.	Roth
Natriumdodecylsulfat, p.A.	Molekula
Natriumhydroxid, $\geq 98$ %, p.A.	Roth
Natronlauge 0,1 N	Roth
Natronlauge 4 N	Roth
Nicotinamidadenindinukleotid, $\geq 98$ %	Sigma Aldrich
Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, $\geq 95$ %	Sigma Aldrich
<i>PCR certified water</i>	TEKnova
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich
Proteinase K	Merck
qScript™ cDNA Synthese Kit	BioRad
rekombinante PARP-1	Enzo Life Science
RNA-Isolierungskit NucleoSpin RNAII	Macherey-Nagel
RNase A	Roche
Rotiphenol	Roth
RPMI-Medium	Sigma Aldrich
Salzsäure 0,1 N	Roth
Salzsäure 4 N	Roth
<i>SsoFast™ EvaGreen® Supermix mit low ROX</i>	BioRad
Sulforaphan, 99,3 %, racematisch	Enzo Life Science (Axxora)
<i>TaqMan® PreAmp mix (2-fach)</i>	Applied Biosystems
TE-Puffer (für PCR)	TEKnova
Tetrahydrofuran, ohne Stabilisator	Sigma Aldrich
Tetrol I-1, HPLC grade	NCI
Trichloressigsäure, $\geq 99$ %, reinst	Roth

## Anhang

---

Triethylamin, $\geq 99\%$	Sigma Aldrich
Tris, $\geq 99,9\%$ , Ultra Qualität	Roth
Trypsin	Sigma Aldrich
VECTASHILD Mounting Medium mit DAPI	Vector Laboratories Inc.
Wasserstoffperoxid, 30 %, Suprapur	Merck
XPAzf-Peptid, Sequenz: Ac-DYVICEECGKEFMDSYLMNHFDLPTCDNCRDADDK-HK-NH <sub>2</sub> , > 95 %	Schafer-N (Kopenhagen, Dänemark)
Zinkchlorid, 99,9 %	Sigma Aldrich

### 8.3 Lösungen und Puffer

Alle Puffer und Lösungen wurden in bidestilliertem Wasser angesetzt und bei längerer Lagerung eventuell aus Stabilitätsgründen sterilfiltriert.

#### Zellkultur

Alle Lösungen, die zur Zellkultivierung eingesetzt wurden (Medium, PBS, TBS, PBS-EDTA), wurden mittels Sterilfiltration entkeimt bzw. autoklaviert.

PBS (pH 7,4)	0,1 M NaCl 0,0045 M KCl 0,007 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,003 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS-EDTA	0,5 mM EDTA in PBS
TBS (pH 7,4)	0,0513 M NaCl 0,0027 M KCl 0,025 M Tris
Trypsin-Lösung	0,25 % Trypsin in PBS-EDTA

#### Bestimmung des Gesamtglutathiongehalts nach Tietze

KP-Puffer (pH 7,4)	Lösung 1: 0,1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 mM EDTA Lösung 2: 0,1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 mM EDTA Lösung 1 vorgelegt und mit Lösung 2 auf pH 7,4 eingestellt
--------------------	---

#### Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen

Alkalische Lösung (pH 12,3)	0,9 M NaCl 0,01 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,03 M NaOH
NaP-Puffer (0,01 M)	0,0049 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,0051 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
KP-Puffer (0,15 M)	0,0765 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,0735 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>



## 8.4 Verbrauchsmaterialien

24-Lochplatte, transparent	Greiner
3 mL-Einwegspritzen	Braun
384-Lochplatte, transparent	Nunc
96-Lochplatte, transparent	TPP
Accuvetten (Zählcups)	Beckmann Coulter
Aufkonzentrierungssäule, Luna 5 $\mu$ C18(2), 30 x 4,60 mm	Phenomenex
Cryoröhrchen mit Innengewinde	Roth
Deckgläschen, $\varnothing$ 12 mm	Roth
Dynamic Array IFC	Fluidigm
Glasfaserfilter	Whatman
HPLC-Gewindeglasflaschen	Chromatographie-Zubehör Klaus Trott
Mikroreaktionsgefäße (1,5 und 2 mL)	Sarstedt
Mikroreaktionsgefäße (2,2 mL)	Greiner
Objektträger Superfrost	Roth
Parafilm	Sigma Aldrich
pH-Indikatorstäbchen	Roth
Pipettenspitzen 0,1 – 20 $\mu$ L	Brand
Pipettenspitzen 1 – 200 $\mu$ L	Roth
Pipettenspitzen 100 – 1000 $\mu$ L	Sarstedt
Pipettenspitzen 500 – 5000 $\mu$ L	Eppendorf
Plastikröhrchen (50 und 15 mL)	Sarstedt
Schraubkappen für HPLC-Gewindeglasflaschen	Chromatographie-Zubehör Klaus Trott
Trennsäule, Luna 5 $\mu$ C18(2), 250 x 4,60 mm	Phenomenex
Zellkulturschalen (verschiedene Größen)	TPP

## 8.5 Verwendete Geräte

Autoklav D-150	Systemec
Axio Imager Z2 (Auflichtmikroskop)	Carl Zeiss
Biofreezer Herafreeze top	Thermo Scientific
Biofuge pico	Heraeus
Biomark™ RT-qPCR-System	Fluidigm
Brutschrank Heracell 150i	Thermo Scientific
Centrifuge 5810R	Eppendorf
Chromatographieblock	Georg, Franz & Bose
Colony Counter BZG-30	WTW
Fluoreszenzdetektor RF2000	Gynkotec
Galaxy Mini Centrifuge	VWR International
Gas-Sicherheitsbrenner 1SCS micro	Roth
Heizschüttler MKR 13	HLC-BioTech
Heizschüttler SH 26	Cat
Heizschüttler TS-100	peqlab
HPLC Pumpe Ultimate 3000	Thermo Scientific (Dionex)
HPLC Sampler Ultimate 3000 (semipräparativ)	Thermo Scientific (Dionex)
Kolbenhubpipetten (verschiedene Volumina)	Eppendorf
Kühl- und Gefrierschränke	Bosch
Laborspülmaschine Professional G7883	Miele
Megafuge 1.0	Heraeus
MicroCentrifuge	Roth
Mikroskop Axiovert 40C (Durchlichtmikroskop)	Carl Zeiss
Mikrotiterplattenlesegerät Infinite M200 Pro	Tecan
Mini Rocker MR-1	peqlab
Motorsäulenschaltventil	Thermo Scientific (Dionex)
Multikanalpipette (30-300 µL)	Eppendorf
NanoQuant Platte	Tecan
pH-Meter 3210	WTW
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte
Real-Time System CF96	BioRad Laboratories
Reinstwasseranlage Milli-Q	Millipore
Schüttler Shaker DOS-10L	Neolab

