

**Untersuchungen zum Einfluss von Ascorbinsäure und  
Langzeitinkubationen auf epigenetische Mechanismen der  
Chromat-induzierten Toxizität in humanen Lungenepithelzellen**

Zur Erlangung des akademischen Grades einer  
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)  
genehmigte

DISSERTATION

von

M. Sc. Franziska Stephanie Fischer

1. Referentin: Prof. Dr. Andrea Hartwig

2. Referent: Prof. Dr. Mirko Bunzel

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2023



*Für meinen Opa*

*Für meinen Papa und meine Mama*



# EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

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

Karlsruhe, den 14.02.2024

Franziska Stephanie Fischer



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>7</b>
2.1 Chrom.....	7
2.1.1 Vorkommen, Verwendung und Exposition.....	8
2.1.2 Toxizität von Chrom.....	8
2.1.3 Mechanismus der Krebsentstehung.....	10
2.2 Epigenetik.....	14
2.2.1 DNA-Methylierung.....	14
2.2.2 Histonmodifikationen.....	18
2.2.3 Einfluss von Chrom auf das Epigenom.....	19
2.3 Zellkulturstudien als Modell zur Untersuchung der Chromat-Toxizität.....	21
2.3.1 Ascorbinsäure in Zellkulturstudien.....	22
2.3.2 Inkubationsdauer in Zellkulturstudien.....	23
<b>3 Fragestellung</b>	<b>25</b>
<b>4 Material und Methoden</b>	<b>27</b>
4.1 Zellkultur.....	27
4.1.1 Zelllinien und Kultivierung.....	27
4.1.2 Kryokonservierung und Inkulturnahme.....	28
4.1.3 Inkubationen mit Chromat.....	29
4.1.4 Präinkubation mit Dehydroascorbinsäure.....	29
4.1.5 Kurzzeitinkubation und Nachinkubation.....	30
4.1.6 Langzeitstudie.....	31
4.2 Analyse des intrazellulären Ascorbinsäure-Gehalts durch flüssig-chromatographische Auftrennung.....	31
4.3 Zytotoxizitätsuntersuchungen.....	33
4.3.1 Metabolische Aktivität mittels ATP-Assay.....	33
4.3.2 Zytotoxizität durch Zellzählung.....	34
4.4 Bestimmung der zellulären Aufnahme von Chromat durch Graphitrohr- Atomabsorptionsspektrometrie.....	34
4.5 Analyse der Zellzyklusverteilung mittels Durchflusszytometrie.....	35
4.6 DNA-Methylierungsanalysen.....	36

4.6.1	DNA-Isolation und Quantifizierung .....	36
4.6.2	Nachweis der globalen Methylierung mittels Flüssigchromatographischer Auftrennung und UV-Detektion.....	37
4.6.3	Bestimmung des Methylierungsgrades von <i>MLH1</i> und <i>MSH2</i> durch <i>Combined Bisulfite Restriction Analysis</i> .....	38
4.7	Genexpressionsanalysen.....	41
4.7.1	RNA-Isolation und Quantifizierung .....	41
4.7.2	cDNA-Synthese.....	42
4.7.3	Präamplifikation und Exonukleaseverdau .....	42
4.7.4	Primer- und Probenvorbereitung .....	43
4.7.5	96x96 Dynamic Array IFC qPCR Analyse .....	43
4.7.6	Datenanalyse und Auswertung .....	44
4.8	Statistische Auswertung.....	45
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>46</b>
5.1	Vergleich der Toxizität von Chromat mit und ohne Präinkubation mit Dehydroascorbinsäure ...	46
5.1.1	Aufnahme von Dehydroascorbinsäure in die Zellen .....	46
5.1.2	Wirkung von Dehydroascorbinsäure auf die Zytotoxizität nach Inkubation mit Chromat	49
5.1.3	Einfluss von Dehydroascorbinsäure auf die Aufnahme von Chromat .....	50
5.1.4	Wirkung von Dehydroascorbinsäure auf die Zellzyklusverteilung.....	53
5.1.5	Untersuchung der globalen Methylierung nach Exposition gegenüber Dehydroascorbinsäure und Chromat.....	56
5.1.6	Einfluss von Dehydroascorbinsäure auf Genexpressionsprofile.....	58
5.2	Untersuchung der Toxizität von Chromat in der Folge einer Nachinkubation .....	71
5.2.1	Wirkung einer Nachinkubation auf die Zytotoxizität nach Exposition gegenüber Chromat.....	71
5.2.2	Analyse der Zellzyklusverteilung in Folge einer Nachinkubation nach Exposition gegenüber Chromat .....	72
5.2.3	Wirkung einer Nachinkubation nach Exposition gegenüber Chromat auf die globale Methylierung .....	74
5.2.4	Einfluss einer Nachinkubation auf die Genexpressionsprofile nach Exposition gegenüber Chromat.....	75
5.3	Analyse der Toxizität von Chromat in einer Langzeitstudie .....	81
5.3.1	Analyse der Zytotoxizität nach Langzeit-Exposition gegenüber Chromat .....	81
5.3.2	Untersuchung des intrazellulären Chromat-Gehalts nach Langzeit-Exposition .....	83
5.3.3	Analyse der Zellzyklusverteilung nach Langzeit-Exposition gegenüber Chromat .....	84
5.3.4	Einfluss einer Langzeit-Behandlung mit Chromat auf die globale Methylierung.....	86
5.3.5	Einfluss einer Langzeit-Exposition mit Chromat auf die Methylierung von <i>MLH1</i> und <i>MSH2</i> .....	87
5.3.6	Genexpressionsprofile nach Langzeit-Behandlung mit Chromat.....	89



<b>6 Zusammenfassende Diskussion</b>	<b>96</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>107</b>
<b>8 Anhang</b>	<b>119</b>
8.1 Chemikalien und Instrumente .....	119
8.1.1 Chemikalien .....	119
8.1.2 Puffer und Lösungen.....	121
8.1.3 Verwendete Kits.....	122
8.1.4 Instrumente & Software.....	123
8.1.5 Verbrauchsmaterialien .....	124
8.2 Ergänzende Daten.....	126
8.2.1 Genliste der ht-RT-qPCR.....	126
8.2.2 Chromatogramm mit Nukleosid-Standards .....	129
8.2.3 Nachweis-, Bestimmungs- und Erfassungsgrenze der Chrombestimmung.....	129
8.2.4 Primersequenzen der COBRA-Versuche .....	130
8.2.5 Agarosegel eines COBRA Versuchs .....	130
8.2.6 Komplette Heatmaps der Genexpressionsanalysen .....	131
8.3 Abkürzungsverzeichnis .....	137
8.4 Abbildungsverzeichnis.....	139
8.5 Tabellenverzeichnis.....	142
<b>9 Publikationsliste</b>	<b>143</b>



# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Das Metall Chrom ist ubiquitär in der Umwelt vorhanden und wird vielfältig industriell eingesetzt, weshalb vor allem Beschäftigte in der Chrom be- und verarbeitenden Industrie gegenüber dem Metall exponiert sind. Die sechswertige Form des Chroms liegt bei neutralem pH-Wert als Chromat vor, wodurch es membrangängig ist. Durch die intrazelluläre Reduktion des Chromats kommt es zu zahlreichen Schädigungen in der Zelle, zu welchen eine kanzerogene Wirkung gehört. Der Mechanismus der Krebsentstehung durch Chromat ist noch nicht vollständig aufgeklärt. In den letzten Jahren wird eine Beteiligung von epigenetischen Mechanismen in der Kanzerogenese diskutiert. Die Epigenetik befasst sich mit stabilen, dynamischen, vererbaren Faktoren, durch welche die Expression eines Gens reguliert wird. In früheren Studien zeigte Chromat bereits einen Einfluss auf die Hauptmechanismen der epigenetischen Regulation, wozu die DNA-Methylierung, posttranslationale Histonmodifikationen und RNA-Interferenzen zählen. Die Untersuchung dieser Mechanismen erfolgt häufig durch *in vitro* Studien. Zellkulturen sind jedoch meistens frei von Ascorbinsäure, welche als Kofaktor von Enzymen der epigenetischen Regulation und Hauptreduktionsmittel im Chromatmetabolismus fungiert. Eine Zugabe von Ascorbinsäure bei der Untersuchung der Chromattoxizität ist daher erforderlich. Ebenso wichtig bei der Betrachtung kanzerogener Mechanismen ist die Inkubation von niedrigen Chromatkonzentrationen über einen längeren Zeitraum.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss von Ascorbinsäure auf die Auswirkungen von Chromat in den Lungenepithelzelllinien A549 und BEAS-2B untersucht. Hierfür wurden die Zellen vor der Chromatinkubation mit Dehydroascorbinsäure vorbehandelt, sodass sie intrazelluläre Gehalte an Ascorbinsäure im physiologischen Bereich erreichten. Die vorbehandelten und Ascorbinsäure-defizienten Zellen wurden bezüglich der Auswirkungen von Chromat auf die Zytotoxizität, Aufnahme, Zellzyklusverteilung, globale Methylierung und Genexpression verglichen. Die Behandlung mit Chromat ohne Ascorbinsäure resultierte in einer konzentrationsabhängigen, zytotoxischen Wirkung, welche mit einem steigenden Chromgehalt korrelierte. Während durch Chromat ein G2-Arrest induziert wurde, zeigte sich keine Veränderung in der globalen Methylierung. Die Auswirkungen von Chromat auf die Genexpression äußerten sich in einer Induktion von DNA-Schadensmarkern (*DDIT3*, *GADD45A*), Genen der oxidativen Stressantwort (*GPX1*, *HMOX1*, *TXN*), Interleukinen (*IL1a*, *IL6*, *IL8*) und Regulatoren der Apoptose und des Zellzyklus (*CDKN1A*, *JUN*, *PMAIP*). Eine Repression erfuhren Gene der DNA-Reparatur und der epigenetischen Regulation, ebenso Gene aus dem Bereich der oxidativen Stressantwort (*MAP3K5*, *NFKB1*). Die Veränderung in der Genexpression deutet

verschiedene Signalwege in der Schadensantwort sowie eine durch Chromat verursachte Dysregulation epigenetischer Mechanismen an. In A549-Zellen bewirkte die Vorbehandlung mit DHA eine geringere Aufnahme von Chromat und damit einhergehende geringere Zytotoxizität. Die niedrigere intrazelluläre Chromkonzentration führte zu einer geringeren Effektstärke der Auswirkungen auf die Genexpression. Im Gegensatz dazu verstärkte sich der durch Chromat ausgelöste G2-Arrest. In BEAS-2B-Zellen blieb die Zytotoxizität durch die Präinkubation mit DHA in einem ähnlichen Bereich, wobei die Chromataufnahme verringert war. Analog zu den A549-Zellen verstärkte sich der G2-Arrest. Diese Effekte können auf die erhöhte Bildung mutagener ternärer DNA-Addukte mit Ascorbat und damit einhergehende vermehrte Bildung von Doppelstrangbrüchen zurückgeführt werden. Die Effekte auf die Genexpression änderten sich nur in ihrer Effektstärke, welche in den meisten Genen abgeschwächt wurde. Verstärkt wurde die Repression epigenetischer Gene (*DNMT3a*, *TET1*), wodurch eine stärkere Dysregulation der epigenetischen Regulation angedeutet wurde. Aufgrund der Induktion von *HSPA1A* und *IL8* in Folge der Präinkubation wird eine verstärkte oxidative Stressantwort und Inflammation angenommen, welche auf eine erhöhte Reduktion von Chromat durch die zugefügte Ascorbinsäure zurückzuführen sein könnte.

Des Weiteren wurde die Beständigkeit der durch Chromat verursachten zellulären Veränderungen untersucht. Hierfür wurde an die 24-stündige Behandlung eine 72-stündige Nachinkubationszeit in Abwesenheit von Chromat angeschlossen und anschließend erneut die Zytotoxizität, Zellzyklusverteilung, globale Methylierung und Genexpression analysiert. Die zytotoxische Wirkung von Chromat verstärkte sich während der weiteren Kultivierung, wohingegen sich die Zellzyklusverteilung wieder der unbehandelten Kontrolle angleich. In beiden Zelllinien entstand eine globale Hypomethylierung, welche aufgrund des zeitlich verzögerten Auftretens durch die Verminderung der Aktivität der Methyltransferasen DNMTs auf passivem Weg verursacht wurde. Wahrscheinlichste Ursache hierfür ist eine Interaktion von oxidativem Stress mit den DNMTs oder deren Kofaktor SAM. Die Genexpressionsprofile wandelten sich in der 72-stündigen Nachinkubation ebenfalls ab. Repressive Effekte konnten nicht mehr beobachtet werden. Die Induktion von inflammatorischen Genen (*IL1a*, *IL1b*, *IL6*, *IL8*) spricht für eine anhaltende, entzündliche Reaktion in den Zellen. In A549-Zellen wurden zudem Gene der oxidativen Stressantwort (*GPX1*, *NFKB2*) und der Regulation von Zellzyklus und Apoptose (*CDKN1A*, *JUN*) vermehrt transkribiert. Eine Induktion in BEAS-2B-Zellen konnte für *CDKN1A* und Gene der DNA-Schadensantwort (*DDB2*, *DDIT3*, *GADD45A*) detektiert werden.

Schließlich wurden die Auswirkungen einer mehrwöchigen Inkubation mit niedrigeren Chromatkonzentrationen mit den Effekten der 24-stündigen Behandlung verglichen. Nach Inkubationen von einer bis fünf Wochen wurden die Zytotoxizität, Chromataufnahme, Zellzyklusverteilung, globale Methylierung, genspezifische Methylierung der Promotorbereiche von *MLH1* und *MSH2* sowie die Genexpression analysiert. Die Zytotoxizität verstärkte sich nach der einwöchigen Inkubation im Vergleich zur Kurzzeitinkubation und nahm bis Woche 2 weiter zu. Der intrazelluläre Chromgehalt war nach der einwöchigen Behandlung niedriger als nach

24 h, blieb danach bis Woche 5 in einem konstanten Bereich. Effekte der Langzeitversuche sind daher auf den längeren Kontakt mit dem Metall und nicht auf eine erhöhte intrazelluläre Chromkonzentration zurückzuführen. Während der Zellzyklus zu allen untersuchten Zeitpunkten unverändert blieb, konnte im Langzeitversuch eine globale Hypomethylierung festgestellt werden. Die Analyse des betrachteten Abschnitts innerhalb der Promotorregionen von *MLH1* und *MSH2* zeigte, dass diese unmethyliert vorlagen und durch Chromat nicht verändert wurden. Somit konnte keine genspezifische Hypermethylierung ermittelt werden. Die Genexpression wurde nach der 24-stündigen Inkubation nicht beeinflusst, wohingegen sich Effekte durch die verlängerte Behandlung zeigten. Besonders beeinflusst wurden Gene der Inflammation, *CCL22* nach einer Woche, *IL1a*, *IL1b* und *IL6* nach drei bis vier Wochen. Bei der Aktivierung dieser Gene könnte der NFκB-Signalweg eine Rolle spielen. Des Weiteren erfuhren Gene der oxidativen Stressantwort eine Induktion. Regulatoren des Zellzyklus und der Apoptose wurden zum Teil vermehrt transkribiert (*CDKN1A*, *E2F1*) und teilweise reprimiert (*JUN*, *VEGFA*). Während Marker der DNA-Schadensantwort vermindert wurden (*DDIT3*, *GADD45A*), erhöhte sich die Transkriptmenge in Genen der DNA-Reparatur (*LIG1*, *RAD51*).

Zusammenfassend zeigte sich in den analysierten toxikologischen Endpunkten ein Einfluss von Ascorbinsäure und der Inkubationsdauer. Eine Präinkubation mit DHA führte zu einer veränderten Schadensantwort in BEAS-2B-Zellen. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit dieses Aspektes, welcher in zukünftigen Untersuchungen von Chromat beachtet werden sollte. Sowohl die Nachinkubation als auch die verlängerte Inkubationsdauer beeinflussten ebenfalls die Auswirkungen von Chromat. Aufgrund des passiven Mechanismus konnte die globale Hypomethylierung erst mit zeitlicher Verzögerung detektiert werden. Die vorliegende Arbeit zeigt die Relevanz von längeren Inkubationszeiträumen zur Analyse der kanzerogenen Mechanismen von Chromat, insbesondere in Hinblick auf die Beteiligung epigenetischer Mechanismen.

# ABSTRACT

Chromium is abundant in the environment and is widely used in industrial applications, making employees in the chromium processing industry in particular exposed to the metal. The hexavalent form of the metal occurs as chromate at neutral pH, which allows its penetration through membranes. The intracellular reduction of chromate causes plenty of damage to the cell, which include a carcinogenic effect. The mechanism behind the carcinogenesis caused by chromate has not yet been fully understood. In recent years, an involvement of epigenetic mechanisms in carcinogenesis has been discussed. Epigenetics is concerned with stable, dynamic, heritable factors through which the gene expression is regulated. In previous studies, chromate has been shown to influence the major mechanisms of epigenetic regulation, DNA methylation, post-translational histone modifications, and RNA interference. The investigation of these mechanisms is often performed by in vitro studies. However, cell cultures usually lack ascorbic acid, which acts as a cofactor of enzymes involved in epigenetic regulation and as a major reducing agent in chromate metabolism. Therefore, addition of ascorbic acid is important in chromate toxicity studies. When considering carcinogenic mechanisms, it is also important to incubate with low concentrations of chromate for a period longer than the usual 24 hours.

Within the first part of this thesis, the influence of ascorbic acid on the effects of chromate in the lung epithelial cell lines A549 and BEAS-2B was investigated. For this purpose, cells were pretreated with dehydroascorbic acid prior to chromate incubation in order to achieve intracellular levels of ascorbic acid in the physiological range. Both the pretreated and ascorbic acid-deficient cells were compared with respect to the effects of chromate on cytotoxicity, uptake, cell cycle distribution, global methylation, and gene expression. Chromate treatment without ascorbic acid resulted in a concentration-dependent cytotoxic effect that correlated with increasing chromium content. While chromate induced a G2-arrest, global methylation remained unchanged. The effects of chromate on gene expression were manifested by induction of DNA damage markers (*DDIT3*, *GADD45A*), oxidative stress response genes (*GPX1*, *HMOX1*, *TXN*), interleukins (*IL1a*, *IL6*, *IL8*), and regulators of apoptosis and cell cycle (*CDKN1A*, *JUN*, *PMAIP*). Genes involved in DNA repair and epigenetic regulation were repressed, likewise the genes involved in the oxidative stress response (*MAP3K5*, *NFKB1*). The change in gene expression suggests different signaling pathways in the damage response as well as chromate-induced dysregulation of epigenetic mechanisms. In A549 cells, pretreatment with DHA caused lower uptake of chromate, accompanied by lower cytotoxicity. Reduced intracellular chromium concentration resulted in a decreased effect intensity of the impacts on gene expression. In contrast, the G2-arrest triggered by chromate increased. In BEAS-2B cells, preincubation with

DHA had a more pronounced cytotoxic effect with respect to lower chromate uptake. Similarly, to A549 cells, the G2-arrest increased. These effects can be attributed to the enhanced formation of mutagenic ternary DNA adducts with ascorbate and associated increased formation of double-strand breaks. The effects on gene expression changed only in their effect strength, which was attenuated in most genes. The repression of epigenetic genes (*DNMT3a*, *TET1*) was enhanced, suggesting greater dysregulation of epigenetic regulation. Due to the induction of *HSPA1A* and *IL8* as a result of preincubation, an increase in the oxidative stress response and inflammation is postulated, which is due to an increased reduction of chromate by the addition of ascorbic acid.

Furthermore, the durability of the cellular changes induced by chromate was investigated. For this purpose, the 24-hour treatment was followed by a 72-hour post incubation period, after which cytotoxicity, cell cycle distribution, global methylation and gene expression were again analyzed. The cytotoxic effect of chromate increased during further cultivation, whereas cell cycle distribution returned to the untreated control. Global hypomethylation occurred in both cell lines, which, due to the delayed onset, was caused by the decrease in the activity of methyltransferases DNMTs via passive pathways. Most likely, the underlying mechanism includes the interaction of oxidative stress with DNMTs or their cofactor SAM. Gene expression profiles also transformed during the 72-hour post incubation period. However, repressive effects could not be observed anymore. The induction of inflammatory genes (*IL1a*, *IL1b*, *IL6*, *IL8*) strongly suggests a persistent inflammatory response in the cells. In A549 cells, oxidative stress response genes (*GPX1*, *NFKB2*) and cell cycle and apoptosis regulation genes (*CDKN1A*, *JUN*) were also transcribed more frequently. Induction in BEAS-2B cells was detected in *CDKN1A* and DNA damage response genes (*DDB2*, *DDIT3*, *GADD45A*).

Finally, the effects of incubation for multiple weeks with lower chromate concentrations were compared with the results of 24 hours of treatment. After incubations of one to five weeks, cytotoxicity, chromate uptake, cell cycle distribution, global methylation, gene-specific methylation of promoter regions of *MLH1* and *MSH2*, and gene expression were analyzed. Cytotoxicity increased after the one-week incubation compared with the short-term incubation and continued to increase until week 2. Intracellular chromium levels were reduced after the one-week treatment compared with 24 h, but remained in the same range until week 5 afterwards. Effects of the long-term experiments can therefore be attributed to prolonged contact with the metal and not to increased chromium concentration. While the cell cycle remained unchanged at all time, global hypomethylation was detected in the long-term experiment. Analysis of the considered section in the promoter region of *MLH1* and *MSH2* revealed that it was unmethylated and not altered by chromate. Thus, no gene-specific hypermethylation could be determined. Gene expression was not affected after the 24-hour incubation, whereas effects were observed with the prolonged treatment. Particularly affected were genes of inflammation, *CCL22* after one week, *IL1a*, *IL1b* and *IL6* after three to four weeks. The NF $\kappa$ B signaling pathway might play a role in the activation of these genes. Furthermore,

oxidative stress response genes underwent induction. Regulators of cell cycle and apoptosis were partially induced (*CDKN1A*, *E2F1*) and partially repressed (*JUN*, *VEGFA*). While markers of DNA damage response were decreased (*DDIT3*, *GADD45A*), transcript levels increased in genes of DNA repair (*LIG1*, *RAD51*).

In summary, the analysis of these toxicological endpoints demonstrated an influence of ascorbic acid and the incubation time. Pre-incubation with DHA resulted in an altered damage response in BEAS-2B cells. This highlights the importance of this aspect, which should be considered in future studies of chromate. Both post-incubation and prolonged incubation time also affected the impact of chromate. Due to the passive mechanism, global hypomethylation could only be detected with a delay. In the present thesis, the relevance of prolonged incubation periods in the analysis of the carcinogenic mechanisms of chromate, especially with regard to the involvement of epigenetic mechanisms, could be elucidated.



## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Chrom

Chrom ist ein natürlich vorkommendes Übergangsmetall, das in der Umwelt ubiquitär vorhanden ist. Sein Name leitet sich vom griechischen *chroma* ab und bedeutet „Farbe“. Diesem Namen liegen seine vielen verschiedenfarbigen Verbindungen zu Grunde. In seiner reinen Form erscheint das Metall silberglänzend (Briehl, 2014).

Im Periodensystem hat Chrom die Ordnungszahl 24 und gehört zur 6. Nebengruppe. Es kann in den Oxidationsstufen von –II bis +VI vorliegen, wobei die Oxidationsstufen 0, +II, +III und +VI am häufigsten vorkommen (Barceloux, 1999). Das zweiwertige Chrom ist ein starkes Reduktionsmittel, das bei Kontakt mit der Luft zu dreiwertigem Chrom oxidiert und daher in biologischen Systemen nicht vorkommt (Pechova & Pavlata, 2007). Das dreiwertige Chrom stellt die stabilste Oxidationsstufe dar. Mit Wasser sowie anderen Sauerstoff, Stickstoff oder Schwefel enthaltenden Molekülen bildet Cr(III) sechsfach koordinierte Komplexe aus, die zu Dimeren, Trimeren oder Polymeren reagieren können. Komplexe, welche Cr(III) mit organischen Liganden eingeht, formen keine Polymere aus. Das sechswertige Chrom fungiert als starkes Oxidationsmittel. Es liegt meistens als Chromat ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) oder Dichromat ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ) vor, welche miteinander im Gleichgewicht stehen. Bei neutralem pH-Wert fällt dieses Gleichgewicht zu Gunsten von Chromat aus, mit sinkendem pH-Wert verschiebt es sich in Richtung Dichromat. Die Sauerstoffgruppen des Chromats ordnen sich tetraedrisch an, wodurch das Molekül strukturelle Ähnlichkeiten zu Phosphaten oder Sulfaten aufweist. In einem sauren pH-Bereich wird Cr(VI) schnell von organischen Molekülen mit oxidierbaren Gruppen zu Cr(III) reduziert, während bei neutralem pH-Wert nur bestimmte organische Reaktionspartner, wie Glutathion oder Ascorbinsäure eine Reduktion von Cr(VI) bewerkstelligen können (Zhitkovich, 2005).

Aufgrund seiner vielfältigen Eigenschaften wird Chrom bereits seit über 200 Jahren industriell verwendet (Browning *et al.*, 2017a). Dadurch trägt der Mensch zusätzlich zu den natürlichen Vorkommen zur Exposition gegenüber Chrom bei (Barceloux, 1999). Auf die Nutzung des Metalls und die verschiedenen Vorkommen sowie die daraus resultierende Exposition des Menschen wird im folgenden Kapitel genauer eingegangen.

## 2.1.1 Vorkommen, Verwendung und Exposition

Chrom ist ein natürlicher Bestandteil der Erdkruste und kommt dort vor allem in Form der Verbindungen Krokotit ( $\text{PbCrO}_4$ ) und Chromit ( $\text{FeCr}_2\text{O}_4$ ) vor (Barceloux, 1999). Des Weiteren trägt der Mensch durch die industrielle Nutzung, Abgase, Zigarettenrauch (Pavesi & Moreira, 2020), Verbrennung fossiler Brennstoffe und Abfälle zur Exposition gegenüber Chrom bei (Nickens *et al.*, 2010). Dadurch kann es in Pflanzen und Tiere gelangen (Shanker *et al.*, 2005) und ist auch in Lebensmitteln zu finden (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2004). Dreiwertiges Chrom wird, meist in Form des Chrompiccolinats, auch als Nahrungsergänzungsmittel angeboten, da ihm eine positive Wirkung auf die Regulation des Blutzuckerspiegels und den Fettstoffwechsel zugeschrieben wird. Die Rolle als essentielles Spurenelement ist jedoch umstritten. Die *European Food Safety Authority* folgerte 2014, dass eine Supplementierung mit Chrom keine vorteilhafte Wirkung für gesunde Menschen darstellt (EFSA, 2014).

Die industrielle Nutzung von Chrom ist vielfältig. Aufgrund seiner farbigen Verbindungen wird es als Pigmente in Farbstoffen und Lacken verwendet (Barceloux, 1999). Zudem wird Chrom bei der Edelstahlherstellung und bei Verchromungen in Legierungen zur Erhöhung der Härte und Korrosionsbeständigkeit eingesetzt (Briehl, 2014). Des Weiteren werden die Verbindungen des Metalls als Holzschutzmittel verwendet (Barceloux, 1999). Bei der Herstellung von metallischem Chrom und Cr(III)-Verbindungen zu diesen Zwecken kann als Zwischenprodukt Cr(VI) entstehen (Beyersmann & Hartwig, 2008). Ein weiteres Einsatzgebiet ist die Ledergerbung, wobei Cr(III)-Verbindungen als Gerbstoffe eingesetzt werden. Dabei können Verunreinigungen mit Cr(VI) auftreten und Rückstände in den Lederprodukten verbleiben (Fuck *et al.*, 2011). Zudem kommt Chrom als natürlicher Bestandteil der Ausgangsprodukte von Zement vor, wodurch es bei dessen Herstellung zur Oxidation von Cr(III)-Verbindungen zu Chromaten kommt (Benedix, 2020).

Durch die vielfältigen Anwendungen sind Beschäftigte in bis zu 80 verschiedenen Industrien gegenüber Chrom exponiert (Pavesi & Moreira, 2020). Die Exposition von Beschäftigten in der Chrom verarbeitenden Industrie erfolgt dabei hauptsächlich über die Lunge und die Haut. Die Allgemeinbevölkerung nimmt das Metall vor allem über die Nahrung auf, jedoch kann sie auch durch Lederprodukte exponiert werden (Chen *et al.*, 2019). Durch Umweltbelastungen erfolgt ebenfalls eine inhalative Exposition, diese ist jedoch geringer als am Arbeitsplatz (Zhang *et al.*, 2021).

## 2.1.2 Toxizität von Chrom

Die Auswirkungen von Chromexpositionen auf die menschliche Gesundheit sind bereits gut erforscht. Die Effekte sind hierbei abhängig vom Aufnahmeweg, der Oxidationsstufe und der Löslichkeit (Pavesi & Moreira, 2020). Bei beruflicher Exposition wird Chrom hauptsächlich

inhalativ und dermal aufgenommen, während die Allgemeinbevölkerung überwiegend oral exponiert ist (Chen *et al.*, 2019).

Bei oraler Aufnahme wird ein Großteil der Cr(VI)-Verbindungen bereits im Magen durch die Magensäure zu Cr(III) reduziert. Die Resorptionsrate im Darm beträgt zwischen 0,5 % und 2 % (Pechova & Pavlata, 2007). Über die Lunge werden lösliche Cr(VI)-Verbindungen sehr gut aufgenommen. Die Aufnahme von Chrom in partikulärer Form ist von Faktoren wie Löslichkeit, Größe und phagozytischer Aktivität der Alveolarmakrophagen abhängig (Barceloux, 1999). Durch dermale Exposition kann sechswertiges Chrom in die Haut eindringen, je nach Konzentration die verschiedenen Hautschichten durchdringen und dann systemisch wirken (Bregnbak *et al.*, 2015). Gelangt aufgenommenes Chrom in den Blutkreislauf, kann es sich im Körper verteilen und akkumuliert vor allem in der Leber, der Milz, in Weichteilgewebe und in den Knochen (Lim *et al.*, 1983). Die Ausscheidung erfolgt hauptsächlich über den Urin (Ducros, 1992).

Im Körper bildet dreiwertiges Chrom Komplexe und wird daher langsam über passive Diffusion oder Phagozytose in die Zelle aufgenommen. Des Weiteren kann Cr(III) an Transferrin binden und über Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen werden (Pavesi & Moreira, 2020). Im Gegensatz dazu passiert sechswertiges Chrom die Zellmembran aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Phosphat und Sulfat über unspezifische Anionentransporter in größerem Ausmaß (Zhitkovich, 2005). Aufgrund der geringen Aufnahme, der Reaktionsträgheit und der Stabilität, weist dreiwertiges Chrom nur eine geringe akute Toxizität auf und wird als nicht-karzinogen angesehen (Pavesi & Moreira, 2020). Im Gegensatz dazu führt der Kontakt mit Cr(VI) zu vielfältigen toxischen Auswirkungen.

Durch eine inhalatorische Exposition gegenüber Cr(VI) entstehen Reizungen der Atemwege, Asthma und Geschwüre der Nasenscheidewand. Des Weiteren weist Cr(VI) eine hautsensibilisierende Wirkung auf, wodurch es zu einer Kontaktallergie kommen kann. Als weitere Folgen einer Cr(VI)-Exposition sind Gastritis, Magengeschwüre, Nierenschädigungen und eine akute tubuläre Nekrose bekannt. Zudem können Leberschäden, Veränderungen des Herzmuskels und reproduktionstoxische Wirkungen auftreten (Chen *et al.*, 2019). Auch neurotoxische Wirkungen von Cr(VI) sind bekannt (Wise *et al.*, 2022). Der Schweregrad der gesundheitlichen Effekte wird durch die exponierte Menge bestimmt. Eine Umweltexposition zu natürlichen Konzentrationen birgt keine Gefahr für die Gesundheit (Pavesi & Moreira, 2020).

Die IARC (*International Agency for Research on Cancer*) stuft Cr(VI) als krebserzeugend für den Menschen (Gruppe 1) ein (IARC, 1990). Durch eine berufliche Exposition mit Cr(VI) kommt es nachweislich zu einem erhöhten Risiko für Lungen-, Nasen- und Nasennebenhöhlenkrebs. Auch ein erhöhtes Risiko für Magenkrebs steht in der Diskussion (den Braver-Sewradj *et al.*, 2021; Mortada *et al.*, 2023). Jedoch stellt die Lunge das am häufigsten betroffene Organ einer Cr(VI)-induzierten Kanzerogenese dar (Browning *et al.*, 2017a).

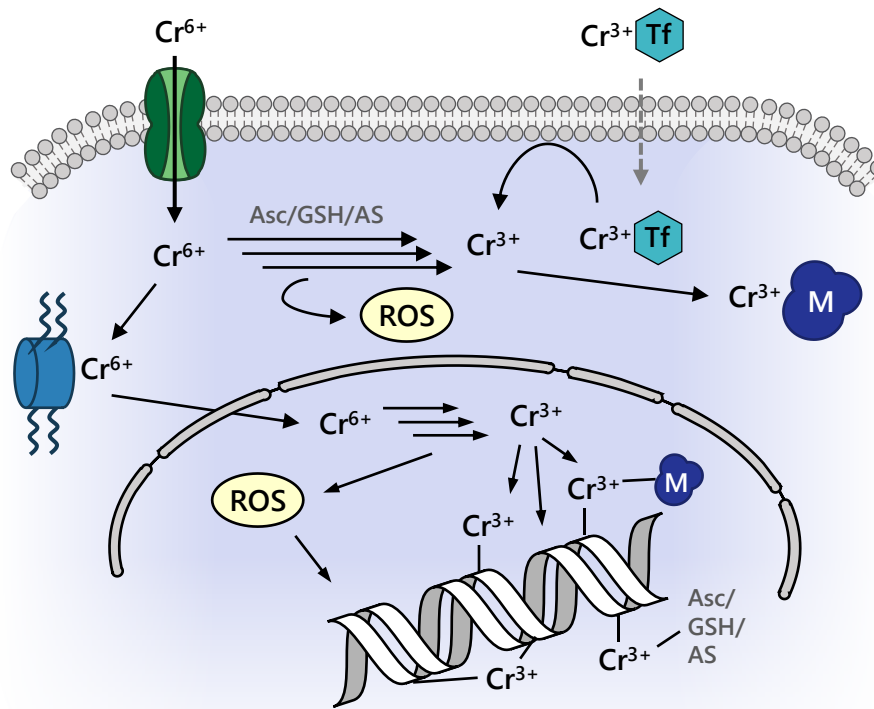
Wie genau es zur Krebsentstehung durch Cr(VI) kommt, ist dabei noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird angenommen, dass mehrere Faktoren bei der Kanzerogenese zusammenwirken (Browning *et al.*, 2017a).

### 2.1.3 Mechanismus der Krebsentstehung

Bereits seit 125 Jahren werden Fälle von Chrom-induziertem Krebs in den Atemwegen dokumentiert. Zahlreiche epidemiologische Studien zeigten, dass Beschäftigte in der Chrom be- und verarbeitenden Industrie ein erhöhtes Risiko für Lungenkrebs aufweisen (Browning *et al.*, 2017a). Ishikawa und Mitarbeitende schätzten die Häufigkeit von Lungenkrebs für ehemalige Chromarbeiter auf über 20-fach höher ein als in der Allgemeinbevölkerung (Ishikawa *et al.*, 1994).

Nach der Aufnahme von Cr(VI) in die Zelle, wird es über das sogenannte „*Uptake Reduction Model*“ zu Cr(III) reduziert (Levina *et al.*, 2006). Dabei kann Cr(VI) über Ein- und Zweielektronendonoren wie Glutathion, Cystein und Ascorbinsäure reduziert werden, wobei letztere der hauptsächliche Reaktionspartner ist (Zhitkovich, 2005). Bei dieser Reduktion entstehen die reaktiven Chromintermediate Cr(V) und Cr(IV). Diese können eine Fenton-ähnliche Reaktion katalysieren, wodurch sich reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bilden (O'Brien *et al.*, 2003). Die entstandenen Chromspezies binden an Makromoleküle, wodurch Chrom in der Zelle akkumuliert. Der größte Teil des von der Zelle aufgenommenen Chromats wird auf diese Weise bereits im Zytoplasma reduziert. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass ein kleiner Teil des Cr(VI) durch die Bindung an lysin- oder argininreiche Peptide, wie Kernproteine, in den Zellkern gelangen und dort mit Proteinen und der DNA interagieren kann (Abbildung 1) (Levina *et al.*, 2006; Pavesi & Moreira, 2020).

Bei den Verbindungen von Chrom mit der DNA handelt es sich sowohl um binäre und ternäre Addukte mit Glutathion, Cystein oder Ascorbat sowie Intra- und Interstrangquervernetzungen. Die ternären Addukte mit Ascorbat weisen ein hohes, mutagenes Potential auf (Eastmond *et al.*, 2008). Chrom bindet hauptsächlich an das Phosphatrückgrat der DNA, kann aber auch mit N<sup>7</sup>-Guanin reagieren (Brown *et al.*, 2020). Während der Replikation können diese Addukte zu Basenfehlpaarungen führen. Das bei der Reduktion von Cr(VI) entstehende Cr(V) ist zudem in der Lage, DNA-Basen direkt zu oxidieren. Oxidative DNA-Schäden können auch durch die Entstehung von ROS generiert werden (Pavesi & Moreira, 2020). Die Reparatur dieser DNA-Schäden erfolgt hauptsächlich über die Nukleotidexzisionsreparatur (NER), Basenexzisionsreparatur (BER) oder die *Mismatch*-Reparatur (MMR) (Wise & Wise, 2012). Werden sie nicht repariert, kann dies zu Fehlpaarungen, prämutagenen Läsionen und Mutationen führen (Pavesi & Moreira, 2020).



**Abbildung 1:** Schematischer Überblick über den Chrom-Metabolismus in der Zelle. Cr(VI) wird über unspezifische Anionentransporter in die Zelle aufgenommen. Cr(III) kann die Zellmembran nur langsam und damit sehr viel weniger im Vergleich zu Cr(VI) durch Diffusion, Phagozytose oder an Transferrin gebunden über Rezeptor-vermittelte Endozytose passieren. Innerhalb der Zelle wird Cr(VI) durch Ascorbinsäure (Asc), Glutathion (GSH) oder Aminosäuren (AS) wie Cystein über Cr(V)- und Cr(IV)-Intermediate zu Cr(III) reduziert, wobei reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen. Intrazelluläres Cr(III) wird an Makromoleküle (M) gebunden. Ein kleiner Teil des Cr(VI) könnte über die Bindung an Kernproteine wie Histone in den Zellkern gelangen. Dort bildet entstehendes Cr(III) binäre und ternäre DNA-Addukte mit den vorherigen Reduktionsmitteln Asc, GSH oder AS sowie DNA- Inter- und Intrastrang Quervernetzungen aus. Modifiziert nach (O'Brien *et al.* (2003), Pavesi&Moreira (2020)).

Zudem können durch eine Exposition gegenüber Chromat Doppelstrangbrüche (DSBs) initiiert werden. Die bei der Replikation der DNA entstandenen Fehlpaarungen werden durch die MMR erkannt. Da das Cr-DNA-Addukt am ursprünglichen DNA-Strang ist, scheitert die MMR bei der Reparatur und durchläuft eine Reihe vergeblicher Reparaturzyklen, die die Replikationsgabel kollabieren lassen und zu einem DSB führen (Browning *et al.*, 2017a). Zudem kann der MMR-Komplex durch die Bindung an die DNA die Replikationsgabel stoppen. Diese kollabiert beim Übergang der Zelle in die G2-Phase, wodurch ein DSB entsteht (Reynolds *et al.*, 2007). Auch aufgrund einer ausbleibenden Reparatur der oxidativen DNA-Schäden durch die BER können DSB entstehen (Browning *et al.*, 2017a). Als Folge einer Anhäufung von DSBs kommt es zu einem G2-Arrest (Wise & Wise, 2012).

Die Reparatur der DSBs kann über verschiedene Mechanismen stattfinden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Cr(VI) die fehlerfrei reparierende Homologe Rekombination (HR)

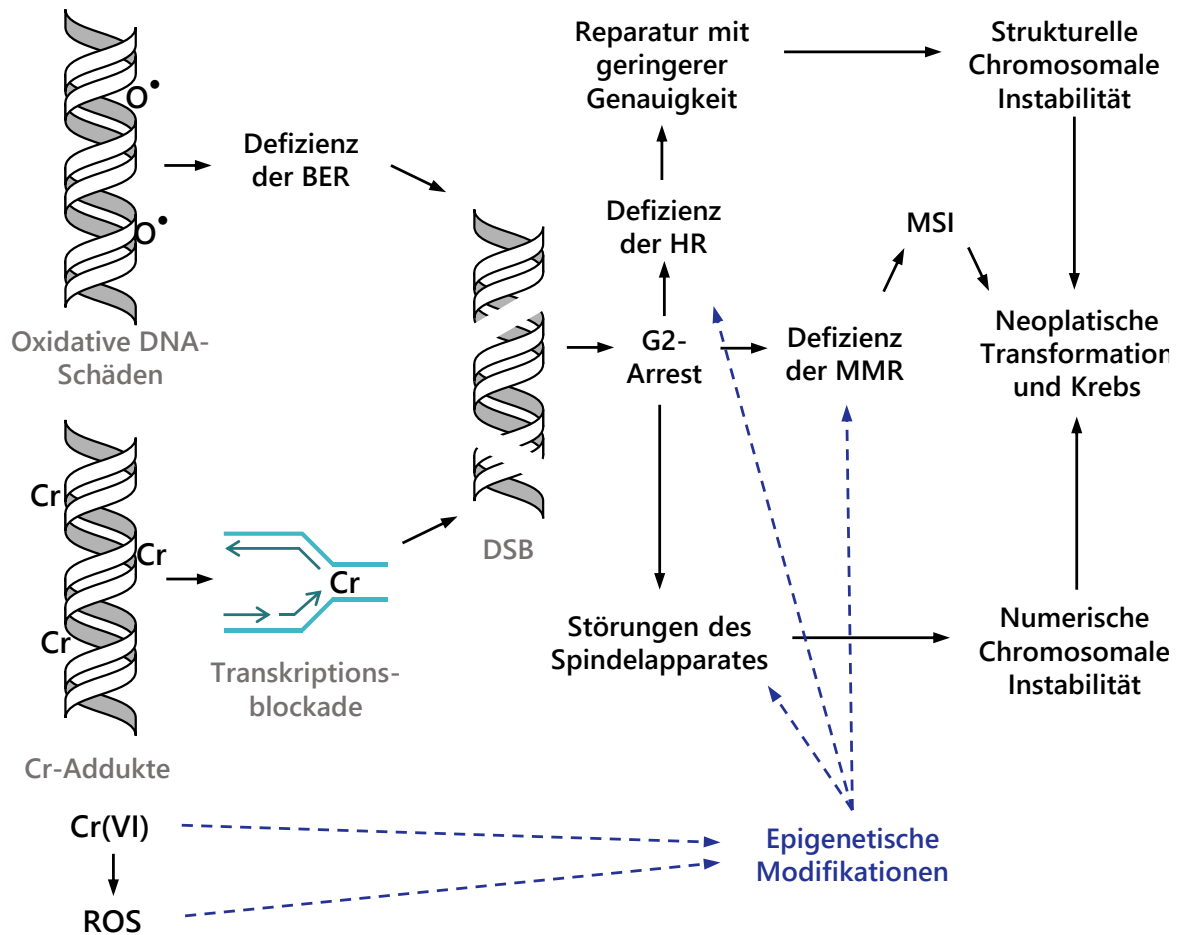
beeinflussen kann und somit weitere Reparaturwege wie *microhomology-mediated endjoining* (MMEJ) aktiviert werden (Haberland *et al.*, 2023). Diese sind ungenauer und können zu strukturellen Chromosomenanomalien wie Deletionen oder Translokationen führen (Browning *et al.*, 2017a). Des Weiteren wirkt Cr(VI) im Zellkern klastogen (Chromosomen-brechend), aneugen (Spindelapparat-beeinflussend) und kann zur Bildung von Mikronuklei führen (Wise *et al.*, 2018). Darüber hinaus kann eine chronische Cr(VI)-Exposition die MMR inaktivieren, wodurch es zu Mikrosatelliteninstabilität und vermehrten Mutationen kommt. Vielen dieser Wirkungen liegen epigenetische Veränderungen zugrunde (Browning *et al.*, 2017a).

Die durch Chrom ausgelöste Kanzerogenese ist multifaktoriell bedingt. Dabei spielen viele Mechanismen eine Rolle (Browning *et al.*, 2017a). Ein Überblick über den momentanen Wissenstand gibt Abbildung 2.

Eines der diskutierten Modelle, wie es durch Chromat zur Tumorbildung kommt, ist die mehrstufige Kanzerogenese. Hierbei gibt es die Schritte Initiation, Promotion und Progression. Im Schritt der Initiation wird eine irreversible, vererbare genetische Mutation erworben (Ito *et al.*, 1995). Auch durch Chromat können aufgrund von DNA-Addukten und oxidativen DNA-Schäden Mutationen entstehen (Pavesi & Moreira, 2020).

Sehr wahrscheinlich spielt genomische Instabilität eine große Rolle in der Chromat-induzierten Tumorentstehung. Es gibt eine Vielzahl an Studien, die ein Entstehen von genomischer Instabilität durch Cr(VI) zeigen konnten, wobei Cr(VI) verschiedene Formen von genomischer Instabilität verursacht, wie Mikrosatelliteninstabilität und Chromosomeninstabilität. Die genauen Mechanismen hinter der Entstehung der genomischen Instabilität sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Es scheint die MMR dabei eine wichtige Rolle zu spielen (Browning *et al.*, 2017a).

In engem Zusammenhang damit steht die Veränderung von epigenetischen Mechanismen. Eine Modifikation dieser transkriptionsregulierenden Mechanismen durch Cr(VI) konnte ebenfalls in mehreren Studien gezeigt werden und scheint in die Chromat-induzierte Kanzerogenese involviert zu sein (Zhang *et al.*, 2021). Einen ausführlichen Überblick über epigenetische Mechanismen und den Einfluss von Cr(VI) auf diese gibt das folgende Kapitel.



**Abbildung 2: Überblick über die Chrom-induzierte Kanzerogenese.** Durch Chrom verursachte oxidative DNA-Schäden führen bei einer ausbleibenden Reparatur durch die Basenexzisionsreparatur (BER) zu DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs). Chrom-DNA-Addukte führen über eine Blockade der Transkriptionsgabel ebenfalls zu DSBs. Eine Anhäufung von DSBs führt zu einem G2-Arrest. Ist die fehlerfreie Homologe Rekombination (HR) gestört, werden die DSB über Reparaturwege mit höherer Fehlerrate repariert, wodurch es zu struktureller, chromosomaler Instabilität kommt. Ist die *Mismatch* Reparatur (MMR) zudem gehemmt, kommt es zu Mikrosatelliteninstabilität (MSI). Störungen des Spindelapparates führen zu numerischer, chromosomaler Instabilität. Alle genomischen Instabilitäten führen zu neoplastischer Transformation und schließlich zur Krebsentstehung. Chrom und entstehende reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können epigenetische Veränderungen verursachen, die zur Defizienz der Reparaturwege und Störungen des Spindelapparates führen können. Modifiziert nach Browning *et al.* (2017a).