## Anhang

---

Software „AxioVision Rel. 4.8“	Carl Zeiss
Software „Chromeleon“	Thermo Scientific (Dionex)
Software „Fluidigm Real Time PCR Analysis“	Fluidigm
Software „GenEx“	MultiD Analyses
Software „ZEN“	Carl Zeiss
Sterilbank HERAsafeKS	Thermo Scientific
Taumler 3012	GFL
Timer	Roth
Tischinkubator B15	Thermo Scientific
Trockenschrank Hereaus T6	Hereaus Instruments
Ultrafeinwaage BP 61S	Sartorius
Ultraschallbad Sonorex TK52	Brandelin
Ultraschallspitze	Branson
Vakuum-System BVC21NT	Vakuubrand
Vortex-Genie 2T	Scientific Industries
Waage VWR 1502	Sartorius
Wasserbad	Memmert
Wasserbad	Julabo
Zellzählgerät Coulter Z2	Beckman Coulter

## 8.6 Ergänzende Daten

### 8.6.1 HPLC-Analyse der BPDE-DNA-Addukte als Tetrol I-1

#### 8.6.1.1 Analyseparameter

Tabelle 4: Parameter der HPLC-Trennung

Zeit (min)	Fluss (mL/min)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> (%)	20 % MeOH in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> (%)	55 % MeOH in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> (%)	Anmerkung
-10	1,0	100	0	0	Motorsäulenschaltventil: Bypass
0	1,0	100	0	0	Fluoreszenzdetektor: Nullabgleich, $\lambda_{\text{Ex}}=344$ nm, $\lambda_{\text{Em}}=398$ nm, Empfindlichkeit: hoch
0	1,0	100	0	0	Injektion von 1,2 mL Probe, Beginn der Datenaufnahme
5	0,5	100	0	0	
6	0,5	0	100	0	
16	0,5	0	100	0	Motorsäulenschaltventil: Trennsäule
16	1,0	0	0	100	
40	0	0	0	0	Ende der Datenaufnahme, Fluoreszenzdetektor: aus, Ende des Programms

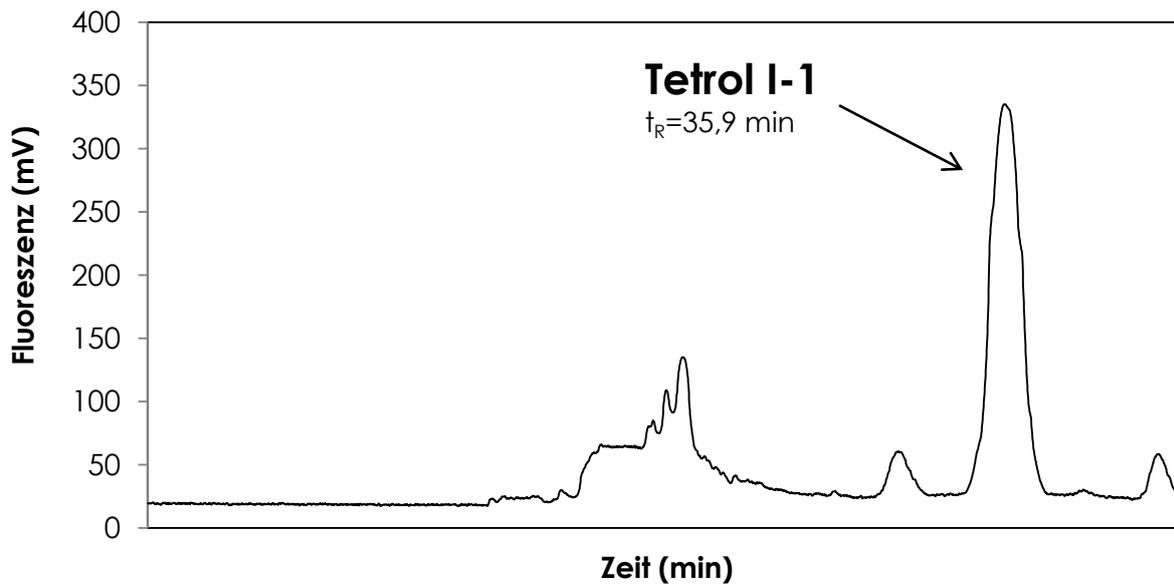


Abbildung 44: Beispielchromatogramm der Analyse des als Tetrol I-1 freigesetzten BPDE-DNA-Addukts aus einer Zellprobe

### 8.6.1.2 Externe Kalibrierung

Die Kalibrierung der HPLC-Analyse erfolgte mit wässrigen Tetrol I-1-Lösungen, die einen Konzentrationsbereich von 10 bis 100 pg/mL abdeckten.

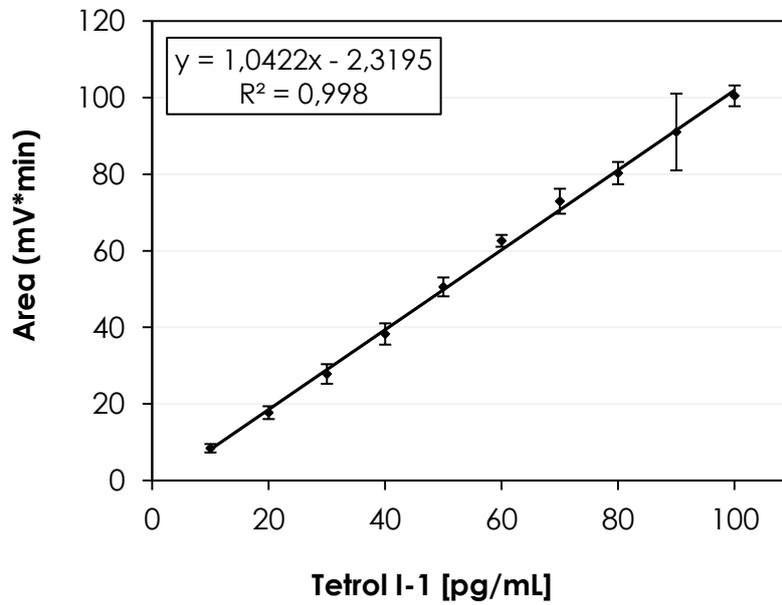


Abbildung 45: Externe Kalibrierung der HPLC-Analyse mittels synthetischem Tetrol I-1. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von sechs Werten aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen.

## 8.6.2 LC-ESI-MS/MS-Analyse der Sulforaphan-Metaboliten

### 8.6.2.1 Analyseparameter

Tabelle 5: Parameter der HPLC

Parameter	Wert
Temperatur Autosamplern	4°C
Injektionsvolumen	2 µL
Temperatur Säulenofen	20°C

Tabelle 6: Gradient HPLC

Zeit (min)	Fluss (µL/min)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> (+ 0,1 % FA) (%)	Acetonitril (+ 0,1 % FA) (%)
0	300	85	15
1	300	85	15
11	300	60	40
12	300	5	95
16	300	5	95
17	300	85	15
22	300	85	15

Tabelle 7: Optimierte Parameter für die Fragment-Ionen des MRM im positiven Ionenmodus

Substanz	Precursor (u)	Fragment (u)	t <sub>R</sub> (min)	Dwell t (msec)
SFN-NAC	341,044	178,1*	3,60	200
SFN-NAC	341,044	114,1**	3,60	80
SFN-NAC	341,044	72,0	3,60	80
SFN-Cys	299,036	136,1*	2,40	200
SFN-Cys	299,036	113,9**	2,40	80
SFN-Cys	299,036	178,1	2,40	80
SFN-CysGly	355,969	136,1*	1,70	200
SFN-CysGly	355,969	114,1**	1,70	80
SFN-CysGly	355,969	71,9	1,70	80
SFN-GSH	485,073	136,0*	2,49	200
SFN-GSH	485,073	179,2**	2,49	80
SFN-GSH	485,073	76,0	2,49	80
ERU-NAC	325,062	164,0*	17,08	200
ERU-NAC	325,062	122,1**	17,08	80
ERU-NAC	325,062	103,2	17,08	80
ERU-Cys	283,091	103,000*	9,99	200
ERU-Cys	283,091	122,100**	9,99	80
ERU-Cys	283,091	61,000	9,99	80
ERU-CysGly	339,965	103,2*	7,02	200
ERU-CysGly	339,965	179,0**	7,02	80
ERU-CysGly	339,965	61,0	7,02	80
ERU-GSH	469,033	103,0*	11,40	200
ERU-GSH	469,033	179,1**	11,40	80
ERU-GSH	469,033	76,0	11,40	80

\*Quantifier, \*\*Qualifier

Tabelle 8: Parameter der ESI-Quelle und des HPLC-Systems für die HPLC-ESI-MS/MS-Kopplung

Parameter	Wert
Ionenspray Spannung	4500 V
Curtain Gas	30 PSI
Collision Gas	6 PSI
Temperatur	400 °C
Ionenquelle Gas 1	30 PSI
Ionenquelle Gas 2	65 PSI
Interfaceheater	On
Waste time	20 min bis 22 min

### 8.6.2.2 Externe Kalibrierung

Zur externen Kalibrierung der LC-MS/MS-Bestimmung aller Sulforaphan-Metaboliten wurden verschiedene Konzentrationen der synthetisierten Standards in bidestilliertem Wasser angesetzt und mittels LC-MS/MS aufgetrennt bzw. quantifiziert.

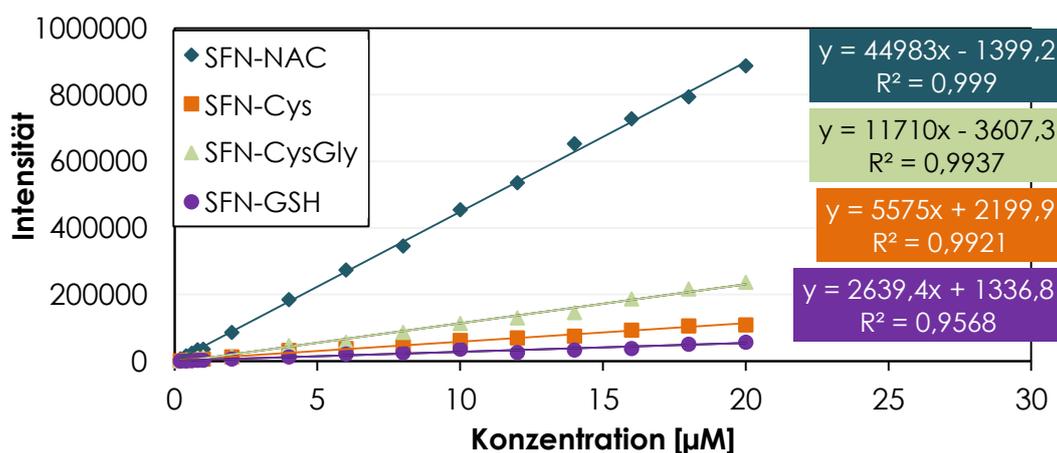


Abbildung 46: Externe Kalibrierung der LC-MS/MS-Bestimmung der Sulforaphan-Konjugate. Die Quantifizierung erfolgte mittels spezifischer Massenübergänge (siehe Tabelle 7).