## 2.2 Epigenetik

Das Gebiet der Epigenetik befasst sich mit stabilen, mitotisch vererbaren Faktoren, die die Expression eines Gens regulieren (Blomen & Boonstra, 2011). Der Begriff setzt sich aus den Wörtern *epi*, aus dem Griechischen für „dazu, über“, und Genetik zusammen. Es handelt sich um Modifikationen, die nicht auf einer Veränderung der Basenabfolge basieren (Reinhold *et al.*, 2018). Epigenetische Mechanismen sind für die gewebsspezifische Expression der proteincodierenden Gene in verschiedenen Zelltypen mit gleicher genetischer Information zuständig (Wei *et al.*, 2014). Sie sind daher auch für die Zelldifferenzierung und normale Entwicklung, insbesondere während der Embryogenese von großer Bedeutung (Handy *et al.*, 2011).

Die epigenetischen Modifikationen sind reversibel und können durch Umwelteinflüsse sowie die Lebensweise, das heißt z. B. durch Stress und Ernährung beeinflusst werden (Toraño *et al.*, 2016). Zudem können epigenetische Veränderungen in Keimzellen auf die nachfolgende Generation übertragen werden. Bestimmte Krankheiten können auf eine Fehlregulation der Epigenetik zurückgeführt werden. Besonders bei der Tumorentstehung spielt die epigenetische Regulation eine Rolle (Wei *et al.*, 2014).

Zu den als Epigenom zusammengefassten Mechanismen zählen die DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und nicht-codierende RNAs (ncRNAs). Die DNA-Methylierung und Histonmodifikationen wirken dabei auf transkriptioneller Ebene, während ncRNAs meist posttranskriptionell wirken. Gebildet werden ncRNAs durch die Transkription von nicht-codierenden Regionen der DNA (Gibney & Nolan, 2010). Sie interagieren mit komplementärer *messenger*-RNA (mRNA), indem sie mit ihr interferieren, sie spalten oder translatorisch unterdrücken und so die Genexpression beeinflussen (Wilson & Doudna, 2013). Die transkriptionellen epigenetischen Mechanismen werden in den nächsten zwei Kapiteln behandelt.

### 2.2.1 DNA-Methylierung

Bei der DNA-Methylierung wird eine Methylgruppe kovalent an eine DNA-Base gebunden. Die häufigste Modifikation bei Säugetieren stellt hierbei die Methylierung am C5-Atom des Cytosins dar (5mC) (Moore *et al.*, 2013). Organismen wie Bakterien weisen zusätzlich andere Formen von DNA-Methylierung auf, wie das N6-Methyladenin (6mA). 6mA wurde in Gewebe von Säugetieren bisher nur in geringen Mengen nachgewiesen und dessen Funktion ist bisher ungeklärt (Sun *et al.*, 2015).

Die Methylierung des Cytosins tritt meist in Cytosin-Guanin-Dinukleotiden (CpGs) auf. Es konnten auch Methylierungen außerhalb des CpG-Kontextes gefunden werden, jedoch ist deren Funktion bisher nicht bekannt. 5mC kann in vielen genomischen Bereichen, wie Genkörpern, Promotorregionen von Genen, intergenischen Regionen, Transposonen und

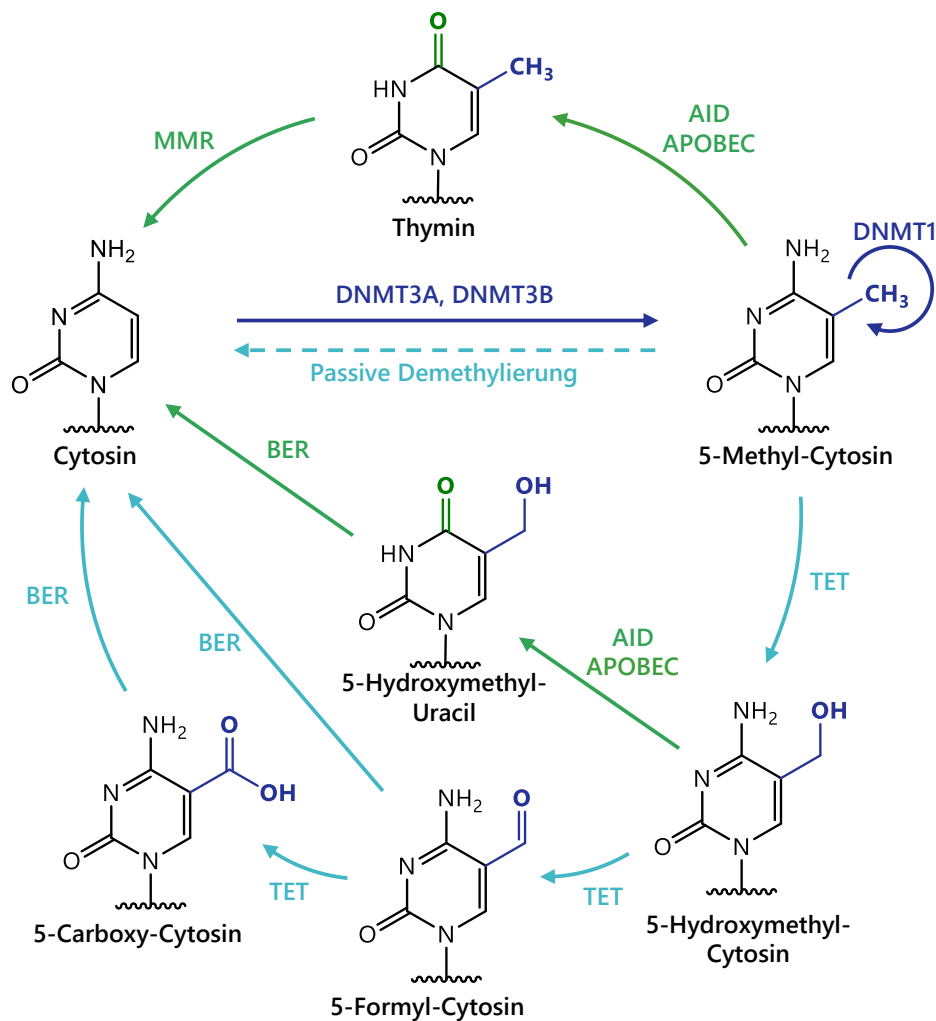


repetitiven Elementen vorkommen (Jones, 2012). In Säugetieren liegen 60-80 % der CpGs methyliert vor (Ambrosi *et al.*, 2017), was etwa 3 % aller Cytosine entspricht (Gibney & Nolan, 2010). CpG sind im gesamten Genom eher selten vorhanden, treten jedoch gehäuft in Promotorregionen, in sogenannten CpG-Inseln auf (Ambrosi *et al.*, 2017). CpG-Inseln umfassen Bereiche von etwa 200 bp, in welchem der CG-Anteil mindestens 50 % beträgt und über 60 % als CpGs auftreten (Fazzari & Grealley, 2004). Dieses Muster ist in etwa 70 % der Promotorregionen vorhanden und zählt somit zu den häufigsten Promotormarkern in Wirbeltieren (Deaton & Bird, 2011). Die CpGs in CpG-Inseln liegen meist unmethyliert vor (Fazzari & Grealley, 2004).

Die Methylierung und Demethylierung der CpG läuft hauptsächlich enzymatisch ab. Für die Methylierung sind die DNA-Methyltransferasen (DNMTs) zuständig. Bei diesem Prozess wird eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (SAM) auf das Cytosin übertragen, wobei SAM zu S-Adenosylhomocystein (SAH) reagiert. DNMTs werden in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt, *de novo*- und Erhaltungs-Transferasen. Die *de novo*-Transferasen DNMT3a und DNMT3b katalysieren die Methylierung unmethylierter CpGs und werden dabei von DNMT3L reguliert. Bei der DNA-Replikation wird diese Methylierung auf den neu synthetisierten Tochterstrang kopiert, wodurch sie bei der Zellteilung erhalten bleibt. Dies wird durch die Erhaltungs-Transferase DNMT1 katalysiert, welche hemimethylierte DNA erkennt und die Methylierung an einem CpG postreplikativ auf das gepaarte CpG des anderen Strangs repliziert (Ambrosi *et al.*, 2017).

Die Entfernung dieser Methylgruppe kann auf verschiedenen Wegen vonstattengehen (Abbildung 3). Die Demethylierung läuft hauptsächlich enzymatisch durch die *Ten-Eleven Translocation* Methylcytosin Dioxygenasen (TET) 1-3 ab. Sie katalysieren die Oxidation von 5mC zu 5-Hydroxymethyl-Cytosin (5hmC), weiter zu 5-Formyl-Cytosin (5fC) und schließlich zu 5-Carboxyl-Cytosin (5caC) (Christmann & Kaina, 2019). Für die Reaktion benötigen die TETs  $\alpha$ -Ketoglutarat, Eisen(II), Sauerstoff und Ascorbinsäure als Kofaktoren. Unter ATP-Verbrauch reagieren  $\alpha$ -Ketoglutarat und  $O_2$  zu Succinat und  $CO_2$ . Fe(II) im katalytischen Zentrum der TETs wird dabei zu Fe(III) oxidiert und anschließend durch Ascorbinsäure wieder zu Fe(II) reduziert (Young *et al.*, 2015). Über die Basenexzisionsreparatur können 5caC und 5fC erkannt und entfernt werden. Anschließend wird unmethyliertes Cytosin wieder in die DNA eingebaut (Brabson *et al.*, 2021). Auch 5hmC kann ohne weitere Oxidation entfernt werden, indem das Molekül mittels AID (Aktivitäts-induzierter Desaminase) oder APOBEC (Apolipoprotein B mRNA-editierendes Enzym, katalytisches Polypeptid) zu 5-Hydroxy-Uracil desaminiert wird, worauf ebenfalls ein Austausch zu Cytosin durch die BER folgt (Christmann & Kaina, 2019).

Methylierte Cytosine haben eine hohe Tendenz zu spontaner Desaminierung, wodurch Thymin entsteht. Diese Reaktion kann auch enzymatisch über AID oder APOBEC vonstattengehen. Dadurch kommt es zu einer Fehlpaarung von Guanin zu Thymin, welche durch die MMR repariert wird. Wird die Fehlpaarung nicht repariert, kann dies zu einer C→T-Transition führen (Brabson *et al.*, 2021).



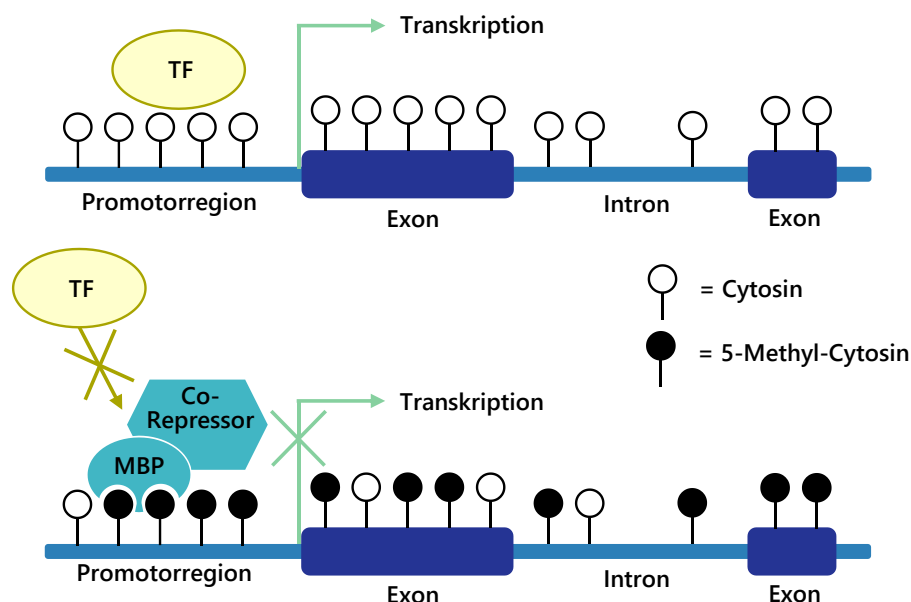
**Abbildung 3:** Mögliche Wege der Demethylierung von 5-Methyl-Cytosin (5mC) zu Cytosin. Bei verringerter DNA-Methyltransferase (DNMT)-Aktivität kann 5mC bei der DNA-Replikation durch eine fehlende Übertragung der Methylgruppe auf den Tochterstrang passiv demethyliert werden. Durch eine Oxidation mit den *Ten-Eleven Translocation* Methylcytosin Dioxygenasen (TET) reagiert 5mC über 5-Hydroxymethyl-Cytosin (5hmC) über 5-Hydroxymethyl-Uracil (5hmU) und 5-Formyl-Cytosin (5fC) zu 5-Carboxy-Cytosin (5caC). 5fC und 5caC werden über die Basenexzisionsreparatur (BER) mit Cytosin ersetzt. 5hmC kann über die Deaminasen AID und APOBEC zu 5-Hydroxymethyl-Uracil desaminiert werden, welches durch die BER mit Cytosin ersetzt wird. 5mC kann durch AID, APOBEC oder spontan zu Thymin desaminiert werden. Die Thymin-Guanin Fehlpaarung wird durch die MMR repariert (Brabson *et al.*, 2021; Christmann & Kaina, 2019; Moore *et al.*, 2013).

Einen weiteren Mechanismus der Entfernung einer Methylgruppe von Cytosin stellt die passive Demethylierung dar. Hierbei wird die Methylgruppe bei der DNA-Replikation durch eine fehlende DNMT1-Aktivität nicht auf den Tochterstrang kopiert, wodurch sie über weitere Zellteilungen hinweg verloren geht (Moore *et al.*, 2013).

Die Methylierung des Cytosins hat keinen Einfluss auf die Basenpaarung mit Guanin. Vielmehr verändert sie die biophysikalischen Eigenschaften der DNA, wodurch die Transkription gesteuert wird (Gibney & Nolan, 2010). Die Auswirkungen einer Methylierung auf die Genexpression sind abhängig von deren Position im Gen (Jones, 2012). Liegt sie im Promotorbereich oder intergenischen Region vor, führt die Methylierung zu einer Inaktivierung des Gens, was ihren hauptsächlichen Effekt darstellt (Moore *et al.*, 2013). Durch die Methylierung wird die Bindung von Transkriptionsfaktoren entweder direkt oder durch die Rekrutierung von Methyl-DNA-bindenden Proteinen verhindert, wodurch keine Transkription möglich ist (Abbildung 4) (Parle-McDermott & Ozaki, 2011). Zu den Methyl-DNA-bindenden Proteinen zählen unter anderem die Methylbindedomäne (MBD) Proteine MBD1-4 und MeCP2. MBD1, MBD2 und MeCP2 können Co-Repressorkomplexe rekrutieren, welche Histonmodifikationen verändern. Dies führt zu einer Chromatinkondensation, wodurch das Gen für die Transkription nicht mehr zugänglich ist (siehe Kapitel 2.2.2) (Moore *et al.*, 2013).

Die Inaktivierung eines Gens ist nicht gleichbedeutend mit der Verhinderung der Genexpression. Durch das Fehlen von regulierenden ncRNAs kann es auch zur vermehrten Expression unerwünschter Gene kommen (Deaton & Bird, 2011).

Ist die Methylierung im Genkörper lokalisiert, könnte dies auch zu einer verstärkten Expression führen (Moore *et al.*, 2013). Dies könnte sich ebenfalls durch die Reduktion von regulierenden ncRNAs ereignen, jedoch ist der genaue Mechanismus noch unbekannt (Siegfried & Simon, 2010).

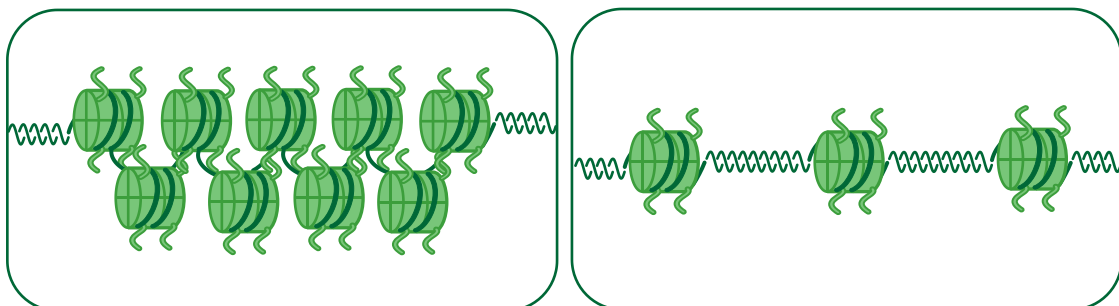


**Abbildung 4: Regulation der Transkription durch die DNA-Methylierung.** Liegt die Promotorregion eines Gens unmethyliert vor, können Transkriptionsfaktoren (TF) an die DNA binden und das Gen abgelesen werden. Durch Anwesenheit von 5-Methyl-Cytosin wird die Bindung von TF direkt, durch die Rekrutierung von Methyl-DNA-bindenden Proteinen (MBP) oder die Rekrutierung von Co-Repressorkomplexen durch MBPs verhindert, wodurch es zur Inaktivierung des Gens kommt. Modifiziert nach Parle-McDermott&Ozaki (2011).

Die DNA-Methylierung ist insbesondere bei der Entwicklung und Differenzierung von Geweben, der X-Chromosomeninaktivierung, beim *Imprinting* und der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität von Bedeutung. Eine Fehlregulation der Methylierung, wie Hypo- oder Hypermethylierung kann zu Entwicklungsdefekten und Erkrankungen wie Krebs führen (Ambrosi *et al.*, 2017).

## 2.2.2 Histonmodifikationen

Wie die DNA können auch Histone, die Kernproteine, auf denen die DNA aufgewickelt ist, modifiziert werden und so Einfluss auf die Genexpression nehmen. Es gibt 5 verschiedene Klassen an Histonen, die H1, H2A, H2B, H3 und H4 (Ramazi *et al.*, 2020). Jeweils zwei Proteine der letzteren vier Klassen ordnen sich zu einem Oktamer zusammen, welches mit einem Abschnitt von etwa 146 bp der DNA umwickelt ist (Gelato & Fischle, 2008). Dies wird als Nukleosom bezeichnet. Im Bereich zwischen den Nukleosomen, der Linker-DNA, bindet das Histon H1 (Legoff *et al.*, 2019). Die DNA kann lockerer oder fester um die Histone gepackt sein, wodurch die Replikation, Transkription, Rekombination und Reparatur reguliert werden können. Bereiche der engeren Packung der DNA um die Histone werden als Heterochromatin bezeichnet, Bereiche der offeneren Packung als Euchromatin. Als Heterochromatin ist die DNA unzugänglicher für Enzyme, wodurch eine Transkription verhindert wird. Im Euchromatin ist die DNA zugänglich und kann abgelesen werden (Gelato & Fischle, 2008). Die beiden Chromatinformen sind in Abbildung 5 dargestellt. Ob die DNA als Hetero- oder Euchromatin vorliegt, ist von verschiedenen Faktoren abhängig, zu welchen die DNA-Methylierung, ncRNAs, RNA-Interferenz und Histonmodifikationen zählen. Auch das Linker-Histon H1 wird mit einer stärkeren Kondensation der DNA assoziiert (Biterge, 2016). Zusätzlich zu dieser Funktion wird H1 eine Förderung der DNA-Methylierung durch eine Interaktion mit DNMT1 und DNMT3b zugeschrieben (Yang *et al.*, 2013).



**Abbildung 5: Verschiedene Packungsdichten des Chromatins.** Die DNA (dunkelgrün) ist auf die Histonoktamere (hellgrün) aufgewickelt. Links dargestellt ist Heterochromatin, die Histone sind eng gepackt und die DNA dadurch unzugänglich. Rechts dargestellt ist Euchromatin, die Histone sind locker gepackt und dadurch zugänglich. Modifiziert nach Biterge (2016).

Die N-terminalen Seitenketten der Histone ragen aus den Nucleosomen heraus und sind zugänglich für reversible, posttranslationale Modifikationen. Bei diesem biochemischen Prozess werden funktionelle Gruppen, wie Acetylierungen, Methylierungen oder Phosphorylierungen, kovalent an Aminosäuren der Histone gebunden. Am häufigsten werden die basischen Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R) modifiziert. Durch die posttranslationalen Modifikationen wird die Genexpression reguliert, indem die Chromatinstruktur, die Bindung von Proteinen und die Rekrutierung von Effektorproteinen beeinflusst werden (Gibney & Nolan, 2010).

Acetylierungen werden durch Histon-Acetyl-Transferasen (HATs) hinzugefügt und durch Histon-Deacetylasen (HDAC) abgespalten (Christmann & Kaina, 2019). Häufig wird die freie Aminogruppe eines Lysins in der N-terminalen Seitenkette acetyliert, wodurch die Aminosäure ihre positive Ladung verliert. Dadurch verringert sich die elektrostatische Wechselwirkung des Histons mit der DNA. Dies führt zu einer Lockerung der Chromatinstruktur und Zugänglichkeit der entsprechenden Gene (Ramazi *et al.*, 2020). Die Acetylierung der Histone kann somit einer Aktivierung von Genen und die Deacetylierung einer Inaktivierung von Genen zugeordnet werden (Handy *et al.*, 2011).

Methylierungen werden durch Histon-Methyltransferasen auf die Histone übertragen und durch Histon-Demethylasen oder -Deiminasen wieder entfernt. Aminosäuren können einfach, zweifach oder dreifach methyliert werden, wobei an Arginin maximal eine Dimethylierung, an Lysin jedoch eine Trimethylierung erfolgen kann (Gibney & Nolan, 2010). Die biologische Funktion der Histon-Methylierungen ist von der Aminosäure, der Position und der Anzahl der funktionellen Gruppen abhängig und kann sowohl aktivierend als auch reprimierend auf die Genexpression wirken (Ramazi *et al.*, 2020). Die Methylierung am vierten Lysin des H3-Histons (H3K4me), am H3K36 und H3K79 führt zu einer Aktivierung des Gens, während die Methylierung an H3K9, H4K20 und H3K27 zur Inaktivierung eines Gens beiträgt (Zhao & Shilatifard, 2019).

### 2.2.3 Einfluss von Chrom auf das Epigenom

Wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben wurde, hat Chrom einen Einfluss auf epigenetische Mechanismen. Eine Exposition gegenüber Chromat kann sowohl Änderungen in der DNA-Methylierung und den Histonmodifikationen bewirken, als auch die Expression von ncRNAs beeinflussen (Zhao *et al.*, 2022). Dadurch kommt es zu einer veränderten Genexpression von Tumorsuppressorgenen, Genen der DNA-Reparaturproteinen und weiteren Genen. Diese Dysregulation kann zu genomischer Instabilität führen und somit zur Kanzerogenese beitragen (Guo *et al.*, 2019). Zur Untersuchung des Einflusses von Chromat auf das Epigenom wurden Studien an Gewebeproben aus Lungentumoren von Beschäftigten in der Chromindustrie, Zellkulturstudien und *in vivo* Studien durchgeführt (Browning *et al.*, 2017a).

Chromat bewirkt auf globaler Ebene eine Hypomethylierung der DNA, während es im Promotorbereich einiger Gene zu einer Hypermethylierung kommt (Ali *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2018). Dies konnte für die Gene *APC* (Ali *et al.*, 2011), *MLH1* (Ali *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2016; Tsuboi *et al.*, 2020), *p16* (Ali *et al.*, 2011; Kondo *et al.*, 2006), *MGMT*, *HOGG1* und *RAD51* (Hu *et al.*, 2018) gezeigt werden. Der zugrundeliegende Mechanismus hinter den Methylierungsänderungen durch Chromat ist noch nicht aufgeklärt. Es könnte möglich sein, dass ROS-induzierter oxidativer Stress eine Rolle spielt (Guo *et al.*, 2019).

Chromat führt ebenfalls zur Veränderung vieler verschiedener Histonmodifikationen, wobei sowohl reprimierende als auch aktivierende Veränderungen auftreten. Eine Beeinflussung der Methylierung von H3K4, H3K9, H3K27, H3R2 und der Acetylierung von H3, H4 und H4K16 durch Chromat konnte bereits nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 2019). Zudem wirkt Chromat auf die Histon-Biotinylierung und -Phosphorylierung (Browning *et al.*, 2017a). Die Veränderungen der Histonmodifikationen könnten in der Beeinflussung der regulierenden Enzyme begründet sein. Für die H3K9-Histonmethyltransferase G9a konnte eine Chromat-induzierte Aktivierung bereits gezeigt werden (Sun *et al.*, 2009). Zudem konnten Effekte auf Proteinlevel von HDACs nachgewiesen werden (Browning *et al.*, 2017a).

Einen weiteren Einfluss von Chromat auf das Epigenom stellt die Veränderung der expressionsregulierenden mikroRNAs (miRNA) und *long non-coding* RNAs (lncRNA), welche Untergruppen der ncRNA sind, dar. Nach Exposition gegenüber Chromat werden diese teilweise vermehrt, teilweise verringert (Zhao *et al.*, 2022).

Viele epigenetische Veränderungen durch Chromat konnten mit einer Hemmung der DNA-Reparatur assoziiert werden. So führt eine Hypermethylierung im Promotorbereich von DNA-Reparaturgenen wie *RAD51*, *HOGG1* oder *MGMT* zu einer verringerten mRNA Expression und einem niedrigeren Proteinlevel (Hu *et al.*, 2018). Ein weiteres Gen, dessen verminderte Expression mit einer Hypermethylierung in Verbindung gebracht wird, stellt *ERCC4* dar (Wu *et al.*, 2012). Ebenfalls konnte eine Hypermethylierung im Promotorbereich für *MLH1* nachgewiesen werden, welche zu einem verringerten Proteinlevel führte, wodurch die MMR gehemmt wurde (Ali *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2005). Auch Veränderungen in Histonmodifikationen zeigten einen Einfluss auf die Genexpression von *MLH1* (Sun *et al.*, 2009). Ein erhöhtes Level bestimmter miRNA nach Chromat-Exposition konnte unter anderem der Regulation von Genen der DNA-Reparatur, wie der HR, zugeordnet werden, wohingegen ein niedrigeres Level an miRNA mit Angiogenesefaktoren und dem NFκB-Signalweg in Verbindung gebracht wird (Browning *et al.*, 2017a).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass eine Exposition gegenüber Chromat epigenetische Veränderungen in allen Bereichen verursacht, wodurch die Genexpression dysreguliert und genetische Instabilität gefördert wird. Jedoch sind die zugrundeliegenden Mechanismen, die genauen Auswirkungen und die spezielle Art der Modifikationen noch unklar und bedürfen weiterer Forschung (Wang & Yang, 2023).

## 2.3 Zellkulturstudien als Modell zur Untersuchung der Chromat-Toxizität

Im Rahmen des 3R (*replace, reduce, refine* – ersetzen, reduzieren, verbessern)-Prinzip, durch welches die Zahl an Tierversuchen aus ethischen Gründen reduziert werden soll, gewinnen *in vitro* Studien immer mehr an Bedeutung. Die Testsysteme werden stetig weiterentwickelt, um Ergebnisse zu generieren, welche adäquater auf den Menschen übertragbar sind (Upadhyay & Palmberg, 2018). Zur Erforschung des Einflusses von Chromat auf die epigenetische Regulation kommen hauptsächlich traditionelle, submerse 2D-Zellkulturen zum Einsatz. Diese bieten viele Vorteile gegenüber anderen Testsystemen, weisen jedoch auch einige Limitationen auf.

Zellkulturen werden häufig verwendet, um ein Verständnis der Mechanismen zu erhalten, die den *in vivo* Effekten zugrunde liegen (Duval *et al.*, 2017). Die klassische 2D-Zellkultur stellt dabei das am häufigsten genutzte Modell dar und findet bereits seit einem Jahrhundert in vielen Forschungsfeldern Einsatz (Kapałczyńska *et al.*, 2018). Inzwischen existieren viele etablierte Zelllinien aus nahezu jedem Organ und Gewebetyp, sodass diese entsprechend der wissenschaftlichen Fragestellung gewählt werden können (Tutty *et al.*, 2023).

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss jedoch beachtet werden, dass Zellkulturstudien nur bedingt auf die Effekte *in vivo* übertragbar sind. Da nur ein Zelltyp vereinzelt kultiviert wird, kann keine natürliche Gewebsstruktur nachgebildet werden. Dadurch fehlen Interaktionen zwischen verschiedenen Zellarten oder der Zelle zu ihrer natürlichen Umgebung. Ebenso können sich die molekularen Mechanismen und die Eigenschaften der kultivierten Zellen zu ihrem Pendant *in vivo* unterscheiden (Kapałczyńska *et al.*, 2018).

Ein weiterer Unterschied der Zellkultur zu den Bedingungen *in vivo* stellt der intrazelluläre Ascorbinsäuregehalt dar. Dieser ist insbesondere bei der Untersuchung der Chromat-Toxizität von Interesse, da Ascorbinsäure eine wichtige Rolle im Metabolismus einnimmt. Hierauf wird in Kapitel 2.3.1 genauer eingegangen (Zhitkovich, 2021).

Trotz der Limitationen ist die klassische Zellkultur weiterhin ein relevantes und effektives Testsystem (Tutty *et al.*, 2023) und weist im Gegensatz zu anderen Testsystemen oder *in vitro* Modellen viele Vorteile auf. Sie ist einfacher in der Handhabung, günstiger und weniger zeitaufwendig (Upadhyay & Palmberg, 2018). Zudem bietet sie eine hohe Effizienz, gute Reproduzierbarkeit und eine einfache Auswertung (Kapałczyńska *et al.*, 2018). Durch das Wachstum in einer Ebene werden alle Zellen gleichmäßig mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren versorgt, wodurch es zu einem homogenen Wachstum und gleichmäßiger Proliferation kommt (Duval *et al.*, 2017). Zudem können mit *in vitro* Modellen detaillierte zelluläre und subzelluläre Funktionen besser erforscht werden (Upadhyay & Palmberg, 2018).

Auch die Durchführung von Langzeitkulturen sind mit der klassischen Zellkultur möglich (Kapałczyńska *et al.*, 2018). Diese sind bei der Betrachtung epigenetischer Mechanismen notwendig, da oft ein längerer Zeitraum benötigt wird, damit Effekte, insbesondere in der DNA-Methylierung, sichtbar werden. Dieser Aspekt wird in Kapitel 2.3.2 näher betrachtet.

### 2.3.1 Ascorbinsäure in Zellkulturstudien

Ascorbinsäure ist ein wasserlöslicher, essenzieller Mikronährstoff, welcher auch als Vitamin C bekannt ist. Das Vitamin kann in seiner reduzierten Form Ascorbinsäure oder der oxidierten Form Dehydroascorbinsäure (DHA) vorliegen. Aufgrund einer Mutation im Enzym L-Gulonolacton-Oxidase im letzten Schritt der Ascorbinsäuresynthese können Menschen das Vitamin nicht selbst herstellen und müssen es im Gegensatz zu vielen anderen Tierarten über die Nahrung aufnehmen (Zhitkovich, 2020).

Ascorbinsäure gelangt über den Natrium-abhängigen Vitamin C-Transporter (SVCT) 2 in die Zelle. DHA hat eine strukturelle Ähnlichkeit zu Glucose und wird daher über GLUT-Transporter aufgenommen und intrazellulär schnell zu Ascorbat reduziert (Bürzle & Hediger, 2012). Die Ascorbinsäure-Konzentration im Plasma beträgt etwa 50  $\mu\text{M}$ , im Gewebe liegt diese bei 1-5 mM und kann in bestimmten Zelltypen bis zu 10 mM erreichen. Die Verteilung von Ascorbat innerhalb der Zelle wurde noch nicht bestimmt, jedoch wird davon ausgegangen, dass die Konzentrationen im Zellkern und Zytoplasma ähnlich sind (Zhitkovich, 2020).

Auf zellulärer Ebene wirkt Ascorbinsäure als Antioxidans und ist Kofaktor für über 60 Enzyme. Die antioxidativen Eigenschaften gehen dabei auf die Fähigkeit der Ascorbinsäure zurück, Radikale abzufangen, indem sie als Elektronendonator fungiert und selbst zu DHA oxidiert wird. Zudem kann Ascorbinsäure ROS wie Singulett-Sauerstoff oder Superoxidanionradikale entgiften (Zhitkovich, 2020). Die hauptsächliche Enzymklasse, in welcher Ascorbinsäure als Kofaktor wirkt, sind Fe(II)/ $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenasen, welche eine Rolle in der Transkription und Bildung der extrazellulären Matrix spielen (Zhitkovich, 2021). Wie in 2.2.1 beschrieben, wird bei der Reaktion dieser Enzyme Fe(II) zu Fe(III) oxidiert, wodurch es die Fähigkeit verliert,  $\text{O}_2$  zu binden (Islam *et al.*, 2018). Ascorbinsäure reduziert Fe(III) zu Fe(II), dadurch steht es den Enzymen wieder zur Verfügung (Losman *et al.*, 2020). Zur Klasse der Fe(II)/ $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen gehören auch Enzyme der epigenetischen Regulation, wie die TET-Enzyme und die Mehrheit der Histon-Lysin-Demethylasen. Dadurch hat Ascorbinsäure Einfluss auf die transkriptionelle Zugänglichkeit der DNA und die genomische Stabilität (Brabson *et al.*, 2021).

Trotz der vielfältigen und bedeutenden Funktionen von Vitamin C sind die typischen Zellkulturen Ascorbinsäure-defizient. Die meisten Nährmedien für Standardzellkulturen beinhalten das Vitamin nicht, wodurch der Zusatz von Serum die einzige Quelle darstellt. Ascorbat wird im Nährmedium schnell oxidiert und DHA reagiert irreversibel weiter, wodurch das Serum keine ausreichende Versorgung gewährleistet. Selbst bei einer täglichen Zugabe von frischem Medium konnten nur intrazelluläre Vitamin C-Gehalte von weniger als 1 % des physiologischen Wertes erreicht werden. Das klinische Symptom eines Ascorbinsäure-Mangels, Skorbut, tritt bereits ab Konzentrationen unter 20 % des Normalwertes auf. Primäre Zellkulturen verlieren ihre intrazelluläre Ascorbinsäure innerhalb von 24 h nach der Inkulturnahme. Auch



Zellkulturen aus Nagern sind Ascorbinsäure-defizient, da die Tiere das Vitamin ausschließlich in der Leber synthetisieren (Zhitkovich, 2021).

Dieser Mangel an Vitamin C in Zellkulturen kann zu veränderten zellulären Prozessen führen. Bei der Betrachtung der Chromat-Toxizität ist Ascorbinsäure von besonderem Interesse, da Chromat intrazellulär durch Ascorbat zu Chrom(III) reduziert wird. Bei dieser Reaktion findet ein Zweielektronentransfer von Chrom(VI) zu Chrom(IV) statt. Liegt ein Mangel an Ascorbinsäure vor, metabolisiert Chrom(VI) durch eine Einelektronentransfer-Reaktion, z. B. mit Glutathion zu Chrom(V), welches hochreaktiv ist und zu DNA Strangbrüchen führen kann (Zhitkovich, 2020). Ein physiologisches Level an Ascorbinsäure bei der Untersuchung von Chromat verändert daher das Schadensprofil des Metalls. Dies konnte bereits in einigen Studien gezeigt werden. Eine Beladung der Zellen mit Vitamin C führte zu einem Anstieg an DSB und Mikrokernen (Reynolds *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu wurden durch Chromat-induzierte Effekte durch eine Ascorbat-Zugabe teilweise auch gemindert. Beispiele hierfür sind die Phosphorylierung der CHK2 Checkpoint Kinase, die C-terminale Acetylierung von p53 oder die Akkumulation der Transkriptionsfaktoren HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  (Luczak *et al.*, 2016; Luczak *et al.*, 2019). Sun und Mitarbeitende zeigten zudem die Umkehrung einer durch Chromat verursachten globalen H3K9 Dimethylierung (Sun *et al.*, 2009).

Die Zugabe von Ascorbinsäure in Zellkulturen ist ein wichtiges Mittel, um physiologischere Effekte darzustellen. Das Beladen der Zellen kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Ascorbat wird von den Zellen nur wenig aufgenommen. Aufgrund des hohen Sauerstoffgehaltes der Zellkulturen wird es leicht extrazellulär reduziert, wodurch zytotoxisch wirkende ROS entstehen. Die Verbindung Ascorbat-2-Phosphat ist im Nährmedium stabil und nicht redox-reaktiv. Intrazellulär wird Phosphat abgespalten, wodurch Ascorbat frei wird. Die Aufnahme von Ascorbat-2-Phosphat ist jedoch nicht effizient, wodurch eine dauerhafte, tägliche Zugabe notwendig ist. Der dadurch erreichte Ascorbinsäure-Gehalt bleibt jedoch meistens unter dem physiologischen Level. Eine weitere Möglichkeit der Supplementierung ist die Zugabe von DHA. Die oxidierte Form bildet keine extrazellulären ROS und wird über die GLUT-Transporter schnell aufgenommen. Durch die Verwendung eines Glucose-armen Puffers kann der physiologische Level nach ein bis zwei Stunden Inkubationsdauer erreicht werden. Die Beladung der Zellen muss jedoch stetig erneuert werden, da die Ascorbinsäure-Konzentration innerhalb von 24 h wieder den Ausgangswert erreicht (Zhitkovich, 2021).

### 2.3.2 Inkubationsdauer in Zellkulturstudien

Viele Zellkulturstudien untersuchen die Auswirkungen einer Substanz nach einer Inkubationsdauer von wenigen Stunden bis Tagen. Der Mensch ist umweltrelevanten Substanzen wie Chrom jedoch meistens über einen längeren Zeitraum, teilweise lebenslang ausgesetzt. Daher bilden diese Studien keine realistischen Expositionsszenarien ab. Besser

geeignet sind daher Langzeit-Experimente, in welchen für realitätsnähere Bedingungen zusätzlich niedrige Inkubationskonzentrationen notwendig sind (Barguilla *et al.*, 2023).

Bei der Untersuchung des kanzerogenen Potentials einer Substanz *in vitro* sind längere Expositionszeiträume von besonderer Wichtigkeit, da sich der Prozess der Kanzerogenese langsam entwickelt. Biomarker des kanzerogenen Prozesses sind genetische und epigenetische Veränderungen (Barguilla *et al.*, 2023). Auch die Chromat-induzierte Kanzerogenese tritt erst nach einer Langzeit-Exposition auf (Nickens *et al.*, 2010), ebenso wie die zugrunde liegenden epigenetischen Veränderungen. Analysen an Chromat assoziierten Lungentumoren zeigten eine Methylierungsänderung im *p16* Gen nur in Tumoren von Arbeitern, die länger als 15 Jahre gegenüber Chromat exponiert waren (Kondo *et al.*, 2006).

Zeitabhängige, durch Chromat ausgelöste Effekte konnten bereits *in vitro* gezeigt werden. Rodriguez und Mitarbeitende wiesen eine maligne Transformation von BEAS-2B-Zellen nach einer Inkubationszeit von zwölf Passagen nach (Rodrigues *et al.*, 2009). Wang und Mitarbeitende zeigten eine Transformation von BEAS-2B-Zellen und 16HBE-Zellen nach 20 bzw. 40 Wochen, welche mit einer Änderung von Histonmodifikationen korrelierte (Wang *et al.*, 2018). Weitere Studien bestätigen durch Chromat verursachte Veränderungen an Histonmodifikationen nach einer Langzeitexposition, ebenso konnten Veränderungen in miRNA nachgewiesen werden (zusammengefasst in Zhao *et al.*, 2022).

### 3 FRAGESTELLUNG

Das Metall Chrom stellt eine ubiquitär vorkommende Umweltkontaminante dar. Aufgrund der vielfältigen industriellen Nutzung sind insbesondere Beschäftigte der Chrom be- und verarbeitenden Industrie gegenüber dem toxikologisch relevanten Chromat exponiert. Zu den von Chromat verursachten, adversen Effekten gehören akut toxische Symptome, Kontaktallergien und Krebserkrankungen. Dabei ist die Wirkweise der Kanzerogenität noch nicht vollständig aufgeklärt, es gibt jedoch Hinweise auf die Beteiligung epigenetischer Mechanismen. Ein Einfluss von Chromat konnte bereits auf die drei Hauptsignalwege der Epigenetik, DNA-Methylierung, posttranslationale Histonmodifikationen und ncRNAs, nachgewiesen werden. Das Ausmaß der Veränderungen, deren Auswirkungen und zugrundeliegenden Mechanismen sind bisher jedoch weitgehend unbekannt.

Zur Untersuchung der toxikologischen Auswirkungen von Chromat, insbesondere der transkriptionellen epigenetischen Faktoren werden in der vorliegenden Arbeit klassische Zellkulturmodelle verwendet. Die Bedingungen *in vitro* unterscheiden sich jedoch von denen *in vivo*, wodurch eine Interpretation generierter Ergebnisse erschwert ist. Daher soll der Einfluss zweier, *in vitro* oftmals vernachlässigter Faktoren auf die Chromat-induzierte Toxizität in Zellkulturstudien analysiert werden.

Einer dieser Faktoren ist der Mangel an Ascorbinsäure in Zellkulturmodellen. Da dieses Vitamin einen entscheidenden Teil des Chromat-Metabolismus darstellt, könnten Untersuchungen unter Ascorbat-defizienten Bedingungen zu verfälschten Ergebnissen führen. Diese Arbeit befasst sich daher zunächst mit der Frage, welchen Einfluss eine Beladung der Zellen mit Ascorbinsäure auf die Chromat-induzierten Effekte hat. Zu diesem Zweck werden die Zellen vor einer 24-stündigen Chromat-Behandlung mit DHA präinkubiert, sodass sie einen intrazellulären Ascorbinsäuregehalt im physiologischen Bereich erreichen. Diese präinkubierten Zellen sollen dabei mit Zellen ohne vorherige Beladung verglichen werden. Die Kulturen werden zunächst auf Zytotoxizität untersucht, wodurch Inkubationsbedingungen im leicht bis moderat toxischen Bereich ausgewählt werden können. Die Untersuchung der intrazellulären Chromgehalte soll es ermöglichen, Effekte aufgrund einer unterschiedlichen Chromataufnahme zu identifizieren. Als toxikologische Endpunkte werden die Zellzyklusverteilung, die globale DNA-Methylierung und Genexpressionsanalysen betrachtet. Das bestehende Genset der anzuwendenden Hochdurchsatz-PCR Methode, welches Gene aus den Bereichen inflammatorische Antwort, Metallhomöostase, Zellzyklus-regulierende und apoptotische Faktoren, oxidative Stressantwort und DNA-Schadensantwort enthält, wird zur Analyse der epigenetischen Mechanismen um Gene transkriptioneller epigenetischer Enzyme erweitert.

Ein weiterer Faktor, welcher in Zellkulturstudien mit Chromat des Öfteren vernachlässigt wird, ist die Inkubationsdauer. Viele Studien nutzen kurze Inkubationszeiträume und hohe Chromatkonzentrationen, während Menschen eher über lange Zeiträume niedrigen Konzentrationen ausgesetzt sind. Daher beschäftigt sich diese Arbeit im zweiten Teil mit der Frage, welchen Einfluss längere Inkubationszeiträume auf die toxikologischen Endpunkte Zytotoxizität, Zellzyklusverteilung, DNA-Methylierung und Genexpression haben. Hierzu wird nach der 24-stündigen Inkubation mit Chromat eine Nachinkubationszeit angeschlossen. Zudem werden die Auswirkungen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit denen einer Inkubationszeit von einer bis fünf Wochen verglichen. Die erhaltenen Ergebnisse sollen Effekte von Chromat aufzeigen, die erst durch einen längeren Kontakt mit dem Metall entstehen und einen Einblick geben, inwieweit sich diese von kurzfristigen Effekten unterscheiden.

## 4 MATERIAL UND METHODEN

In diesem Kapitel werden die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Materialien und Methoden beschrieben. Eine Auflistung der verwendeten Chemikalien, Lösungen, Geräte und Kits ist dem Anhang unter 8.1 angefügt.

### 4.1 Zellkultur

Zur Gewährleistung des sterilen Arbeitens wurde mit den Zellkulturen ausschließlich in einer Reinraumwerkbank mit vertikaler Strömung (*Laminar Flow*) gemäß DIN EN 12469 gearbeitet. Alle verwendeten Lösungen, Puffer und Verbrauchsmaterialien wurden vor Verwendung sterilfiltriert, autoklaviert oder heißluftsterilisiert. Zudem wurden alle Materialien vor Eintrag in die Werkbank mit 80 %-igem Ethanol sterilisiert.

Vor ihrer Verwendung wurden alle benötigten Lösungen und Puffer in einem Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt.

#### 4.1.1 Zelllinien und Kultivierung

Für die folgenden Experimente kamen die zwei humane Lungenepithelzelllinien A549 und BEAS-2B zum Einsatz.

Bei den A549-Zellen (ATCC® CCL-185) handelt es sich um Alveolarepithelzellen des Typ II, welche aus einem Adenokarzinom eines 58-jährigen Mannes entnommen wurden (Foster *et al.*, 1998; Giard *et al.*, 1973). Die Zellen wurden in *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI-1640) mit den Zusätzen 10 % Fetales Kälberserum (FKS) und 100 U/mL Penicillin sowie 100 µg/mL Streptomycin kultiviert. Die Bedingungen im Inkubator betragen 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchtigkeit. Eine Subkultivierung der Zellen fand zweimal pro Woche statt. Hierfür wurde das Medium der Zellen abgenommen und der Zellrasen mit einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen. Danach folgte die Inkubation der Zellen mit 0,25 %-iger Trypsinlösung für 3 min bei 37 °C. Nach dem Lösen des Zellrasens von der Platte wurde die Reaktion des Trypsins durch die Zugabe von Medium gestoppt und die Zellen resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl und Viabilität erfolgte mit dem CASY® TT Zellzählgerät. Anschließend wurde eine definierte Zellzahl mit frischem Medium in eine neue Zellkulturplatte gegeben.

Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Roel Schins (Leibnitz-Institut für umweltmedizinische Forschung, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Es wurden Zellen im Bereich der Passagen 15 bis 35 verwendet.