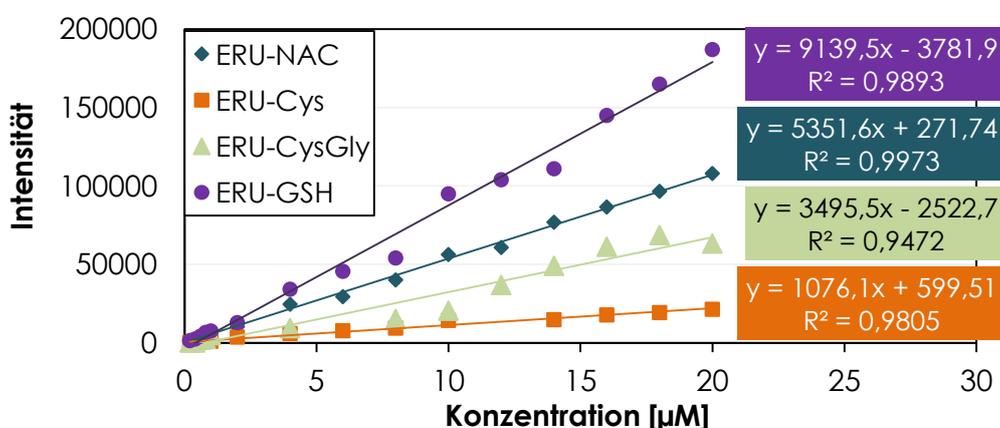


Abbildung 47: Externe Kalibrierung der LC-MS/MS-Bestimmung der Erucin-Konjugate. Die Quantifizierung erfolgte mittels spezifischer Massenübergänge (siehe Tabelle 7).

### 8.6.3 Beeinflussung der Genexpression durch Sulforaphan

#### 8.6.3.1 PCR-Primer

Tabelle 9: Auswahl der genutzten Primer-Sequenzen für die RT-qPCR-Analysen

Gen	forward-Primer	reverse-Primer
ABCB1	5'-AACACCACTGGAGCATTGAC-3'	5'-ACAGCAAGCCTGGAACCTA-3'
ABCC1	5'-CCTGTTCTCGGAAACCATCC-3'	5'-AAGGTGATCCTCGACAGGAA-3'
CAT	5'-AGAAGTGC GGAGATTCAACAC-3'	5'-CCTCATT CAGCACGTT CACA-3'
DDB1	5'-TTGCCTACAAGCCCATGGAA-3'	5'-CAAGATTCCACAGCACTCATCC-3'
ERCC1	5'-GCCGACTGCACATTGATCC-3'	5'-TCCGCTGGTTTCTGCTCATA-3'
ERCC2	5'-TACCCCGAGCAGTTCTCCTA-3'	5'-CTGAGGGCATCTCCAGGAC-3'
ERCC4	5'-CTTCTGGAATCTCTGAGAGCAA-3'	5'-GAGGTGCTGGAGTCAAGAAA-3'
ERCC5	5'-TTGATGGGGATGCTCCACTA-3'	5'-TGGAGTCACTGGACGCTAA-3'
GCLC	5'-TGGATGCCATGGGATTTGGAA-3'	5'-CTCAGATATACTGCAGGCTTGGAA-3'
GPX1	5'-CACCTCTCTTCGCCTTCC-3'	5'-GAGCTTGGGGTTCGGTCATAA-3'
GSR	5'-GCATCTATGCAGTTGGGGATGTA-3'	5'-AAGTTTTCGGCCAGCAGCTA-3'
GSTP1	5'-CACCTGTACCAGTCCAATACC-3'	5'-TCCTGCTGGTCCCTTCCATA-3'
LIG1	5'-TGGGAAGTACCCGGACATCA-3'	5'-GCTTCGGTGTCCAGGATGAA-3'
MT2A	5'-CCCCGCTCCAGATGTAAA-3'	5'-GGTCACGGTCAGGGTTGTA-3'
POLD1	5'-AGCTGGTGGAGTCTAAGTACAC-3'	5'-GACGGAGTCAGTGCACCATA-3'
XPA	5'-ACATCATTACAATGGGGTGATA-3'	5'-ACCCCAAAC TCAAGAGACC-3'
XPC	5'-TAAAGGGGTCCATGAGGACACA-3'	5'-CTGGCTGGCTGCAGATGTTA-3'

#### 8.6.3.2 Temperaturprogramme

Tabelle 10: Temperaturprogramm der cDNA-Umschreibung aus den RNA-Proben

Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer (min)
1	25	5
1	42	30
1	85	5

Tabelle 11: Temperaturprogramm der Präamplifikation

Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer
1	95	10 min
12	95	15 sek
	60	4 min

Tabelle 12: Temperaturprogramm der RT-qPCR

Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer
1	70	40 min
1	60	30 sek
1	95	60 sek
30	96	5 sek
1	60	20 sek
1	60 auf 95	in 3 min

### 8.6.3.3 Beeinflussung der Genexpression der *GSTP1*-, *ABCB1*- und *ABCC1*-Gene

Innerhalb des nicht-zytotoxischen Konzentrationsbereiches bis zu 10  $\mu\text{M}$  Sulforaphan (Koloniebildungsfähigkeit  $83,5 \pm 3,4 \%$ ) traten keine biologisch relevanten Beeinflussungen der Expression der *GSTP1*-, *ABCB1*- oder *ABCC1*-Gene auf.

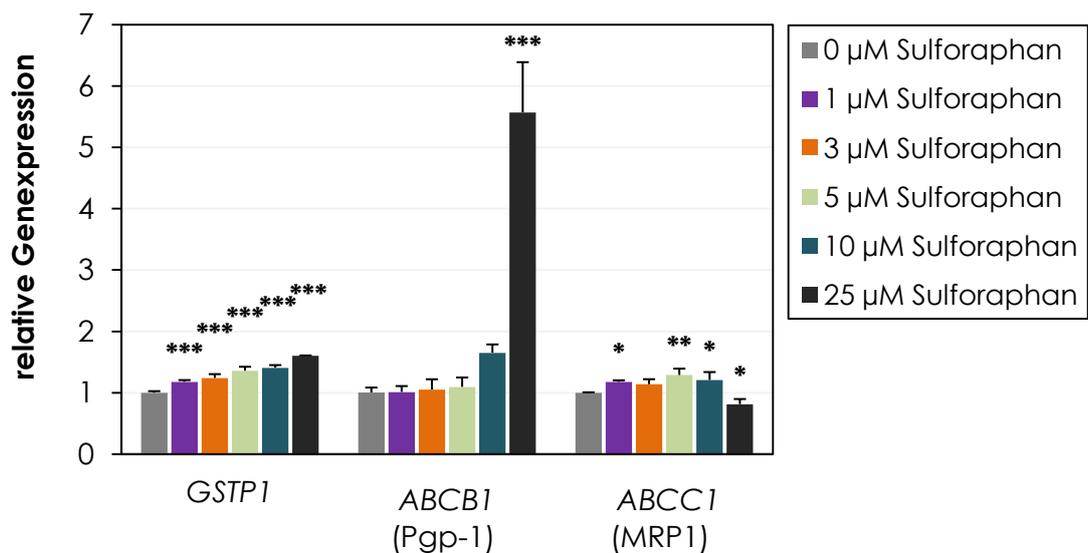


Abbildung 48: Beeinflussung der Genexpression der *GSTP1*-, *ABCB1*- und *ABCC1*-Gene durch eine 24-stündige Inkubation mit Sulforaphan in HCT 116-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von acht Werten aus zwei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 8.6.4 Beeinflussung der $\text{H}_2\text{O}_2$ -vermittelten Schadensinduktion in HeLa S3-Zellen durch Sulforaphan

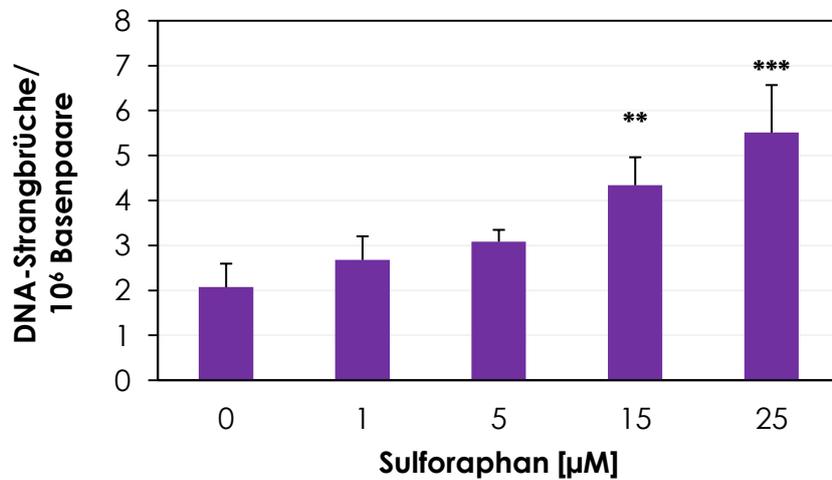


Abbildung 49: Beeinflussung der Anzahl von  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbrüchen durch eine 3-stündige Vorinkubation mit Sulforaphan in HeLa S3-Zellen. Die Schadensinduktion erfolgt mit  $40 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  für 5 min. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von sechs Werten aus zwei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test: \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

### 8.6.5 Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Sulforaphan

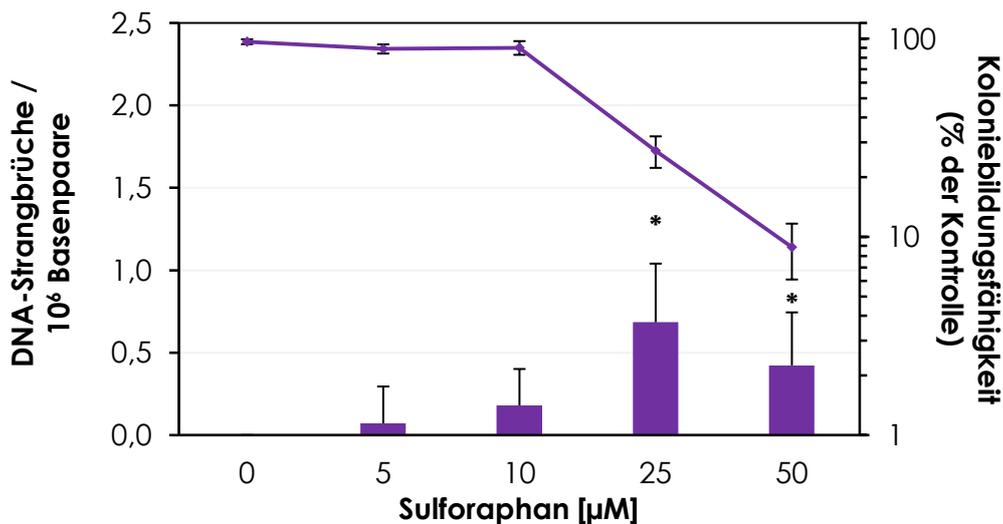


Abbildung 50: Induktion von DNA-Strangbrüchen nach einer 24-stündigen Inkubation mit Sulforaphan in HCT 116-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von sechs Werten aus zwei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test: \*  $p < 0,05$