Die Zelllinie BEAS-2B (ATCC® CRL-9609) entstand durch die Transfektion von gesunden Bronchialepithelzellen mit einem Adenovirus 12-SV40, wodurch diese immortalisiert sind (Reddel *et al.*, 1988). Die Zellen haben Merkmale von Bronchial- als auch Alveolarepithel (Bhowmick & Gappa-Fahlenkamp, 2016). Zur Kultivierung der Zellen wurde *Keratinocyte Growth Medium* (KGM) verwendet, wobei die Bedingungen im Inkubator ebenfalls 37 °C bei 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchtigkeit betragen. Die Zellen wurden einmal pro Woche subkultiviert und es wurde zusätzlich nach 3-4 Tagen das Medium gewechselt. Alle Zellkulturflaschen und -schalen wurden vor dem Aussäen der BEAS-2B-Zellen vorbehandelt. Hierfür wurde die Wachstumsfläche der Zellkulturgefäße mit einer Proteinmischung bestehend aus 10 µg/mL bovinem Fibronectin, 30 µg/mL Collagen und 10 µg/mL Rinderserumalbumin (BSA) in PBS benetzt, für mindestens 30 min bei 37 °C inkubiert und die Lösung anschließend wieder entfernt. Für die Subkultivierung wurde das Medium von den Zellen abgenommen und diese mit PBS gewaschen. Nach einer Inkubation der Zellen mit 0,05 %-iger Trypsinlösung für 3 min bei 37 °C wurde der Zellrasen von der Flasche gelöst. Die Reaktion des Trypsins wurde mit 10 %-iger FKS/PBS-Lösung gestoppt und die Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Zur Entfernung des FKS folgte eine Zentrifugation bei 1300 rpm für 3 min. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in PBS resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei denselben Bedingungen wurde der Überstand entfernt und das Pellet in frischem Medium resuspendiert. Nach Ermittlung der Zellzahl und Viabilität mithilfe des CASY® TT Zellzählgerätes wurde eine definierte Zellzahl mit frischem Medium in eine neue, vorbehandelte Zellkulturflasche übertragen.

Die Zellen wurden freundlicherweise von PD Dr. Carsten Weiss (Institut für Biologische und Chemische Systeme, KIT, Karlsruhe) zur Verfügung gestellt. Es wurden Zellen im Bereich der Passagen 54 bis 64 verwendet.

### 4.1.2 Kryokonservierung und Inkulturnahme

Zur Aufbewahrung der Zellen bei niedriger Passagenzahl, wurden diese bei –196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierfür wurden die Zellen wie bereits beschrieben abgelöst und gezählt. Es wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 1 mL Einfrierlösung (10 % DMSO in FKS) in einem Kryoröhrchen suspendiert und mit Hilfe eines *Cyro 1 °C Coolers* in Schritten von –1 °C / min auf –80 °C abgekühlt. Nach 24 h wurde das Röhrchen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff (–196 °C) überführt.

Zur Inkulturnahme der konservierten Zellen, wurde ein Röhrchen mit der entsprechenden Zelllinie aus dem Flüssigstickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37 °C angetaut. Anschließend folgte die Überführung der Zellen in ein Zentrifugenröhrchen mit vorgewärmtem

Medium. Zur Entfernung der Einfrierlösung wurde das Röhrchen bei 1300 rpm für 3 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in 1 mL frischem Medium resuspendiert und anschließend in eine Zellkulturplatte bzw. -flasche mit entsprechendem Volumen an Medium überführt. Nach 24 h fand ein Mediumswechsel statt. Die Zellen wurden nach zwei- bis dreimaligem Passagieren für Versuche verwendet.

### 4.1.3 Inkubationen mit Chromat

Zur Behandlung der Zellen mit Chromat wurde Kaliumdichromat eingesetzt. Es wurde eine Stammlösung mit bidestilliertem (bidest) Wasser hergestellt, welche einen Gehalt von 10 mM  $K_2Cr_2O_7$  aufwies. Dies entspricht 20 mM Chromat. Aus dieser Stammlösung wurden zwei Inkubationslösungen mit bidest Wasser verdünnt, die eine Konzentration von 1 mM bzw. 10 mM hatten.

Die Inkubation der Zellen mit Chromat erfolgte durch das direkte Pipettieren der Inkubationslösungen in das Medium. Hierbei wurde die Konzentration der Inkubationslösung so gewählt, dass sich das Pipettiervolumen im Bereich von 2  $\mu$ L bis 25  $\mu$ L befand. Für Versuche mit Kurzzeitinkubation und Nachinkubation wurde vor Zugabe des Chromats in das Medium ein Korrekturfaktor bestimmt. Hierfür wurden das Volumen des Mediums von drei Zellkulturschalen mit einer Glaspipette aufgezogen, abgelesen und anschließend zurück auf die Zellen gegeben. Der Mittelwert der drei Volumina wurde auf das ursprüngliche Mediumsvolumen bezogen, wodurch sich der Korrekturfaktor ergab. Dieser wurde auf die berechneten Pipettierolumina der Inkubationslösungen angewandt, um eine möglichst genaue Chromatkonzentration im Medium zu erhalten.

Eine Ausnahme vom beschriebenen Inkubationsprotokoll stellen die ATP-Assays dar. Für diese Versuche wurden die Inkubationslösungen mit Medium in Mikroreaktionsgefäßen auf die gewünschten Chromatkonzentrationen verdünnt und zur Behandlung auf die Zellen gegeben.

### 4.1.4 Präinkubation mit Dehydroascorbinsäure

Zur Beladung der Zellen mit Ascorbinsäure wurden diese vor der Behandlung mit Chromat mit einer DHA-Lösung inkubiert. Aufgrund ihrer geringen Stabilität wurde die DHA-Lösung vor jedem Versuch frisch hergestellt, auf Eis gelagert und vor Lichteinstrahlung geschützt. Zunächst wurde eine Stammlösung mit bidest Wasser und einer Konzentration von 5 mM hergestellt. Diese wurde mit Krebs-HEPES-Puffer auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Der Puffer, welche für die Inkubation der A549-Zellen eingesetzt wurde, enthielt zusätzlich 5 % FKS. Mit den BEAS-2B-Zellen wurde serumfrei gearbeitet.

Für die Präinkubation wurde das Medium von den Zellkulturschalen entfernt, in Zentrifugenröhrchen überführt und aufbewahrt. Anschließend wurde die DHA-Lösung auf die Zellen gegeben. Das Volumen richtete sich dabei nach dem zuvor verwendeten Volumen des

Nährmediums. Nach einer 90-minütigen Inkubation im Brutschrank wurde die DHA-Lösung entfernt und der Zellrasen mit PBS gewaschen, um Rückstände des DHA zu entfernen. Da Zellen ohne Präinkubation kein frisches Nährmedium erhielten, wurde nach der Vorbehandlung das zuvor entfernte Medium wieder auf die Zellschale gegeben. So konnte eine bessere Vergleichbarkeit der Behandlungsarten gewährleistet werden. Direkt im Anschluss erfolgte die Inkubation mit Chromat.

#### 4.1.5 Kurzzeitinkubation und Nachinkubation

Die Versuche der Kurzzeitinkubation und Nachinkubation wurden mit beiden Zelllinien in Zellkulturschalen durchgeführt. Abhängig von der folgenden Analyse wurde in 6 cm Schalen oder in 10 cm Schalen gearbeitet. In die 6 cm Schalen wurden  $5 \times 10^5$  Zellen der A549-Zellen oder  $1 \times 10^6$  Zellen der BEAS-2B-Zellen in 5 mL Nährmedium ausgestreut. Wurden 10 cm Schalen verwendet, so wurden  $1 \times 10^6$  Zellen (A549-Zellen) bzw.  $2 \times 10^6$  (BEAS-2B-Zellen) ausgesät. Nach einer Anwachszeit von 24 h befanden sich die Zellen in ihrer exponentiellen Wachstumsphase.

Für Versuche mit Kurzzeitinkubation wurde eine Behandlungsdauer von 24 h gewählt. Ein Teil der Zellen wurde, wie unter 4.1.4 beschrieben, mit DHA präinkubiert. A549-Zellen erhielten Lösungen mit 0,1 mM (Niedrigdosis) und 0,5 mM DHA (Hochdosis) und BEAS-2B-Zellen wurden mit 0,2 mM (Niedrigdosis) oder 0,5 mM DHA (Hochdosis) behandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit Chromat, wie es unter 4.1.3 beschrieben wurde. Als Konzentrationen in einem nicht bis moderat toxischen Bereich wurden 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 20  $\mu$ M Chromat gewählt. Nach 24 h wurden die Zellen mit Ausnahme der ATP-Assay Versuche wie unter 4.1.1 beschrieben von der Platte abgelöst und fixiert (siehe 4.5) oder pelletiert. Die Pellets wurden bis zu ihrer Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Versuche mit einer Nachinkubation wurden ausschließlich ohne vorherige Behandlung mit DHA durchgeführt. Für diese Versuche wurden Zellen in 6 cm Schalen ausgestreut und nach 24 h mit Chromat behandelt. Die Chromatkonzentrationen wurden auf 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M und 5  $\mu$ M festgelegt. Die Inkubation wurde nach weiteren 24 h durch das Entfernen des Inkubationsmediums gestoppt. Die Zellen wurden wie beschrieben abgelöst und die Zellzahl mit dem CASY® TT Zellzählgerät bestimmt. Es folgte das Ausstreuen von  $1,5 \times 10^6$  Zellen auf 15 cm Schalen in 20 mL frischem Nährmedium ohne Chromat. Nach weiteren 72 h im Inkubator wurden die Zellen wie unter 4.1.1 beschrieben von der Schale gelöst, gezählt und mit PBS gewaschen. Die Zellsuspension wurde in vier Teile aufgeteilt. Ein Teil wurde für die Bestimmung des Zellzyklus fixiert (siehe 4.5), die anderen drei Teile wurden jeweils pelletiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Die Kurzzeitversuche wurden in Zusammenarbeit mit Eva Veh und Sydney Schorb im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeiten durchgeführt.



### 4.1.6 Langzeitstudie

Die Langzeitstudie wurde ausschließlich mit A549-Zellen in 15 cm Schalen durchgeführt. Hierfür wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 20 mL Medium ausgesät und direkt mit Chromat behandelt. Als Konzentrationen wurden 0,2  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M und 1  $\mu$ M Chromat gewählt. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage, wie unter 4.1.1 beschrieben, subkultiviert, indem erneut  $2 \times 10^6$  Zellen auf eine frische Schale gesetzt wurden. Direkt nach dem Aussäen erfolgte erneut eine Behandlung mit der entsprechenden Chromatkonzentration, sodass die Zellen durchgehend für einen Zeitraum von fünf Wochen mit Chromat inkubiert wurden. Einmal pro Woche wurden Zellen, die nicht wieder ausgesät wurden, für nachfolgende Versuche aufbewahrt. Hierfür folgte das Aufteilen der Zellsuspension in 5 Teile, wovon ein Teil für Zellzyklusmessungen fixiert wurde (siehe 4.5) und die übrigen Teile pelletiert und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt wurden.

Die Experimente der Langzeitstudie wurden teilweise in Zusammenarbeit mit Lisa Wegmann im Rahmen ihrer Abschlussarbeit durchgeführt. Die vergleichenden 24 h Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Sandra Stöber und Marlene Parsdorfer im Rahmen eines gemeinsamen Projektvorhabens durchgeführt.

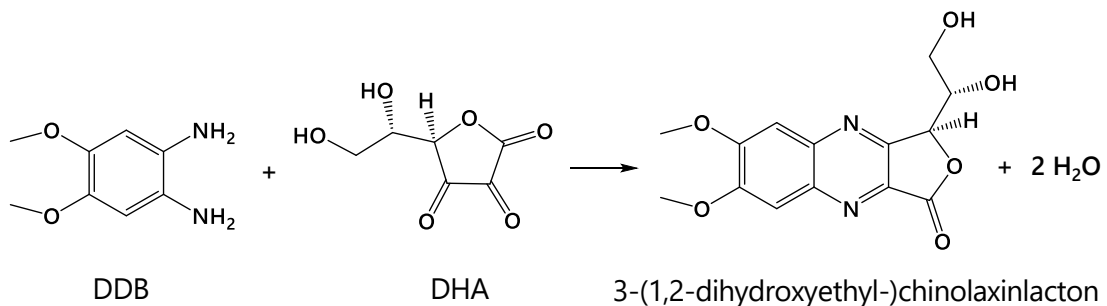
## 4.2 Analyse des intrazellulären Ascorbinsäure-Gehalts durch flüssig-chromatographische Auftrennung

Um die Bedingungen für die Präinkubation mit DHA festlegen zu können, wurde der intrazelluläre Ascorbinsäuregehalt bestimmt. Zudem konnte so analysiert werden, wie hoch der Gehalt an DHA in der Zelle direkt nach der Behandlung ist und wie schnell er wieder auf das Ursprungsniveau absinkt. Die Methode wurde aus Reynolds *et al.* (2007) entnommen (Reynolds *et al.*, 2007).

Die Bestimmung des Ascorbinsäuregehalts erfolgte durch die Oxidation von Ascorbinsäure zu DHA mittels Ascorbinsäure-Oxidase und die anschließende Reaktion von DHA mit 1,2-Diamino-4,5-Dimethoxybenzol (DDB). Die Reaktion ist in Abbildung 6 dargestellt. Das entstandene Chinoxalinlacton wurde mittels Flüssigchromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) von unspezifischen Nebenprodukten abgetrennt und durch eine Fluoreszenzmessung quantifiziert. Bei dieser Analyse wurde der Gehalt an Ascorbinsäure und DHA in der Zelle gemeinsam analysiert und nicht zwischen den Spezies unterschieden. Da das intrazelluläre DHA von der Zelle zu Ascorbinsäure reduziert wird, wird das Ergebnis der Analyse vereinfacht als Ascorbinsäuregehalt angegeben.

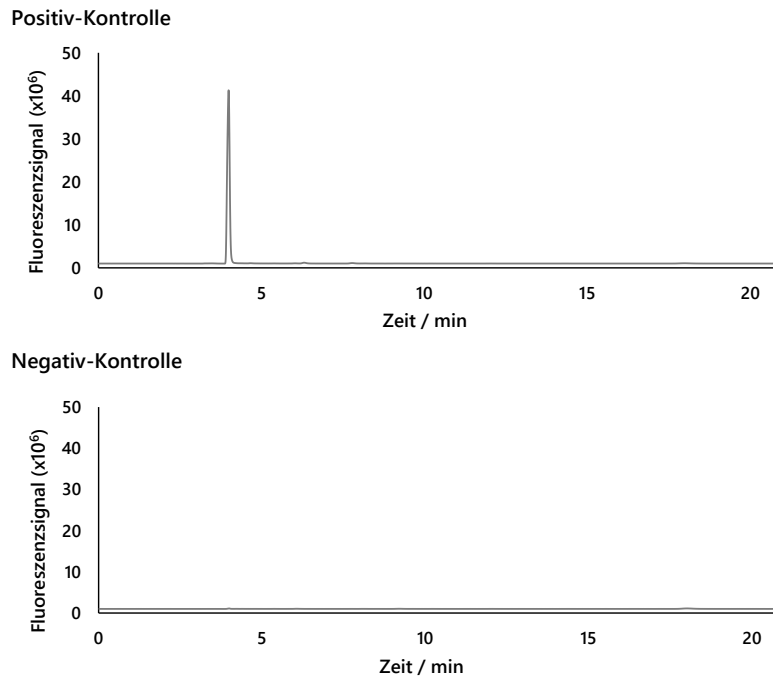
Für die Bestimmung wurden die Zellen in 6 cm Schalen ausgesät. Eine Behandlung mit DHA erfolgte wie in 4.1.4 beschrieben. Direkt nach der Inkubation wurden die Zellen von einem Teil der Schalen abgelöst, mit dem CASY® TT Zellzählgerät die Zellzahl und das Zellvolumen bestimmt und die Zellen pelletiert. Weitere Zellen bekamen frisches Nährmedium, wurden für

3 h bzw. 24 h weiter kultiviert, anschließend ebenfalls gezählt, das Zellvolumen bestimmt und pelletiert. Zur Zellyse wurden die Zellen in 100  $\mu\text{L}$  Methansulfonsäurelösung (MSSL) resuspendiert und 2 Zyklen auf  $-80^\circ\text{C}$  und  $37^\circ\text{C}$  für jeweils 20 min temperiert. Anschließend wurde die Probe lichtmikroskopisch überprüft und bei unvollständiger Lyse wurde ein Zyklus bei  $-80^\circ\text{C}$  und  $37^\circ\text{C}$  wiederholt. Es folgte eine Zentrifugation bei  $1200 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 10 min. Aus dem Überstand wurden 10  $\mu\text{L}$  mit 90  $\mu\text{L}$  einer Färbelösung (FL), welche die Ascorbat-Oxidase und DDB enthielt, gemischt. Die FL wurde vor jeder Analyse frisch hergestellt, auf Eis gelagert und vor Lichteinstrahlung geschützt. Die Probe wurde mit der FL für 4 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, danach folgte eine 100-fache Verdünnung mit bidest Wasser und die Überführung in ein HPLC-Gläschen. Die Auftrennung der Probe erfolgte an einer Luna 5u C18(2) 100A Säule mit dem Laufpuffer bestehend aus 75 % 50 mM Phosphorsäure und 25 % Acetonitril bei 1 mL/min. Die Fluoreszenz wurde bei 458 nm Emission und 371 nm Extinktion gemessen. Der Chinoxalinlacton-*Peak* eluierte bei 4 min.



**Abbildung 6:** Gleichung der Reaktion von DDB und DHA zu einem fluoreszierenden Chinolaxinlacton zum quantitativen Nachweis von Ascorbinsäure. DDB: 1,2-Diamino-4,5-Dimethoxybenzol, DHA: Dehydroascorbinsäure.

Die Quantifizierung des Ascorbinsäuregehaltes erfolgte mit Hilfe einer externen Kalibrierung. Hierfür wurde eine Stammlösung mit 5 mM Ascorbinsäure in bidest Wasser frisch hergestellt. Daraus wurden Arbeitslösungen mit 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM, 0,8 mM und 1 mM Ascorbinsäure in bidest Wasser verdünnt. Aus diesen Arbeitslösungen wurden jeweils 10  $\mu\text{L}$  mit 100  $\mu\text{L}$  MSSL vermischt und daraus 10  $\mu\text{L}$  mit 90  $\mu\text{L}$  FL analog zu den Proben inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung und Messung an der HPLC. Ein Beispielchromatogramm einer positiven Kontrolle (Kalibrierpunkt) und einer negativen Kontrolle (Wasser mit FL) ist in Abbildung 7 gezeigt.



**Abbildung 7: Beispielchromatogramm der Ascorbinsäure-Messung mittels HPLC.** Als Positiv-Kontrolle (oben) wurde ein Kalibrierpunkt (1 mM Ascorbinsäure) und als Negativ-Kontrolle (unten) wurde bidestilliertes Wasser verwendet. Die Proben wurden mit Ascorbat-Oxidase zu Dehydroascorbinsäure oxidiert, welche mit dem Farbstoff DDB zu einer fluoreszierenden Verbindung reagiert, welche bei 458 nm Emission / 371 nm Extinktion detektiert wurde. Der Peak der Ascorbinsäure eluierte an der HPLC auf einer Luna 5u C18(2) 100A Säule nach 4 min.

## 4.3 Zytotoxizitätsuntersuchungen

Zur Untersuchung der akuten zytotoxischen Wirkung von Chromat wurde in den Kurzzeitversuchen ein ATP-Assay eingesetzt und in den Nachinkubations- und Langzeitversuchen wurde der *relative cell count* (RCC) über die Zellzahl ermittelt.

### 4.3.1 Metabolische Aktivität mittels ATP-Assay

Der ATP-Assay basiert auf der Freisetzung von intrazellulärem ATP, wodurch dieses als Kofaktor des Enzyms Luziferase dienen kann. Das Enzym setzt Luziferin zu Oxyluziferin um, welches wiederum mittels Chemilumineszenz detektiert werden kann.

Hierfür wurden  $3 \times 10^4$  Zellen (A549-Zellen) bzw.  $5 \times 10^4$  Zellen (BEAS-2B-Zellen) in einer weißen 96-well Platte mit durchsichtigem Boden ausgesät. Nach einer 24-stündigen Kultivierung im Inkubator wurde ein Teil der Zellen wie in 4.1.4 beschrieben mit DHA präinkubiert und danach wurden alle Zellen mit Chromat behandelt, wie es in 4.1.3 beschrieben wurde. Nach der 24-stündigen Exposition wurde das Medium entfernt und 60  $\mu$ L frisches Nährmedium zugegeben. Die Platte wurde auf Raumtemperatur gebracht, danach folgte die

Zugabe von 60 µL CellTiter-Glo®-Lösung. Diese Lösung lysiert die Zellen, wodurch das ATP freigesetzt wird. Es folgte die Messung am Mikrotiterplattenlesegerät Infinite® 200 Pro. Hierbei wurde zunächst für 2 min orbital geschüttelt, anschließend für 10 min gewartet und schließlich erfolgte die Messung der Chemilumineszenz bei 562 nm. Dieses Programm wurde noch dreimal wiederholt, bis sich das Messsignal stabilisiert hatte.

### 4.3.2 Zytotoxizität durch Zellzählung

Aus den Zellzählungen der Nachinkubationsversuche und aus der wöchentlichen Messung der Zellzahl des Langzeitversuchs wurde der RCC mit folgender Formel berechnet:

$$\text{RCC (\%)} = \frac{\text{Zellzahl der behandelten Probe}}{\text{Zellzahl der unbehandelten Kontrolle}} \times 100$$

Zur Berechnung wird die Zellzahl einer behandelten Probe auf die Zellzahl der unbehandelten Probe bezogen.

## 4.4 Bestimmung der zellulären Aufnahme von Chromat durch Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie

Zur Bestimmung der Aufnahme von Chromat in die Zellen, wurde der intrazelluläre Chromgehalt mit der Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) analysiert.

Für diesen Versuch wurden die Zellen vor der Pelletierung gezählt und das Zellvolumen bestimmt, um das gesamte Zellvolumen der untersuchten Zellen zu erhalten. Die Zellen wurden einem oxidativen Aufschluss unterzogen, in dem diese in 500 µL einer 1:1 (v:v) Lösung aus 69 %-iger HNO<sub>3</sub> und 30 %-iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resuspendiert wurden. Anschließend erfolgte das schrittweise Eindampfen bei 65 °C, 75 °C und 85 °C für je 1 h, sowie das Halten der Temperatur bei 95 °C für 9 h. Zu dem erhaltenen Rückstand wurden 500 µL 0,2 %-iger HNO<sub>3</sub> gegeben und das Reaktionsgefäß für ca. 3-4 h auf einem Vibrationsmischer durchmischt, um ein vollständiges Lösen des Rückstandes zu gewährleisten. Vor der Messung wurden die Proben falls notwendig mit 0,2 %-iger HNO<sub>3</sub> verdünnt.

Zur Messung an der AAS wurden jeweils 20 µL einer Probe mit 5 µL eines Matrixmodifiers (300 mg/L MgNO<sub>3</sub>) durch einen *Autosampler* in das Graphitrohr pipettiert. Das verwendete Temperaturprogramm ist in Tabelle 1 angegeben. Die Detektion fand bei einer Wellenlänge von 357,87 nm statt.

Zur Quantifizierung wurde eine externe Kalibrierung im Bereich von 2 – 10 µg / L Chrom aus einem AAS-Standard (1 g / L Cr in 2 % HNO<sub>3</sub>) verwendet.

Tabelle 1: Temperaturprogramm für die Chrombestimmung an der AAS.

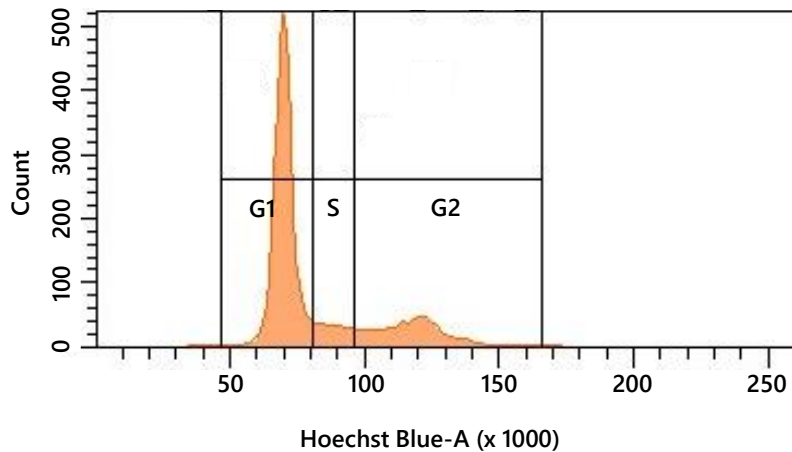
Schritt	Temperatur / °C	Aufheizzeit / s	Haltezeit / s	Argonfluss / (mL/min)
Trocknung 1	120	1	45	250
Trocknung 2	140	15	45	250
Pyrolyse	1500	10	20	250
Atomisierung	2300	0	5	0
Ausheizen	2450	1	3	250

## 4.5 Analyse der Zellzyklusverteilung mittels Durchflusszytometrie

Für die Untersuchung des Zellzyklus wurde 1 mL der sich in PBS befindlichen Zellen in ein Rundbodenröhrchen überführt. Anschließend wurden 3 mL eiskalter Ethanol tropfenweise in die Zellsuspension auf einem Vibrationsmischer pipettiert. Es folgte die Fixierung der Zellen über Nacht bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nach einer Zentrifugation bei 4000 rpm und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 4 min und dem Entfernen des Überstands, wurde 1 mL PBS zugegeben. Es folgte erneut eine Zentrifugation bei denselben Bedingungen. Im Anschluss wurden die Zellen angefärbt, indem  $350\text{ }\mu\text{L}$  4',6-Diamidin-2-phenylindol-Lösung (DAPI) zugegeben wurde. Nach einer Inkubation unter Lichtausschluss auf Eis von mindestens 30 min und einer guten Durchmischung auf dem Vibrationsmischer folgte die Messung am Durchflusszytometer BD LSRII Fortessa. Es wurden pro Probe 30.000 Events aufgenommen und die Exzitation bei 405 nm mittels eines violetten Lasers gemessen. In einem Histogramm wurde die Anzahl der Zellen über das Signal aufgetragen.

Da der Farbstoff DAPI in die DNA interkaliert, können über die Signalintensität Rückschlüsse auf die Zellzyklusphasen gezogen werden. In der G1-Phase des Zellzyklus ist ein einfacher Chromosomensatz, in der G2-Phase ein doppelter Chromosomensatz vorhanden. Daher ist das Messsignal einer Zelle, die in der G2-Phase ist, doppelt so groß, wie das Signal einer Zelle, die sich in der G1-Phase befindet. Für die quantitative Auswertung wurden Bereiche, sogenannte *Gates* der einzelnen Zellzyklusphasen festgelegt. Die G2-Phase wurde dabei auf die doppelte Intensität der G1-Phase festgelegt. Ein Beispiel für die Verteilung der *Gates* ist in Abbildung 8 gezeigt.

Die Messungen der Zellzyklusverteilung wurden in Zusammenarbeit mit Sandra Stöber im Rahmen eines gemeinsamen Projektvorhabens und Lea Geisel im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit generiert.



**Abbildung 8: Beispiel-Histogramm einer Zellzyklus-Messung in A549-Zellen.** Gemessen wird die Fluoreszenzintensität bei 405 nm des Farbstoffes DAPI am BD LSRFortessa Durchflusszytometer. Aufgetragen ist die Messung der Zellzahl (*count*) gegen die Fluoreszenzintensität von Hoechst Blue-A, welche bei derselben Wellenlänge wie DAPI emittiert. Anhand der Intensität werden die Gates für die G1-, S- und G2-Phase festgelegt.

## 4.6 DNA-Methylierungsanalysen

Zur Erfassung der Änderung des Methylierungsgrades der DNA, wurde der Gehalt an 5-Methyl-Cytosin global und für den Langzeitversuch zusätzlich genespezifisch analysiert.

### 4.6.1 DNA-Isolation und Quantifizierung

Für beide Methylierungsanalysen musste zunächst die DNA isoliert und quantifiziert werden. Die DNA-Isolation wurde mit dem *Monarch gDNA purification* Kit von New England Biolabs durchgeführt, wobei nach Anleitung vorgegangen wurde.

Zunächst wurde das Zellpellet in 100  $\mu\text{L}$  kalten PBS resuspendiert. Anschließend folgte die Zugabe von 1  $\mu\text{L}$  Proteinkinase K und 3  $\mu\text{L}$  RNase A, sowie das kurze Durchmischen auf einem Vibrationsmischer. Nach der anschließenden Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  Zellysepuffer wurde erneut gemischt. Danach fand eine Inkubation auf einem Thermomixer bei 56  $^{\circ}\text{C}$  und 1400 rpm für 5 min statt. In Anschluss wurden 400  $\mu\text{L}$  gDNA-Bindungspuffer zugegeben und durch Pulsen auf dem Vibrationsmischer für 5 s bis 10 s eine gründliche Durchmischung gewährleistet. Die gesamte Flüssigkeit wurde auf eine gDNA-Reinigungssäule auf einem Sammelröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation bei 1000 g für 3 min und 16000 g für 1 min wurde der Durchfluss verworfen und 500  $\mu\text{L}$  gDNA-Waschpuffer hinzugegeben und das Röhrchen mit der Säule einige Male invertiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 16000 g für 1 min und das Verwerfen des Durchflusses. Nach dem Entfernen aller Flüssigkeitsreste auf einem Papiertuch wurden erneut 500  $\mu\text{L}$  Waschpuffer hinzugegeben und für 1 min bei 16000 g zentrifugiert. Die

Säule wurde auf ein 1,5 mL-Mikroreaktionsgefäß gesteckt und 50 µL vorgewärmter (60 °C) gDNA-Elutionspuffer zu pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 min erfolgte eine Zentrifugation bei 16000 g für eine Minute. Der Durchfluss wurde zur Erhöhung der DNA-Konzentration erneut auf die Säule gegeben und wieder für 1 min bei 16000 g zentrifugiert.

Die Quantifizierung der DNA fand photometrisch auf einer NanoQuant™-Platte am Mikrotiterplattenlesegerät Infinte® 200 Pro statt. Hierfür wurden 2 µL der DNA-Lösung auf die Platte pipettiert und bei 260 nm gemessen. Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm analysiert und das Verhältnis der Werte von 260 nm / 280 nm berechnet. Dies diente der Reinheitsbestimmung der DNA. Weitere Versuche erfolgten nur mit Proben, die ein Verhältnis zwischen 1,8 und 2,0 aufwiesen.

Die DNA wurde bei –20 °C gelagert.

#### 4.6.2 Nachweis der globalen Methylierung mittels Flüssigchromatographischer Auftrennung und UV-Detektion

Die zuvor isolierte DNA wurde mit einem *Nucleoside Digestion Mix* von New England Biolabs in Nucleoside degradiert. Hierfür wurden 1 µg DNA mit 1 µL Enzymmischung und 2 µL Puffer vermischt und mit bidest Wasser auf 20 µL aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37 °C. Anschließend fand die Auftrennung der Nucleoside mittels HPLC an einer Luna 5u C18(2) 100A Säule statt. Das Laufmittel setzte sich aus bidest Wasser, einem 50 mM Natriumacetatpuffer (pH=4) und Methanol zusammen, es wurde mit 1 mL/min und mit einem Gradienten gefahren. Der Eluentengradient ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Eluenten für die Trennung der Nucleoside an der HPLC.

Retentionszeit / min	A	B	C
<b>0 – 6,6</b>	77 %	15 %	8 %
<b>6,7 – 16,6</b>	72 %	15 %	13 %
<b>16,7 – 25</b>	77 %	15 %	8 %

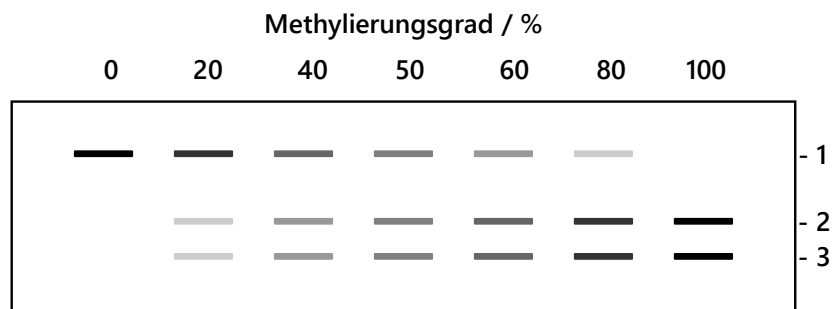
A: Bidest H<sub>2</sub>O, B: 50 mM Natriumacetatpuffer (pH=4), C: Methanol

Die Peaks der Nucleoside wurden durch die Messung von Standardreagenzien zugeordnet. Ein beispielhaftes Chromatogramm mit Nucleosid-Zuordnung ist im Anhang unter 8.2.2 in Abbildung 38 beigefügt. Die Detektion erfolgte durch Messung der Absorption, wobei Cytidin bei 272 nm und 5-Methyl-Cytidin bei 280 nm gemessen wurde. Zur Quantifizierung wurden externe Kalibriergeraden erstellt. Für Cytidin lag diese im Bereich von 4 µM – 16 µM und für 5-Methyl-Cytidin bei 0,1 µM – 0,7 µM. Die Berechnung des 5-Methyl-Cytosin-Gehalt erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{Genomischer 5-Methyl-Cytosin-Gehalt (\%)} = \frac{n(5\text{-Methyl-Cytidin})}{n(5\text{-Methyl-Cytidin}) + n(\text{Cytidin})}$$

#### 4.6.3 Bestimmung des Methylierungsgrades von *MLH1* und *MSH2* durch *Combined Bisulfite Restriction Analysis*

Zur Analyse des genspezifischen Methylierungsgrades kam die *Combined Bisulfite Restriction Analysis* (COBRA) zum Einsatz. Bei dieser Analyse wird die DNA zunächst Bisulfit-konvertiert, wobei Cytosin zu Uracil transformiert wird. 5-Methyl-Cytosin wird nicht verändert. In der folgenden PCR paart sich 5-Methyl-Cytosin mit Guanin, Uracil jedoch mit Adenosin. Das aus der PCR entstandene Produkt wird anschließend mit einem Restriktionsenzym verdaut. Das Enzym schneidet die DNA an einer spezifischen DNA-Sequenz, die ein CpG-Dinukleotid miteinschließt. Je nachdem ob das Dinukleotid methyliert vorlag, wird die DNA in Fragmente geschnitten oder bleibt unverdaut. Die DNA wird mittels Elektrophorese aufgetrennt und detektiert. Anhand des Intensitäts-Verhältnisses der Fragmente zur unverdauten DNA kann der Methylierungsgrad bestimmt werden. Eine schematische Darstellung verschiedener Methylierungsgrade ist in Abbildung 9 zu sehen.



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung verschiedener Methylierungsgrade nach Analyse mit der *Combined Bisulfite Restriction Analysis*. Liegt das Substrat unmethyliert vor (Methylierungsgrad 0 %), wird die Probe nicht verdaut und es ist eine Bande (1) sichtbar. Liegt das Substrat methyliert vor (100 % Methylierungsgrad), wird die Probe verdaut und es entstehen zwei Fragmente (2,3). Liegt der Methylierungsgrad dazwischen, sind alle Banden in unterschiedlicher Intensität zu beobachten.

Nach der DNA Isolation und Quantifizierung folgte zunächst die Bisulfit-Umwandlung. Hierfür wurde das *Epitect Fast DNA Bisulfite* Kit von Qiagen verwendet und nach Anleitung vorgegangen. Es wurde 1 µg DNA eingesetzt, in PCR-Achterstreifen pipettiert und das Volumen mit bidest Wasser auf 20 µL ergänzt. Nach der Zugabe von 85 µL Bisulfit-Lösung und 35 µL DNA-Schutzpuffer wurde gründlich gemischt, bis sich die Flüssigkeit blau gefärbt hatte. Die Umwandlung fand im Thermocycler bei dem in Tabelle 3 dargestellten Programm statt.



Tabelle 3: Temperaturprogramm der Bisulfit-Umwandlung.

Schritt	Zeit / min	Temperatur / °C
<b>Denaturierung</b>	5	95
<b>Inkubation</b>	20	60
<b>Denaturierung</b>	5	95
<b>Inkubation</b>	20	60
<b>Halten</b>	Bis Entnahme	20

Anschließend wurde die Probe kurz durchmischt und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Es folgte die Zugabe von 310 µL BL Puffer sowie ein kurzes Durchmischen und Zentrifugieren. Danach wurden 250 µL 96 %-iger Ethanol zugegeben, die Lösungen durch 15 s Pulsen auf einem Vibrationsmischer vermischt und kurz zentrifugiert. Nach der Überführung der Probe auf eine *MinElute DNA Spin* Säule auf einem Sammelgefäß, erfolgte eine Zentrifugation bei 16000 x g für 1 min. Der Durchfluss wurde verworfen, 500 µL BD Puffer zugegeben und die Probe für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte eine Zentrifugation bei 16000 x g für 1 min, das Verwerfen des Durchflusses und die Zugabe von 500 µL BW Puffer. Nach einer Zentrifugation bei 16000 x g für 1 min wurde der Durchfluss verworfen, die Säule auf ein neues Sammelgefäß gesteckt und 250 µL 96 %-iger Ethanol zugegeben. Es fand eine Zentrifugation bei 16000 x g für 1 min statt, woraufhin die Säule in ein neues Sammelgefäß eingesetzt wurde und erneut bei 16000 x g für 1 min zentrifugiert wurde, um Flüssigkeitsreste zu entfernen. Die Säule wurde auf ein frisches Mikroreaktionsgefäß gesteckt und 15 µL Elutionspuffer zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 min bei Raumtemperatur und einer Zentrifugation bei 15000 x g für 1 min konnte die Säule entfernt und die Bisulfit-konvertierte DNA (bDNA) bei -20 °C gelagert werden.

Im Anschluss an die Bisulfit-Umwandlung fand eine *Touchdown* PCR statt. Hierfür wurden 1 µL der bDNA mit 5 µL 10x PCR Puffer, 1,5 µL 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µL 10 mM Nukleotide (dNTP), 1 µL 10 µM Bisulfite Primer (*forward:reverse* 1:1) und 0,25 µL Taq Platinum Polymerase gemischt und auf 50 µL mit bidest H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die PCR fand im Thermocycler statt. Zunächst wurde beim Schritt „*Anneal*“ mit 10 °C über der optimalen *Annealing*-Temperatur gestartet und diese mit jedem Zyklus um 0,5 °C reduziert. Danach folgten 35 Zyklen bei der optimalen *Annealing*-Temperatur. Das gesamte PCR Programm ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Temperaturprogramm der COBRA-PCR.

Schritt	Zeit	Temperatur / °C
<b>Denaturierung</b>	5 min	95
<b>Denaturierung</b>	30 s	95
<b>Annealing</b>	45 s	$(T_m + 10) - 0,5$ / Zyklus
<b>Elongation</b>	1 min	72
<b>Denaturierung</b>	30 s	95
<b>Annealing</b>	45 s	$T_m$
<b>Elongation</b>	1 min	72
<b>Elongation</b>	5 min	72
<b>Halten</b>	Bis Entnahme	12

$T_m$  (MLH1): 56,4 °C;  $T_m$  (MSH2): 57,7 °C

Nach der PCR wurden die Produkte mit dem *Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up Kit* von Machery-Nagel aufgereinigt. Hierbei wurde nach der Anleitung vorgegangen. Zunächst erfolgte die Zugabe von 100 µL NT1 Puffer und die Überführung der Mischung auf eine *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* Säule. Nach einer Zentrifugation bei 11000 x g für 30 s wurden 700 µL NT3 Puffer zugegeben und erneut bei 11000 x g für 30 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und erneut mit 700 µL NT3 Puffer gewaschen und zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchflusses folgte eine Zentrifugation bei 11000 x g für 1 min, um die Flüssigkeitsreste zu entfernen. Die Säule wurde auf ein Mikroreaktionsgefäß gesteckt. Danach wurden 30 µL NE Puffer zugegeben, für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 1 min bei 11000 x g zentrifugiert.

Nach der Aufreinigung wurden die Proben erneut am Mikrotiterplattenlesegerät Infinte® 200 Pro, wie bereits beschrieben, quantifiziert. Aus jeder Probe wurden zwei Ansätze pipettiert. Jeder Ansatz enthielt 40 ng DNA und 2 µL Taqα1 Puffer. Einem Ansatz wurden 0,5 µL des Restriktionsenzym Taqα1 zugefügt und beide Ansätze wurden mit bidest H<sub>2</sub>O auf 20 µL aufgefüllt. Die Inkubation fand für mindestens 30 min bei 37 °C im Thermocycler statt. Nach der Inkubation wurde zu jeder Probe 6 µL *Purple Loading Dye* pipettiert. Die Trennung fand auf einem 2 %-igem Agarosegel in TBE-Puffer bei 180 V für 30 min statt. Die Anfärbung der Proben erfolgte durch die Zugabe von GelRed in das Agarosegel. Das Gel wurde am LAS-3000 Luminescent Image Analyzer detektiert. Die Zuordnung der Banden erfolgte durch eine 100 bp DNA-Leiter.

## 4.7 Genexpressionsanalysen

Für die Genexpressionsanalysen wurde eine quantitative Hochdurchsatz Reverse Transkriptase PCR (ht-RT-qPCR) verwendet (Fischer *et al.*, 2016). Diese ermöglicht die parallele Analyse von 96 Proben auf die Expression von 95 Genen. Für diese Versuche wurde zunächst die RNA aus den Zellen isoliert, in *complementary* DNA (cDNA) umgeschrieben, anschließend vervielfältigt und detektiert. Die erhaltenen  $C_q$ -Werte (*Cycle of quantification*) werden auf Referenzgene normiert, welche unabhängig von der Behandlung gleich exprimiert werden, und anschließend auf die unbehandelte Kontrolle bezogen. Als Referenzgene kamen *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB* sowie *HPRT1* zum Einsatz. Weitere untersuchte Gene lassen sich den Bereichen Metallhomöostase, Inflammation, oxidative Stressantwort, Zellzyklus und apoptotische Kontrolle, DNA-Schadensantwort und Epigenetik zuordnen. Die gesamte Liste der analysierten Gene ist im Anhang unter 8.2.1 in Tabelle 14 angefügt. Die Sequenzen der Primer-Paare des ursprünglichen Gensets können Fischer *et al.* entnommen werden (Fischer *et al.*, 2016). Die Sequenzen der im Rahmen dieser Arbeit hinzugefügten Gene sind in Stöber *et al.* aufgelistet (Stöber *et al.*, 2023).

### 4.7.1 RNA-Isolation und Quantifizierung

Die RNA aus den Zellpellets wurde mit dem *NucleoSpin RNA Plus* Kit von Machery-Nagel isoliert, wobei nach der Anleitung des Herstellers vorgegangen wurde. Zunächst wurden die Pellets in 350  $\mu$ L LB-Puffer resuspendiert, auf dem Vibrationsmischer durchgemischt und auf eine *NucleoSpin gDNA Removal* Säule überführt. Nach einer Zentrifugation bei 11000 x g für 30 s und Entfernen der Säule folgte die Mischung des Durchflusses mit 100  $\mu$ L *Binding Solution*. Das gesamte Lysat wurde auf eine *NucleoSpin RNA* Säule überführt, für 20 s bei 11000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Es folgte das Waschen mit 200  $\mu$ L Waschpuffer 1 und eine Zentrifugation für 20 s bei 11000 x g. Die Säule wurde auf ein neues Sammelgefäß gesteckt, 250  $\mu$ L Waschpuffer 2 zugegeben und bei denselben Bedingungen zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses folgte die Zugabe von 600  $\mu$ L Waschpuffer 2 und die Zentrifugation bei 11000 x g für 2 min. Die Säule wurde auf ein Mikroreaktionsgefäß gesteckt und es wurden 30  $\mu$ L bidest Wasser zugegeben. Nach der Zentrifugation bei 11000 x g für 1 min wurde der Durchfluss erneut auf die Säule gegeben und bei denselben Bedingungen erneut zentrifugiert. Die Proben konnten bis zu zwei Wochen bei  $-80$  °C gelagert werden.

Die Quantifizierung der RNA fand photometrisch auf einer NanoQuant™-Platte am Mikrotiterplattenlesegerät Infinte® 200 Pro statt. Hierfür wurden 2  $\mu$ L der RNA-Lösung auf die Platte pipettiert und der Gehalt durch die Absorption bei 260 nm bestimmt. Die Reinheit wurde durch die Berechnung des Quotienten der Absorption bei 260 nm / 280 nm analysiert, wobei nur mit Proben weitergearbeitet wurde, die einen Quotienten von  $\geq 2,0$  aufwiesen.

## 4.7.2 cDNA-Synthese

Zur Umschreibung der RNA in cDNA wurde das Volumen für 1 µg RNA berechnet und in zwei Replikaten in PCR 8er-Streifen pipettiert. Das Volumen wurde mit bidest H<sub>2</sub>O auf 15 µL aufgefüllt. Es erfolgte die Zugabe von 1 µL *iScript* Reverse Transkriptase und 4 µL Reaktionsmix (5x) in jede Probe. Die Streifen wurden gemischt und kurz zentrifugiert. Danach fand die Umschreibung mit dem Temperaturprogramm aus Tabelle 5 statt. Die Proben konnten bei -20 °C gelagert werden.

Tabelle 5: Temperaturprogramm der cDNA-Synthese.

Zeit / min	Temperatur / °C
5	25
30	42
5	85
Bis Entnahme	4

## 4.7.3 Präamplifikation und Exonukleaseverdau

Vor der eigentlichen PCR wurden die Gene von Interesse zunächst präamplifiziert, um genügend Ausgangsmenge an cDNA zur Verfügung zu haben. Hierfür wurde ein *pooled primer mix* (PPM) aus dem Primern des Primer-Stammsets hergestellt. Das Stammset bestand aus den *forward* und *reverse* Primern (1:1) mit einer Konzentration von 100 µM. Hieraus wurden jeweils 1 µL pipettiert und mit DNA-Suspensionspuffer auf 200 µL aufgefüllt, um eine Primerkonzentration von 500 nM zu erhalten. Dieser PPM reichte für mehrere Analysen und wurde bei -20 °C gelagert.

Pro Ansatz wurden 2,5 µL TaqMan PreAmp Master Mix (2x), 0,5 µL PPM und 0,75 µL PCR-Wasser mit 1,25 µL cDNA vermischt. Zusätzliche Ansätze erfolgten mit einer RNA-Probe pro Zelllinie (noRT) und Wasser (NTC-STA). Die Ansätze wurden mehrfach gründlich vermischt und zentrifugiert und anschließend fand die Präamplifikation bei dem in Tabelle 6 dargestellten Programm im Thermocycler statt.