### 8.6.6 Beeinflussung der rekombinanten PARP-1 durch die späten Metaboliten von Sulforaphan *in vitro*

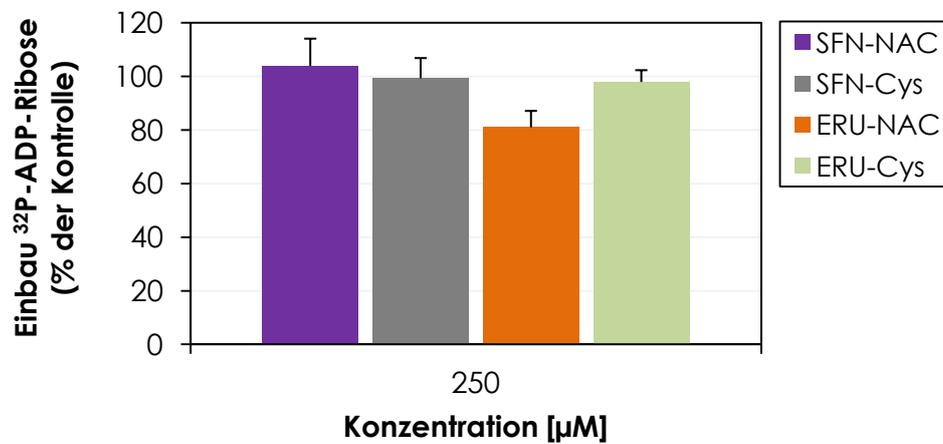


Abbildung 51: Beeinflussung des PARP-1-vermittelten Einbaus von <sup>32</sup>P-ADP-Ribose durch späte Sulforaphan-Metaboliten. Rekombinante PARP-1 wurde 30 min mit den jeweiligen Metaboliten inkubiert, bevor die Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch die Zugabe von sonifizierter Lachsspermien-DNA gestartet wurde und in Gegenwart von <sup>32</sup>P-NAD<sup>+</sup> für 30 min erfolgte. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen.

### 8.6.7 Beeinflussung der Nukleotidexzisionsreparatur von (+)-*anti*-BPDE-induzierten DNA-Addukten durch Sulforaphan

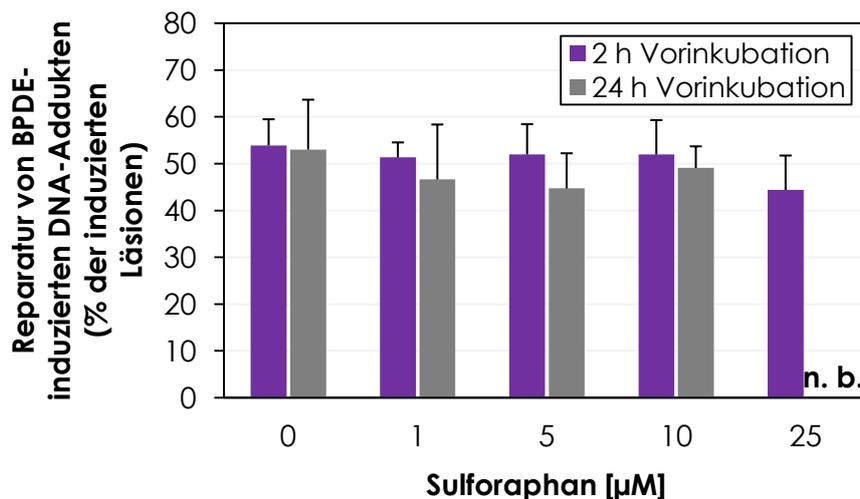


Abbildung 52: Einfluss einer Vor- und Nachinkubation mit Sulforaphan auf die späte Phase der Reparatur von (+)-*anti*-BPDE-induzierten DNA-Addukten nach 24 h in HCT 116-Zellen. Die Schadensinduktion erfolgte mit 50 nM (+)-*anti*-BPDE für 1 h. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von mindestens sechs Werten aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen. (n.b. nicht bestimmt)

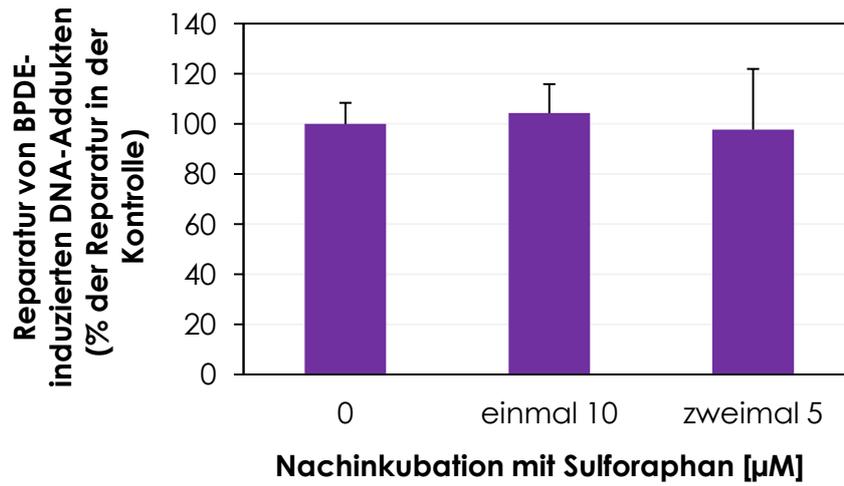


Abbildung 53: Einfluss einer gesplitteten Applikation von Sulforaphan während der 24-stündigen Nachinkubation auf die Reparatur von (+)-*anti*-BPDE-induzierten DNA-Addukten nach 24 h. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von acht Werten aus drei unabhängigen Versuchen.

## Publikationsliste

### Publikationen

- A. L. Piberger, B. Köberle, A. Hartwig (2014) „*The broccoli-born isothiocyanate sulforaphane impairs nucleotide excision repair: XPA as one potential target.*“ Archives of Toxicology 88(3): 647-658

### Veröffentlichte Abstracts

- A. L. Piberger, K. Wanzek, A. Hartwig (2012) „*Nahrungsergänzungsmittel aus Broccoli zur Kolonkrebprävention: biochemisch sinnvoll?*“; Abstractband des 41. Deutschen Lebensmittelchemikertags 2012 – Lebensmittelchemische Gesellschaft, Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh), Münster 2012 (ISBN 978-3-936028-73-7)
- A. L. Piberger, C. Keil, A. Hartwig (2013) „*The broccoli-born isothiocyanate sulforaphane impairs DNA repair processes in HCT 116 cells*“, Abstractband der 11<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens, Foz do Iguassu 2013 (ISBN 975-85-67287-00-3)

### Vorträge auf Fachtagungen

- 25. Tagung der Gesellschaft für Umweltmutationsforschung  
Potsdam (GER), 12. - 15. Oktober 2010  
Gesellschaft für Umweltmutationsforschung (GUM)  
„*Einfluss von Sulforaphan auf die Nukleotidexzisionsreparatur*“  
A. L. Piberger, A. Hartwig
- 41. Deutscher Lebensmittelchemikertag  
Münster (GER), 10. - 12. September 2012  
Lebensmittelchemische Gesellschaft, Fachgruppe der GDCh  
„*Nahrungsergänzungsmittel aus Broccoli zur Kolonkrebprävention: biochemisch sinnvoll?*“  
A. L. Piberger, K. Wanzek, A. Hartwig

- 11<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens  
Foz do Iguassu (BRA), 3. – 8. November 2013  
Co-organisiert von ALAMCTA, IAEMS und SBMCTA  
*„The broccoli-born isothiocyanate sulforaphane impairs DNA repair processes in mammalian cells“*  
A. L. Piberger, C. Keil, A. Hartwig

### **Posterbeiträge auf Fachtagungen**

- 1. Statusseminar Ernährung BMBF  
Bonn (GER), 23. – 24. Februar 2010  
Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)  
*„Verbesserte Gewinnung und Verarbeitung diätetischer Glucosinolate sowie die Charakterisierung ihrer potenziellen Funktion in der Prävention von Darmkrebs - Einfluss von Sulforaphan auf die genomische Stabilität“*  
A. L. Piberger, A. Hartwig
- 11<sup>th</sup> Biannual DGDR Meeting  
Jena (GER), 7. – 10. September 2010  
Deutsche Gesellschaft für DNA-Reparaturforschung (DGDR)  
*„Impact of sulforaphane on the zinc-binding structure of XPA and nucleotide excision repair“*  
A. L. Piberger, A. Hartwig
- 25. Tagung der Gesellschaft für Umweltmutationsforschung  
Potsdam (GER), 12. - 15. Oktober 2010  
Gesellschaft für Umweltmutationsforschung (GUM)  
*„Einfluss von Sulforaphan auf die Nukleotidexzisionsreparatur“*  
A. L. Piberger, A. Hartwig
- 39. Deutscher Lebensmittelchemikertag  
Stuttgart-Hohenheim (GER), 20. - 22. September 2010  
Lebensmittelchemische Gesellschaft, Fachgruppe der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh)  
*„Sulforaphan – Schutz vor exogenen Stressoren?“*  
A. L. Piberger, A. Hartwig

- 2. Statusseminar Ernährung BMBF  
Potsdam (GER), 16. – 18. Mai 2011  
Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)  
*„Verbesserte Gewinnung und Verarbeitung diätetischer Glucosinolate sowie die Charakterisierung ihrer potenziellen Funktion in der Prävention von Darmkrebs - Einfluss von Glucosinolaten und deren Abbauprodukten auf die genomische Stabilität: DNA-Reparaturprozesse“*  
A. L. Piberger, D. Neumann, A. Hartwig
- ToxNet-BW Symposium 2011  
Konstanz (GER), 13. Oktober 2011  
*„Sulforaphane impairs genomic stability via indirect genotoxic effects“*  
A. L. Piberger, K. Wanzek, A. Hartwig
- 26. Tagung der Gesellschaft für Umweltmutationsforschung  
Mainz (GER), 28. Februar – 2. März 2012  
Gesellschaft für Umweltmutationsforschung (GUM)  
*„Impact of sulforaphane on the redox homeostasis in HCT 116 cells“*  
A. L. Piberger, K. Wanzek, A. Hartwig
- 42<sup>nd</sup> Annual EEMS Meeting  
Warschau (POL), 16. – 20. September 2012  
European Environmental Mutagen Society (EEMS)  
*„The isothiocyanate sulforaphane inhibits nucleotide excision repair and poly(ADP-ribosylation) in cultured mammalian cells“*  
A. L. Piberger, C. Keil, A. Hartwig
- 28. Jahrestagung der GMS  
Karlsruhe (GER), 11. – 13. Oktober 2012  
Gesellschaft für Mineralstoffe und Spurenelemente (GMS)  
*„The isothiocyanate sulforaphane interferes with zinc-binding proteins and downstream processes in cultured mammalian cells“*  
A. L. Piberger, J. Greiner, C. Keil, A. Hartwig

- 3. Statusseminar Ernährung BMBF  
Berlin (GER), 19. – 21. November 2012  
Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)  
*„Verbesserte Gewinnung und Verarbeitung diätetischer Glucosinolate sowie die Charakterisierung ihrer potenziellen Funktion in der Prävention von Darmkrebs - Einfluss von Glucosinolat-Hydrolyseprodukten auf DNA-Reparaturprozesse und Genexpression sowie die Bedeutung für die genomische Stabilität“*  
A. L. Piberger, D. Neumann, A. Hartwig
- ToxNet-BW Symposium 2012  
Karlsruhe (GER), 23. November 2012  
*„Sulforaphane provokes a prooxidative status and impairs poly(ADP-ribose)ylation in mammalian cultured cells“*  
A. L. Piberger, K. Wanzek, A. Hartwig
- Regionalverbandstagung Südwest 2013  
Karlsruhe (GER), 19. – 20. März 2013  
Lebensmittelchemische Gesellschaft, Fachgruppe der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh)  
*„Sulforaphane increases the amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced single strand breaks and impairs poly(ADP-ribose)ylation and single strand break repair in mammalian cultured cells“*  
A. L. Piberger, K. Wanzek, C. Keil, A. Hartwig
- German-French DNA Repair Meeting on Epigenetics and Genome Integrity  
Strasbourg-Illkirch (FRA), 7. – 10. Oktober 2013  
Co-organisiert von SFTG, DGDR, GUM und IREBS  
*„The broccoli-born isothiocyanate sulforaphane impairs poly(ADP-ribose)ylation and single strand break repair in mammalian cultured cells“*  
A. L. Piberger, C. Keil, A. Hartwig