Im Anschluss an die Präamplifikation fand ein Exonukleaseverdau statt, um die ungebundenen Primer und Nukleotide aus der Probe zu entfernen. Dazu wurden zu jedem Ansatz 0,4 µL Exonuklease I (20 U / µL), 0,2 µL Exonuklease I Reaktionspuffer und 1,4 µL PCR-Wasser pipettiert. Es folgten vorsichtiges Vermischen, Zentrifugieren und die Reaktion im Thermocycler bei dem in Tabelle 7 dargestellten Programm.

Nach dem Verdau wurden die Proben fünffach verdünnt, in dem pro Ansatz 18 µL TE-Puffer zu pipettiert wurden. Anschließend folgten gründliche Mischungs- und Zentrifugationsschritte. Die Proben konnten bei -20 °C gelagert werden.

Tabelle 6: Temperaturprogramm der Präamplifikation.

Zeit	Temperatur / °C	Zyklen
10 min	95	
15 s	95	12
4 min	60	12
Bis Entnahme	4	

Tabelle 7: Temperaturprogramm des Exonukleaseverdaus.

Zeit / min	Temperatur / °C
40	37
15	80
Bis Entnahme	4

#### 4.7.4 Primer- und Probenvorbereitung

Für die Hochdurchsatz-PCR mussten die Primer und die Proben vorbereitet werden. Aus dem Primer-Stammset wurde eine *Assay Mix Solution* pipettiert. Für diese wurden pro Ansatz 25 µL *2x Assay Loading Reagent* und 22,5 µL DNA-Suspensionspuffer mit 2,5 µL des 100 µM Primer-Stamms vermischt, wodurch die Endkonzentration der Primer 5 µM betrug. Zusätzlich wurde ein Ansatz mit 2,5 µL PCR-Wasser als NRC (*No Reaction Control*) erstellt. Anschließend erfolgte gründliches Durchmischen und Zentrifugieren. Die *Assay Mix Solution* reichte für mehrere Versuche und wurde bei –20 °C gelagert. Vor der Verwendung wurden sie aufgetaut, erneut durchmischt und zentrifugiert.

Zur Probenvorbereitung wurden 3 µL *2x SsoFast EvaGreen Supermix mit Low ROX* und 0,3 µL *20x DNA Bindung Dye Sample Loading Reagent* mit 2,7 µL der nach dem Exonukleaseverdaus verdünnten Proben pipettiert. Zusätzlich wurde eine NRC-Probe mit PCR-Wasser statt Probe mitgeführt. Es folgte gründliches Durchmischen und Zentrifugieren, wobei entstehende Luftblasen durch schnipsen entfernt wurden. Das Pipettieren des Dynamic Arrays mit den vorbereiteten Proben fand innerhalb eines Tages statt.

#### 4.7.5 96x96 Dynamic Array IFC qPCR Analyse

Die PCR erfolgte auf einem *Dynamic Array integrated fluidic circuit (IFC)*. Zunächst wurden die beiden Akkumulatoren des Dynamic Array mit der *Control Line Fluid* luftblasenfrei befüllt und dieser wurde anschließend im *IFC Controller HX* dem Programm *Prime* unterzogen. Hierbei

wird die *Control Line Fluid* in die Mikrokapillaren geleitet. Nach dem *Priming* musste der Dynamic Array innerhalb von 2 Stunden beladen werden.

Mit Hilfe einer Multikanalpipette wurden jeweils 5 µL der vorbereiteten Proben und Primer in die dafür vorgesehenen Kammern pipettiert. Eventuell entstandene Luftblasen wurden entfernt. Anschließend fand im IFC Controller HX das Beladen der Reaktionskammern und Durchmischen der Primer und Proben statt. Nachdem Staubpartikel auf der Oberfläche der Kammern entfernt wurden, konnte der Dynamic Array in das BioMark™-System überführt werden. Dort fanden die PCR und eine Schmelzkurvenanalyse bei dem in Tabelle 8 dargestellten Programm statt.

Tabelle 8: Programm der qPCR und Schmelzkurvenanalyse am BioMark™-System.

Zeit	Temperatur / °C	Zyklen
40 min	70	
30 s	60	
60 s	95	
5 s	96	30
20 s	60	30
3 s	60	
1 °C / 3 s	Bis 95	

#### 4.7.6 Datenanalyse und Auswertung

Im ersten Schritt wurden die aus der qPCR enthaltenen Daten mit dem Programm *Fluidigm Real-Time PCR Analysis* prozessiert. Aus den durch den Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen® enthaltenen Signalen konnte der C<sub>q</sub>-Wert bestimmt werden. Zudem wurde dieser Wert auf das Signal des Farbstoffes Low ROX, welches durch die PCR nicht beeinflusst wird, normiert. Mit Hilfe des Programms erfolgte zudem eine Basislinienkorrektur. Die erhaltenen Werte wurden als Heatmap dargestellt, wodurch ein erster Überblick über die Daten möglich war. Zudem fand eine Überprüfung der analysierten Schmelzkurven statt. Die C<sub>q</sub>-Werte wurden exportiert und mit der Software *GenEx* weiterverarbeitet.

Zunächst wurde sich ein allgemeiner Überblick über die Verteilung der C<sub>q</sub>-Werte verschafft. Auffällige Proben oder Gene wurden entfernt. Zudem fand ein *Cut-off* statt, bei welchem Werte mit einem C<sub>q</sub> über 28 entfernt wurden, da hier die Genauigkeit der PCR nicht mehr gewährleistet ist. Mit Hilfe der Funktionen *GeNorm* und *Normfinder* fand eine Selektion der Referenzgene statt. Falls notwendig, erfolgte anschließend eine Normierung mit Hilfe der noRT-Kontrolle. Anschließend kam die  $\Delta\Delta C_q$ -Methode mit folgenden Formeln zum Einsatz:

$$\Delta C_q = C_q \text{ Zielgen} - C_q \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta C_q = \Delta C_q \text{ Behandlung} - \Delta C_q \text{ Kontrolle}$$

$$\text{Verhältnis} = 2^{-\Delta\Delta C_q}$$

Hierfür wurden die Werte zunächst auf die Referenzgene und anschließend auf die unbehandelte Kontrolle normiert. Hierbei wurde die Kontrolle auf 1 gesetzt. Zur besseren Darstellung fand zudem eine Umrechnung in die  $\log_2$ -Werte statt.

## 4.8 Statistische Auswertung

Alle Analysen wurden, sofern nicht anders angegeben, in mindestens drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung durchgeführt. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse berechneten sich dabei aus den Mittelwerten der unabhängigen Versuche und deren Standardabweichung.

Zur statistischen Auswertung der Unterschiede zwischen mit DHA behandelten Proben und ohne DHA behandelten Proben kam der Student's t-Test zum Einsatz. Für alle anderen Vergleiche wurde ein einfaktorieller ANOVA mit folgendem Dunnett's Post-Hoc Test durchgeführt. Dieser erfolgte mit Hilfe des *Real Statistics Resource Pack Software* (Version 7.6).

Als statistisch signifikant wurden p-Werte  $\leq 0,05$ ,  $\leq 0,01$  und  $\leq 0,001$  betrachtet.

## 5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei der Untersuchung der Chromat-induzierten Toxizität und deren Auswirkung auf die Epigenetik unterliegt das Testsystem Zellkultur einigen Limitationen. Zwei dieser Faktoren werden in der vorliegenden Arbeit analysiert und ihr Einfluss auf die Untersuchung von Chromat in klassischen Zellkulturen betrachtet. Im ersten Teil wird zunächst auf den Einfluss einer Vorbehandlung der Zellen mit DHA eingegangen. Der zweite Teil befasst sich mit der Untersuchung der Reversibilität von Effekten, die mit Chromat assoziiert sind, durch die Betrachtung nach einer Nachinkubationszeit. Schließlich werden im dritten Teil Langzeitinkubationen mit Chromat (bis zu fünf Wochen) mit kurzen Inkubationszeiträumen (24 h) verglichen.

### 5.1 Vergleich der Toxizität von Chromat mit und ohne Präinkubation mit Dehydroascorbinsäure

Zur Beladung der Zellen mit einem physiologischen Ascorbinsäuregehalt wurden diese für 90 Minuten in einer DHA-Lösung in Krebs-HEPES-Puffer behandelt. Dabei wurden zwei verschiedene Konzentrationen an DHA verwendet. Zellen, die mit der niedrigeren Dosis an DHA (0,1 mM für A549-Zellen, 0,2 mM für BEAS-2B-Zellen) inkubiert wurden, werden im Folgenden als DHA(+) und Zellen, die mit 0,5 mM DHA-Lösung behandelt wurden, als DHA(++) bezeichnet. Zellen ohne Beladung erhalten die Bezeichnung DHA(-).

#### 5.1.1 Aufnahme von Dehydroascorbinsäure in die Zellen

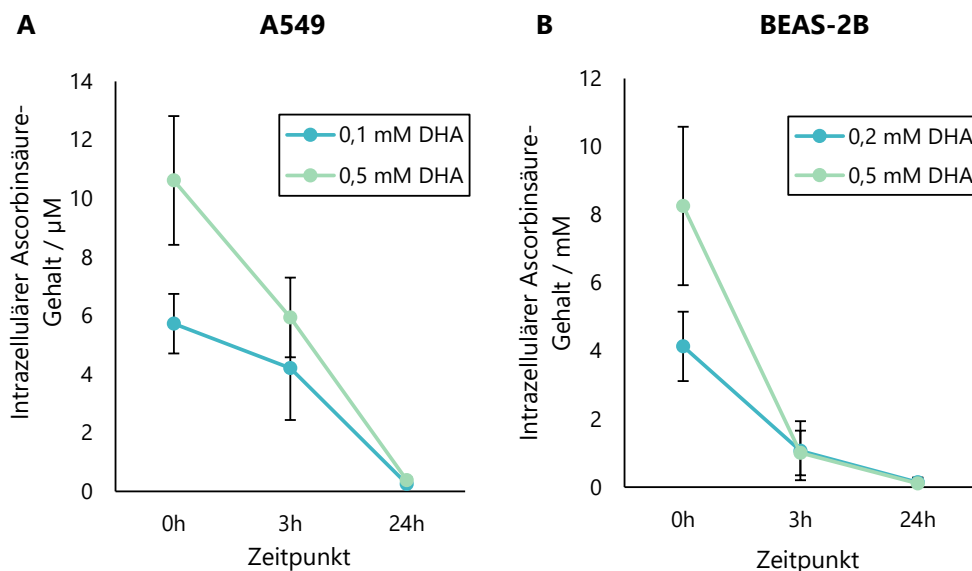
Zur Sicherstellung, dass die Präinkubation der Zellen in einem physiologischen Level an Ascorbinsäure resultierte, wurde der intrazelluläre Gehalt an Ascorbinsäure gemessen. Da die Zelle Ascorbinsäure *in vitro* schnell wieder verliert, sollte zudem der zeitliche Verlauf des Gehaltes während der Chromatinkubation betrachtet werden, um die intrazelluläre Ascorbinsäurekonzentration beurteilen zu können. Daher fand eine zusätzliche Messung zu den Zeitpunkten 3 h und 24 h nach der Präinkubation statt.

Der Gehalt an Ascorbinsäure wurde mittels einer HPLC-Fluoreszenz Methode analysiert. Hierzu wurde Ascorbinsäure zu DHA oxidiert, mit DDB angefärbt, die Produkte wurden mittels HPLC getrennt und durch Fluoreszenzmessung detektiert. Der gemessene Wert umfasst den



Gesamtgehalt von Ascorbinsäure und DHA, wird jedoch verallgemeinert als Ascorbinsäuregehalt bezeichnet. Abbildung 10 zeigt den Verlauf der intrazellulären Gehalte.

Durch die Präinkubation mit DHA sollten die Zellen mit Ascorbinsäure im physiologischen Bereich von 1-5 mM beladen werden. Eine Inkubation mit 0,1 mM DHA führte in A549-Zellen zu einem leichten Überschreiten dieses Wertes mit  $5,7 \pm 1,0$  mM. Es zeigte sich jedoch, dass sich die Konzentration direkt nach dem Entfernen der Inkubationslösung wieder reduzierte, wodurch schnell der gewünschte Bereich erreicht wurde. Nach 3 h konnte ein Wert von  $4,2 \pm 1,8$  mM festgestellt werden. Der intrazelluläre Gehalt sank weiter und befand sich nach 24 h wieder unter dem physiologischen Level. Die BEAS-2B-Zellen nahmen weniger DHA auf als A549-Zellen. Um Ascorbinsäure-Konzentrationen am oberen Rand des physiologischen Levels zu erreichen, wurden sie daher mit 0,2 mM statt 0,1 mM DHA-Lösung inkubiert. Trotz der doppelten Konzentration erreichten BEAS-2B-Zellen nicht die Gehalte von A549-Zellen, lagen mit  $4,1 \pm 1,0$  mM jedoch im physiologischen Bereich. Die BEAS-2B-Zellen verloren die Ascorbinsäure schneller als A549-Zellen und hatten nach 3 h noch  $1,1 \pm 0,9$  mM, wodurch sie am unteren Ende des gewünschten Bereichs lagen. Nach 24 h erreichte der intrazelluläre Gehalt fast den Ausgangswert. Während A549-Zellen durch die DHA(+)-Inkubation mehrere Stunden einen physiologischen Ascorbinsäure-Gehalt aufwiesen, wurde dieser in BEAS-2B-Zellen nur für 3 h erreicht. Beide Zelllinien lagen nach 24 h wieder unter dem physiologischen Ascorbinsäurewert.



**Abbildung 10:** Intrazellulärer Ascorbinsäuregehalt in A549-Zellen (A) und BEAS-2B-Zellen (B). Die Zellen wurden für 90 min mit Dehydroascorbinsäure (DHA) in einem Krebs-HEPES-Puffer bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der DHA-Puffer entfernt und Messungen nach 0 h, 3 h und 24 h durchgeführt. Die Ascorbinsäure wurde als DHA durch Anfärben mit 1,2-Diamino-4,5-Dimethoxybenzol und Fluoreszenzdetektion analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen.

Wie sich in den Unterschieden zwischen A549-Zellen und BEAS-2B-Zellen bei der Beladung mit Ascorbinsäure zeigte, ist die Aufnahme von DHA stark von der Zelllinie abhängig. Bei Anwendung desselben Inkubationsprotokolls benötigten Luczak und Mitarbeitende für H460 Lungenepithelzellen 0,2 mM DHA-Puffer, um einen physiologischen Gehalt zu erreichen. Die primäre Lungenfibroblasten IMR90 mussten mit 1 mM DHA inkubiert werden (Luczak *et al.*, 2019). Die Bedingungen der H460 entsprechen denen der BEAS-2B-Zellen in dieser Arbeit. Die unterschiedlich starke Aufnahme ist vermutlich in der verschieden ausgeprägten Expression der GLUT-Transporter begründet. Über diese in Krebszellen überexprimierten Transporter nimmt die Zelle das DHA auf (Blaszczak *et al.*, 2019). Dass es sich bei A549-Zellen um eine Krebszelllinie handelt und bei BEAS-2B-Zellen nicht, unterstützt diese Annahme.

Da sich der intrazelluläre Ascorbinsäurelevel innerhalb von 24 h wieder unter den physiologischen Gehalt reduzierte, wurden beide Zelllinien zusätzlich mit höheren DHA-Konzentrationen inkubiert. Für beide Zelllinien wurden hierfür 0,5 mM DHA gewählt, damit die Ascorbinsäure-Gehalte über einen möglichst langen Zeitraum im gewünschten physiologischen Bereich liegen. Zu hohe Gehalte sollten dabei vermieden werden, da diese zu toxischen Effekten in der Zelle führen können (Zhitkovich, 2021). Die Inkubation mit 0,5 mM DHA führte in A549-Zellen direkt nach der Behandlung zu einem Gehalt von  $10,6 \pm 2,2$  mM und in BEAS-2B-Zellen zu  $8,3 \pm 2,3$  mM Ascorbinsäure. Während sich der intrazelluläre Gehalt in A549-Zellen analog zu den DHA(+)-Zellen langsam auf  $5,9 \pm 1,4$  mM reduzierte, sank er in BEAS-2B-Zellen schnell ab und erreichte nach 3 h mit  $1,0 \pm 0,7$  mM denselben Wert wie die DHA(+)-Zellen. Beide Zelllinien verloren ihren Ascorbinsäure-Gehalt ebenfalls bei diesen Inkubationsbedingungen nach 24 h, wodurch dieser unter den physiologischen Wert sank.

Wie genau Ascorbinsäure die Zelle wieder verlässt, ist nicht bekannt (Zhitkovich, 2020). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass sowohl Ascorbinsäure als auch DHA über verschiedene Mechanismen in das extrazelluläre Medium abgegeben werden können. Wird die Zelle mit DHA in einem Ausmaß beladen, in dem sie die Reduktion zu Ascorbinsäure nicht mehr bewerkstelligen kann, ist es möglich, dass DHA die Zelle über die GLUT-Transporter wieder verlässt. In den Efflux von Ascorbinsäure sind vermutlich volumensensitive Anionenkanäle, Calcium-empfindliche Anionenkanäle, Gap-junctions und die Exozytose von Ascorbinsäure enthaltenden Vesikeln involviert (Corti *et al.*, 2010). Zudem findet bei physiologischem pH-Wert ein irreversibler Abbau von DHA statt (Zhitkovich, 2021). Sie wird dabei zu 2,3-Diketogulonsäure hydrolysiert (Yin *et al.*, 2022).

Insgesamt konnten beide Zelllinien erfolgreich mit Ascorbinsäure im gewünschten Bereich beladen werden. Die intrazellulären Gehalte sanken jedoch innerhalb von 24 h wieder stark ab. Auch eine höhere Inkubation-Konzentration resultierte nicht in höheren Gehalten nach 24 h. Die weiteren Versuche wurden mit beiden Präinkubationskonzentrationen, 0,1 M in A549-Zellen bzw. 0,2 mM in BEAS-2B-Zellen und 0,5 mM in beiden Zelllinien, durchgeführt.

## 5.1.2 Wirkung von Dehydroascorbinsäure auf die Zytotoxizität nach Inkubation mit Chromat

Als erster toxikologischer Endpunkt wurde die akute Zytotoxizität über die Messung des ATP-Gehaltes bestimmt. Die erhaltenen Werte sind in Abbildung 11 dargestellt.

Beide Zelllinien zeigten einen konzentrationsabhängigen Rückgang der Viabilität, wobei die BEAS-2B-Zellen bei hohen Konzentrationen empfindlicher auf Chromat reagierten. Die A549-Zellen zeigten erste zytotoxische Effekte ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$ , bei welcher sich der ATP-Gehalt auf 78 % reduzierte. Mit steigender Chromat-Konzentration sank die Viabilität, wodurch sie bei 20  $\mu\text{M}$  Chromat bei 45 % lag und bei 50  $\mu\text{M}$  21 % erreichte. Die BEAS-2B-Zellen zeigten ebenfalls ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  erste zytotoxische Effekte, welche mit einer Viabilität von 80 % im selben Bereich wie die der A549-Zellen liegen. Der ATP-Gehalt reduzierte sich in dieser Zelllinie in einem ähnlichen Ausmaß wie in den A549-Zellen und erreichte bei 20  $\mu\text{M}$  42 %, lag bei 50  $\mu\text{M}$  jedoch unter 5 %. Diese Werte ordnen sich in die Literatur ein, in welcher zytotoxische Wirkungen von Chromat im niedrigen mikromolaren Bereich für beide Zelllinien beschrieben werden (Caglieri *et al.*, 2008; Schumacher *et al.*, 2022).

Die Vorbehandlung mit DHA zeigte in den Zelllinien unterschiedliche Wirkungen. In A549-Zellen bewirkten 0,1 mM DHA einen protektiven Effekt bei 10  $\mu\text{M}$  Chromat. Die DHA(+)-Zellen wiesen eine Viabilität von 79 % auf, während DHA(-)-Zellen bei 66 % Viabilität lagen. Ab 20  $\mu\text{M}$  lagen die ATP-Gehalte im selben Bereich. Eine Präinkubation mit 0,5 mM DHA hatte protektive Effekte zwischen 5  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  Chromat. Bei Inkubationen mit 5  $\mu\text{M}$  hatten DHA(++)-Zellen eine Viabilität von 90 %, bei 50  $\mu\text{M}$  von 41 %. In BEAS-2B-Zellen hingegen führte die Vorbehandlung zu leicht toxischen Effekten. Bei 1  $\mu\text{M}$  Chromat führte die Präinkubation mit 0,5 mM DHA zu einem ATP-Gehalt von 82 %, während er ohne DHA bei 92 % lag. Eine Behandlung mit 0,2  $\mu\text{M}$  und 0,5  $\mu\text{M}$  DHA bewirkte bei einer Inkubation von 20  $\mu\text{M}$  Chromat eine Reduktion der Viabilität auf 33 %. Im Konzentrationsbereich zwischen 2  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Chromat ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen.

Bei der Betrachtung der Auswirkungen von DHA auf die Chromat-induzierte Toxizität sollte die intrazelluläre Aufnahme miteinbezogen werden. Zellen verlieren ihren Ascorbinsäurespiegel *in vitro* sehr schnell wieder, wodurch diese auch in das Inkubationsmedium gelangen kann. Die Ascorbinsäure kann dort das Chromat bereits extrazellulär zu Chrom(III) reduzieren. Das entstandene Chrom(III) kann die Zellmembran wesentlich langsamer passieren als Chrom(VI) und wirkt daher weniger toxisch. Protektive Effekte von DHA könnten daher in einer verminderten Aufnahme von Chromat begründet sein.

Für Aufnahmestudien und weitere toxikologische Untersuchungen wurden Chromatkonzentrationen im nicht (2  $\mu\text{M}$ ), leicht (5  $\mu\text{M}$ ), moderat (10  $\mu\text{M}$ ) und stark (20  $\mu\text{M}$ ) zytotoxischen Bereich ausgewählt.

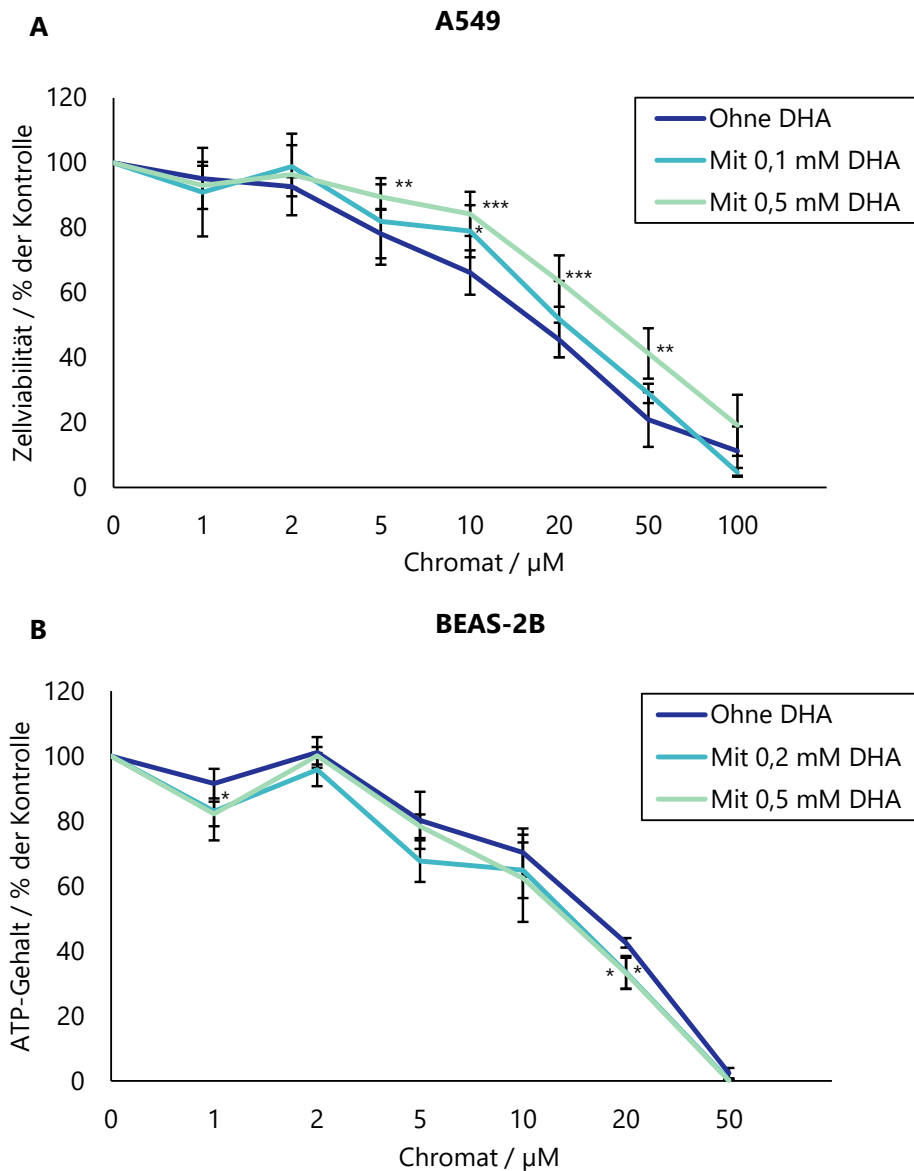


Abbildung 11: ATP-Gehalte der A549-Zellen (A) und BEAS-2B-Zellen (B) nach 24-stündiger Inkubation mit Kaliumdichromat. Die Präinkubation erfolgte für 90 min mit Dehydroascorbinsäure (DHA). Gemessen wurde der ATP-Gehalt, welcher auf eine Chromat-freie Kontrolle bezogen wurde. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz zwischen DHA-präinkubierten Zellen und nicht vorbehandelten Zellen wurde mit dem Student's t-Test bestimmt: \*/\*\*/\*\* (p<0,05/0,01/0,001).

### 5.1.3 Einfluss von Dehydroascorbinsäure auf die Aufnahme von Chromat

Zur Detektion der Chromataufnahme wurde der intrazelluläre Chromgehalt an der AAS gemessen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt. Sowohl in A549-Zellen als auch in BEAS-2B-Zellen nahm der intrazelluläre Chromgehalt mit steigender Chromatinkubation nahezu linear zu, wobei keine Sättigung erreicht wurde. Bei einem Vergleich

der Zelllinien ist festzustellen, dass A549-Zellen über den gesamten Inkubationsbereich hinweg mehr Chromat aufnahmen als die BEAS-2B-Zellen. Während A549-Zellen bei 2  $\mu\text{M}$  Chromatinkubation 256  $\mu\text{M}$  Chrom aufnahmen, lag der Gehalt in BEAS-2B-Zellen mit 136  $\mu\text{M}$  bei fast der Hälfte. Die Werte steigerten sich bei 20  $\mu\text{M}$  auf 3,68 mM in A549-Zellen und 2,77 mM in BEAS-2B-Zellen. Bisherige Messungen der Chromataufnahme nach 24 h Inkubation zeigen ebenfalls eine Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie. Während die Aufnahme in B-lymphoblastischen Zellen ähnlich der in dieser Arbeit gemessenen Werte in BEAS-2B-Zellen liegt (Lou *et al.*, 2015), konnten für die bronchialen Fibroblasten WTHBF-6 mehr als doppelt so hohe Gehalte gemessen werden (Holmes *et al.*, 2006; Wise *et al.*, 2010). Die intrazellulären Aufnahmen waren jedoch alle abhängig von der Inkubationskonzentration.

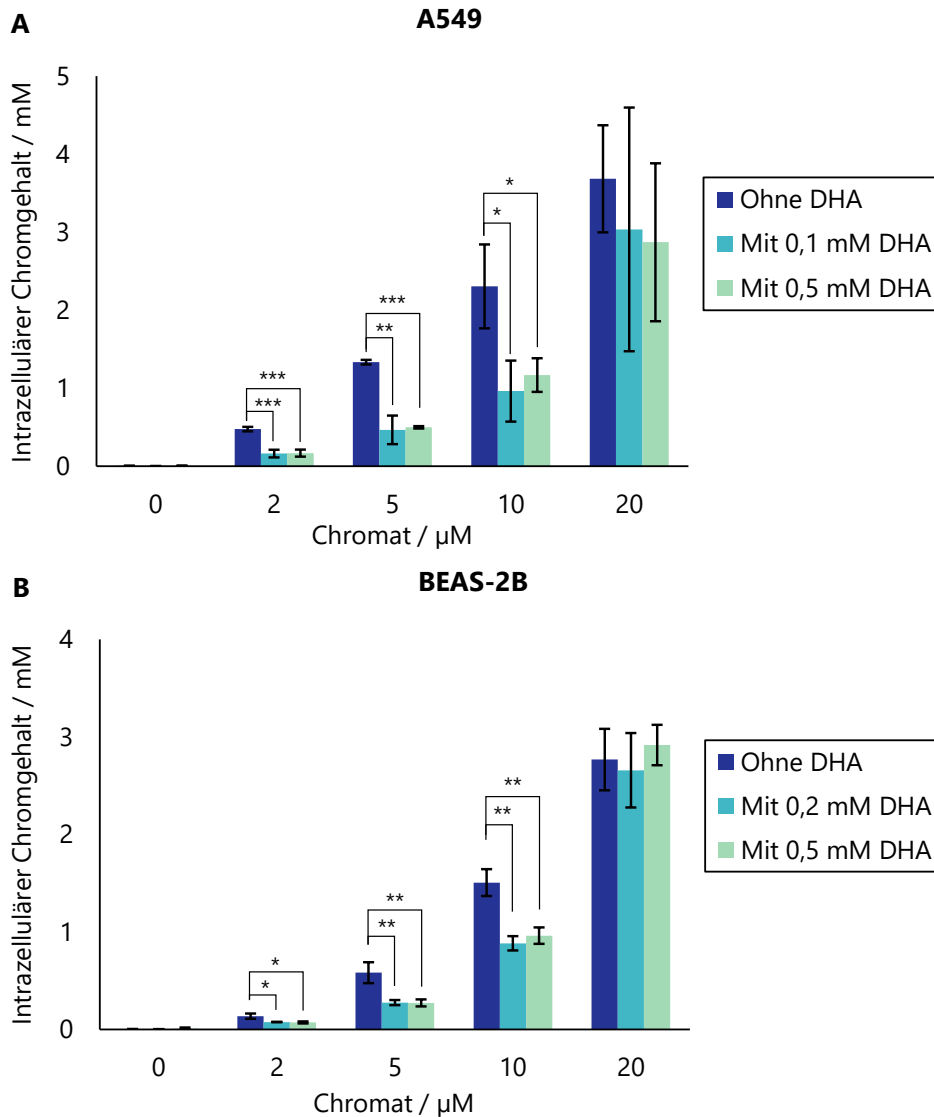
Im ATP-Assay reagierte Chromat auf beide Zelllinien vergleichbar zytotoxisch, trotz der unterschiedlichen Aufnahme. Daraus lässt sich schließen, dass die BEAS-2B-Zellen empfindlicher auf Chromat reagieren. A549-Zellen überexprimieren konstitutiv den Transkriptionsfaktor Nrf2, wodurch es zu einer veränderten oxidativen Stressantwort kommt (Kweon *et al.*, 2006). Da die Toxizität von Chromat unter anderem in der Entstehung von oxidativem Stress begründet ist (O'Brien *et al.*, 2003), könnte dies die Ursache der Unterschiede in der Zytotoxizität der beiden Zelllinien darstellen.

Die Präinkubation mit DHA führte in beiden Zelllinien zu einer verminderten Chromaufnahme im Konzentrationsbereich von 2  $\mu\text{M}$  bis 10  $\mu\text{M}$ . Die Konzentration der DHA-Lösung hatte auf die Reduktion keinen Einfluss. Bei einer Inkubation mit 20  $\mu\text{M}$  Chromat sind keine signifikanten Unterschiede der Aufnahme zwischen DHA(-)-, DHA(+)- und DHA(++)-Zellen zu beobachten. Wie bereits beschrieben ist die verringerte Aufnahme von Chromat nach einer Präinkubation mit DHA auf die extrazelluläre Reduktion von Chrom(VI) zu Chrom(III) zurückzuführen. Eine Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  Chromat im Medium scheint die Reduktionskapazität der extrazellulären Ascorbinsäure jedoch zu erschöpfen, wodurch es keinen Unterschied in der Chromaufnahme gab.

Die akuten Zytotoxizitäten von DHA(-)-Zellen sollten mit denen von DHA(+)- und DHA(++)-Zellen ebenfalls unter Betrachtung der Chromaufnahme verglichen werden. In A549-Zellen zeigte eine Vorbehandlung mit DHA teilweise protektive Effekte, die jedoch auf die geringere Aufnahme zurückzuführen sind. Somit wies eine Präinkubation mit DHA lediglich protektive Effekte durch die Verringerung der Chromaufnahme auf. In BEAS-2B-Zellen konnte im Inkubationsbereich von 2-10  $\mu\text{M}$  Chromat kein Unterschied in der Zytotoxizität beobachtet werden, obwohl DHA(+)- und DHA(++)-Zellen signifikant weniger Chromat aufnahmen. Daraus lässt sich schließen, dass eine Vorbehandlung mit DHA den toxischen Effekt von Chromat verstärkt. Dies zeigte sich ebenfalls bei einer Inkubation mit 20  $\mu\text{M}$  Chromat, bei welcher die DHA(+)- und DHA(++)-Zellen eine geringere Viabilität im ATP Assay bei gleicher Aufnahme zeigten.

Eine Beladung der Zellen mit DHA kann zu einer Erschöpfung des Glutathionvorkommens führen. DHA wird intrazellulär durch Glutathion zu Ascorbinsäure reduziert, wodurch es bei zu

hohen DHA-Konzentrationen zu einer Dezimierung des intrazellulären Glutathions kommen kann. Dies ist jedoch nur bei sehr hohen intrazellulären DHA-Gehalten der Fall (Zhitkovich, 2021). In dieser Arbeit wurde die DHA-Menge bei DHA(+)-Zellen im physiologischen Bereich gehalten, bei DHA(++)-Zellen lagen sie darüber. DHA(++)-Zellen zeigten jedoch keinen Unterschied zu DHA(+)-Zellen, wodurch eine toxische Wirkung des DHA durch die Erschöpfung des intrazellulären Glutathions unwahrscheinlich ist.



**Abbildung 12: Intrazellulärer Chromgehalt nach 24-stündiger Behandlung mit Kaliumdichromat in A549-Zellen (A) und BEAS-2B-Zellen (B).** Die Präinkubation erfolgte für 90 min mit Dehydroascorbinsäure (DHA). Gemessen wurde der intrazelluläre Chromgehalt mit Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz zwischen DHA-präinkubierten Zellen und nicht vorbehandelten Zellen wurde mit dem Student's t-Test bestimmt: \*/\*\*/\*\* (p<0,05/0,01/0,001).

Eine protektive Wirkung durch eine Zugabe von Ascorbinsäure zu A549-Zellen konnten Martin und Mitarbeitende ab einer Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Chrom(VI) ebenfalls beobachten. Sie zeigten ebenfalls, dass diese Wirkung mit einer geringeren Aufnahme von Chrom in mit Ascorbinsäure vorbehandelten Zellen einherging (Martin *et al.*, 2006). Eine Verstärkung der Toxizität durch eine Präinkubation mit DHA konnten Reynolds und Mitarbeitende ebenfalls in verschiedenen primären Lungenzellen feststellen (Reynolds *et al.*, 2007).

In Ascorbinsäure-defizienten Zellen wird Chrom(VI) durch thiolhaltige Moleküle, wie Glutathion reduziert. Bei dieser Reaktion wird ein Elektron übertragen, wobei das Intermediat Cr(V) entsteht. Ist Ascorbinsäure in den Zellen vorhanden, wird Cr(VI) sehr schnell durch diese reduziert. Dabei werden zwei Elektronen übertragen und es entsteht direkt das Intermediat Cr(IV) (Zhitkovich, 2020). Aufgrund der verschiedenen Reduktionswege abhängig vom Reduktionsmittel ergeben sich unterschiedliche Schadensprofile. Die Anzahl an Chrom-DNA-Addukten erhöht sich durch die Anwesenheit von Ascorbinsäure nicht, jedoch die Art der Addukte (Zhitkovich *et al.*, 2012). Es entstehen mehr ternäre DNA-Addukte mit Ascorbat, welche ein höheres genotoxisches Potential ausweisen (Quievryn *et al.*, 2002; Quievryn *et al.*, 2003; Quievryn *et al.*, 2006). Dieses geht einher mit einer erhöhten Mutagenität, vermehrten Mikronuklei und einem Verschieben von Einzelstrangbrüchen hin zu DSB. Dadurch wird eine verstärkte Zytotoxizität verursacht (Reynolds *et al.*, 2007; Zhitkovich *et al.*, 2012).

Der Effekt einer Toxifizierung durch die Anwesenheit von Ascorbinsäure konnte in der vorliegenden Arbeit in BEAS-2B-Zellen festgestellt werden und ist vermutlich ebenfalls auf die veränderten DNA-Schäden aufgrund vermehrter Ascorbat-Chrom-DNA-Addukte zurückzuführen.

#### 5.1.4 Wirkung von Dehydroascorbinsäure auf die Zellzyklusverteilung

Als nächster toxikologischer Endpunkt wurde die Zellzyklusphasenverteilung bestimmt. Hierbei wurden die Zellen mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI angefärbt und mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.

Die Verteilung der unbehandelten Kontrolle in A549-Zellen wurde mit 69 % in der G1-Phase, 8 % in der S-Phase und 23 % in der G2-/M-Phase gemessen. Die Inkubation mit Chromat führte bei 5  $\mu\text{M}$  zu einer erhöhten G2-/M-Phase von 39 %. Ab einer Inkubation von 10  $\mu\text{M}$  Chromat glich sich diese wieder dem Wert der Kontrolle an. Eine Präinkubation mit DHA resultierte in einer vergleichbaren Zellzyklusverteilung der unbehandelten Kontrollen. Bereits ab einer Inkubationskonzentration von 2  $\mu\text{M}$  zeigte sich eine Anreicherung der Zellen in der G2-/M-Phase. Die größte Anreicherung in dieser Phase wurde ebenfalls mit Präinkubation bei 5  $\mu\text{M}$  erreicht, diese war jedoch etwas weniger stark ausgeprägt und erreichte Werte von 34 % in DHA(+)- bzw. 31 % in DHA(++)-Zellen. Diese Veränderung ging mit steigenden Inkubationskonzentrationen zurück, blieb in DHA(+)-Zellen jedoch signifikant erhöht. Die

gemessene Zellzyklusverteilung der unbehandelten Kontrolle lässt sich ungefähr mit Literaturdaten zum Zellzyklus der A549-Zellen vergleichen (Lou *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2013).

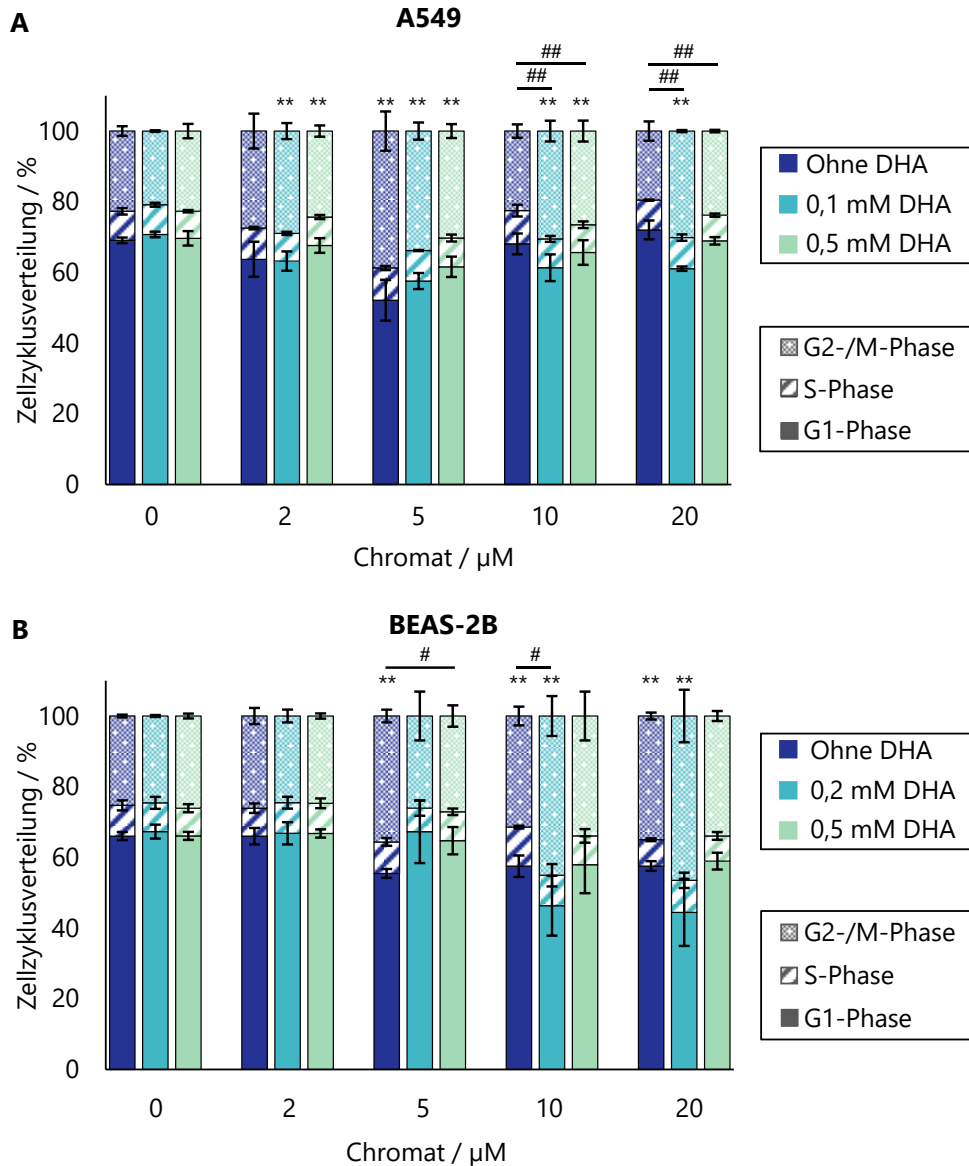
In den BEAS-2B-Zellen ist eine ähnliche Verteilung des Zellzyklus zu beobachten. In den unbehandelten Kontrollen der DHA(-), DHA(+)- und DHA(++)-Zellen waren 66 % - 67 % der Zellen in der G1-Phase, 8 % - 9 % in der S-Phase und 25 % - 26 % in der G2-/M-Phase. Wie in den A549-Zellen führte auch in den BEAS-2B-Zellen eine Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  Chromat zu einer Erhöhung der G2-/M-Phase auf 36 %. Im Gegensatz zu den A549-Zellen ging dieser Effekt durch die Inkubation mit höheren Chromatkonzentrationen nicht zurück, sondern lag bei 20  $\mu\text{M}$  Chromat bei 35 %. Eine Präinkubation mit DHA führte je nach Konzentration zu unterschiedlichen Effekten. Während in DHA(++)-Zellen keine signifikante Erhöhung der G2-/M-Phase ausgelöst wurde, bewirkte eine Präinkubation mit 0,2 mM DHA einen Anstieg der Zellen in der G2-/M-Phase auf 45 % (10  $\mu\text{M}$ ) bzw. 46 % (20  $\mu\text{M}$ ). In der Literatur gibt es unterschiedliche Angaben zur Zellzyklusverteilung in BEAS-2B-Zellen. Während sich ein Großteil der Zellen, vergleichbar mit den vorliegenden Daten, in der G1-Phase befindet, schwanken die Angaben der in der S-Phase und in der G2-Phase befindlichen Zellen (Huang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2017).

Eine Verschiebung der Zellzyklusphasenverteilung zugunsten der G2-/M-Phase deutet auf einen G2-Arrest hin. Eine Induktion eines G2-Arrests durch Chromat ist in der Literatur bereits beschrieben (Bakke *et al.*, 1984; Monteiro *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2001). Zhang und Mitarbeitende konnten einen Anstieg der G2-/M-Phase in A549-Zellen durch Chromat bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  erkennen. Bei höheren Konzentrationen ging dieser durch erhöhtes Auftreten apoptotischer Zellen wieder zurück (Zhang *et al.*, 2001). Monteiro und Mitarbeitende konnten einen Rückgang der Erhöhung in der G2-/M-Phase bei steigenden Inkubationskonzentrationen ebenfalls beobachten (Monteiro *et al.*, 2019). Der Rückgang des G2-Arrestes in A549-Zellen könnte ebenfalls durch ein erhöhtes Zellsterben begründet sein, da die Zytotoxizität durch eine Inkubation mit 20  $\mu\text{M}$  bei über 50 % lag. Die BEAS-2B-Zellen hatten bei derselben Inkubationskonzentration eine ähnliche Zytotoxizität, der G2-Arrest blieb jedoch bestehen. Dieser Effekt scheint daher abhängig von der Zelllinie zu sein.

Der Zellzyklusarrest als Antwort auf eine Chromatexposition wird vermutlich durch verschiedene Ursachen ausgelöst. Zum einen konnte gezeigt werden, dass durch Chromat induzierte DSBs in der S- und G2-Phase auftreten (Reynolds *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2015). Dadurch kann es zu einem G2-Arrest kommen, welcher der Zelle die Möglichkeit der Reparatur dieses Strangbruchs gibt (Bryant *et al.*, 2006; DeLoughery *et al.*, 2014). Des Weiteren könnte der Zellzyklusarrest durch die Induktion von ROS verursacht werden. Die durch die Reduktion von Chromat entstehenden Intermediate produzieren ROS wie Hydroxylradikale, welche mit der Entstehung eines G2-Arrests in Verbindung stehen (Hayashi *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass es durch Chromat-induzierte ROS zu einer Stabilisierung von p53 kommt, wodurch die Expression des Zellzyklusmarkes p21 gefördert wird (Zhang *et al.*, 2016). Zudem können entstandene ROS zu DSBs führen, die wiederum einen



Zellzyklusarrest induzieren (Thompson *et al.*, 2012). Neuere Forschungen weisen zudem auf einen Zusammenhang zwischen dem durch Chromat verursachten Zellzyklusarrest und dessen Regulation durch lncRNAs hin (Zheng *et al.*, 2021).



**Abbildung 13: Zellzyklusverteilung in A549-Zellen (A) und BEAS-2B-Zellen (B) nach 24-stündiger Behandlung mit Kaliumdichromat.** Die Präinkubation erfolgte für 90 min bei 37 °C mit Dehydroascorbinsäure (DHA). Die Zellzyklusverteilung wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Gezeigt ist die statistische Auswertung der G2-/M-Phase. Die Signifikanz der Unterschiede der behandelten Proben zur unbehandelten Kontrolle wurde mit ANOVA-Dunnett's bestimmt: \*\*  $p < 0,01$ . Die Signifikanz zwischen DHA-präinkubierten Zellen und nicht vorbehandelten Zellen wurde mit dem Student's t-Test bestimmt: #/## ( $p < 0,05/0,01$ ).