### **Reisestipendien**

- Reisestipendium der European Environmental Mutagen Society (EEMS)  
11<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens  
Foz do Iguassu (BRA), 3. – 8. November 2013

## **Lebenslauf**

### **Persönliches**

Name	Ann Liza Piberger
Geburtsdatum und -ort	25. Oktober 1984, Berlin
Staatsangehörigkeiten	deutsch, österreichisch

### **Schulische Ausbildung**

1997 – 2004	Kant-Gymnasium in Berlin-Spandau, Abschluss: Abitur
-------------	--

### **Studium**

10/2004 – 09/2009	Technische Universität Berlin, Studiengang: Lebensmittelchemie (Staatsexamen), Abschluss: Staatsexamen Teil A
10/2009	Technische Universität Berlin, Aufbaustudiengang: Lebensmittelchemie (Diplom), Abschluss: Diplom Lebensmittelchemie

### **Dissertation**

10/2009 bis 09/2010	Promotion am Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie der TU Berlin (Prof. Dr. Andrea Hartwig)
Seit 10/2010	Fortsetzung der Promotion am Institut für Lebensmittel- chemie und Toxikologie des KIT (Prof. Dr. Andrea Hartwig)

## Danksagung

Mein erster Dank gilt meiner Doktormutter Andrea Hartwig. Durch Dich habe ich nicht nur die DNA-Reparatur kennen und lieben gelernt, sondern auch die Möglichkeit zum Forschen erhalten. Dabei hast Du mir stets den so ersehnten, wissenschaftlichen Freiraum gelassen und doch ständig unterstützend auf meinen Werdegang eingewirkt. Ohne Dein Vertrauen wäre mein Traum vom wissenschaftlichen Arbeiten nie in Erfüllung gegangen.

Bei allen Projektpartner\_innen des BMBF-geförderten Vorhabens „*Improving dietary glucosinolate production, processing and characterization of potential health effects for the prevention of colon cancer*“ will ich mich für die Zusammenarbeit und das geteilte Interesse bedanken. Durch die ausgiebigen Diskussionen wurden darüber hinaus bereits frühzeitig Ideen und Handlungsstrategien im Umgang mit einer Vielzahl von Fragen (auch den polemischen oder rhetorischen) gesät. Vor allem Stefanie Platz und Sascha Rohn von der Universität Hamburg danke ich für die Kooperation bezüglich der zellulären Bioverfügbarkeit von Sulforaphan.

All meine wundervollen Diplomand\_innen, insbesondere Katharina, Isabel und Susanne, haben ein Dankeschön für die Begeisterung und den Fleiß verdient, mit denen sie Wissen geschaffen haben.

Von meinem Berliner Arbeitskreis habe ich nicht nur so wichtige Dinge wie Abstract-Schreiben, Poster-Gestalten und Vorträge-Halten, sondern auch so manche soziale Praxis erlernt. Dafür gilt ein besonderer Dank Viola, Ingrid, Conny und den beiden Claudias. Darüber hinaus wären die *in vitro*-Analysen zur PARP-1 ohne Claudia Keil nicht möglich gewesen und Dir gebührt ein extra Dank.

Von meinem Karlsruher Arbeitskreis habe ich den Umgang mit dem Süden gelernt und Ihr alle wart, insbesondere kurz nach dem Wechsel, eine Familie. Mittlerweile sind vor allem Sarah, Betty und Beate enge Freundinnen geworden, die sich immer wieder meiner Probleme annehmen. Betty und Beate waren des Weiteren so lieb und haben ihre Zeit bzw. Nerven investiert, um diese Arbeit Korrektur zu lesen. Danke Euch beiden! Ein zusätzlicher und spezieller Dank gilt Dir Beate, da Du sowas wie ein wissenschaftliches Vorbild geworden bist.

Dem kompletten Arbeitskreis Bunzel muss ich dafür danken, dass er immer wieder eine grandiose Adoptivfamilie war. So hatte Andi für jede Frage einen Lösungsansatz parat und war das charmante Karlsruher Willkommenskomitee. Judith teilte sowohl ihr Büro-Sofa als auch so manches gute Gespräch mit mir und durch Rachel, die mir stets ein Lied sang, lernte ich eine mir völlig neue Welt kennen. Mit Daniel habe ich nicht nur die Vorliebe zu so manchem formidablen Lebensmittel und Katzen, sondern auch für Antirassismus gemein. Danke für Eure generelle awesomeness.

Dir, meiner lieben Freundin Kati, danke ich dafür, dass Du im Moment der größten Verzweiflung den Schritt auf mich zugegangen bist und all den Schmerz, die Einsamkeit und Melancholie mitempfunden hast.

Zuletzt möchte ich den PiBÄRgers mit all meiner Liebe danken:

Nrpa, Du zeigst mir immer wieder, mit welcher Selbstverständlichkeit mensch menschlich sein kann, selbst wenn alle anderen einen für etwas ganz anderes halten.

Jirko, durch Dich habe ich gelernt, dass mensch sich nur zur Entwicklung entscheiden muss und dann ist alles möglich.

Mom, Du hast die Stärke besessen, in einem bildungsfernen Haushalt zwei Feminist\_innen groß zu ziehen, die das wissenschaftliche Arbeiten lieben.

Pizz, Du bist stets mein aufrichtigster Spiegel, meine fairste Kritikerin, meine beste Freundin und für alle Zeiten nicht nur metaphorisch ein Teil von mir... „*Und die Zwillinge lachten lautlos.*“