In beiden Zelllinien zeigte sich durch die Präinkubation mit 0,1 mM bzw. 0,2 mM DHA ein erhöhter G2-Arrest. In BEAS-2B-Zellen könnte dies durch die erhöhte Zytotoxizität bezogen auf die Chromataufnahme verursacht sein. In A549-Zellen wiesen DHA(+)-Zellen jedoch dieselbe Zytotoxizität wie DHA(-)-Zellen auf. Zudem zeigte sich in DHA(+ +)-Zellen beider Zelllinien ein geringerer Zyklusarrest als in DHA(+)-Zellen, obwohl die Zytotoxizitäten vergleichbar waren.

In früheren Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass eine Inkubation der Zellen mit Ascorbinsäure alleine keinen Zellzyklusarrest auslöst. In Kombination mit oxidativen Stress auslösenden Substanzen wird jedoch ein G2-/M-Arrest induziert (Bijur *et al.*, 1999; Herst *et al.*, 2012). Dieser gibt den Zellen Zeit zur Reparatur der Schäden. Ein verstärkter Zellzyklusarrest konnte ebenfalls in dem vorliegenden Versuch nachgewiesen werden. Reynolds und Mitarbeitende konnten zudem feststellen, dass es durch die Anwesenheit von Ascorbinsäure in der Zelle zu vermehrten DSBs kommt (Reynolds *et al.*, 2007). Dies wird begründet durch die vermehrte Ausbildung von Ascorbat-Chrom-DNA-Addukten, welche mutagener als anderen DNA-Addukte sind. Fehlpaarungen rekrutieren den MMR-Enzymkomplex an die Schadensstelle, welcher zum Kollabieren der Replikationsgabel führt und so DSBs generiert (Reynolds *et al.*, 2007; Zhitkovich *et al.*, 2012). Ein häufigeres Auftreten von DSBs könnte zu einem verstärkten Zellzyklusarrest führen.

Dies erklärt jedoch nicht, warum dieser Effekt durch einen höheren Ascorbinsäuregehalt gemindert wird. Bisherige Studien untersuchten jeweils nur eine Konzentration an Ascorbinsäure oder DHA, wodurch es diesbezüglich keine Literaturdaten gibt. Jedoch ist denkbar, dass die DNA-Ascorbinsäure-Addukte und daraus resultierende DSBs mit der Menge an DHA korrelieren, wodurch ein höherer DHA-Gehalt zu vermehrten Strangbrüchen führt. Sind diese zu ausgeprägt, um repariert zu werden, geht die Zelle in die Apoptose über statt in einen Zellzyklusarrest, wodurch es zu einem geringeren Anteil der Zellen in der G2-/M-Phase kommt. Zur Bestätigung dieser Hypothese bedarf es weiterer Experimente.

### 5.1.5 Untersuchung der globalen Methylierung nach Exposition gegenüber Dehydroascorbinsäure und Chromat

Zur Analyse einer Änderung in der DNA-Methylierung durch Chromat, wurde der globale 5mC Gehalt bestimmt. Hierfür wurde die DNA in Nukleoside gespalten, mittels HPLC aufgetrennt und anschließend detektiert und quantifiziert.

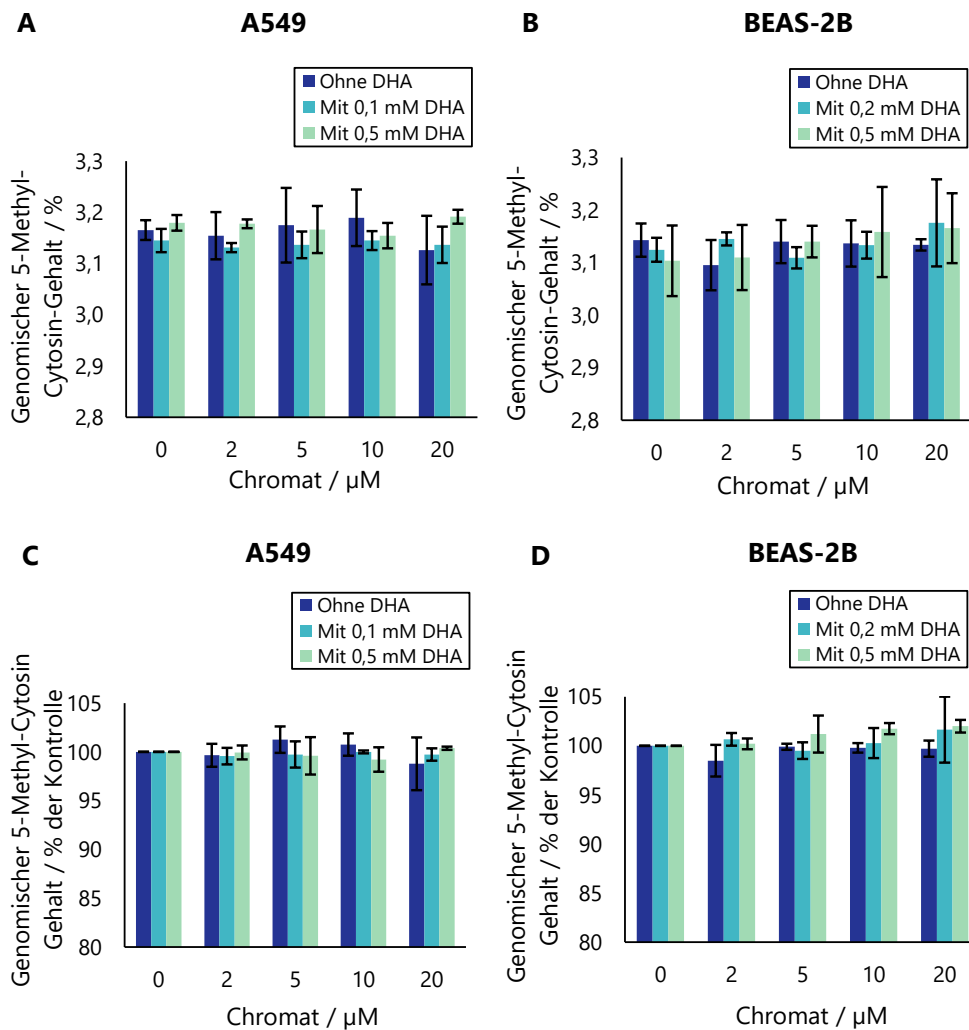
Abbildung 14 zeigt den Einfluss von Chromat sowie der Vorbehandlung mit DHA auf die Methylierung. Dargestellt sind die Anteile von 5mC am Cytosin (A, B) sowie die Anteile von 5mC bezogen auf die unbehandelten Kontrollen (C, D). In A549-Zellen wurde ein Gehalt zwischen 3,13 % und 3,19 % und in BEAS-2B-Zellen ein Gehalt zwischen 3,10 % und 3,18 % gemessen. Damit stimmen die erhaltenen 5mC Anteile mit dem in der Literatur beschriebenen durchschnittlichen Methylierungsgrad von 3 % in Säugierzellen überein (Gibney & Nolan, 2010). Beide Zelllinien unterscheiden sich nicht in ihrem natürlichen Methylierungsgrad.

Weder die Behandlung mit Chromat noch die Präinkubation mit DHA zeigten einen Einfluss auf die Methylierung. Eine globale Hypomethylierung, verursacht durch Chromat, konnte demgegenüber durch Untersuchungen an Chrom-assoziierten Tumoren nachgewiesen werden (Ali *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2018). *In vitro* Studien mit einer 24-stündigen Chromatbehandlung zeigen unterschiedliche Ergebnisse. Während Lou und Mitarbeitende in A549-Zellen und B-Lymphoblastoidzellen nach 24-stündiger Inkubation ab 10  $\mu\text{M}$   $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  eine Hypomethylierung detektierten (Lou *et al.*, 2013), konnten Xiong und Mitarbeitende diesen Effekt in embryonalen Mausstammzellen nach 24-stündiger Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  nicht beobachten (Xiong *et al.*, 2017). Wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, gibt es verschiedene Wege, wie eine Demethylierung vonstattengehen kann.

Eine globale Hypomethylierung kann zum einen aktiv durch die Demethylierung mittels TET-Enzymen geschehen oder passiv durch fehlende Aktivität der Methylierung-erhaltenden DNMTs (Christmann & Kaina, 2019). Xiong und Mitarbeitende konnten in ihrer Studie zeigen, dass die TET Aktivität durch Chromat eher verringert als erhöht wird. Auch der Kofaktor der TET Enzyme,  $\alpha$ -Ketoglutarat, wurde nicht verbraucht und die weiteren Produkte der Demethylierungsreaktion, Succinat, 5hmC, 5fC und 5caC, wurden reduziert (Xiong *et al.*, 2017). Dies spricht nicht für eine erhöhte TET-Aktivität durch Chromat. Wahrscheinlicher ist daher ein Einfluss auf die Aktivität der DNMT. Sie übertragen die Methylgruppe während der DNA-Replikation auf den unmethylierten Tochterstrang. Werden sie bei diesem Prozess gehemmt, wird keine Methylgruppe übertragen. Wird der unmethylierte Tochterstrang in einer weiteren Replikation verdoppelt, ist an der entsprechenden Stelle keine Methylgruppe vorhanden, welche auf den neuen DNA-Strang übertragen werden könnte. Die Methylierung geht somit verloren (Moore *et al.*, 2013). Der Verlust der Methylierung auf diesem Weg wird passive Demethylierung genannt. Aufgrund des beschriebenen Mechanismus sind mindestens zwei DNA-Replikationen, also zwei Zellteilungen, für den Verlust der Methylierung notwendig. Bei einer Verdopplungszeit von ca. 22 h der beiden Zelllinien ist daher die Detektion einer Hypomethylierung nach 24 h eher unwahrscheinlich. Aus diesem Grund wird die globale Methylierung in 5.2.3 nach einer zusätzlichen Nachinkubationszeit von 72 h betrachtet.

Der Einfluss von Ascorbinsäure auf die Methylierung beruht auf ihrer Funktion als Kofaktor der TET-Enzyme. Sie reduziert dabei Fe(III) zu Fe(II), welches das zentrale Metall bei dieser Reaktion darstellt. Bei einem Mangel an Ascorbinsäure können zwar andere Moleküle die Reduktion des Eisens übernehmen, diese sind jedoch wesentlich ineffektiver (Zhitkovich, 2021). Die Zugabe von Ascorbinsäure könnte daher wenig aktive TETs wieder aktivieren und zu einer Demethylierung führen, wie es in embryonalen Mausstammzellen bereits gezeigt werden konnte (Blaschke *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2013). Ebenfalls konnte eine Aktivierung der TETs durch Ascorbinsäure über die Messung des Oxidationsproduktes 5-hmC in Tumorzellen der Niere (Ge *et al.*, 2018) und Blase (Peng *et al.*, 2018) gezeigt werden. Diese Effekte traten jedoch nach einer längeren Inkubation mit Ascorbinsäure auf, während in dieser Arbeit nach 24 h detektiert wurde. Daher ist es möglich, dass eine Demethylierung durch die Zugabe von DHA ebenfalls längere

Zeit benötigt. In dem Beobachtungszeitraum von 24 h hat Ascorbinsäure keinen Einfluss auf die Methylierung in A549-Zellen und BEAS-2B-Zellen.



**Abbildung 14:** Anteil von methyliertem Cytosin am Gesamt-Cytosin der DNA nach 24-stündiger Behandlung mit Kaliumdichromat in A549-Zellen (A,C) und BEAS-2B-Zellen (B,D). Der Methylierungsgrad wurde durch HPLC-UV Detektion bestimmt. Dargestellt ist der absolute Anteil an 5-Methyl-Cytosin (A,B) und der Anteil bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (C,D). Die Vorbehandlung fand für 90 Minuten mit Dehydroascorbinsäure (DHA) bei 37 °C statt. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen.

### 5.1.6 Einfluss von Dehydroascorbinsäure auf Genexpressionsprofile

Um die Wirkung von Ascorbinsäure auf die Chromat-induzierte Toxizität näher zu beleuchten, wurde ein Genexpressionsprofil erstellt. Hierfür wurde eine Hochdurchsatzmethode angewandt, bei welcher 95 Gene parallel analysiert wurden. Eine Auswahl an Genen der A549-Zellen ist in Abbildung 15 und der BEAS-2B-Zellen ist in Abbildung 16 dargestellt, die

kompletten Übersichten sind in Abbildung 40 und Abbildung 41 im Anhang unter 8.2.6 beigefügt. Zur besseren Übersicht sind die Werte in den Abbildungen als  $\log_2$ -fache Änderung angegeben. Ab einer Expressionsänderung von  $\pm 1$ , was einer Verdopplung oder Halbierung der Transkriptmenge entspricht, wird von einer biologisch relevanten Änderung ausgegangen. Dieses Vorgehen ist bereits in anderen Studien angewandt worden (Izzotti *et al.*, 2002; Ye & Shi, 2001) und im Arbeitskreis etabliert (Friesen *et al.*, 2022; Schumacher *et al.*, 2022).

Die Genexpressionsprofile der beiden Zelllinien sind fast identisch in ihren Trends, jedoch nicht in der Ausprägung. Insgesamt reagieren die A549-Zellen deutlich stärker als die BEAS-2B-Zellen, obwohl beide Zelllinien ähnliche Zytotoxizitäten aufweisen.

Auch im Vergleich der DHA(-)-Zellen mit präinkubierten Zellen fällt auf, dass sich die Genexpressionsprofile ähneln. Sie unterscheiden sich teilweise in der Intensität der Reaktion, teilweise sind die Werte in einem ähnlichen Bereich. Bei diesem Vergleich sollte jedoch wie bei der Interpretation der Zytotoxizität die unterschiedlichen Aufnahmemengen der DHA(-)-Zellen und vorbehandelten Zellen beachtet werden.

Im Bereich der inflammatorischen Antwort ist eine Änderung einiger Gene zu beobachten. Eine detaillierte Darstellung der Gene *IL1a*, *IL6* und *IL8* ist in Abbildung 17 gezeigt. Diese drei Gene kodieren für die entsprechenden Interleukine. Während IL-1 $\alpha$  und IL-8 eine wichtige Rolle bei der Immunantwort und entzündlichen Prozessen spielen (Jones, 2005; Russo *et al.*, 2014), werden für IL-6 pro- und antiinflammatorische Wirkungen diskutiert (Weber *et al.*, 2010). In A549-Zellen wurde *IL6* bereits ab einer Inkubation von 2  $\mu$ M Chromat verstärkt exprimiert und erreichte bei 10  $\mu$ M eine maximale Induktion vom 9-fachen des Ausgangswertes. *IL8* wurde ab einer Konzentration von 10  $\mu$ M induziert und wurde durch 20  $\mu$ M Chromat um das 3,4-fache vermehrt exprimiert. Die Exposition gegenüber Chromat führte in *IL1a* zur 3-fachen Transkriptmenge. In BEAS-2B-Zellen wurde *IL1a* durch 10  $\mu$ M um das 2,8-fache vermehrt exprimiert, dies war jedoch bei höheren Inkubationskonzentrationen nicht mehr der Fall. Die Transkriptmenge von *IL6* wurde bei 10  $\mu$ M Chromat verdoppelt, durch 20  $\mu$ M zeigte sich jedoch ein Trend der Repression. Im Gegensatz zu A549-Zellen wurde *IL8* konzentrationsabhängig nach einer Behandlung mit Chromat reprimiert. Durch die höchste Inkubationskonzentration wurde der mRNA-Gehalt auf 29 % reduziert. Durch eine Präinkubation mit DHA wurden die Effekte in A549-Zellen abgeschwächt. Bei einer Inkubation mit 20  $\mu$ M Chromat wurde *IL1a* in DHA(++)-Zellen nicht induziert. Die Transkriptmenge von *IL6* und *IL8* reduzierte sich in DHA(++)-Zellen vom 4,8-fachen auf das 2,1-fache bzw. vom 3,4-fache auf das 2-fache. In den BEAS-2B-Zellen zeigte sich ein differenziertes Bild. Die Auswirkungen von Chromat auf *IL1a* wurden durch DHA vermindert, bei einer Inkubation von 20  $\mu$ M zeigte sich der Trend einer Repression. Die Effekte auf *IL6* wurden durch DHA ebenfalls abgeschwächt. In *IL8* ist eine Umkehr der Wirkung von Chromat zu erkennen. Statt einer Repression ist bei der Inkubation von 20  $\mu$ M eine Induktion auf das 2,3-fache bzw. 2,7-fache des Kontrollwertes zu sehen.

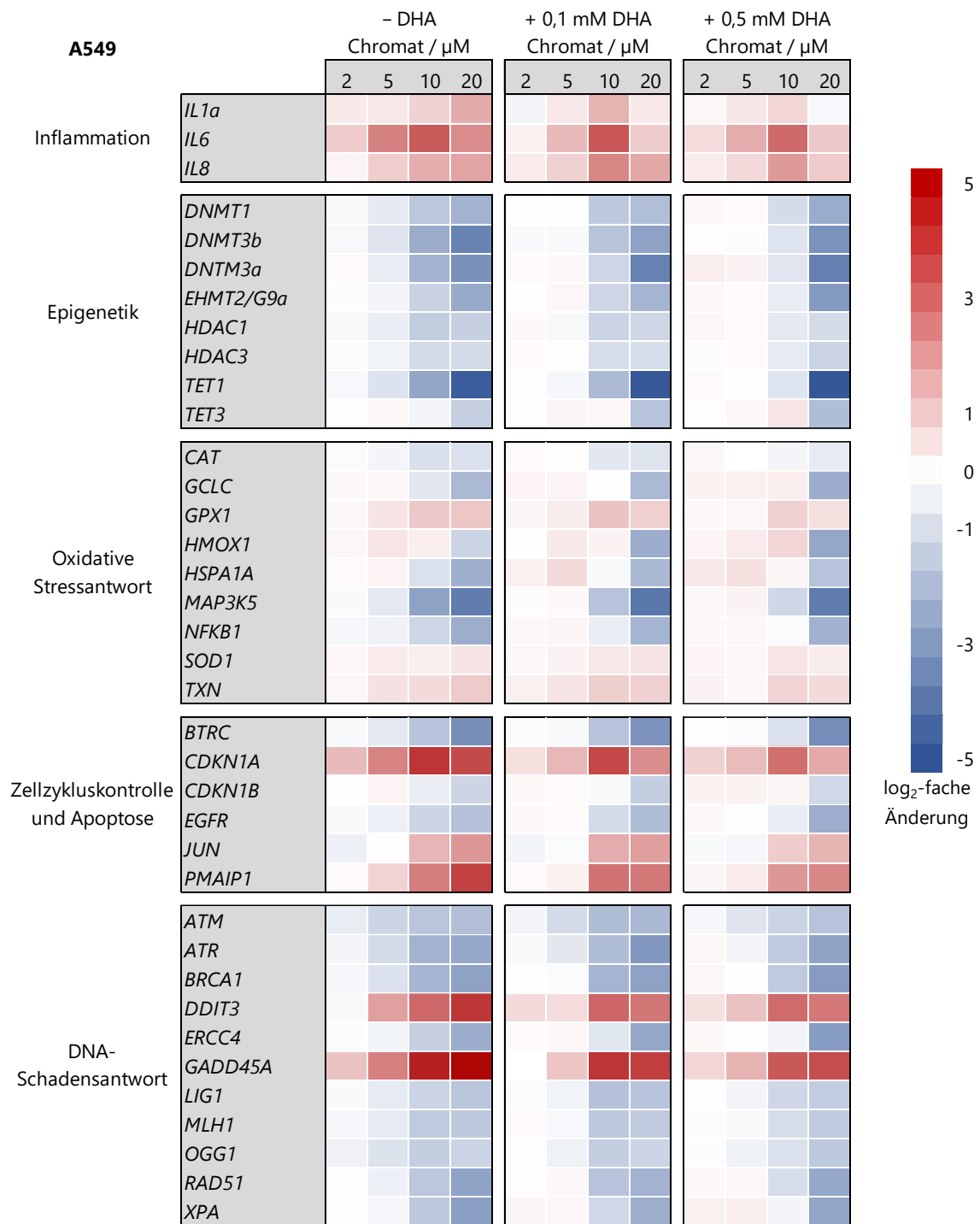


Abbildung 15: Auswahl an Genen des Genexpressionsprofils in A549-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Kaliumdichromat. Die Vorbehandlung mit Dehydroascorbinsäure (DHA) fand für 90 min bei 37 °C statt. Eine rote Färbung steht für eine Induktion, eine blaue Färbung markiert eine Repression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

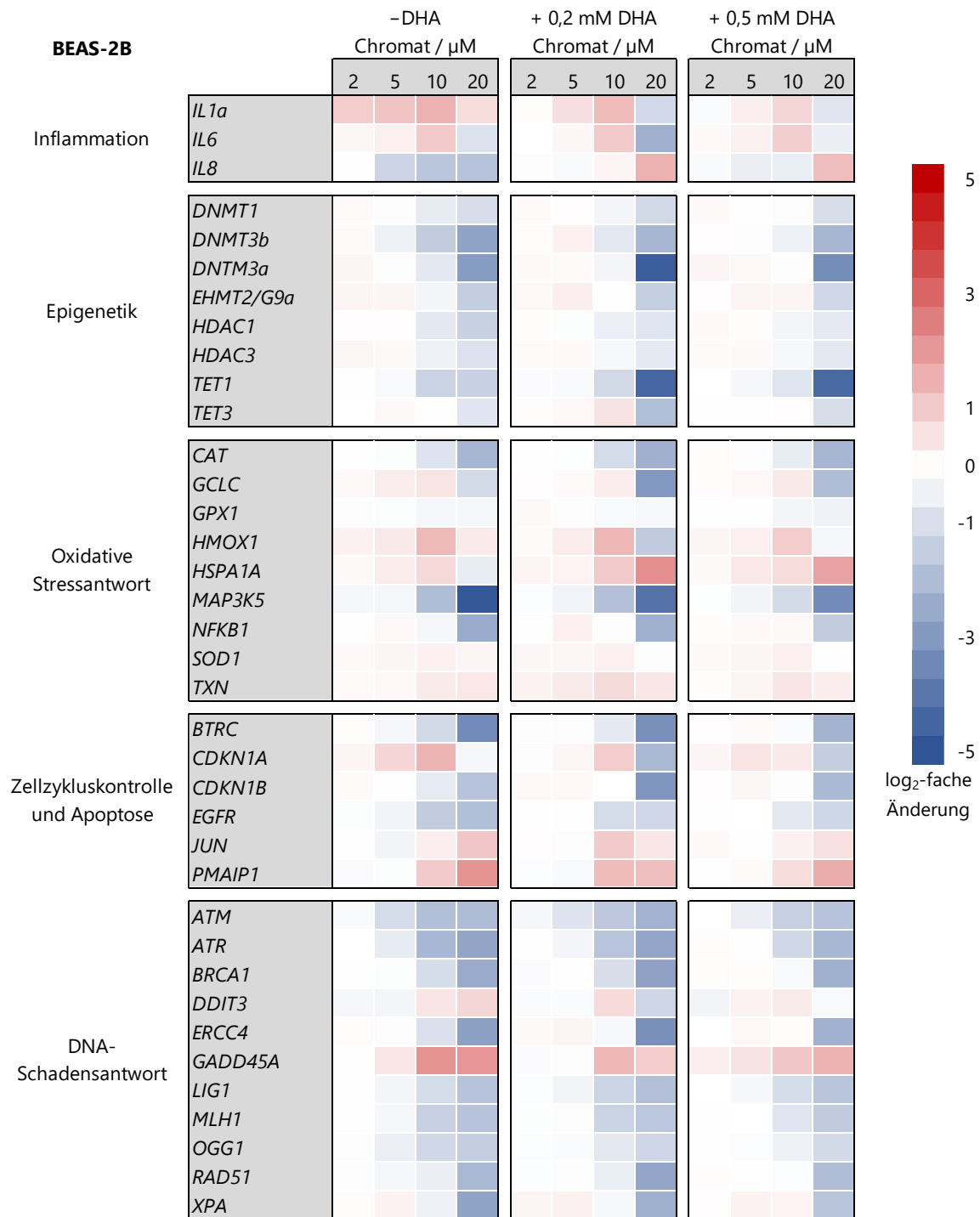
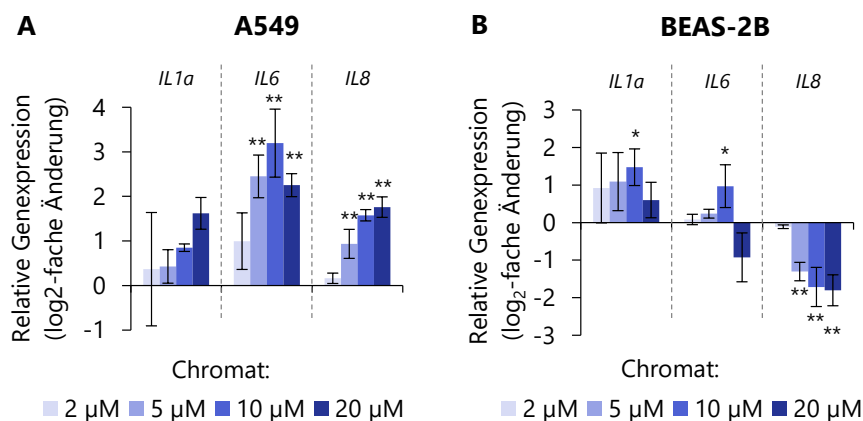


Abbildung 16: Auswahl an Genen des Genexpressionsprofils in BEAS-2B-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Kaliumdichromat. Die Vorbehandlung mit Dehydroascorbinsäure (DHA) fand für 90 min bei 37 °C statt. Eine rote Färbung steht für eine Induktion, eine blaue Färbung markiert eine Repression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

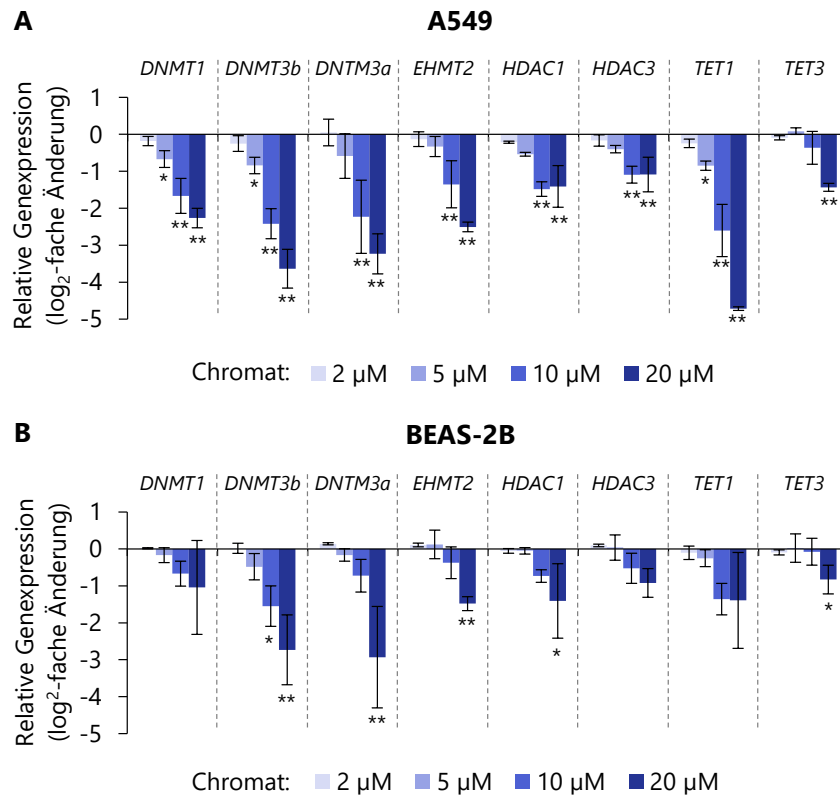
Aus dem Bereich der epigenetischen Regulation sind einige Gene beispielhaft in Abbildung 18 dargestellt. Ein breites Spektrum der untersuchten Gene wurde durch die Behandlung mit Chromat konzentrationsabhängig reprimiert. Eine Induktion ist für kein Gen zu erkennen. In A549-Zellen ist eine Repression in den meisten Genen bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu erkennen, während es in den BEAS-2B-Zellen ab 20  $\mu\text{M}$  Chromat zu einer Minderung der Genexpression kam. Die Repression der epigenetischen Modulatoren zeigte keine Spezifität. Es wurden sowohl Gene, welche für Enzyme der DNA Methylierung (DNMTs) als auch der DNA Demethylierung (TETs) codieren, beeinflusst. Ebenso verhält es sich mit Enzymen aus dem Bereich der Histonmodifikationen. Die Präinkubation mit DHA schwächte in den A549-Zellen die Effekte ab. In den DHA(++)-Zellen konnten deutliche Effekte erst ab einer Inkubation mit 20  $\mu\text{M}$  Chromat beobachtet werden. In den BEAS-2B-Zellen bewirkte eine Präinkubation mit DHA in den meisten Genen ebenfalls eine Abschwächung der Repression, in wenigen Genen jedoch eine Verstärkung des Effekts. In DHA(-)-Zellen wurde die Transkriptmenge von *TET1* auf 38 % reduziert, eine zusätzliche Vorbehandlung mit DHA verminderte sie auf 5 % des Kontrollwertes. Die Abschwächung der Effekte durch DHA kann erneut auf die verminderte Aufnahme von Chromat im Bereich von 2  $\mu\text{M}$  bis 10  $\mu\text{M}$  in beiden Zelllinien zurückgeführt werden.

Es wurden ebenfalls Gene aus dem Cluster der oxidativen Stressantwort durch Chromat beeinflusst (Abbildung 19). Einige antioxidative Gene, wie *CAT* und *GCLC*, wurden in beiden Zelllinien konzentrationsabhängig reprimiert. Dies trifft auch auf *NFKB1* zu, welches für eine Vorstufe des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*) kodiert. NF $\kappa$ B wird als Antwort auf zelluläre Stresssituationen aktiviert und wirkt im



**Abbildung 17:** Detaillierte Darstellung der Genexpression einer Auswahl an Genen aus dem Cluster der inflammatorischen Antwort in A549-Zellen (A) und BEAS-2B-Zellen (B) nach einer 24-stündigen Behandlung mit Kaliumdichromat. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz der Unterschiede der behandelten Proben zur unbehandelten Kontrolle wurde mit ANOVA-Dunnett's bestimmt: \*/\*\* ( $p < 0,05/0,01$ ).





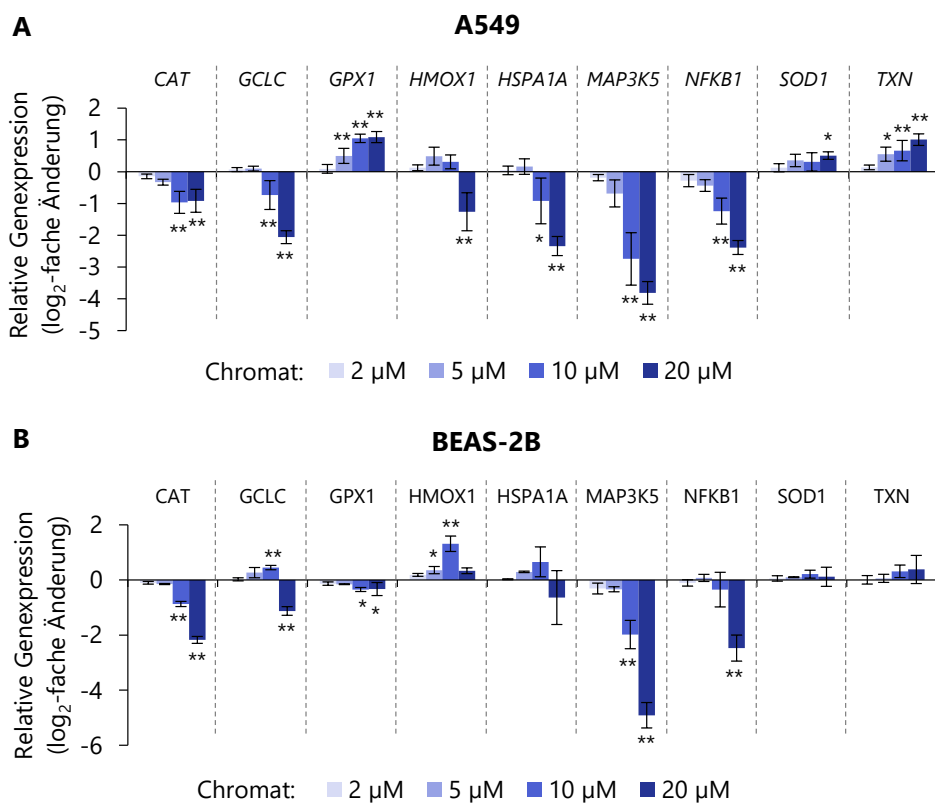
**Abbildung 18:** Detaillierte Darstellung der Genexpression einer Auswahl an Genen aus dem Cluster der Epigenetik in A549-Zellen (A) und BEAS-2B-Zellen (B) nach einer 24-stündigen Behandlung mit Kaliumdichromat. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz der Unterschiede der behandelten Proben zur unbehandelten Kontrolle wurde mit ANOVA-Dunnett's bestimmt: \*/\*\* ( $p < 0,05/0,01$ ).

Zellkern als Transkriptionsfaktor für eine Vielzahl von Stress-assoziierten Genen (Savinova *et al.*, 2009). Am stärksten reprimiert wurde in beiden Zelllinien *MAP3K5*, welches für die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase 5, auch *ASK1* (*apoptosis signal regulating kinase 1*) genannt, kodiert. *ASK1* ist unter anderem an der Induktion der Apoptose beteiligt (Hattori *et al.*, 2009). In A549-Zellen wurde die Transkriptmenge durch 20 µM Chromat auf 7 % des Kontrollwertes reduziert. In BEAS-2B-Zellen bewirkten 20 µM eine Reduktion auf 3 %. Zu den Genen, welche durch Chromat in A549-Zellen vermehrt exprimiert wurden zählen *GPX1*, *SOD1* und *TXN*, welche für antioxidativ wirkende Enzyme kodieren. In BEAS-2B-Zellen hatte Chromat keinen Einfluss auf diese Gene. Die Gene *HMOX1* und *HSPA1A* wurden widersprüchlich beeinflusst. *HMOX1* kodiert für die Hämoxigenase 1, welche einen ROS-Marker darstellt (Holowiecki *et al.*, 2016). Das dem *HSPA1A* zugehörige Enzym ist das *Heat shock protein 72*, welches ebenfalls durch oxidativen Stress induziert wird (Kurashova *et al.*, 2020). Durch eine Behandlung mit Chromat zeigte sich in *HMOX1* ein Trend der Induktion bis zu einer Konzentration von 10 µM, welcher in BEAS-2B-Zellen eine Verdopplung erreichte. Bei einer Inkubation mit 20 µM Chromat drehte sich dieser Trend um und das Gen wurde in A549-Zellen

reprimiert. Mit *HSPA1A* verhielt es sich ähnlich. Während sich zunächst ein leichter Trend der Induktion zeigte, wurde das Gen in A549-Zellen ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  reprimiert.

Eine Vorbehandlung mit DHA hatte sowohl abschwächende als auch verstärkende Auswirkungen auf die Expressionsänderungen. In A549-Zellen wurden insbesondere die induktiven Effekte reduziert. In BEAS-2B-Zellen zeigte sich eine leichte Abschwächung der repressiven Auswirkungen. *HSPA1A* wurde in vorbehandelten BEAS-2B-Zellen konzentrationsabhängig induziert und zeigte keine Repression mehr.

Aus dem Bereich der Apoptose und Zellzykluskontrolle sind die Gene *BTRC*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *EGFR*, *JUN* und *PMAIP1* besonders beeinflusst worden (Abbildung 20). *BTRC* codiert für eine E3-Ubiquitin-Ligase, die an dem Abbau des NF $\kappa$ B-Inhibitors I $\kappa$ B und somit an der Aktivierung von NF $\kappa$ B beteiligt ist (Vucic *et al.*, 2011). Es wurde in beiden Zelllinien ab einer Inkubation von 10  $\mu\text{M}$  Chromat konzentrationsabhängig reprimiert. Die Transkriptmenge wurde durch 20  $\mu\text{M}$  Chromat auf 10 % des Kontrollwertes gemindert. Die Gene *CDKN1A* und *CDKN2B* kodieren für die Proteine p21 und p27. Hierbei handelt es sich um Cyclin-abhängige



**Abbildung 19:** Detaillierte Darstellung der Genexpression einer Auswahl an Genen aus dem Cluster der oxidativen Stressantwort in A549-Zellen (A) und BEAS-2B-Zellen (B) nach einer 24-stündigen Behandlung mit Kaliumdichromat. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz der Unterschiede der behandelten Proben zur unbehandelten Kontrolle wurde mit ANOVA-Dunnett's bestimmt: \*/\*\* ( $p < 0,05/0,01$ ).

Kinaseinhibitoren, durch welche ein Zellzyklusarrest initiiert wird. Zusätzlich ist p21 in Signalwegen der DNA-Reparatur und der Apoptose involviert (Dutto *et al.*, 2015). Während *CDKN1A* induziert wird, zeigte sich in *CDKN1B* eine Repression. In A549-Zellen wurde *CDKN1A* bereits ab der niedrigsten Inkubationskonzentration mehr als doppelt so stark induziert, welche bei 10  $\mu\text{M}$  mit mehr als dem 15-fachen den höchsten Wert erreichte. In BEAS-2B-Zellen ist die Transkriptmenge lediglich bei 10  $\mu\text{M}$  mit dem 2,6-fachen mehr als verdoppelt worden und erreichte bei 20  $\mu\text{M}$  wieder den Ausgangswert. *CDKN1B* wurde in beiden Zelllinien konzentrationsabhängig auf 42 % (A549-Zellen) bzw. 29 % (BEAS-2B-Zellen) reprimiert. *EGFR* kodiert für den Transmembranrezeptor für epidermale Wachstumsfaktoren, durch welchen unter anderem die Proliferation und Differenzierung der Zelle reguliert wird. Eine Aktivierung kann daher die Einleitung der Apoptose verhindern (Herbst, 2004). In beiden Zelllinien wurde *EGFR* konzentrationsabhängig reprimiert, wobei eine Minderung um mehr als die Hälfte bereits ab 10  $\mu\text{M}$  erreicht wurde. Im Gegensatz dazu wurden die Gene *JUN* und *PMAIP1* beide induziert. *JUN* kodiert für das Protein c-Jun, welches einen Teil des Transkriptionsfaktors AP-1 darstellt. Dieser reguliert Gene der oxidativen und inflammatorischen Stressantwort sowie der

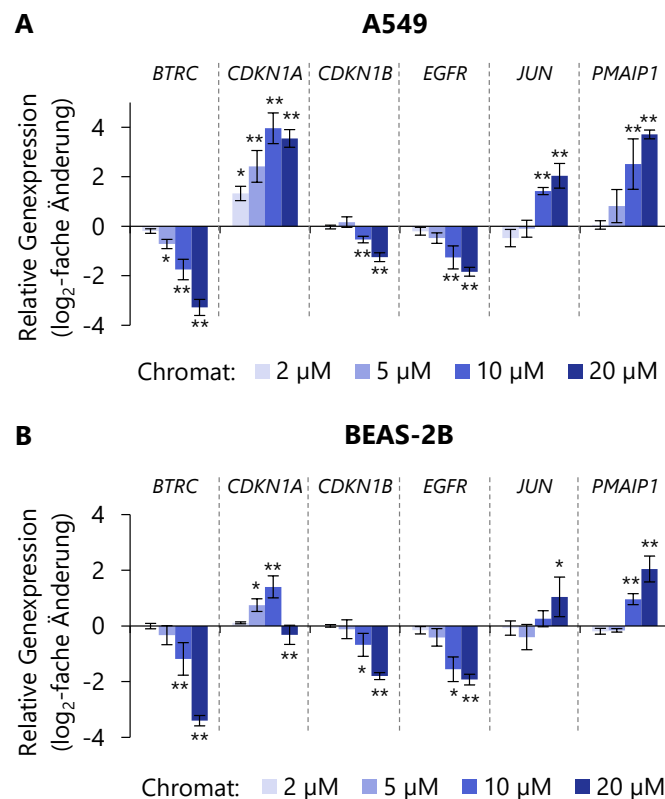


Abbildung 20: Detaillierte Darstellung der Genexpression einer Auswahl an Genen aus dem Cluster der apoptotischen und Zellzykluskontrolle in A549-Zellen (A) und BEAS-2B-Zellen (B) nach einer 24-stündigen Behandlung mit Kaliumdichromat. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz der Unterschiede der behandelten Proben zur unbehandelten Kontrolle wurde mit ANOVA-Dunnett's bestimmt: \*/\*\* ( $p < 0,05/0,01$ ).

Differenzierung und Apoptose (Wisdom *et al.*, 1999). In den A549-Zellen wurde *JUN* ab einer Chromatkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  induziert und wurde durch 20  $\mu\text{M}$  Chromat um das 4-fache vermehrt exprimiert. Weniger stark wurde das Gen in den BEAS-2B-Zellen induziert, welches durch eine Inkubation mit 20  $\mu\text{M}$  Chromat den doppelten Wert der Kontrolle erreichte. Das Genprodukt von *PMAIP1* ist das proapoptotische Protein Noxa. Die konzentrationsabhängige Induktion führte in A549-Zellen zu einer 15-fachen und in BEAS-2B-Zellen zu einer 4-fachen Transkriptmenge. Durch eine Präinkubation mit DHA wurden die Effekte in A549-Zellen abgeschwächt. Sowohl die repressiven als auch die induktiven Effekte wurden gemindert. In den BEAS-2B-Zellen zeigten sich durch die DHA-Behandlung dieselben Effekte. Zudem verhinderte die Präinkubation in diesen Zellen die Induktion von *JUN*. *CDKN1A* wurde durch die höchste Inkubationskonzentration reprimiert, statt wie zuvor durch 10  $\mu\text{M}$  Chromat induziert.

Die untersuchten Gene aus dem Bereich der DNA Schadensantwort wurden fast alle durch Chromat beeinflusst. Besonders auffällig sind die Gene *DDIT3* und *GADD45A*, welche vermehrt exprimiert wurden, während alle anderen untersuchten Gene reprimiert wurden. Eine Auswahl an Genen ist detailliert in Abbildung 21 dargestellt. Die beiden Gene *DDIT3* und *GADD45A* kodieren für Enzyme der GADD (*growth arrest and DNA damage*)-Familie. Das Genprodukt von *GADD45A* ist das Protein GADD45 $\alpha$  und *DDIT3* kodiert für GADD153. Die Enzyme der GADD-Familie sind sensitive Marker für DNA-schädigende Substanzen und zellulären Stress. Sie haben Einfluss auf die Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur und Apoptose (Jauhainen *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2010). In A549-Zellen wurde *GADD45A* am stärksten im gesamten Genset induziert. Eine vermehrte Expression tritt bereits bei der niedrigsten Inkubationskonzentration auf und erreicht nach einer Exposition gegenüber 20  $\mu\text{M}$  Chromat die 30-fache Menge. *DDIT3* wird ab 5  $\mu\text{M}$  Chromat induziert und erreicht bei der höchsten Inkubationskonzentration die 15-fache Transkriptmenge. In den BEAS-2B-Zellen sind die Effekte deutlich schwächer ausgeprägt. Während *GADD45A* nach der Exposition gegenüber Chromat 4-mal so häufig abgelesen wurde, erfuhr *DDIT3* keine Verdopplung der Induktion, ein Trend ist jedoch zu erkennen. Die weiteren untersuchten Gene aus diesem Cluster sind spezifischen DNA-Reparaturwegen zuzuordnen. Es wurden in A549-Zellen 19 von 21 Genen und in BEAS-2B-Zellen 20 von 21 Genen reprimiert. Die beobachtete Repression betrifft Gene aus allen Reparaturwegen, wie der Strangbruchreparaturen, der NER, BER, MMR, *Crosslink*-Reparatur und Reparatur von oxidativen Basenschäden. In den Genen *ATM*, *ATR* und *RAD50* (A549-Zellen) bzw. *ATM* und *MGMT* (BEAS-2B-Zellen) ist die Repression ab 5  $\mu\text{M}$  Chromatinkubation ersichtlich. Durch die höchste Inkubation wurde die Transkriptmenge um zwischen 51 % und 90 % reduziert. Die stärkste Repression in A549-Zellen erfuhren die Gene *BRCA2* und *LIG3*, die auf 11 % bzw. 10 % reduziert wurden. In BEAS-2B-Zellen ist dies für die Gene *BRCA2* und *DDB2* der Fall. Die Transkriptmenge reduzierte sich jeweils auf 11 %. Durch eine Vorbehandlung mit DHA wurden die induktiven Effekte in beiden Zelllinien deutlich abgeschwächt. In A549-DHA(++)-Zellen wurde *GADD45A* 11,2-fach und *DDIT3* 6,3-fach verstärkt exprimiert. In BEAS-2B-Zellen erhöhte sich die Transkriptmenge von *GADD45A* auf das 2,7-fache im Vergleich

zur unbehandelten Kontrolle. Die repressiven Effekte blieben in A549-Zellen bis auf geringe Schwankungen durch DHA-Behandlung unbeeinflusst. In BEAS-2B-Zellen schwächte sich der Effekt in den meisten Genen leicht ab, in einigen blieb er unverändert.

Es zeigte sich, dass Chromat einen vielseitigen Einfluss auf die Expression verschiedener Gene hat. Eine Veränderung der Genexpression hat jedoch nicht zwangsläufig eine Auswirkung auf funktionaler Ebene, da keine Aussage über die Translation der detektierten mRNA getroffen werden kann. Zudem werden Proteine zusätzlich über weitere Mechanismen aktiviert und gehemmt. Die Genexpression liefert dennoch wichtige Hinweise auf die Wirkweise von Chromat.

Die untersuchten Gene aus dem Bereich der epigenetischen Modifikatoren wurden fast vollständig reprimiert. Dies deutet auf eine generelle Dysregulation der epigenetischen Mechanismen durch Chromat hin. Eine Repression von DNMTs könnte eine Hypomethylierung bewirken, wie sie auf globaler Ebene in der Literatur beschrieben wird (Ali *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2018; Lou *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016). Es werden jedoch auch deren Gegenspieler, die TETs,

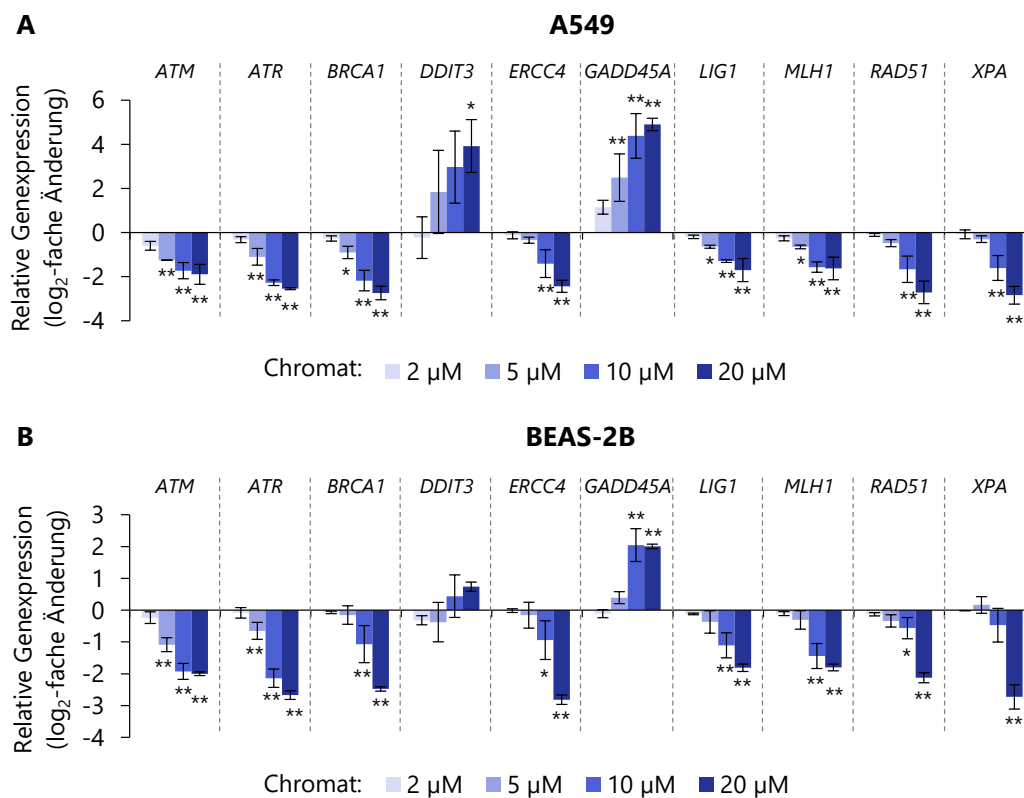


Abbildung 21: Detaillierte Darstellung der Genexpression einer Auswahl an Genen aus dem Cluster der DNA Schadensantwort in A549-Zellen (A) und BEAS-2B-Zellen (B) nach einer 24-stündigen Behandlung mit Kaliumdichromat. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz der Unterschiede der behandelten Proben zur unbehandelten Kontrolle wurde mit ANOVA-Dunnett's bestimmt: \*/\*\* (p<0,05/0,01).

reprimiert, wodurch es zu einer genspezifischen Hypermethylierung in DNA-Reparaturgenen kommen kann. Über eine vermehrte Promotormethylierung von DNA-Reparaturgenen wurde bereits berichtet (Ali *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2018; Kondo *et al.*, 2006; Tsuboi *et al.*, 2020). Diese steht im Zusammenhang mit einer verringerten Expression der entsprechenden Gene (Ali *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2018). Eine Repression der DNA-Reparaturgene konnte ebenfalls in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Bei diesen zeigte sich analog zu den epigenetischen Markern keine Spezifität der repressiven Wirkung. Auch hier scheint Chromat eine Dysregulation der DNA-Schadensantwort zu verursachen. Diese könnte, wie erwähnt, an fehlregulierten epigenetischen Mechanismen liegen. Diese ausgeprägte Repression verschiedener Gene zeigte sich ab Inkubationen von 10  $\mu$ M Chromat, bei welchen deutliche zytotoxische Effekte auftreten. Somit ist es auch möglich, dass die Zelle bereits in Zelltodmechanismen übergeht, wodurch eine DNA-Reparatur und epigenetische Regulation nicht mehr notwendig ist. Anders als die DNA-Reparaturgene wurden die Stressmarker *GADD45A* und *DDIT3* induziert. Ein ähnliches Expressionsmuster konnte ebenfalls von Mitarbeitenden dieses Arbeitskreises in A549-Zellen detektiert werden (Schumacher *et al.*, 2022). Gene der GADD-Familie werden durch genotoxischen Stress sowohl p53-abhängig als auch -unabhängig vermehrt transkribiert. Eine erhöhte Transkription durch Chromat ist bereits in anderen Zelllinien bekannt (Ceryak *et al.*, 2004; Tully *et al.*, 2000). Vertreter der GADD-Familie nehmen so Einfluss auf zelluläre Prozesse und sind entscheidende Regulatoren für die Zellzyklusprogression und die Apoptose. *GADD45A* und *DDIT3* können durch oxidative DNA-Schäden und genotoxischen Stress induziert werden, wie sie Chromat in der Zelle verursacht (Jauhainen *et al.*, 2012; Liebermann & Hoffman, 2008). Somit könnte die Überexpression von *GADD45A* eine Ursache des beobachteten G2-/M-Arrest darstellen. Zudem konnte gezeigt werden, dass das Genprodukt von *GADD45A*, *GADD45 $\alpha$* , am katalytischen Zentrum von DNMT1 binden kann und somit dessen Aktivität mindert. Dadurch entsteht eine Hypomethylierung, insbesondere nach der Reparatur eines DSB durch die HR. Durch die Wiederherstellung der DNA nach einem DSB liegt der neu synthetisierte DNA-Abschnitt unmethyliert vor. Durch die Hemmung von DNMT1 wird die Methylierung nicht wieder hergestellt (Lee *et al.*, 2011). Eine Induktion auf Genebene ist jedoch keine Garantie für eine erhöhte Proteinaktivität, welche in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde.

Weitere Hinweise auf einen Zellzyklusarrest geben die Induktion von *CDKN1A* und die Repression von EGFR. Die verminderte Expression des Wachstumsfaktor-Rezeptors kann die Zellzyklusprogression verhindern. Das Protein von *CDKN1A*, p21, verhindert den Übergang von der G1- in die S-Phase und ist ebenso an der Entstehung eines G2-Arrests beteiligt. Die Induktion von *CDKN1A* wird hauptsächlich über p53 aktiviert, sie kann jedoch auch unabhängig von p53 stattfinden (Dutto *et al.*, 2015). Eine Aktivierung von p53 in BEAS-2B-Zellen steht aufgrund einer Mutation in der Diskussion. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass p53 in BEAS-2B-Zellen durch Chromat aktiviert wird, was ebenfalls mit der Induktion von p21 einhergeht (Park *et al.*, 2015). Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung von p53 ist die vermehrte

Expression von *PMAIP1*, welches ebenfalls durch p53 induziert wird. Das zugehörige Protein Noxa wirkt proapoptotisch (Oda et al., 2000). Die Induktion von *PMAIP1* ist somit ein Hinweis auf eine durch Chromat-induzierte Apoptose. Im Gegensatz dazu deutet die Repression von *MAP3K5* durch die Behandlung mit Chromat auf die Verminderung der Apoptose hin. Kann die Apoptose nach einer schweren Schädigung der Zelle nicht reguliert ablaufen, kommt es zu unregulierten Zelltodmechanismen oder dem Überleben der Zelle. Überlebt die Zelle trotz starker Schädigung, fördert dies die Krebsentstehung. Ein unkontrollierter Zelltod, wie die Nekrose, geht mit schweren Entzündungsreaktionen einher und schädigt damit umliegendes Gewebe (Ryuno et al., 2017). Die Dysregulation von *MAP3K5* wird zusätzlich durch die Induktion von *TXN* verstärkt, da Thioredoxin ASK1 auf Proteinebene inhibiert (Ryuno et al., 2017). Eine Verminderung von ASK1 und Erhöhung von Thioredoxin auf Proteinebene ist in A549-Zellen bekannt (Hodges et al., 2004).

Hodges und Mitarbeitende zeigten zudem eine Erhöhung des Proteinlevels von c-Jun, welches von *JUN* codiert wird (Hodges et al., 2004). *JUN* wurde in der vorliegenden Arbeit auf Genebene aktiviert. Das Protein c-Jun stellt einen Teil des Transkriptionsfaktors AP-1 dar, welcher einen Einfluss auf den Zellzyklus und die Apoptose hat. Eine Induktion von *JUN* deutet auf eine oxidative Stressantwort hin (Ma, 2010). Einen Einfluss auf den Zellzyklus hat AP-1 zum Beispiel durch einen repressiven Effekt auf die Transkription von *CDKN1B* (Bachs et al., 2018), wie er ebenfalls in den vorliegenden Daten beobachtet werden konnte. Die Reduzierung von *CDKN1B* könnte zur Verhinderung eines G1-Arrests beitragen.

Aus dem Cluster der apoptotischen Kontrolle wurde ebenfalls *BTRC* reprimiert. Das zugehörige Protein ist an der Ubiquitinierung und damit dem Abbau von IKBA beteiligt. IKBA wiederum inhibiert NFκB. Durch die Repression von *BTRC* wird daher NFκB sowohl auf diesem Weg als auch transkriptionell gehemmt (Suzuki et al., 2000). Eine Beteiligung des NFκB-Signalwegs als Antwort auf Chromat-induzierte Schäden ist daher unwahrscheinlich. Unterstützt wird diese These durch die Repression von *NFKB1* und *NFKB2*, welche Bestandteile von NFκB sind. In der Studie von Hodges und Mitarbeitenden konnte ebenfalls keine Aktivierung von NFκB durch Chromat in A549-Zellen festgestellt werden (Hodges et al., 2004).

Obwohl NFκB durch eine Behandlung mit Chromat auf Genebene reprimiert wurde, wurden Entzündungsmarker, wie die Interleukine *IL1A*, *IL6* und *IL8*, in A549-Zellen induziert. Eine Erhöhung der Proteine IL-6 und IL-8 konnte in Lungenepithelzellen nachgewiesen werden (Pascal & Tessier, 2004). Eine Aktivierung auf einem anderen Wege als über NFκB, beispielsweise über den Transkriptionsfaktor AP-1, ist denkbar (Xie, 2001). Damit ist ein entzündlicher Prozess in den Zellen wahrscheinlich, welcher beispielsweise durch die beschriebene Verschiebung der Zelltodmechanismen zur Nekrose hin entstehen könnte. Ein Unterschied zwischen den verwendeten Zelllinien A549 und BEAS-2B ist hier besonders deutlich zu sehen. Während die erwähnten Interleukingene in A549-Zellen konzentrationsabhängig exprimiert werden, ist dies in den BEAS-2B-Zellen nicht der Fall. Zudem wird *IL8* in BEAS-2B-Zellen reprimiert. Weitere Unterschiede in den Genexpressionsmustern zwischen den untersuchten Zelllinien könnten in

der konstitutiven Überexpression von *HMOX1* und des damit verbundenen Transkriptionsfaktor Nrf2 in A549-Zellen bedingt sein (Kweon *et al.*, 2006). Dies zeigt sich auch dadurch, dass *HMOX1* in den A549-Zellen aufgrund der dauerhaften Überexpression durch Chromat nicht weiter induziert wurde. In BEAS-2B-Zellen wurde dagegen eine vermehrte Expression dieses Gens beobachtet. Die Überexpression in A549-Zellen führt zu einer erhöhten antioxidativen Abwehr und verminderter Apoptose (Kweon *et al.*, 2006). Die Folge ist eine erhöhte Reaktion auf oxidative Stimuli, wie den durch Chromat ausgelösten oxidativen Stress. Dies steht in Einklang mit den geringer ausgeprägten Expressionsänderungen in den BEAS-2B-Zellen.

Eine Präinkubation mit DHA in den A549-Zellen führte entweder zu einer Abschwächung der durch Chromat ausgelösten Effekte oder zu einer Änderung der Effekte auf die Genexpression. Eine mögliche Begründung für den Rückgang von Effekten ist die geringere Aufnahme von Chromat in die vorbehandelten Zellen. Einige Effekte blieben gleich stark ausgeprägt, obwohl der intrazelluläre Chromgehalt variierte. Ein Einfluss auf Signalwege ist nicht zu erkennen. In den BEAS-2B-Zellen verringerten sich die Effekte durch die Präinkubation mit DHA ebenfalls in den meisten Genen. Auch eine gleichbleibende Effektstärke einiger Gene war zu beobachten. In den BEAS-2B-Zellen kam es ebenso zu einer geringeren Aufnahme von Chromat durch DHA bis zu einer Inkubation von 10  $\mu$ M Chromat. Unterschiede zeigten sich insbesondere bei den Interleukinen. Während *IL8* in DHA(-)-Zellen reprimiert wurde, wurde es in DHA(+)- und DHA(++)-Zellen induziert. Dadurch deutet sich eine veränderte entzündliche Reaktion durch Ascorbinsäure an.

Wie in 5.1.2 bereits beschrieben, wird der intrazelluläre Chromatmetabolismus durch die Anwesenheit von Ascorbinsäure verändert. Aufgrund der Reaktion von Cr(VI) mit Ascorbat entsteht direkt das Intermediat Cr(IV). Durch eine erhöhte Anzahl mutagener ternärer Ascorbat-Chrom-DNA-Addukte kommt es zu einem gehäuftem Auftreten von Mikronuklei und DSBs sowie einer verstärkten Zytotoxizität (Zhitkovich *et al.*, 2012). Für den Einfluss auf die Entstehung von ROS gibt es unterschiedliche Literaturangaben. Während Martin und Mitarbeitende ein erhöhtes Auftreten von ROS durch die Zugabe von Ascorbinsäure detektierten (Martin *et al.*, 2006), zeigten andere Studien ein geringeres Level ROS (DeLoughery *et al.*, 2014; Reynolds *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2012). Dieses wird auf die direkte Reduktion von Cr(VI) zu Cr(IV), bei der kein hochreaktives Cr(V) entsteht, zurückgeführt (DeLoughery *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2012).

Zusammenfassend konnte das Genexpressionsprofil in DHA(+)- und DHA(++)-Zellen das in der Literatur beschriebene veränderte Schadensprofil nicht abbilden. Durch die Präinkubation mit DHA veränderten sich teilweise lediglich die Effektstärken, es können jedoch keine Rückschlüsse auf veränderte zelluläre Signalwege gezogen werden.



## 5.2 Untersuchung der Toxizität von Chromat in der Folge einer Nachinkubation

Um zu analysieren, ob die durch eine 24-stündige Chromatbehandlung ausgelösten Effekte bestehen bleiben oder sich der unbehandelten Kontrolle angleichen und somit reversibel sind, wurden die Zellen nach der Chromatinkubation für 72 h weiter kultiviert. Insbesondere können durch diese Nachinkubation Wirkungen beobachtet werden, die erst zu einem späteren Zeitpunkt auftreten. Zu diesem Zweck wurden die Zellen beider verwendeten Zelllinien zunächst mit Chromat für 24 h behandelt, abgelöst, eine definierte Zellzahl neu ausgesät und für weitere 72 h im Brutschrank kultiviert. Danach wurden die Zellen gezählt, der Zellzyklus analysiert, die globale Methylierung gemessen und ein Genexpressionsprofil erstellt. Die erhaltenen Daten sind im Folgenden dargestellt und werden mit den Ergebnissen ohne Nachinkubation verglichen.

### 5.2.1 Wirkung einer Nachinkubation auf die Zytotoxizität nach Exposition gegenüber Chromat

Zur Analyse der Zytotoxizität wurden Zellzählungen durchgeführt und aus ihnen die relative Zellzahl berechnet. Der RCC nach einer Nachinkubation wurde mit Zellzählungen der 24 h Versuche ohne Nachinkubation verglichen und ist in Abbildung 22 dargestellt.

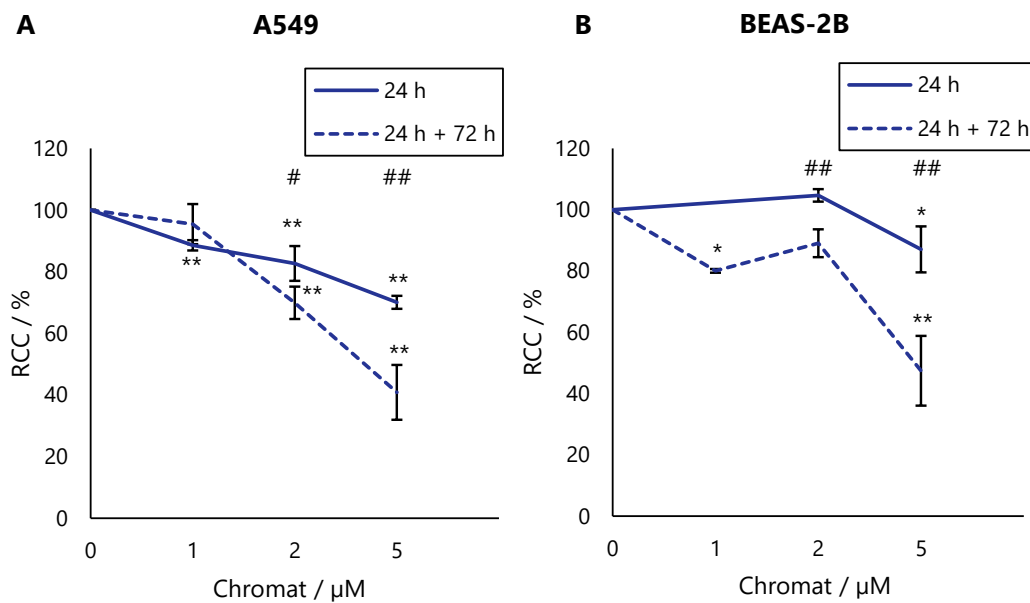
In beiden Zelllinien ist eine signifikant geringere Zellzahl nach der weiteren Kultivierung bei 2  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  Chromat zu beobachten. Nach einer Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  Chromat war die Toxizität nach der Nachinkubation so hoch, dass keine weiteren Versuche mit den Zellen durchgeführt werden konnten. Daher wurde zusätzlich die Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Chromat durchgeführt.

In A549-Zellen war die Zellzahl bei allen Inkubationskonzentrationen vermindert, sie lag bei 5  $\mu\text{M}$  Chromat bei 70 % der unbehandelten Kontrolle. Somit liegen die Zellzahlen in einem ähnlichen Bereich wie die Zytotoxizitäten des ATP-Assays. Die Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Chromat scheint keinen längerfristigen Einfluss auf die Proliferation der Zellen zu haben, da sich die relative Zellzahl nach 72 h nicht von den Proben ohne Nachinkubation unterschied. Anders sieht es bei den Inkubationen mit 2  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  aus, hier zeigte sich nach 72 h eine verringerte Zellzahl.

In BEAS-2B-Zellen stieg die Zellzahl bei einer Inkubation mit 2  $\mu\text{M}$  zunächst auf 105 % an, sank dann bei 5  $\mu\text{M}$  auf 87 % ab. Der Effekt eines leichten Anstiegs bei 2  $\mu\text{M}$  Chromat und folgendem Absinken ist ebenfalls im ATP-Assay beobachtet worden. Inkubationen mit 2  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  Chromat führten nach einer 72-stündigen Nachinkubation vergleichbar zu den Effekten in den A549-Zellen zu verringerten Zellzahlen. Anders als in A549-Zellen konnte in BEAS-2B-Zellen bei 2  $\mu\text{M}$  Chromatinkubation keine Zytotoxizität nach der Nachinkubation

festgestellt werden. Bei 1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  hingegen liegen die Werte im Bereich derer der A549-Zellen.

Eine Reduktion der Zellzahl nach der 72-stündigen Nachinkubation könnte durch einen Zellzyklusarrest und damit einhergehenden Wachstumsstopp oder einem erhöhten Zellsterben auch nach der 24-stündigen Inkubation verursacht sein. Zur Beurteilung des Zellzyklus wurde dieser ebenfalls nach einer 72-stündigen Nachinkubationszeit analysiert.



**Abbildung 22:** Relative Zellzahl (RCC) der A549-Zellen (A) und BEAS-2B-Zellen (B) nach einer 24-stündigen Behandlung mit Kaliumdichromat und 72 h Nachinkubation. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz der Unterschiede der behandelten Proben zur unbehandelten Kontrolle wurde mit ANOVA-Dunnett's bestimmt: \*/\*\* ( $p < 0,05/0,01$ ). Die Signifikanz zwischen Zellen mit und ohne Nachinkubation wurde mit dem Student's t-Test bestimmt: #/### ( $p < 0,05/0,01$ ).

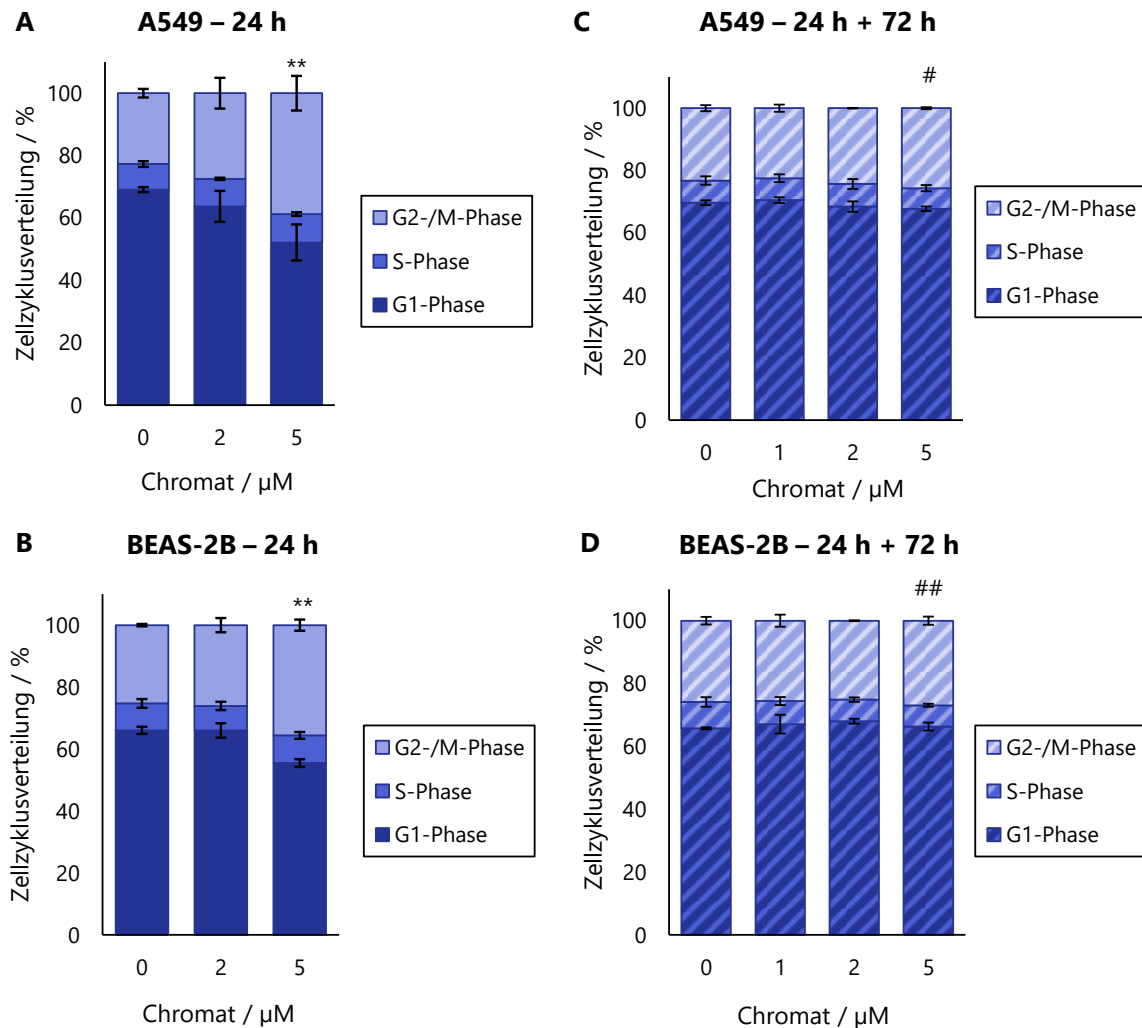
## 5.2.2 Analyse der Zellzyklusverteilung in Folge einer Nachinkubation nach Exposition gegenüber Chromat

Der Zellzyklus wurde ebenfalls nach einer 72-stündigen Nachinkubation in A549-Zellen und BEAS-2B-Zellen analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt. In dieser Abbildung sind die Ergebnisse der 24 h Versuche ohne Nachinkubation aus Abbildung 13 erneut dargestellt, um einen Vergleich der Ergebnisse mit und ohne Nachinkubation zu erleichtern.

Die gemessene Zellzyklusverteilung der unbehandelten Kontrollen mit und ohne Nachinkubation stimmen überein. Während es direkt nach der 24-stündigen Inkubation mit Chromat in beiden Zelllinien zu einem G2-Arrest ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  kam, ist dieser Effekt nach einer 72-stündigen Nachinkubation nicht mehr zu sehen.

Wie in Kapitel 5.1.4 beschrieben, ist es möglich, dass der G2-Arrest ausgelöst wird, um durch Chromat-induzierte DSBs reparieren zu können. Diese Strangbrüche können wie in 2.1.3

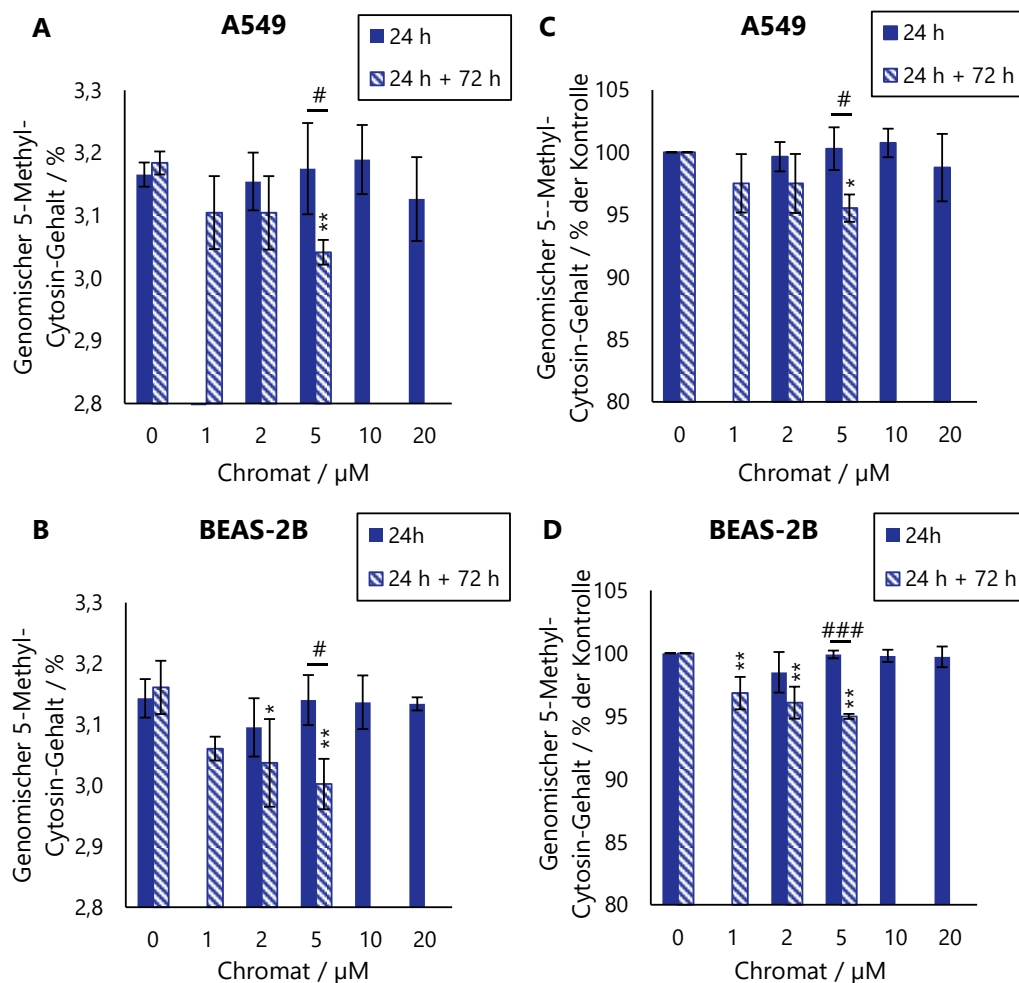
beschrieben auf unterschiedliche Weise entstehen. Die wahrscheinlichste Ursache ist eine Blockade der Replikationsgabel durch den MMR-Enzymkomplex aufgrund von Chrom-DNA-Addukten. Beim Übergang der Zelle in die G2-Phase kollabiert die Replikationsgabel, wodurch sich DSBs bilden (Reynolds *et al.*, 2007). Die entstandenen Strangbrüche werden innerhalb der folgenden 24 h nach Beendigung der Inkubation durch die Zelle repariert (Wakeman *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2008). Daher ist ein Arrest 72 h nach der Chromatinkubation nicht mehr notwendig und der Anteil der Zellen in der G2-/M-Phase erreicht wieder ihren Ausgangswert.



**Abbildung 23:** Zellzyklusverteilung in A549-Zellen (A,C) und BEAS-2B-Zellen (B,D) nach 24-stündiger Behandlung mit Kaliumdichromat (A,B) und anschließender 72-stündiger Nachinkubation (C,D). Die Zellzyklusverteilung wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die 24 h Ergebnisse wurden bereits in Abbildung 13 gezeigt und wurden zur besseren Vergleichbarkeit erneut dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Gezeigt ist die statistische Auswertung der G2-/M-Phase. Die Signifikanz der Unterschiede der behandelten Proben zur unbehandelten Kontrolle wurde mit ANOVA-Dunnett's bestimmt: \*\*  $p < 0,01$ . Die Signifikanz zwischen Zellen mit und ohne Nachinkubation wurde mit dem Student's t-Test bestimmt: #/## ( $p < 0,05/0,01$ ).

### 5.2.3 Wirkung einer Nachinkubation nach Exposition gegenüber Chromat auf die globale Methylierung

Wie in Kapitel 5.1.5 beschrieben, besteht die Möglichkeit, dass sich der Einfluss von Chromat auf die globale Methylierung erst nach einer längeren Zeit als der 24-stündigen Inkubationszeit detektieren lässt. Daher wurde die globale Methylierung mittels HPLC-UV Messung ebenfalls nach der 72-stündigen Nachinkubation analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit werden die Daten der Versuche ohne Nachinkubation aus Abbildung 14 erneut in Abbildung 24 gezeigt.



**Abbildung 24:** Anteil von methyliertem Cytosin am Gesamt-Cytosin der DNA nach 24-stündiger Behandlung mit Kaliumdichromat in A549-Zellen (A,C) und BEAS-2B-Zellen (B,D). Der Methylierungsgrad wurde durch HPLC-UV Detektion bestimmt. Dargestellt ist der absolute Anteil an 5-Methyl-Cytosin (A,B) und der Anteil bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (C,D). Die 24 h Ergebnisse wurden bereits in Abbildung 14 gezeigt und wurden zur besseren Vergleichbarkeit erneut dargestellt. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz der Unterschiede der behandelten Proben zur unbehandelten Kontrolle wurde mit ANOVA-Dunnett's bestimmt: \*/\*\* ( $p < 0,05/0,01$ ). Die Signifikanz zwischen Zellen mit und ohne Nachinkubation wurde mit dem Student's t-Test bestimmt: #/### ( $p < 0,05/0,001$ ).

Im Gegensatz zur Methylierung nach 24 h Inkubation mit Chromat, welche sich unverändert darstellte, wurde der globale Methylierungsgehalt nach weiteren 72 h Kultivierung beeinträchtigt. Eine Behandlung der Zellen mit 5  $\mu\text{M}$  Chromat führte durch die Nachinkubation zu einer Reduktion der Methylierung von 3,18 % auf 3,04 % in A549-Zellen, was einer Reduktion auf 95,5 % des ursprünglichen Gehalts entspricht. In BEAS-2B-Zellen ist eine Hypomethylierung bereits ab 1  $\mu\text{M}$  zu erkennen. Sie reduzierte sich bei der höchsten Inkubationskonzentration von 3,16 % auf 3,00 %. Die Methylierung wurde auf 95 % des Ursprungswertes gemindert. Damit unterscheidet sich der Methylierungsgrad von den Werten, die direkt nach der Chromatinkubation detektiert wurden. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass die Beeinflussung der Methylierung durch Chromat passiv geschieht und daher einige Zellteilungen benötigt, um sichtbar zu werden. Dies widerspricht der Arbeit von Lou und Mitarbeitenden, die eine Hypomethylierung in A549-Zellen bereits nach 2 h nachweisen konnten, welche nach 24 h noch bestand (Lou *et al.*, 2013). Zudem wird in dieser Studie mit einer Reduktion der Methylierung von über 50 % eine deutlich höhere Reaktion nachgewiesen, als es in der vorliegenden Arbeit der Fall ist. Lou und Mitarbeitende erhielten einen Methylierungsgrad zwischen 0,2 % und 0,3 % im gesamten Genom (Lou *et al.*, 2013). Dies widerspricht Sequenzierungsanalysen, welche einen Methylierungsgrad von ca. 1 % im Gesamtgenom in Säugerzellen postulieren (Dahl *et al.*, 2011). Daher sind die Ergebnisse dieser Studie kritisch zu betrachten. Analog zu den Ergebnissen in dieser Arbeit zeigte die Analyse von Xiong und Mitarbeitenden keine Veränderung der Methylierung durch Chromat nach 24 h in embryonalen Stammzellen (Xiong *et al.*, 2017). Beide Studien verwendeten Konzentrationen im selben Bereich wie in der vorliegenden Arbeit. Dass eine Demethylierung durch Chromat auftritt, bestätigen die Ergebnisse der Analyse von Chromat-assoziierten Lungentumoren, die ebenfalls eine globale Hypomethylierung aufwiesen (Ali *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2018). Es konnte gezeigt werden, dass Chromat die Methylierung beeinflusst, jedoch ist zur Manifestation dieser mehrere Zellteilungen von Nöten, sowie Konzentrationen in einem hohen, zytotoxischen Bereich. Ob Chromat die Methylierung auch bei niedrigeren Expositionen und längeren Inkubationsdauern beeinflusst, wurde im Rahmen dieser Arbeit in der Langzeitstudie (siehe Kapitel 5.3.4) ebenfalls untersucht.

#### **5.2.4 Einfluss einer Nachinkubation auf die Genexpressionsprofile nach Exposition gegenüber Chromat**

Zusätzlich zur Analyse der globalen Methylierung und Zellzyklusverteilung wurde ebenfalls der Einfluss einer Nachinkubationszeit auf die Genexpression untersucht. Hierfür wurden die Zellen nach der 24-stündigen Inkubation mit Chromat für 72 h weiter kultiviert und anschließend ein Genexpressionsprofil mit denselben Genen wie in Kapitel 5.1.6 erstellt. Eine Auswahl an Genen wurde zur Übersicht als Heatmap in Abbildung 25 für die A549-Zellen und in Abbildung 26 für BEAS-2B-Zellen dargestellt. Alle in dieser Arbeit untersuchten Gene sind in

Form von Heatmaps in Abbildung 42 und Abbildung 43 im Anhang unter 8.2.6 angefügt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden in den Abbildungen die Ergebnisse der Versuche ohne Nachinkubation aus Abbildung 15 bzw. Abbildung 16 erneut dargestellt.

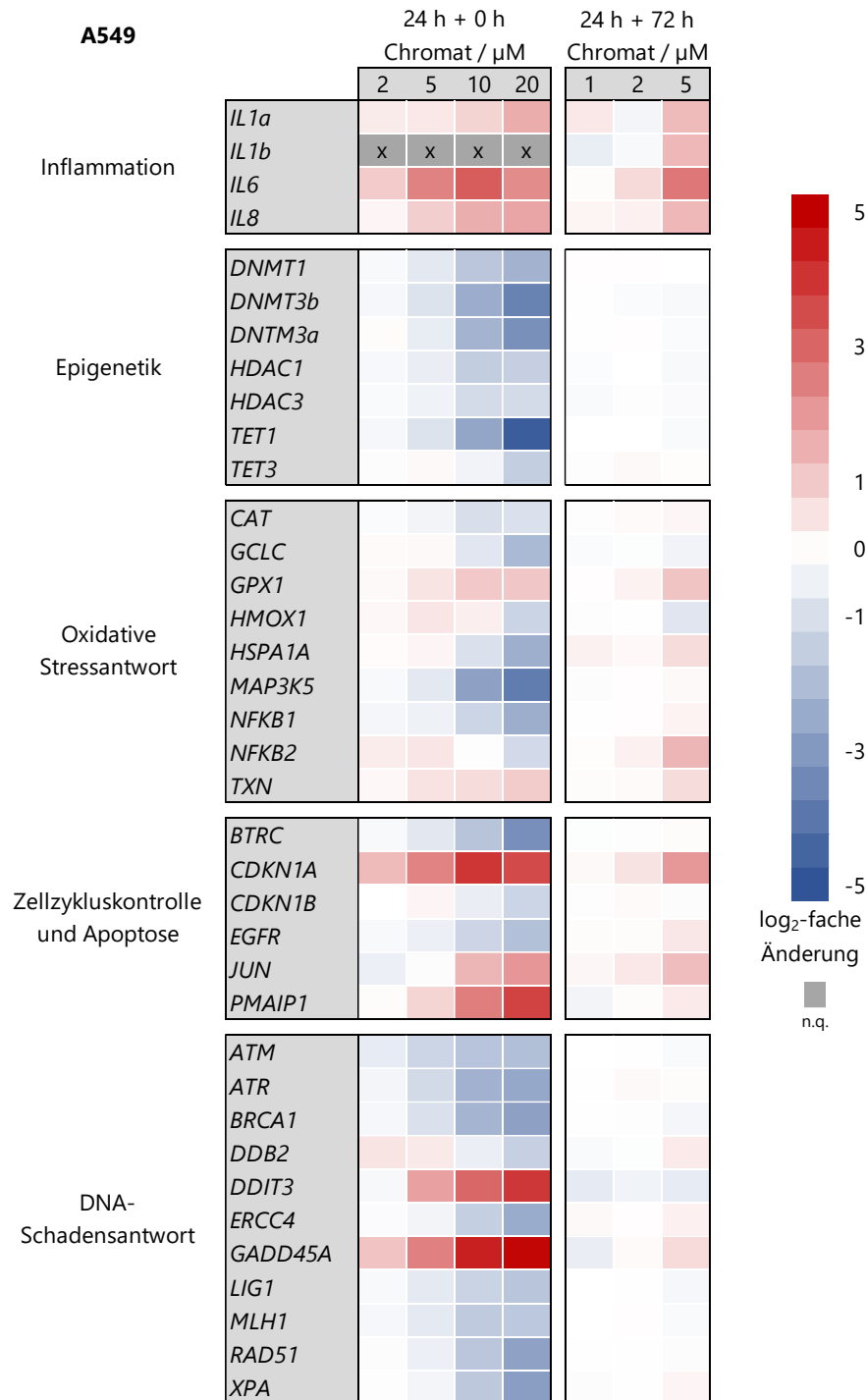


Abbildung 25: Auswahl an Genen des Genexpressionsprofils in A549-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Kaliumdichromat und 72-stündiger Nachinkubation. Eine rote Färbung steht für eine Induktion, eine blaue Färbung markiert eine Repression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

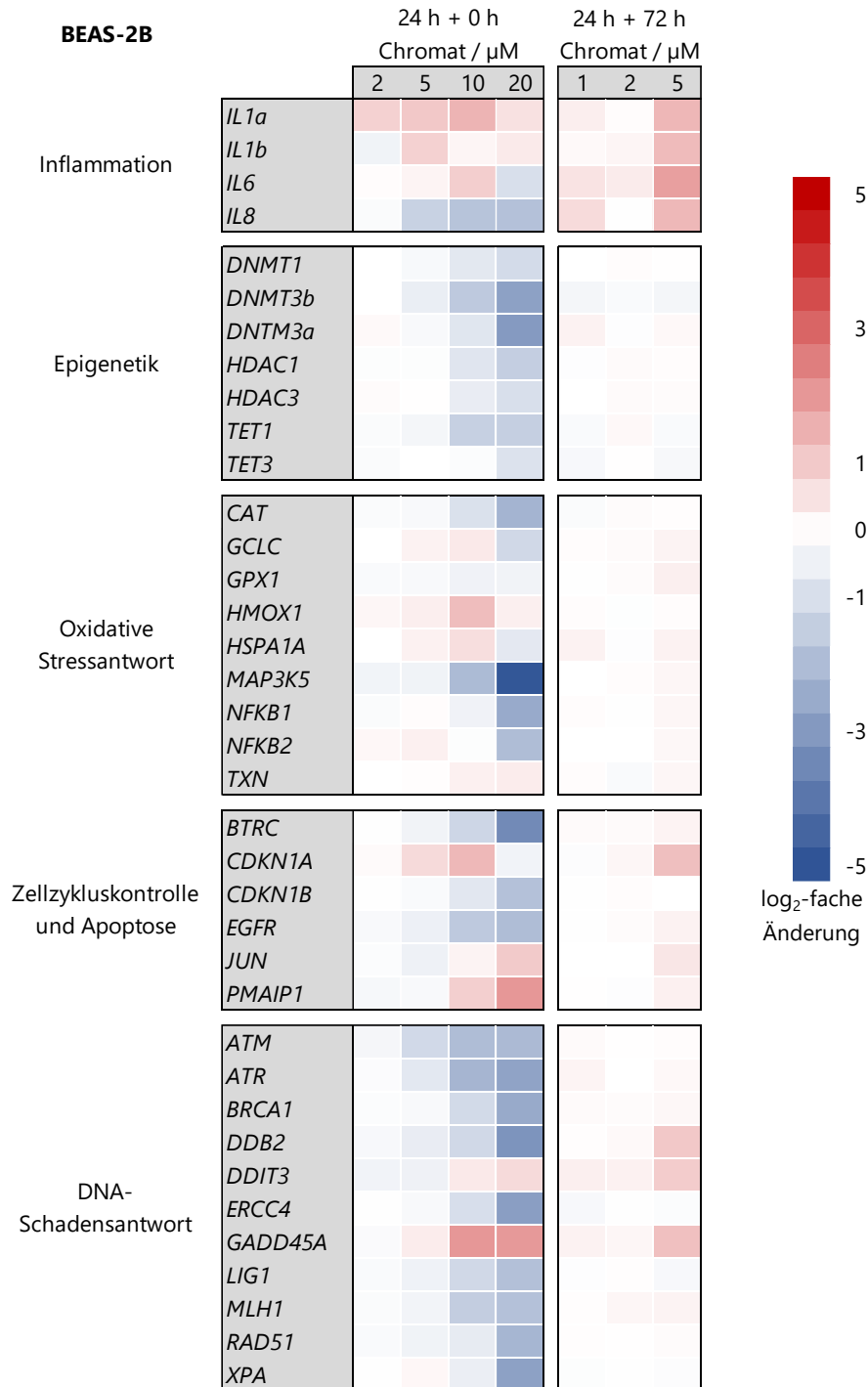


Abbildung 26: Auswahl an Genen des Genexpressionsprofils in BEAS-2B-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Kaliumdichromat und 72-stündiger Nachinkubation. Eine rote Färbung steht für eine Induktion, eine blaue Färbung markiert eine Repression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Viele der beobachteten Genexpressionsänderungen nach der 24-stündigen Inkubation erreichten innerhalb der Nachinkubationszeit wieder ihren Kontrollwert. Dies betrifft insbesondere zuvor reprimierte Gene. Eine Minderung der Transkriptmenge konnte nach der weiteren Kultivierung für keines der untersuchten Gene erhalten werden. Einige Gene waren jedoch durch die 72-stündige Nachinkubation vermehrt exprimiert, obwohl diese direkt nach der Inkubation nicht, oder nicht bei derselben Inkubationskonzentration induziert wurden.

Aus dem Bereich der inflammatorischen Antwort wurden in A549-Zellen direkt nach der Inkubation mit Chromat die Interleukine *IL1a*, *IL6* und *IL8* induziert. Nach der folgenden 72-stündigen Kultivierung zeigten diese Gene weiterhin eine erhöhte Transkriptmenge, ebenso wie *IL1b*, welches direkt nach der Inkubation nicht quantifiziert werden konnte. Während *IL1a* und *IL8* direkt nach der Inkubation erst bei höheren Konzentrationen von 20  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$  Chromat induziert wurden, zeigten sich infolge der Nachinkubation bereits bei 5  $\mu\text{M}$  deutliche Auswirkungen. Die Transkriptmenge von *IL6* wurde durch die Nachkultivierung vom 5,5-fachen auf das 6-fache erhöht. In BEAS-2B-Zellen wurden die untersuchten Gene der Interleukine ebenfalls alle durch eine Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  Chromat induziert, obwohl dies direkt nach der Inkubation nur für *IL1a* der Fall war. Die Transkriptmenge erhöhte sich durch die Nachinkubation vom 2,1-fachen auf das 2,7-fache des Kontrollwertes. Der repressive Effekt von 5  $\mu\text{M}$  Chromat auf *IL8* wurde durch die Nachinkubation umgekehrt.

Die repressiven Auswirkungen der Chromatinkubation auf die Gene der epigenetischen Regulation klangen in beiden Zelllinien durch die weitere Kultivierung wieder ab. Die Transkriptmenge erreichte wieder die Werte der unbehandelten Kontrolle. Auch ein Trend ist nicht mehr erkennbar.

Die Gene der oxidativen Stressantwort zeigten in BEAS-2B-Zellen nach der weiteren 72-stündigen Kultivierung keine Beeinflussung mehr. In A549-Zellen wurden *GPX1* und *NFKB2* nach der Nachinkubation durch 5  $\mu\text{M}$  Chromat induziert. *GPX1*, welches für die Glutathion Peroxidase 1 kodiert, wurde ebenfalls direkt nach der Inkubation vermehrt exprimiert, erreichte jedoch erst bei höheren Konzentrationen mehr als eine Verdopplung der mRNA-Gehalte. Bei einer 5  $\mu\text{M}$  Inkubation erhöhte sich die Induktion vom 1,4-fachen auf das 2,2-fache. Das für eine Vorstufe des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B kodierende *NFKB2* wurde durch die 5  $\mu\text{M}$  Chromatinkubation um das 1,4-fache vermehrt transkribiert, was sich durch die Nachinkubation auf das 2,7-fache erhöhte. Bei höheren Inkubationen wurde das Gen nach der 24-stündigen Inkubation reprimiert.

Im Bereich der apoptotischen und Zellzykluskontrolle glichen sich ebenfalls die meisten Effekte auf die Genexpression durch die Nachinkubation wieder den Kontrollwerten an. In beiden Zelllinien zeigte sich *CDKN1A* nach der weiteren Kultivierung induziert. In A549-Zellen reduzierte sich der Effekt von Chromat auf *CDKN1A* durch die Nachinkubation. Bei einer 2  $\mu\text{M}$  Inkubation war keine Wirkung mehr zu detektieren, bei 5  $\mu\text{M}$  reduzierte sie sich vom 5,4-fachen auf das 4-fache des Kontrollwertes. In den BEAS-2B-Zellen erhöhte sich die Induktion des Gens bei 5  $\mu\text{M}$  auf das 2,4-fache. Zudem wurde in A549-Zellen, jedoch nicht in BEAS-2B-Zellen, das



Gen *JUN* induziert. Während sich direkt nach der Inkubation induktive Effekte erst ab 10  $\mu\text{M}$  Chromat zeigten, wurde das Gen nach der weiteren Kultivierung bereits bei 5  $\mu\text{M}$  vermehrt transkribiert.

Die Effekte auf die Gene aus dem Cluster der DNA-Schadensantwort verringerten sich in A549-Zellen alle auf weniger als eine Verdopplung oder Halbierung der Transkriptmenge. In BEAS-2B-Zellen waren die Gene *DDB2*, *DDIT3* und *GADD45A* nach der Nachinkubation vermehrt transkribiert. *DDB2*, dessen zugehöriges Protein das *damage specific DNA binding* Protein 2 (DDB2) ist, auch unter dem Namen XPE bekannt, wurde direkt nach der Inkubation durch Chromat reprimiert. Nach der weiteren 72-stündigen Kultivierung erhöhte sich die Transkriptmenge bei der höchsten Konzentration auf das Doppelte des Kontrollwertes. Auch *DDIT3* wurde nach der Nachinkubation um das 2-fache erhöht transkribiert, obwohl das Gen direkt nach der Inkubation nicht induziert wurde. *GADD45A* wurde durch die Chromatinkubation bei höheren Inkubationskonzentrationen induziert, bei 5  $\mu\text{M}$  erreichte die Transkriptmenge erst nach der Nachinkubation erhöhte Werte.

Durch die Untersuchung der Genexpression nach einer 72-stündigen Nachinkubation können Aussagen zur Beständigkeit der durch Chromat-induzierten Effekte auf ebendiese getroffen werden. Obwohl viele Gene direkt nach der 24-stündigen Inkubation erst ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Chromat eine Verdopplung oder Halbierung der Transkriptmenge erreichten, zeigten sich Trends bereits bei niedrigeren Konzentrationen. Diese Trends waren jedoch nach der weiteren Kultivierung nicht mehr erkennbar. Daraus lässt sich schließen, dass die direkt nach der Inkubation detektierbaren Effekte reversibel sind. Dies trifft besonders auf Gene zu, die durch Chromat reprimiert wurden. In Kapitel 5.1.6 wurde die Theorie einer Repression bestimmter Gene durch die Hypermethylierung der jeweiligen Promotorbereiche durch Chromat aufgestellt. Sollte die Repression darauf zurückzuführen sein, müsste die Hypermethylierung ebenfalls reversibel sein. Ob dies der Fall ist, wurde bisher nicht untersucht und müsste Gegenstand zukünftiger Forschung sein. Zudem könnte eine Repression der Gene durch DNA-Schäden, welche durch Chromat auftreten, verursacht werden. Da bereits gezeigt werden konnte, dass durch Chromat-induzierte DSB 24 h nach dem Kontakt mit dem Metall wieder repariert wurden (Xie *et al.*, 2008), ist ein Rückgang der repressiven Effekte mit dieser Theorie vereinbar.

In den BEAS-2B-Zellen deutet sich zusätzlich durch die Induktion von *GADD45A*, *DDIT3* und *DDB2* an, dass die durch Chromat verursachten DNA-Schäden nach 72 h noch nicht vollständig repariert wurden. Die Gene *GADD45A* und *DDIT3* kodieren für Enzyme der GADD-Familie, welche sensitive Marker für DNA-schädigende Substanzen und zellulären Stress sind. Sie haben Einfluss auf die Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur und Apoptose (Jauhainen *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2010). DDB2 agiert zusätzlich zu seiner Funktion in der NER als Modulator von Histonmodifikationen und steuert darüber die Transkription. Zudem beeinflusst DDB2 den Zellzyklus, indem es den Übergang von der G1- in die S-Phase fördert (Gilson *et al.*, 2019). Die Induktion eines an der NER beteiligten Genes könnte auf die Aktivierung dieses Reparaturweges

hindeuten. Eine Beteiligung der NER an der Reparatur durch Chromat verursachter DNA-Schäden ist bereits bekannt (Wise *et al.*, 2008). Weitere Gene, welche für an der NER beteiligte Enzyme kodieren, zeigten jedoch keine Induktion, wodurch eine Aktivierung der NER zu diesem Zeitpunkt fraglich ist. Die Induktion von *DDB2* wird unter anderem durch p53 gesteuert (Gilson *et al.*, 2019). Die mögliche Involvierung von p53 in die durch Chromat verursachte Schadensantwort zeigte sich bereits direkt nach der Inkubation. Einen weiteren Hinweis darauf, dass p53 auch nach der weiteren Kultivierung aktiv ist, liefert die Induktion von *CDKN1A*, welches ebenfalls p53-abhängig transkribiert werden kann.

In A549-Zellen sind nach der Nachinkubationszeit andere Gene induziert worden als in den BEAS-2B-Zellen. Dies zeigt, dass die Reaktion auf Chromat abhängig von der verwendeten Zelllinie ist. Während eine Induktion von *CDKN1A* in A549-Zellen nach der Nachinkubation deutlich zu erkennen ist, hat die relative Intensität jedoch bereits abgenommen. Gene der DNA-Schadensantwort sind im Gegensatz zu den BEAS-2B-Zellen nicht mehr erhöht transkribiert worden, wie es in HLF-Lungenfibroblasten nach einer 24-stündigen Nachinkubation für *GADD45A* gezeigt werden konnte (Ceryak *et al.*, 2004). Eine Induktion war für *GPX1*, *NFKB2* und *JUN* detektiert worden. Eine Induktion von *GPX1* und *JUN* auch nach der Nachinkubation deutet auf einen anhaltenden oxidativen Stress hin. Eine vermehrte Transkription von *NFKB2* liefert einen Hinweis auf die Beteiligung des NFκB-Signalweges. Während dieser direkt nach der Inkubation durch die Repression von *NFKB1* und *BTRC* unwahrscheinlich schien, ist eine spätere Aktivierung dieses Signalwegs in A549-Zellen denkbar.

Durch eine Aktivierung von NFκB können auch die Interleukine vermehrt transkribiert werden. Diese zeigten in beiden Zelllinien eine stärkere Induktion als es direkt nach der Chromatinkubation der Fall war. Eine anhaltende entzündliche Reaktion nach einem Kontakt mit Chromat kann die kanzerogene Wirkung des Metalls verstärken. Über welchen Signalweg diese inflammatorische Antwort aktiviert wird, ist nicht abschließend geklärt und Gegenstand derzeitiger Forschungen (Kouokam *et al.*, 2022).

## 5.3 Analyse der Toxizität von Chromat in einer Langzeitstudie

In diesem Kapitel werden die Effekte einer längeren Inkubation mit niedrigeren Dosen Chromat betrachtet. Häufig werden in Zellkulturstudien kurze Inkubationszeiträume verwendet, obwohl die Exposition der Menschen über einen längeren Zeitraum besteht. Daher sind Studien mit einer längeren Inkubationsdauer notwendig (Barguilla *et al.*, 2023).

Aus diesem Grund wurden A549-Zellen für einen Zeitraum von fünf Wochen mit geringeren Chromat-Konzentrationen als in den 24 h Versuchen inkubiert. Oftmals übersteigen die *in vitro* verwendeten Konzentrationen die realistischen Expositionsbedingungen (Barguilla *et al.*, 2023; Hodges *et al.*, 2001). Die Allgemeinbevölkerung weist geringe Chromkonzentrationen im Blut auf, während beruflich exponierte Menschen höher belastet sind (IARC, 1990). Kumar und Mitarbeitende detektierten Blutkonzentrationen von  $1,2 \pm 1,0 \mu\text{M}$  Chrom in Proben von Arbeitern in einer Chrom verarbeitenden Fabrik in Indien (Kumar *et al.*, 2005). Bei der Analyse wurde nicht zwischen den Oxidationsstufen unterschieden, wodurch es sich bei einem Teil der Gehalte im Blut um das ungiftige Cr(III) handeln könnte. Zusätzlich zu einer Exposition über das Blut sind Lungenzellen auch direkt über die Atemluft Chromat ausgesetzt, wodurch die tatsächliche Chromatexposition schwer abzuschätzen ist. In den folgenden Versuchen wurden die Zellen für realistischere Inkubationsszenarien mit  $0,2 \mu\text{M}$ ,  $0,5 \mu\text{M}$  und  $1 \mu\text{M}$  behandelt und wöchentlich auf verschiedene toxikologische Endpunkte untersucht. Zusätzlich wurden die Effekte der höchsten Konzentration nach 24 h analysiert. Dadurch soll ein differenziertes Bild zeitabhängiger Auswirkungen von Chromat erhalten werden.

### 5.3.1 Analyse der Zytotoxizität nach Langzeit-Exposition gegenüber Chromat

Zunächst wurde die Zellzahl der A549-Zellen bestimmt, um einen Überblick über die zytotoxischen Wirkungen zu erhalten. Der RCC nach ein bis fünf Wochen wurde in Abbildung 27 dargestellt und mit dem RCC nach einer 24-stündigen Inkubation verglichen.

Bereits nach 24 h war bei der höchsten Inkubationskonzentration von  $1 \mu\text{M}$  Chromat eine leichte Verringerung der Zellzahl auf 89 % zu erkennen. Nach einer Woche Inkubation sank die Zellzahl auf 78 % ab, nach zwei Wochen erreichte sie einen Wert um etwa 50 %, welche bis Woche 5 bestehen blieb. Somit zeigte sich ein zeitabhängiger Effekt auf die Zellzahl. Eine längere Inkubation führte zu einer höheren Zytotoxizität.

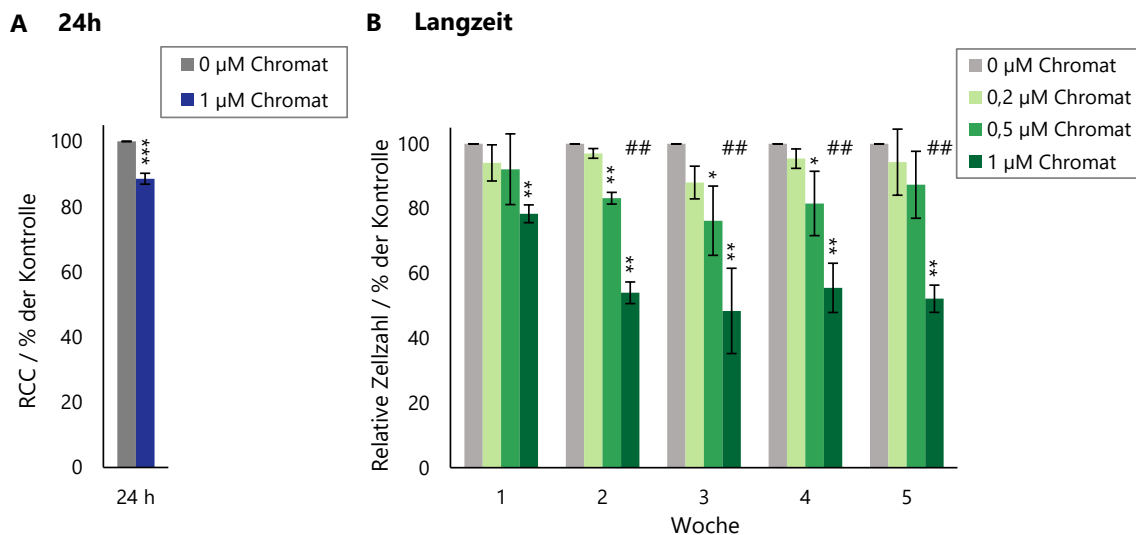
Die niedrigste verwendete Konzentration von  $0,2 \mu\text{M}$  Chromat zeigte keine veränderte Zellzahl und somit keine Zytotoxizität über den untersuchten Zeitraum. Bei  $0,5 \mu\text{M}$  konnte ab Woche 2 eine leichte Verringerung des RCC auf 83 % beobachtet werden, welcher bei den

folgenden Zeitpunkten jeweils etwa 80 % betrug. Somit zeigte sich auch bei dieser Konzentration eine Zeitabhängigkeit zwischen der ersten Woche und den weiteren Zeitpunkten.

Die Zellzahl nahm zu allen Zeitpunkten konzentrationsabhängig ab. Die Zytotoxizitäten lagen in einem nicht, leicht und moderat zytotoxischen Bereich.

Somit konnte gezeigt werden, dass eine längere Inkubation zu einer höheren Zytotoxizität führt und dies bereits bei geringen Konzentrationen von 0,5  $\mu\text{M}$  beobachtet werden kann.

Einen zeitabhängigen Effekt der Zytotoxizität konnten auch Speer und Mitarbeitende in ihrer Studie an primären Fibroblasten mit Zinkchromat-Partikeln nachweisen. Sie untersuchten die Zytotoxizität nach 24 h und 120 h und konnten leicht stärkere Effekte zum späteren Zeitpunkt nachweisen (Speer *et al.*, 2019). Der in dieser Studie gewählte Zeitpunkt liegt in der Nähe von dem in der vorliegenden Arbeit gewählten Zeitpunkt von einer Woche, was 168 h entspricht. In der genannten Studie konnte nach fünf Tagen eine leicht höhere, jedoch statistisch nicht signifikante Zytotoxizität detektiert werden. Ob sich diese nach einer noch längeren Inkubationsdauer weiter verringert, untersuchten Speer und Mitarbeitende nicht. Dasselbe Ergebnis konnte in Lungenfibroblasten des Wals unter denselben Inkubationsbedingungen erhalten werden (Browning *et al.*, 2017b). Einen deutlich stärkeren zeitabhängigen Effekt konnten Holmes und Mitarbeitende in humanen bronchialen Fibroblasten (WTHBF-6) nach einer Inkubation mit Zinkchromat-Partikeln feststellen. Jedoch untersuchten auch sie lediglich Zeitpunkte bis 120 h (Holmes *et al.*, 2010).



**Abbildung 27: Relative Zellzahl (RCC) der A549-Zellen nach 24-stündiger Inkubation (A) und Inkubationen für ein bis fünf Wochen (B) mit Kaliumdichromat.** Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz der Unterschiede der behandelten Proben zur unbehandelten Kontrolle wurde in der Langzeitstudie mit ANOVA-Dunnett's bestimmt: \*/\*\* ( $p < 0,05/0,01$ ) und im 24 h Versuch durch den Student's t-Test: \*/\*\*/\*\*\*\* ( $p < 0,05/0,01/0,001$ ). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen dem 24 h Versuch und dem Langzeit Versuch wurde mit dem ANOVA-Dunnett's bestimmt: ##  $p < 0,01$ .

### 5.3.2 Untersuchung des intrazellulären Chromat-Gehalts nach Langzeit-Exposition

Der intrazelluläre Chromgehalt wurde mittels Graphitrohr-AAS gemessen, um die Chromataufnahme nach ein bis fünf Wochen Inkubation zu analysieren. Die Ergebnisse werden in Abbildung 28 gezeigt und mit den Chromgehalten nach einer 24-stündigen Inkubation verglichen.

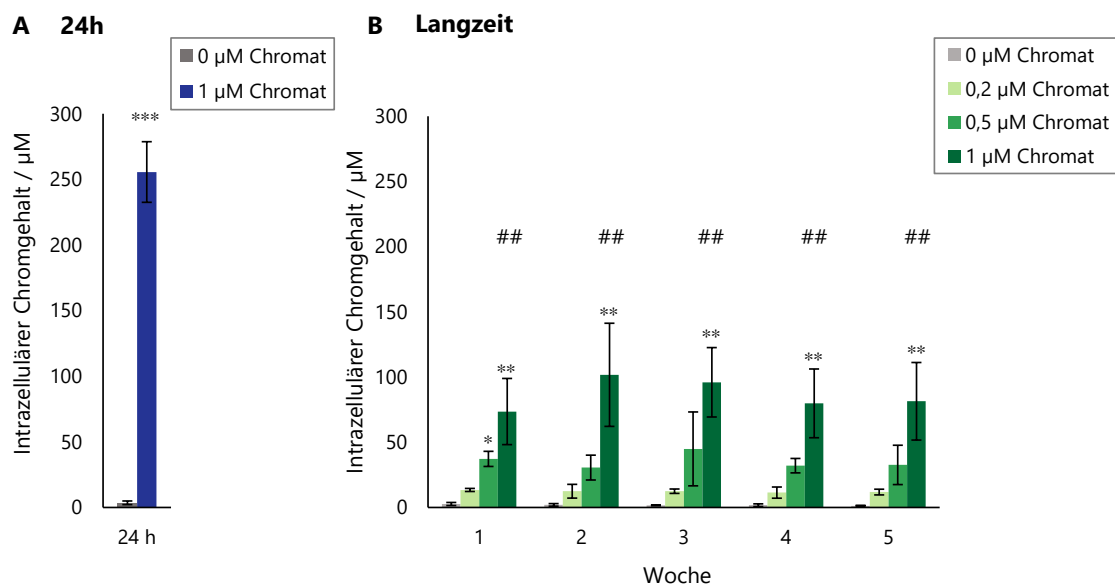
Die Chromataufnahme war über alle fünf Wochen hinweg konzentrationsabhängig. Der intrazelluläre Chromgehalt erhöhte sich mit steigender Inkubationskonzentration. Im Verlauf der 5-wöchigen Inkubation änderte sich der Chromgehalt innerhalb der Inkubationskonzentrationen nicht. Eine Behandlung der Zellen mit 0,2  $\mu\text{M}$  führte zu einem Gehalt zwischen 11  $\mu\text{M}$  und 13  $\mu\text{M}$  Chrom, während eine Behandlung mit 0,5  $\mu\text{M}$  Gehalte zwischen 31  $\mu\text{M}$  und 45  $\mu\text{M}$  Chrom ergab. Nach einer Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Chromat konnten Chromgehalte zwischen 74  $\mu\text{M}$  und 102  $\mu\text{M}$  detektiert werden. Im Vergleich zum Chromgehalt von 256  $\mu\text{M}$  nach einer 24-stündigen Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Chromat sind nach einer Langzeitinkubation deutlich geringere Werte erhalten worden. Daher ist anzunehmen, dass die Zellen Chromat in höheren Dosen aufnehmen, welche sich im Laufe der Versuchsdauer wieder reduzieren.

Vorherige Studien, welche den intrazellulären Chromgehalt nach 24 h und 72 h bzw. 120 h analysierten, zeigten, dass die Chromataufnahme zeitabhängig abläuft. In beiden Studien wurde zum späteren Zeitpunkt ein signifikant höherer Chromgehalt gemessen (Holmes *et al.*, 2006; Speer *et al.*, 2019). Jedoch ist in den Studien nicht ersichtlich, ob die Zellen einmalig mit Chromat behandelt wurden oder täglich neu inkubiert wurden. Eine tägliche Zugabe von Chromat könnte die höheren intrazellulären Gehalte zu späteren Zeitpunkten erklären. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen zweimal pro Woche mit neuen Inkubationslösungen versorgt. Die Messung erfolgte kurz vor einer erneuten Inkubation, also 4 Tage nach der letzten Zugabe. Es ist daher möglich, dass Chromat zunächst zeitabhängig aufgenommen wird, sich der intrazelluläre Gehalt jedoch nach einer längeren Zeit wieder reduziert.

Damit sich der Gehalt reduziert, muss die Zelle mehr Chrom verlieren als neu aufnehmen. Chromat wird durch unspezifische Anionentransporter aufgenommen und innerhalb der Zelle zu Chrom(III) reduziert. Dadurch kann es die Zelle nicht mehr verlassen (Zhitkovich, 2011). Eine Abgabe von Chrom in den extrazellulären Raum ist daher unwahrscheinlich. Vielmehr reduziert sich der intrazelluläre Chromgehalt durch die Proliferation der Zellen, indem das intrazelluläre Chrom bei der Zellteilung auf beide Zellen aufgeteilt wird. Das Zellvolumen nimmt zu, ohne dass neues Chromat aufgenommen wird. Die geringere oder ausbleibende Aufnahme von Chromat nach einiger Zeit könnte darin begründet sein, dass extrazelluläres Chromat im Laufe der Inkubationszeit zu Cr(III) reduziert wird. Das verwendete Medium (RPMI-1640) enthält Bestandteile wie Aminosäuren und Glutathion (Moore *et al.*, 1967), welche das zugegebene Cr(VI) reduzieren können (Zhitkovich, 2005). Dadurch könnte die extrazelluläre Chromatkonzentration

sinken, wodurch sich die Aufnahme reduziert. Diese These müsste jedoch durch weitere Experimente bestätigt werden.

Die Messungen der Langzeitstudie wurden regelmäßig und in gleichmäßigen Abstand, jeweils vier Tage nach der letzten Zugabe von Chromat zum Medium, gemessen. Aufgrund der höheren Werte nach der 24-stündigen Inkubation ist anzunehmen, dass der Chromgehalt zwischen den Messungen, insbesondere direkt nach der Zugabe des Chromats ins Medium, zeitweise höher war als zum Zeitpunkt der Messungen. Jedoch konnten die wöchentlichen Messungen zeigen, dass sich der Chromgehalt durch die längere Inkubation nicht dauerhaft erhöht. Etwaige zeitabhängige Effekte sind daher auf die Länge des Kontaktes mit dem Metall und nicht auf steigende Chromgehalte zurückzuführen.



**Abbildung 28: Intrazellulärer Chromgehalt in A549-Zellen nach 24-stündiger Inkubation (A) und Inkubationen für ein bis fünf Wochen (B) mit Kaliumdichromat.** Der Chromgehalt wurde mittels Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt und auf das Zellvolumen bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz der Unterschiede der behandelten Proben zur unbehandelten Kontrolle wurde in der Langzeitstudie mit ANOVA-Dunnnett's bestimmt: \*/\*\* ( $p < 0,05/0,01$ ) und im 24 h Versuch durch den Student's t-Test: \*/\*\*/\*\* ( $p < 0,05/0,01/0,001$ ). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen dem 24 h Versuch und dem Langzeit Versuch wurde mit dem ANOVA-Dunnnett's bestimmt: ##  $p < 0,01$ .

### 5.3.3 Analyse der Zellzyklusverteilung nach Langzeit-Exposition gegenüber Chromat

Die Messungen des Zellzyklus sollten Aufschluss darüber geben, ob auch bei niedrigen Inkubationskonzentrationen ein Zellzyklusarrest nach einem längeren Zeitraum induziert wird. Hierfür wurde die Phasenverteilung am Durchflusszytometer nach 24 h sowie nach ein bis fünf

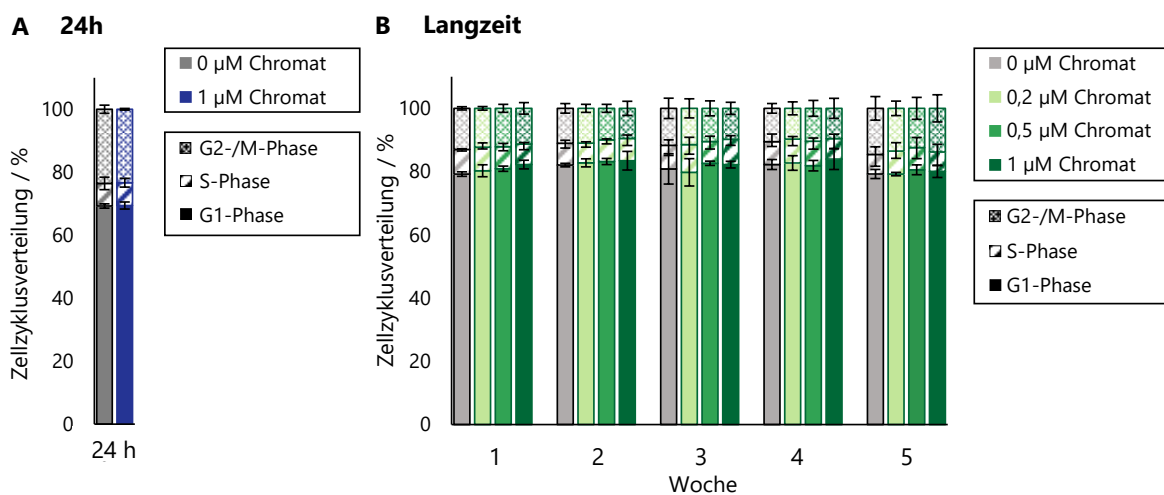
Wochen gemessen (Abbildung 29). Nach 24 h waren die Zellzyklusphasen in der unbehandelten Kontrolle und der behandelten Probe gleich verteilt. Es befanden sich 66 % bzw. 67 % der Zellen in der G1-Phase, 8 % in der S-Phase und 25 % bzw. 26 % in der G2-/M-Phase. Es wurde kein Zellzyklusarrest nach 24 h beobachtet.

Bei den Langzeitversuchen fallen 79 % bis 84 % auf die G1-Phase, 6 % bis 9 % auf die S-Phase und 10 % bis 15 % auf die G2-/M-Phase. Der Unterschied in der Zellzyklusphasenverteilung zwischen den Zeitpunkten ist auf Geräteschwankungen zurückzuführen und keine Folge der längeren Kultivierung der Zellen. Trotz dieser Unterschiede können Effekte, welche auf Unterschieden zur unbehandelten Kontrolle beruhen, bewertet werden.

In den Langzeit-Versuchen wurde keine signifikante Veränderung des Zellzyklus beobachtet. Es wurde in diesem Konzentrationsbereich kein Zellzyklusarrest nach einer 24-stündigen oder mehrwöchigen Chromatinkubation beobachtet.

Im Gegensatz zu den vorliegenden Daten, konnten Zhang und Mitarbeitende bei derselben Konzentration in A549-Zellen bereits einen leichten G2-Arrest detektieren (Zhang *et al.*, 2001). Studien an anderen Lungenzelllinien zeigten einen Zellzyklusarrest analog zu den vorliegenden Daten erst bei höheren Konzentrationen (Lou *et al.*, 2013; Wise *et al.*, 2006).

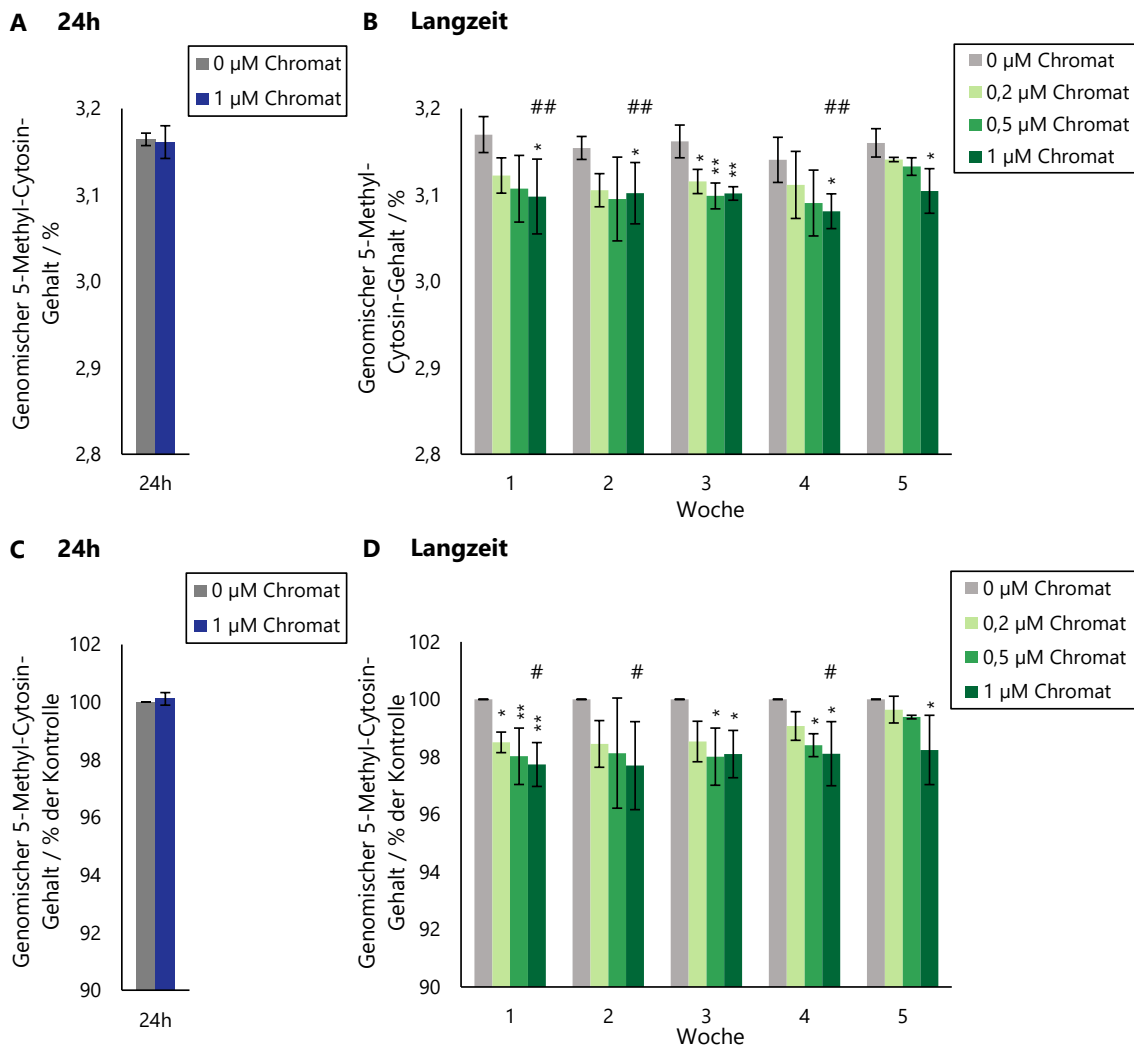
Insgesamt zeigen die Daten, dass auch eine längere Inkubation mit Chromat keinen Zellzyklusarrest im gewählten Konzentrationsbereich verursacht, obwohl sich die Zellzahl zeitabhängig reduzierte.



**Abbildung 29:** Zellzyklusverteilung in A549-Zellen nach 24-stündiger Inkubation (A) und Inkubationen für ein bis fünf Wochen (B) mit Kaliumdichromat. Die Zellzyklusverteilung wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz der Unterschiede der behandelten Proben zur unbehandelten Kontrolle wurde in der Langzeitstudie mit ANOVA-Dunnett's bestimmt und im 24 h Versuch durch den Student's t-Test. Es konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

### 5.3.4 Einfluss einer Langzeit-Behandlung mit Chromat auf die globale Methylierung

Die globale Methylierung wurde ebenfalls nach der Inkubation mit Chromat für mehrere Wochen analysiert. Hierfür wurde die DNA degradiert, die Nucleoside an der HPLC aufgetrennt und mittels UV-Detektion gemessen. Der Gehalt an 5mC wurde auf den Gesamtcytosinegehalt bezogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt.



**Abbildung 30:** Anteil an methyliertem Cytosin am Gesamt-Cytosin der DNA nach 24-stündiger Behandlung (A,C) und nach einer Inkubation für ein bis fünf Wochen (B,D) mit Kaliumdichromat in A549-Zellen. Der Methylierungsgrad wurde durch HPLC-UV Detektion bestimmt. Dargestellt ist der absolute Anteil an 5-Methyl-Cytosin (A,B) und der Anteil bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (C,D). Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz der Unterschiede der behandelten Proben zur unbehandelten Kontrolle wurde in den 24 h Versuchen mit dem Student's t-Test bestimmt: \*/\*\* ( $p < 0,05/0,01$ ) und in den Langzeit-Versuchen mit ANOVA-Dunnett's bestimmt: \*/\*\* ( $p < 0,05/0,01$ ). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen dem 24 h Versuch und dem Langzeit Versuch wurde mit dem ANOVA-Dunnett's bestimmt: #/### ( $p < 0,05/0,01$ ).



Der gemessene Methylierungsgrad der A549-Zellen beträgt in der unbehandelten Kontrolle 3,14 % - 3,17 %. Dieser Wert verändert sich nicht über den Zeitraum der untersuchten fünf Wochen. Daraus lässt sich schließen, dass die Kultivierungsdauer der A549-Zellen keinen Einfluss auf die Methylierung hat. Nach 24 h ist keine Änderung des Methylierungsgrades durch eine 1  $\mu$ M Inkubation mit Chromat erkennbar. Dies ändert sich nach der Inkubationsdauer für eine Woche. Im Langzeitversuch ist eine konzentrationsabhängige Hypomethylierung erkennbar. Besonders nach einer Inkubation mit 1  $\mu$ M ist eine verringerte Methylierung zu allen Messzeitpunkten detektiert worden. In Woche 3 konnte eine signifikante Hypomethylierung bereits durch 0,2  $\mu$ M Chromat beobachtet werden. Der Methylierungsgrad der höchsten Konzentration verringerte sich auf 3,08 % - 3,10 % bzw. auf 98 %.

Wie bereits in 5.2.3 beschrieben, zeigte sich auch hier der Einfluss auf die Methylierung erst nach einer längeren Beobachtungsdauer als 24 h. Dies deutet auf eine Beeinflussung der DNMTs durch Chromat hin, wodurch es zu einer passiven Demethylierung kommt. Jedoch zeigte sich nach einer 24-stündigen Inkubation mit 1  $\mu$ M Chromat auch nach dem Nachinkubationszeitraum keine Änderung der Methylierung. Nach einer Woche Inkubation ist jedoch ein Effekt erkennbar. Das heißt, die Länge des Kontaktes mit Chromat hat ebenso wie die Konzentration einen Einfluss auf die Methylierung. Eine Zeitabhängigkeit der Methylierungsänderung konnten auch Kondo und Mitarbeitende in Chromat assoziierten Tumoren detektieren. Sie untersuchten jedoch nicht die globale Methylierung, sondern die Methylierung im Promotor von *p16*. Es zeigte sich eine Veränderung im Gewebe von Arbeitern, die mehr als 15 Jahre gegenüber Chromat exponiert waren. Bei kürzerer Kontaktdauer war dies nicht der Fall (Kondo *et al.*, 2006). *In vitro* Studien zur Untersuchung der Methylierung beschränken sich auf kurze Inkubationsdauern von maximal 24 h (Hu *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2018; Lou *et al.*, 2015; Xiong *et al.*, 2017).

Die Ausprägung der Verringerung des Methylierungsgrades ist mit 98 % eher gering. Es ist jedoch möglich, dass sich die Effekte bei einer deutlich längeren Inkubation weiter verstärken. Zudem handelt es sich bei A549-Zellen um eine Krebszelllinie, welche sich durch eine bereits veränderte Methylierung auszeichnet (Paz *et al.*, 2003). Krebszellen sind in ihrer Methylierung meist statischer als nicht-kanzerogene Zellen. Eine Wiederholung des Versuchs mit einer anderen Zelllinie, wie beispielsweise den BEAS-2B-Zellen ist für weiterführende Aussagen notwendig.

### 5.3.5 Einfluss einer Langzeit-Exposition mit Chromat auf die Methylierung von *MLH1* und *MSH2*

Die Analyse der genspezifischen Methylierung wurde in den Promotorbereichen der *Mismatch*-Reparaturgene *MLH1* und *MSH2* mittels COBRA durchgeführt. Diese Gene kodieren für die Enzyme MLH1 und MSH2, welche Bestandteile der MMR sind (Iyer *et al.*, 2006). In der Antwort auf durch Chromat-induzierte Schäden wirkt die MMR toxisch auf die Zelle.

Chrom-DNA-Addukte führen bei der Replikation zu Fehlpaarungen, welche von der MMR erkannt werden. Die Enzyme des MMR-Komplexes veranlassen nach der Bindung an die Schadensstelle einen Replikationsstopp. Beim Übergang der Zelle in die G2-Phase kollabiert die Replikationsgabel und es entstehen DSBs. Durch die Akkumulation von DSBs wird der Zelltod initiiert. Bei einer ausbleibenden MMR kommt es zu einer geringeren apoptotischen Antwort und damit einhergehend zu einem höheren klonogenen Überleben und einer erhöhten Mutationsrate. Dadurch wird die kanzerogene Wirkung von Cr(VI) gefördert (Peterson-Roth *et al.*, 2005; Zhitkovich *et al.*, 2005). Zudem führt eine verminderte MMR zu Mikrosatelliteninstabilität (Takahashi *et al.*, 2005). Eine Defizienz der MMR wird durch Mutationen oder Deletionen von *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS2* oder einer Hypermethylierung des *MLH1*-Promotors verursacht (Olave & Graham, 2022).

Für die Analyse mittels COBRA wurde die DNA der Zellproben isoliert und anschließend Bisulfit-konvertiert. Bei diesem Schritt reagiert die Base Cytosin zu Uracil, während 5mC nicht angegriffen wird. Bei der nachfolgenden PCR wird Uracil mit Adenin und 5mC mit Guanin gepaart. Aufgrund der Unterschiede in der Basenabfolge können daher Rückschlüsse darüber getroffen werden, ob ein Cytosin methyliert vorlag oder nicht. Bei der COBRA geschieht dies über einen Restriktionsverdau, bei welchem das PCR Produkt nur geschnitten wird, wenn eine bestimmte Basenabfolge vorhanden ist. Anhand der Größe der PCR Produkte wird somit der Methylierungsgrad bestimmt. Die Auftrennung der PCR Produkte erfolgte durch Gelelektrophorese. Ein Agarosegel ist beispielhaft als Abbildung 39 im Anhang unter 8.2.5 dargestellt.

Sowohl bei *MLH1* als auch bei *MLH2* zeigte sich kein Einfluss von Chromat auf die Methylierung. Die untersuchten Bereiche der Promotorregion lagen beide unmethyliert vor.

In früheren Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass Chromat einen Einfluss auf die Methylierung der Promotorregionen von Reparaturgenen wie *MLH1* hat (Ali *et al.*, 2011; Tsuboi *et al.*, 2020). Ali und Mitarbeitende untersuchten Tumoren von Arbeitern in der Chromindustrie, die dort mindestens 12 Jahre lang gearbeitet hatten. Tsuboi und Mitarbeitende sequenzierten ebenfalls Chromat assoziierte Tumoren von Arbeitern, die durchschnittlich 23 Jahre lang exponiert waren und konnten eine Hypermethylierung dieses Gens nachweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden die A549-Zellen fünf Wochen lang mit Chromat behandelt. Diese Zeit könnte nicht ausgereicht haben, um eine Methylierung des Promotors zu bewirken, ebenso könnte das A549-Zellmodell für die Untersuchung der genspezifischen Methylierung dieser Gene ungeeignet sein. Außerdem ist zu beachten, dass bei der Analyse mittels COBRA nur ein Abschnitt von etwa 300 bp um die Transkriptionsstartstelle und nicht die gesamte Promotorregion untersucht wird. Es könnte daher möglich sein, dass eine Methylierungsänderung in einem anderen Bereich stattgefunden hat und daher in dieser Analyse nicht erfasst wurde. So zeigte sich in Studien, welche verschiedene CpGs anderer Gene untersuchten, dass nur spezifische CpGs durch Chromat und nicht alle beeinflusst werden (Hu *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2018).

### 5.3.6 Genexpressionsprofile nach Langzeit-Behandlung mit Chromat

Zum besseren Verständnis des durch einen längeren Kontakt mit Chromat verursachten Schadensprofils wurde die Genexpression nach den Inkubationszeiträumen von einer, zwei, drei, vier und fünf Wochen analysiert und mit den Ergebnissen nach einer 24-stündigen Inkubation verglichen. Die Langzeitinkubation wurde mit den Konzentrationen 0,2  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  durchgeführt, während für die Kurzzeitinkubation die Ergebnisse mit 1  $\mu\text{M}$  Chromat dargestellt wurden. Eine Heatmap in Abbildung 31 gibt einen Überblick über die Gene mit den stärksten Expressionsänderungen. Die gesamten Ergebnisse sind im Anhang als Abbildung 44 unter 8.2.6 dargestellt.

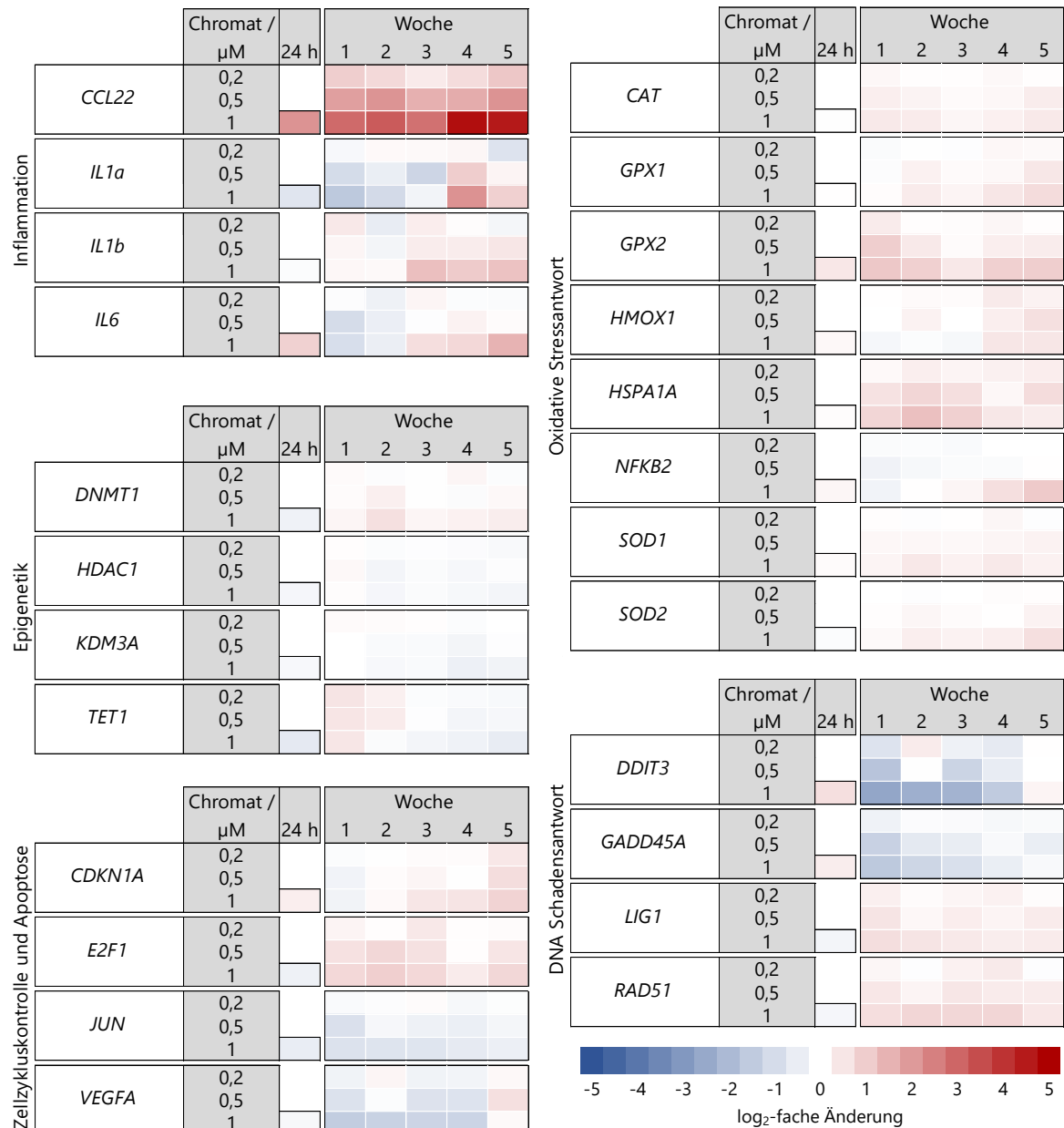
Eine detaillierte Darstellung zweier Gene aus dem Bereich der inflammatorischen Antwort ist in Abbildung 32 gezeigt. Die stärkste Chromat-induzierte Veränderung aller untersuchten Gene ist *CCL22*, welches für ein Zytokin aus der Familie der CC-Chemokine kodiert und an Entzündungsprozessen beteiligt ist. Bereits nach einer 24-stündigen Inkubation mit Chromat wurde *CCL22* um das 4,4-fache vermehrt exprimiert. Im Langzeitversuch wird das Gen konzentrationsabhängig induziert und erreichte durch eine Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Chromat für fünf Wochen eine 26-mal höhere Transkriptmenge als die Kontrolle. Auch andere inflammatorische Gene erfuhren eine Induktion. Während *IL6* bereits nach 24 h leicht induziert wurde, zeigte sich in *IL1a* und *IL1b* kein Effekt. Alle 3 Interleukingene wurden im Langzeitversuch vermehrt transkribiert, jedoch erst nach drei bzw. vier Wochen.

Gene aus dem Cluster der epigenetischen Regulation wurden durch die längere Behandlung mit Chromat nicht beeinflusst. Es konnte kein Trend in einem der Modulatoren identifiziert werden. Stellvertretend wurden die Gene *DNMT1*, *HDAC1*, *KDM3A* und *TET1* in der Heatmap dargestellt. Auch die 24 h Exposition mit Chromat führte zu keinen Veränderungen in den entsprechenden Expressionsprofilen.

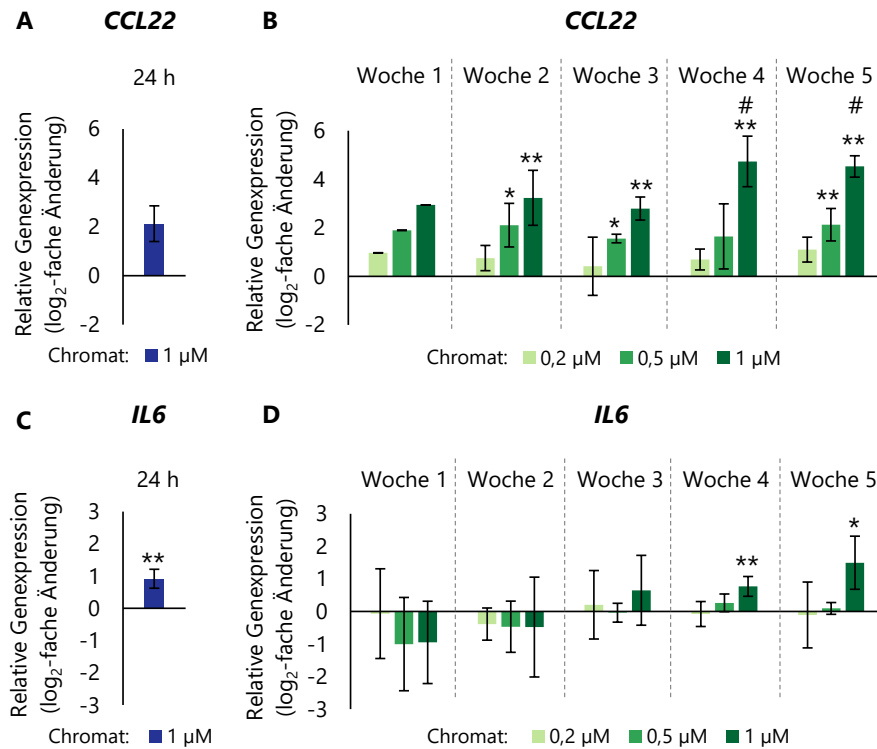
Aus dem Bereich der Apoptose und Zellzykluskontrolle sind die Gene *CDKN1A* und *JUN* detaillierter in Abbildung 33 dargestellt. Bereits nach 24 h Inkubation zeigte sich in *CDKN1A* der Trend zur Induktion. Während sich in den ersten Wochen des Langzeitversuchs keine vermehrte Transkriptmenge zeigte, wurde das Gen nach einer 5-wöchigen Inkubation signifikant induziert. Für das Gen *JUN* wurden gegenteilige Effekte beobachtet. Nach der 24-stündigen Inkubation deutete der Trend eine Repression an, welche im Langzeitversuch ebenfalls zu erkennen war. Der Effekt war in Woche 2, 3 und 4 signifikant, die Effektstärke nahm jedoch mit der Zeit ab. Weitere Gene, welche durch Chromat beeinflusst wurden, sind *E2F1* und *VEGFA*. Das Genprodukt von *VEGFA* ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A. Dieses Protein fördert die Durchgängigkeit und die Neubildung von Gefäßen und erleichtert somit die Zellmigration von Immunzellen in entzündetes Gewebe (Claesson-Welsh & Welsh, 2013). Bei dem zugehörigen Enzym von *E2F1* handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, welcher einen Einfluss auf die Zellzykluskontrolle und Apoptose hat (Biswas & Johnson, 2012). Beide Gene wurden durch die 24-stündige Inkubation mit Chromat nicht beeinflusst. Im Langzeitversuch

zeigte sich in *E2F1* durchgängig der Trend zur Induktion, während *VEGFA* in den Wochen 1-4 reprimiert wurde. Dieser repressive Effekt ging in Woche 5 der Inkubation wieder zurück.

Aus dem Bereich der oxidativen Stressantwort sind die Gene *GPX1*, *HMOX1* und *NFKB2* detaillierter in Abbildung 34 dargestellt. Alle drei Gene wurden durch die 24-stündige Inkubation mit Chromat nicht beeinflusst. Auch nach der einwöchigen Behandlung zeigte sich in keinem Gen eine Veränderung. Erst im Laufe der weiteren Inkubationszeit kam es bei der höchsten Inkubationskonzentration zu einer erhöhten Transkriptmenge. Die stärkste Induktion wurde für alle drei Gene in Woche 5 erhalten.



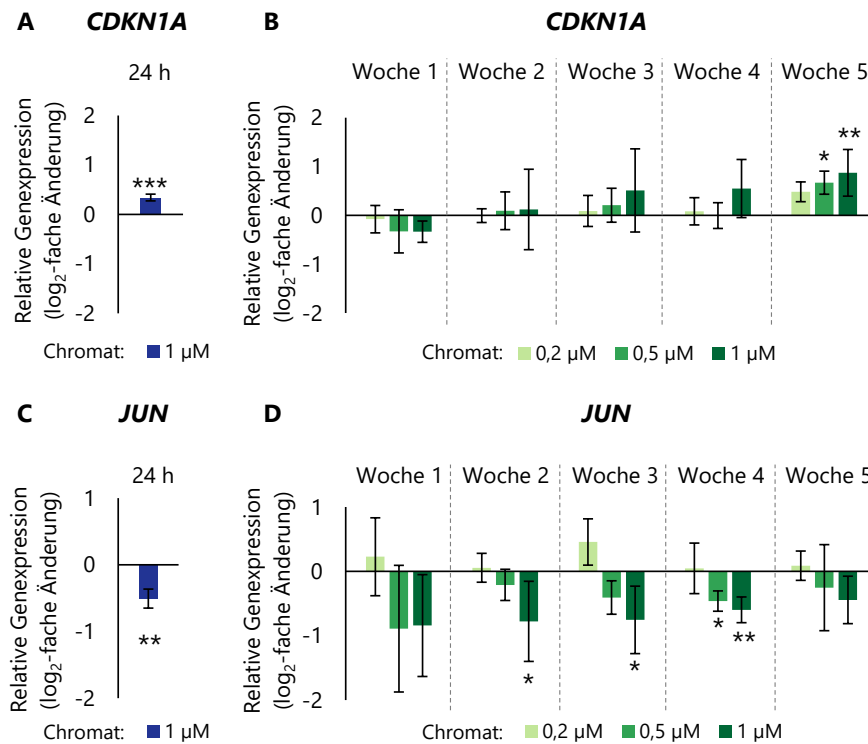
**Abbildung 31:** Auswahl an Genen des Genexpressionsprofils in A549-Zellen nach 24-stündiger und ein- bis fünfwöchiger Inkubation mit Kaliumdichromat. Eine rote Färbung steht für eine Induktion, eine blaue Färbung markiert eine Repression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.



**Abbildung 32: Detaillierte Darstellung der Genexpression einer Auswahl an Genen aus dem Cluster der inflammatorischen Antwort, *CCL22* (A,B) und *IL6* (C,D) in A549-Zellen nach einer 24-stündigen (A,C) und ein- bis fünfwöchigen (B,D) Behandlung mit Kaliumdichromat.** Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz der Unterschiede der behandelten Proben zur unbehandelten Kontrolle wurde in den 24 h Versuchen mit dem Student's t-Test bestimmt: \*\*  $p < 0,01$  und in den Langzeitversuchen mit ANOVA-Dunnett's bestimmt: \*/\*\* ( $p < 0,05/0,01$ ). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen dem 24 h Versuch und dem Langzeit Versuch wurde mit dem ANOVA-Dunnett's bestimmt: #  $p < 0,05$ .

Die weiteren dargestellten Gene aus der oxidativen Stressantwort zeigten ähnliche Effekte. *CAT*, *GPX2*, *HSPA1A*, *SOD1* und *SOD2* wurden durch eine Kurzzeitinkubation mit Chromat nicht beeinflusst. Durch die längere Inkubationsdauer zeigte sich in den Genen ein Trend zur Induktion. *HSPA1A* erreichte die stärkste Induktion nach einer 2-wöchigen Inkubationsdauer mit einer 2,4-fachen Transkriptmenge. *GPX2* erreichte die stärkste Induktion nach einer Woche und wurde dort 2,1-mal stärker transkribiert als die Kontrolle.

Gene aus dem Cluster der DNA-Schadensantwort wurden durch die längere Inkubation mit Chromat ebenfalls beeinflusst. Am stärksten waren die Gene *DDIT3* und *GADD45* verändert worden, welche detailliert in Abbildung 35 dargestellt sind. Nach der 24-stündigen Inkubation wurde keines der Gene signifikant verändert. In den Genen *DDIT3* und *GADD45A* zeigte sich jedoch ein Trend zur Induktion. In den Langzeitversuchen kehrte sich dieser Effekt um. *DDIT3* wurde nach einer Woche Kontakt mit Chromat konzentrationsabhängig reprimiert, wobei sich die Effektstärke mit steigender Inkubationsdauer zurückbildete. In Woche 4 waren 35 % der

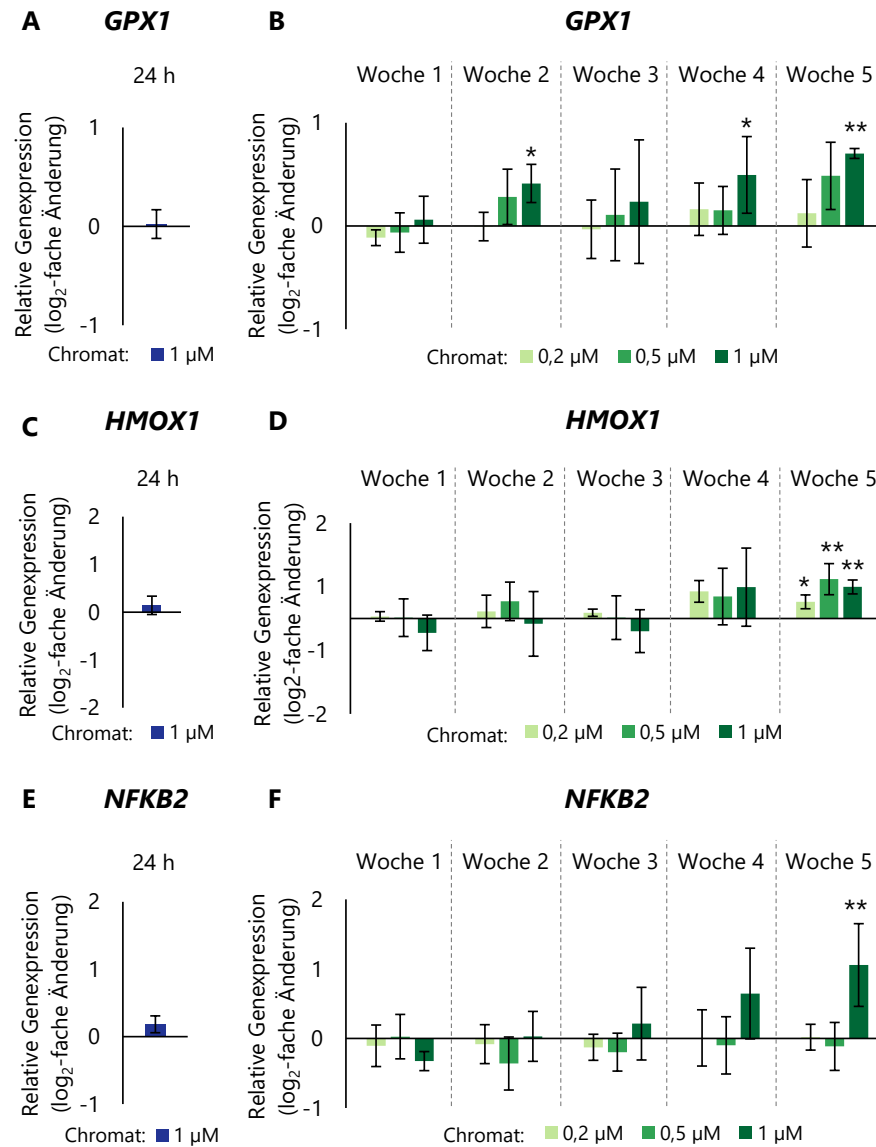


**Abbildung 33:** Detaillierte Darstellung der Genexpression einer Auswahl an Genen aus dem Cluster der Zellzyklus und apoptotischen Kontrolle, *CDKN1A* (A,B) und *JUN* (C,D) in A549-Zellen nach einer 24-stündigen (A,C) und ein- bis fünfwöchigen (B,D) Behandlung mit Kaliumdichromat. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz der Unterschiede der behandelten Proben zur unbehandelten Kontrolle wurde in den 24 h Versuchen mit dem Student's t-Test bestimmt: \*\*/\*\*\* p (<0,01/0,001) und in den Langzeit-Versuchen mit ANOVA-Dunnett's bestimmt: \*/\*\* (p<0,05/0,01). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen dem 24 h Versuch und dem Langzeit Versuch wurde mit dem ANOVA-Dunnett's bestimmt.

Transkriptmenge im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle vorhanden. Nach fünf Wochen Inkubation zeigte sich für *DDIT3* keine Änderung in der Transkription mehr. *GADD45A* zeigte nach der einwöchigen Inkubation ebenfalls eine konzentrationsabhängige Repression. Die Transkriptmenge wurde durch 1 µM Chromat auf 34 % reduziert. Die Wirkung von Chromat schwächte sich im Laufe der Inkubationsdauer ab, wodurch nach Woche 5 kein Effekt mehr ersichtlich war.

Die Auswirkungen von niedrigen Chromatkonzentrationen über einen längeren Zeitraum auf die Genexpression unterscheiden sich deutlich von den Effekten einer kurzzeitigen Inkubation. Zusätzlich veränderten sich die Expressionsmuster innerhalb des Langzeitversuchs. Während die Interleukine erst im späteren Verlauf induziert wurden, schwächen sich viele andere Effekte nach der 5-wöchigen Inkubation ab.

Die Gene der epigenetischen Modulatoren wurden durch die Chromatbehandlung nicht beeinflusst. Die Veränderung epigenetischer Mechanismen ist daher nicht auf eine Änderung der regulierenden Enzyme auf transkriptioneller Ebene zurückzuführen.

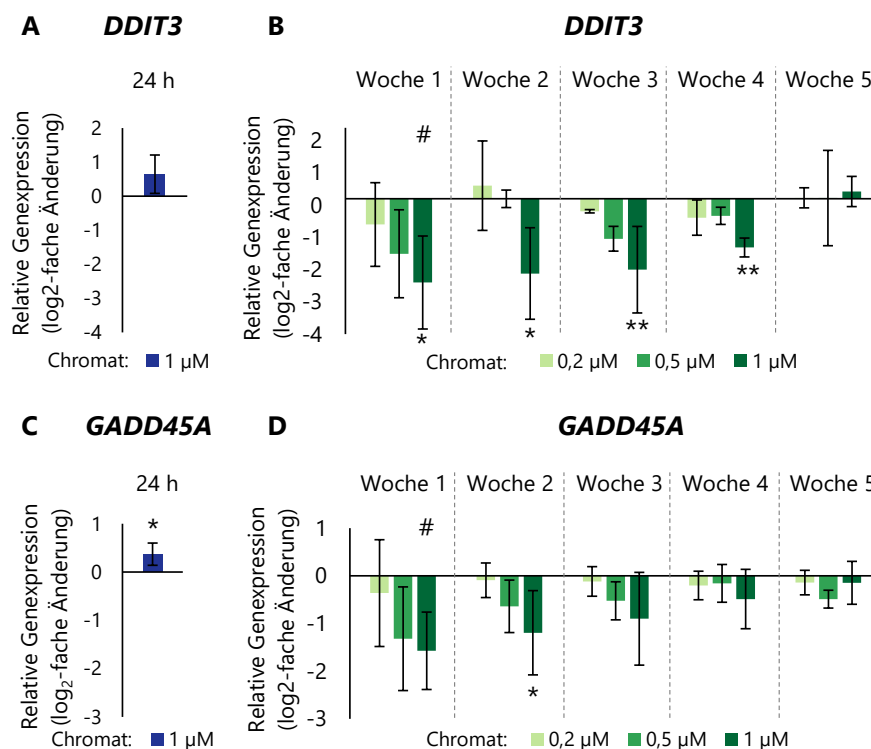


**Abbildung 34:** Detaillierte Darstellung der Genexpression einer Auswahl an Genen aus dem Cluster der oxidativen Stressantwort, *GPX1* (A,B), *HMOX1* (C,D), *NFKB2* (E,F) und *SOD1* (G,H) in A549-Zellen nach einer 24-stündigen (A,C,E,G) und ein- bis fünfwöchigen (B,D,F,H) Behandlung mit Kaliumdichromat. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz der Unterschiede der behandelten Proben zur unbehandelten Kontrolle wurde in den 24 h Versuchen mit dem Student's t-Test bestimmt: \*\*  $p < 0,01$  und in den Langzeit-Versuchen mit ANOVA-Dunnett's bestimmt: \*/\*\* ( $p < 0,05/0,01$ ). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen dem 24 h Versuch und dem Langzeit Versuch wurde mit dem ANOVA-Dunnett's bestimmt: #  $p < 0,05$ .

Aus dem Bereich der Zellzykluskontrolle und Apoptose wurde *CDKN1A* im Langzeitversuch vermehrt transkribiert. Dieses Gen wurde durch den kurzen Inkubationszeitraum bei höheren Konzentrationen ebenfalls induziert. Obwohl p21 den Zellzyklus hemmt (Dutto *et al.*, 2015), ist ein Zellzyklusarrest in den Messungen am Durchflusszytometer nicht beobachtet worden. Einer Zellzyklus hemmenden Wirkung entgegen steht die Induktion von *E2F1*, dessen Genprodukt

die Zellproliferation fördert (Biswas & Johnson, 2012). Beide Gene können sowohl p53-abhängig, als auch unabhängig aktiviert werden und somit Einfluss auf die Apoptose nehmen (Biswas & Johnson, 2012; Dutto *et al.*, 2015).

Gene der oxidativen Stressantwort zeigten durchweg einen Trend zur Induktion. Diese werden durch die Chromat-induzierte Bildung von ROS aktiviert und zeigen damit die dauerhafte Präsenz von oxidativem Stress durch den Kontakt mit Chromat an. Die vermehrte Transkription von *NFKB2* liefert einen Hinweis auf die Beteiligung des NFκB-Signalweges. Eine Beteiligung von NFκB in der Chromat-induzierten zellulären Antwort konnte in BEAS-2B-Zellen in einem Langzeitversuch mit einer Inkubationsdauer von 6 Monaten bereits gezeigt werden (Pratheeshkumar *et al.*, 2014). Für eine Involvierung von NFκB spricht ebenfalls der Trend zur Induktion von *SOD2*, dessen Transkription über NFκB gesteuert wird (Darville *et al.*, 2000).



**Abbildung 35:** Detaillierte Darstellung der Genexpression einer Auswahl an Genen aus dem Cluster der DNA Schadensantwort, *DDIT3* (A,B), *GADD45A* (C,D), *LIG1* (E,F) und *RAD51* (G,H) in A549-Zellen nach einer 24-stündigen (A,C,E,G) und ein- bis fünfwöchigen (B,D,F,H) Behandlung mit Kaliumdichromat. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz der Unterschiede der behandelten Proben zur unbehandelten Kontrolle wurde in den 24 h Versuchen mit dem Student's t-Test bestimmt: \*\*\*  $p < 0,001$  und in den Langzeit-Versuchen mit ANOVA-Dunnett's bestimmt: \*/\*\* ( $p < 0,05/0,01$ ). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen dem 24 h Versuch und dem Langzeit Versuch wurde mit dem ANOVA-Dunnett's bestimmt: #/###  $p < 0,05/0,01$ .



Durch NFκB werden zudem inflammatorische Marker gesteuert, welche mit *IL1a*, *IL1b*, *IL6* und *CCL22* ebenfalls induziert wurden. Pratheeshkumar und Mitarbeitende zeigten in ihrer Studie die Beteiligung von NFκB an der Chromat-induzierten Entzündung sowie die Ausschüttung von Zytokinen (Pratheeshkumar *et al.*, 2014). Die vermehrte Transkription dieser Gene zeigt eine entzündliche Reaktion durch Chromat in den Zellen an. Abgesehen von NFκB werden sie durch viele weitere Signalwege gesteuert. Eine Aktivierung durch AP-1, wie es in den Kurzzeitversuchen in 5.1.6 diskutiert wurde, ist durch die Repression von *JUN* jedoch unwahrscheinlich.

Im Bereich der DNA-Schadensantwort war ein Trend zur Induktion in den Genen *LIG1* und *RAD51* erkennbar, welcher jedoch keine Verdopplung der Transkriptmenge erreicht. Trotzdem könnte dies ein Hinweis auf eine Aktivierung der DNA-Reparatur aufgrund von DNA-Schäden, welche durch den Kontakt durch Chromat verursacht werden, sein. *RAD51* ist vor allem an der HR beteiligt, daher spricht die Erhöhung der Transkriptmenge für die Entstehung von DSBs durch Chromat (Bonilla *et al.*, 2020). In der Literatur ist jedoch eine Minderung der HR durch eine Chromatbehandlung beschrieben worden (Browning *et al.*, 2016; Haberland *et al.*, 2023). Die Bildung von RAD51-Foci blieb jedoch unbeeinflusst (Haberland *et al.*, 2023). Die leichte Erhöhung in der Transkriptmenge der *LIG1* deutet auf eine Aktivierung von DNA-Exzisionsreparaturen hin, in welchen die Ligase 1 eine entscheidende Rolle spielt (Tomkinson *et al.*, 2006). Sowohl die NER als auch die BER sind in der Reparatur von durch Chromat verursachten Schäden beteiligt (Wise *et al.*, 2008).

Ein zeitabhängiger Effekt ist insbesondere bei den Stressmarkern *GADD45A* und *DDIT3* zu erkennen. Während die Expression nach 24 h einen Trend zur Induktion zeigte, wobei die Transkriptmenge bei höheren Inkubationskonzentrationen mehr als verdoppelt wurde, wurden die Gene im Langzeitversuch nach einer Woche stark reprimiert. Zunächst scheint die Unterdrückung dieser Stresssensoren für die Zelle nicht nützlich zu sein. Es wurde jedoch bereits gezeigt, dass *DDIT3* (Nozaki *et al.*, 2001) und *GADD45A* (Zerbini & Libermann, 2005) in Krebszellen durch NFκB reprimiert werden, um das Überleben der Zellen zu sichern. Da es sich bei den A549-Zellen ebenfalls um eine Krebszelllinie handelt, könnte die Langzeitinkubation mit Chromat zu dieser NFκB-vermittelten Unterdrückung dieser Sensoren geführt haben. Ein Vergleich mit einer nicht krebsartigen Zelllinie sollte daher in zukünftigen Forschungen durchgeführt werden. Allerdings kehrt die Expression nach fünf Wochen wieder auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle zurück, was darauf hindeutet, dass sich diese Reaktion im Laufe der Zeit abschwächt.

## 6 ZUSAMMENFASSENDER DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung einer Präinkubation mit Ascorbinsäure auf die Chromat-induzierte Toxizität sowie der Einfluss der Inkubationsdauer von Chromat in Zellkulturstudien untersucht. Ein besonderer Schwerpunkt lag dabei auf der Analyse epigenetischer Modifikationen. Hierfür wurden die Lungenepithelzelllinien A549 und BEAS-2B zunächst mit einer DHA-Lösung behandelt, um eine Beladung der Zellen mit einem physiologischen Gehalt an Ascorbinsäure zu erreichen. Nachfolgend wurden präinkubierte und nicht vorbehandelte Zellen mit Chromatkonzentrationen von 0  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  inkubiert. Es folgte die Untersuchung der konzentrationsabhängigen Auswirkungen von Chromat auf die akute Zytotoxizität, die Chromataufnahme, die Zellzyklusverteilung und die globale Methylierung. Anschließend fand die Erstellung eines Genexpressionsprofils mit Hilfe einer Hochdurchsatz-RT-qPCR Methode statt. Das Genset beinhaltete Gene aus den Bereichen der Metallhomöostase, Inflammation, oxidativen Stressantwort, DNA-Schadensantwort, Zellzykluskontrolle und Apoptose und wurde um Modulatoren epigenetischer Mechanismen erweitert. Zusätzlich wurden Unterschiede zwischen den mit Ascorbinsäure beladenen und unbeladenen Zellen in den genannten toxikologischen Endpunkten analysiert. Ziel war es hierbei, festzustellen, ob die Präinkubation von Zellen mit DHA die Schadensantwort von Chromat in *in vitro* Untersuchungen verändert.

Des Weiteren wurden zeitabhängige Effekte von Chromat untersucht. Hierfür wurde zunächst an die 24-stündige Inkubation mit 0  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  Chromat eine 72-stündige Nachinkubationszeit angeschlossen. Nach dieser wurden die oben beschriebenen, toxikologischen Endpunkte in A549-Zellen und BEAS-2B-Zellen erneut untersucht. Durch den Anschluss einer 72-stündigen Kultivierung der Zellen nach Beendigung des Kontaktes mit Chromat konnte beurteilt werden, ob die entstandenen Schäden reversibel oder dauerhaft waren, oder neue Effekte auftraten.

Zudem wurden in A549-Zellen Langzeitstudien durchgeführt, um die Auswirkungen eines längeren Kontaktes mit niedrigeren Dosen Chromat abzubilden. Die Zellen wurden 0  $\mu\text{M}$ , 0,2  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  Chromat für fünf Wochen dauerhaft ausgesetzt, worauf wöchentliche Messungen der Zytotoxizität, Aufnahme, Zellzyklusverteilung, globalen Methylierung und des Genexpressionsprofils folgten. Zusätzlich fanden Messungen der Methylierungen im Promotorbereich der MMR-Gene *MLH1* und *MSH2* statt. Ziel dieser Langzeitstudien war es hierbei, einen Einblick in die längerfristigen Auswirkungen von Chromat zu erhalten und diese mit Effekten aus den Kurzzeitversuchen zu vergleichen.

Nach der Präinkubation der Zellen mit DHA wurden zunächst die intrazellulären Ascorbinsäuregehalte analysiert. In A549-Zellen wurde durch die Behandlung mit 0,1 mM bzw. 0,5 mM DHA eine Konzentration von 5,7 mM bzw. 10,6 mM Ascorbinsäure erhalten. In BEAS-2B-Zellen führt die Inkubation mit 0,2 mM bzw. 0,5 mM DHA zu Ascorbinsäuregehalten von 4,1 mM bzw. 8,3 mM. In den folgenden 3 h nach der Präinkubation sanken die Gehalte ab, in den BEAS-2B-Zellen stärker als in den A549-Zellen. Nach 24 h Kultivierung waren die Konzentrationen auf Werte unterhalb des physiologischen Levels abgesunken. Zellen ohne Vorbehandlung (DHA(-)), mit Präinkubation mit dem niedrigeren DHA-Gehalt (DHA(+)) und mit Präinkubation mit dem höheren DHA-Gehalt (DHA(++)) wurden anschließend für 24 h mit Chromat behandelt.

Als erster toxikologischer Endpunkt aller Versuche wurde die Zytotoxizität bestimmt. Für den Vergleich von DHA(-)-Zellen und DHA(+)- bzw. DHA(++)-Zellen kam der ATP-Assay zum Einsatz. Im Nachinkubations- und Langzeitversuch erfolgte die Bestimmung der zytotoxischen Wirkung mit Hilfe des RCC. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit Chromat wiesen beide Zelllinien ab einer Konzentration von 5 µM Chromat eine konzentrationsabhängige Reduktion der Viabilität auf. Die Vorbehandlung mit Ascorbinsäure hatte einen Einfluss auf diese. A549-DHA(++)-Zellen wiesen über weite Teile geringere Zytotoxizitäten auf. Für DHA(+)-Zellen konnte dies bei 10 µM Chromat beobachtet werden. In den BEAS-2B-Zellen wurde eine geringere Viabilität der DHA(+)- und DHA(++)-Zellen bei 1 µM und 20 µM Chromat detektiert, während sich die Zytotoxizität zu den DHA(-)-Zellen durch andere Chromatkonzentrationen nicht unterschied. Die Zytotoxizitätsunterschiede in A549-Zellen sind auf die abweichenden Aufnahmemengen an Chromat in präinkubierten Zellen zurückzuführen. Die Messungen des intrazellulären Chromgehaltes ergaben für DHA(+)- und DHA(++)-Zellen eine geringere Aufnahme des Metalls als in DHA(-)-Zellen. In BEAS-2B-Zellen konnte dies ebenfalls beobachtet werden. Die geringere Aufnahme lässt sich auf die Freisetzung von intrazellulärer Ascorbinsäure in das Inkubationsmedium zurückführen, welche extrazellulär Chromat zu Cr(III) reduziert. Dieses kann nicht mehr in die Zelle aufgenommen werden (Zhitkovich, 2021). Im Gegensatz zu den A549-Zellen war die Zytotoxizität in BEAS-2B-DHA(+)- und DHA(++)-Zellen ähnlich oder stärker ausgeprägt wie in den DHA(-)-Zellen. Bezogen auf die Aufnahmemenge führte eine Vorbehandlung mit DHA zu zytotoxischeren Effekten. Eine erhöhte Zytotoxizität durch die Anwesenheit von Ascorbinsäure in der Zelle wurde bereits von Reynolds und Mitarbeitenden beschrieben (Reynolds *et al.*, 2007). Eine Zugabe von Ascorbinsäure erhöht die Entstehung von ternären DNA-Addukten mit Ascorbat, welche ein höher mutagenes Potential als andere Chrom-DNA-Addukte aufweisen. Bei der DNA-Replikation kann es durch diese ternären Addukte zu Fehlpaarungen kommen, durch welche Enzyme der MMR rekrutiert werden. Diese blockieren die Replikation. Geht die Zelle in die G2-Phase über, kollabiert die Replikationsgabel und es entstehen DSBs. Eine Akkumulation von DSBs führt zu einer erhöhten apoptotischen Antwort und somit zu erhöhter Zytotoxizität (Reynolds *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2012; Zhitkovich *et al.*, 2012).

Eine Nachinkubationszeit von 72 h bewirkte eine Verstärkung der zytotoxischen Wirkung. Der RCC war in beiden Zelllinien signifikant reduziert. Das aufgenommene Chromat wirkt daher auch nach Entfernung der Inkubationslösung weiter toxisch auf die Zellen. Auch die verlängerte Inkubation mit niedrigen Konzentrationen Chromat veränderte die Zytotoxizität. Während der RCC nach einer 24-stündigen Inkubation nur leicht reduziert wurde, reduzierte er sich nach der einwöchigen Inkubation stärker. In Woche 2 reduzierte sich der RCC weiter und blieb danach bis Woche 5 konstant. Die höchste Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Chromat verringerte dabei die Zellzahl auf ca. 50 % der unbehandelten Kontrolle. Obwohl sich die Zytotoxizität im Laufe der Versuchsdauer verstärkte, verringerte sich der intrazelluläre Chromgehalt. Nach 24 h lag dieser höher als nach der mehrwöchigen Inkubationsdauer. Der Chromgehalt in Woche 1-5 blieb konstant und veränderte sich zu den Messzeitpunkten nicht. Eine längere Inkubation mit Chromat erhöht daher das intrazelluläre Chrom nicht dauerhaft. Zudem zeigt die gleichbleibende Chromkonzentration in der Zelle, dass zeitabhängige Effekte, wie die erhöhte Zytotoxizität, auf die Länge des Kontaktes mit Chromat und nicht auf steigende intrazelluläre Chromgehalte zurückzuführen sind.

Insgesamt zeigten alle untersuchten Faktoren einen Einfluss auf die Zytotoxizität. Die Vorbehandlung mit DHA in BEAS-2B-Zellen, die Nachinkubation in beiden Zelllinien und die längere Behandlung der A549 verstärkten die zytotoxischen Effekte von Chromat.

Als Nächstes wurde die Zellzyklusverteilung analysiert. Nach der 24-stündigen Inkubation zeigte sich ein G2-Arrest ab 5  $\mu\text{M}$  Chromat in beiden Zelllinien. Während dieser Arrest in A549-Zellen mit steigenden Inkubationskonzentrationen nicht mehr nachweisbar war, schwächte er sich in BEAS-2B-Zellen ab, blieb jedoch bestehen. Durch die Präinkubation mit DHA wurde der Arrest in A549-Zellen bereits ab 2  $\mu\text{M}$  Chromat ausgelöst, in BEAS-2B-Zellen hingegen erst ab 10  $\mu\text{M}$ . Besonders auffällig ist der stärkere G2-Arrest in DHA(+)-Zellen im Gegensatz zu DHA(-)- und DHA(++)-Zellen beider Zelllinien. Nach einer angeschlossenen 72-stündigen Nachinkubationszeit hatte sich die Zellzyklusverteilung wieder der unbehandelten Kontrolle angeglichen. Die Inkubation mit niedrigeren Konzentrationen an Chromat bewirkte keine Änderung in der Verteilung des Zellzyklus. Auch nach der mehrwöchigen Inkubationszeit konnte kein Zellzyklusarrest detektiert werden.

Ein G2-Arrest könnte durch die Induktion von ROS verursacht sein (Hayashi *et al.*, 2004) oder auf das vermehrte Auftreten von DSBs zurückzuführen sein, welche sich nach einem Kontakt mit Chromat in der S- und G2-Phase bilden können (Xie *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2015). Der verstärkte G2-Arrest in DHA(+)-Zellen beider Zelllinien steht in Zusammenhang mit der Induktion von DSBs. Diese werden durch die Bildung mutagener ternärer Chrom-DNA-Addukte mit Ascorbat verstärkt gebildet (Reynolds *et al.*, 2007). In DHA(++)-Zellen könnte durch die erhöhte Anzahl an DNA-Schäden eine verstärkte apoptotische Antwort anstelle eines Zellzyklusarrests eingeleitet worden sein. Zur Erklärung der unterschiedlichen Zellzyklusverteilung in Abhängigkeit der DHA-Konzentration bedarf es weiterer Experimente. Der Zellzyklusarrest bildete sich innerhalb der 72-stündigen Nachinkubationszeit wieder zurück,

was darauf schließen lässt, dass entstandene DNA-Schäden repariert wurden. Die Reparatur von DNA-Strangbrüchen innerhalb von 24 h nach Beendigung der Inkubation wurde in früheren Studien gezeigt (Wakeman *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2008).

Zusammengenommen hatte eine niedrige Präinkubation mit DHA einen verstärkenden Einfluss auf den durch Chromat-induzierten G2-Arrest, während höhere DHA-Konzentrationen diesen Effekt nicht aufwiesen. Die Nachinkubationszeit wirkte ebenfalls auf die Zellzyklusverteilung, wohingegen eine verlängerte Inkubation mit Chromat keine Auswirkungen auf diese hatte.

Die Messung der globalen Methylierung der unbehandelten Kontrollen ergab einen Methylierungsgrad zwischen 3,1 % und 3,2 %. Dies steht im Einklang mit dem in der Literatur beschriebenen durchschnittlichen Methylierungsgrad von etwa 3 % in Säugerzellen (Gibney & Nolan, 2010). Weder durch die 24-stündige Inkubation mit Chromat noch durch Präinkubationen mit DHA konnte ein Einfluss auf die globale Methylierung detektiert werden. Nach der 72-stündigen weiteren Kultivierung ergab sich eine konzentrationsabhängige Reduzierung des Methylierungsgrades in beiden Zelllinien, welcher sich in Beas-2B ab 2  $\mu\text{M}$  Chromat und in A549 ab 5  $\mu\text{M}$  Chromat signifikant von der Kontrolle unterschied. Durch die mehrwöchige Behandlung reduzierte sich der Methylierungsgrad signifikant und konzentrationsabhängig auf 98 % zu allen Messzeitpunkten.

Da Ascorbinsäure als Kofaktor der TETs fungiert, wäre eine Erhöhung der Aktivität dieser Demethylasen und somit eine Hypomethylierung zu erwarten gewesen, wie es in der Literatur mehrfach beschrieben wurde (Blaschke *et al.*, 2013; Ge *et al.*, 2018; Peng *et al.*, 2018; Yin *et al.*, 2013). Dieser Effekt trat jedoch erst nach längeren Inkubationszeiten als die in dieser Arbeit betrachteten 24 h auf. Der unveränderte Methylierungsgrad nach 24 h und die Hypomethylierung nach längerer Zeit, sowohl nach einer Nachinkubation als auch nach einer verlängerten Inkubationsdauer, deuten auf einen passiven Mechanismus der Reduktion des Methylierungsgrades hin. Das heißt, die Demethylierung wird durch eine verminderte Aktivität der DNMTs verursacht und benötigt mehrere Zellteilungen, um sich zu manifestieren (Moore *et al.*, 2013). Eine Repression der DNMTs auf Genebene konnte in der Messung der Genexpressionsprofile nach 24 h nachgewiesen werden, jedoch nicht nach der Nachinkubationszeit oder während der mehrwöchigen Versuche. Da diese die Hypomethylierung aufwiesen, die 24 h Versuche jedoch nicht, scheint eine Herunterregulierung der *DNMT*-Gene unwahrscheinlich. Der genaue Mechanismus hinter dieser verminderten Aktivität ist noch unbekannt. Im Folgenden werden jedoch mehrere Theorien erörtert.

Ein möglicher Mechanismus bezieht sich auf die Reaktion von Cr(III) mit Proteinen. Schnekenburger und Mitarbeitende konnten nachweisen, dass intrazellulär zu Cr(III) reduziertes Chromat eine Quervernetzung von DNMT1 mit HDAC1 verursachen kann, wodurch es zu einer verminderten Methylierungsaktivität kommt (Schnekenburger *et al.*, 2007). Weitere Theorien beziehen sich auf die Beteiligung des durch Chromat ausgelösten oxidativen Stresses. Eine Beteiligung von oxidativem Stress wird durch die Induktion einiger Gene der oxidativen

Stressantwort zu allen Versuchszeitpunkten angezeigt. Es konnte gezeigt werden, dass durch oxidativen Stress induzierte DNA-Läsionen die DNMTs an der Interaktion mit der DNA hindern können. Zu diesen Läsionen gehören 8-Oxo-Guanin und O<sup>6</sup>-Methylguanin (Franco *et al.*, 2008). Ein Einfluss von Chromat über die Bildung von 8-Oxo-Guanin scheint unwahrscheinlich, wie Wang und Mitarbeitende in Ratten nachgewiesen haben (Wang *et al.*, 2016). Dies wird durch die Repression nach der Inkubation und gleichbleibende Expressionshöhe nach der Nachinkubation und verlängerten Inkubationsdauer von *OGG1* in dieser Arbeit unterstützt. Des Weiteren könnte es sein, dass die entstehenden ROS mit SAM interagieren. Dadurch kann SAM den DNMTs nicht mehr als Kofaktor zur Verfügung stehen, wodurch es zu einer Hypomethylierung kommt (Kreuz & Fischle, 2016). Ob SAM auch durch den durch Chromat verursachten oxidativen Stress beeinflusst wird, sollte Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

Alles in allem zeigte insbesondere die zeitliche Komponente einen Einfluss auf die globale Methylierung. Sowohl eine kurze Inkubation mit höheren Inkubationskonzentrationen als auch eine längere Inkubation mit niedrigeren Chromatkonzentrationen führte zu einer Hypomethylierung auf globaler Ebene. Ein Einfluss von Ascorbinsäure konnte nicht beobachtet werden, da dieser nach 24 h analysiert wurde und etwaige Auswirkungen zu diesem Zeitpunkt wahrscheinlich noch nicht sichtbar waren.

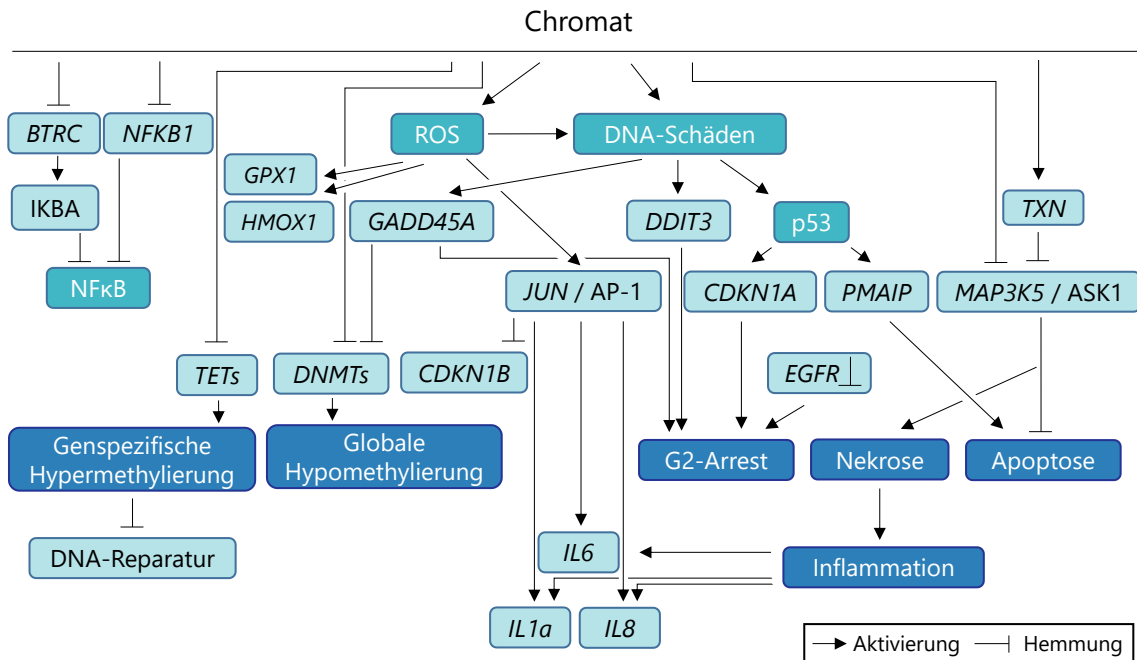
Die Analyse der genspezifischen Methylierung von *MLH1* und *MSH2* erfolgte im Langzeitversuch mittels COBRA. Der untersuchte Abschnitt in der Promotorregion der Gene lag unmethyliert vor und wurde durch Chromat nicht beeinflusst. Eine Hypermethylierung im Promotorbereich von *MLH1* wurde in der Literatur bereits beschrieben (Ali *et al.*, 2011; Tsuboi *et al.*, 2020). Diese genspezifische Methylierungsänderung führt zu einer Inaktivierung von *MLH1* und somit zu einer Defizienz der MMR (Olave & Graham, 2022). Eine durch Chromat gehemmte MMR führt zu einer geringeren apoptotischen Antwort, höherem klonogenen Überleben, einer erhöhten Mutationsrate (Peterson-Roth *et al.*, 2005; Zhitkovich *et al.*, 2005) und Mikrosatelliteninstabilität (Takahashi *et al.*, 2005). Dies fördert die kanzerogene Wirkung von Chromat. In dieser Arbeit konnte eine Veränderung nicht detektiert werden. Mögliche Gründe hierfür könnten eine zu kurze Inkubationsdauer, eine Methylierungsänderung an einem anderen als mit der COBRA erfassten CpG sein oder dass sich die A549 nicht als Testsystem zur Analyse der genspezifischen Methylierung eignet.

Des Weiteren wurde ein Genexpressionsprofil erstellt, um Veränderungen auf transkriptioneller Ebene durch eine Inkubation mit Chromat zu beobachten. Nach der 24-stündigen Inkubation wurden bereits ab einer Konzentration von 2 µM Chromat die Gene *CDKN1A* und *GADD45A* in A549-Zellen induziert. Aus den Bereichen der DNA-Schadensantwort, oxidativen Stressantwort und Apoptose sowie Zellzykluskontrolle wurden ebenfalls *DDIT3*, *GPX1*, *TXN*, *JUN* und *PMAIP* vermehrt transkribiert. Andere Gene aus diesen Bereichen erfuhren eine Repression, wie *MAP3K5*, *NFKB1*, *BTRC*, *CDKN1B* und *EGFR*. Mit der DNA-Reparatur assoziierte Gene wurden in einer Vielzahl reprimiert. Eine Repression zeigte sich auch im Bereich der epigenetischen Regulatoren, deren Gene durchweg weniger abgelesen

wurden. Eine Induktion wurde hingegen für Gene der inflammatorischen Antwort, *IL1a*, *IL6* und *IL8*, beobachtet. Die Expression dieser Gene unterschied sich in BEAS-2B-Zellen. Während *IL6* nur bis zu einer Konzentration von 10 µM Chromat induziert wurde, erfuhr *IL8* eine Repression. Zudem unterschieden sich die Auswirkungen von Chromat in BEAS-2B-Zellen von den A549-Zellen hauptsächlich in ihrer Intensität, welche in BEAS-2B-Zellen geringer ausgeprägt war. Abweichend hiervon wurde *HMOX1* in BEAS-2B-Zellen induziert, in A549-Zellen nicht. Die Präinkubation mit DHA bewirkte in A549-Zellen keine Änderung im Expressionsmuster. Lediglich die Ausprägung der Effekte schwächte sich in DHA(+)- und DHA(++)-Zellen in den meisten Genen ab. In BEAS-2B-Zellen verringerte sich durch die Präinkubation mit DHA die Intensität der Expressionsveränderung in einigen Genen, in anderen blieb sie unverändert. Die Repression einiger epigenetischer Regulatoren wurde durch DHA verstärkt. Die Repression von *IL8* in DHA(-)-Zellen wurde geschwächt und ab 20 µM Chromat kam es zu einer Induktion präinkubierter Zellen. Nach der Nachinkubationszeit veränderte sich das Genexpressionsprofil deutlicher. Die repressiven Effekte und die Trends zu diesen gingen in fast allen Genen zurück und glichen sich der unbehandelten Kontrolle an. Es erfuhren insbesondere Gene der inflammatorischen Antwort, wie *IL1a*, *IL1b*, *IL6* und *IL8*, eine verstärkte Induktion. Weitere Gene, welche in A549-Zellen vermehrt transkribiert wurden, sind *GPX1*, *NFKB2*, *CDKN1A* und *JUN*, während in BEAS-2B-Zellen *CDKN1A*, *JUN*, *DDB2*, *DDIT3* und *GADD45A* induziert wurden. Die Effektstärke erhöhte sich dabei in allen genannten Genen mit Ausnahme von *CDKN1A* in A549-Zellen, welches ungeachtet dessen 4-fach vermehrt transkribiert wurde. *DDB2* und *DDIT3*, welche in BEAS-2B-Zellen nach 24 h reprimiert bzw. nicht beeinflusst wurden, zeigten nach der Nachinkubation eine Induktion. Im Langzeitversuch zeigte sich erneut eine abweichende Genexpression. Am stärksten im gesamten Genset wurde *CCL22* verändert, das nach fünf Wochen 23-mal stärker exprimiert wurde. Dieses Gen wurde als einziges bereits nach der 24-stündigen Inkubation induziert. Als weitere Gene der inflammatorischen Antwort erfuhren *IL1a*, *IL1b* und *IL6* eine Induktion nach drei bis vier Wochen. Ebenfalls induziert wurden *E2F1* und *CDKN1A*, wobei die Transkriptmenge von Letzterem erst nach einer fünfwöchigen Inkubation signifikant erhöht wurde. Eine Repression erfuhren hingegen *JUN* und *VEGFA*. Viele Gene der oxidativen Stressantwort zeigten einen Trend zur Induktion, wovon insbesondere *GPX2* und *HSPA1A* verstärkt induziert wurden. *NFKB2* zeigte eine zeitabhängige Transkriptionsänderung und wurde nach fünf Wochen vermehrt transkribiert. Im Cluster der DNA-Schadensantwort wurden *DDIT3* und *GADD45A* reprimiert, wobei der Effekt mit fortschreitender Inkubationsdauer nachließ. Induziert wurden hingegen *LIG1* und *RAD51*. Gene der epigenetischen Regulation wurden nicht beeinflusst.

Durch die Untersuchung dieser toxikologischen Endpunkte konnten einige Erkenntnisse zur toxischen Wirkung von Chromat auf Lungenepithelzellen gewonnen werden. Das Genexpressionsprofil zeigt einen Einfluss von Chromat auf eine Vielzahl von Genen. Auf Grundlage der Expressionsänderungen nach 24 h und vorhandener Literatur werden im

Folgenden mögliche Verbindungen und Signalwege in der Chromat-induzierten Schadensantwort nach einer Kurzzeitinkubation vorgeschlagen und in Abbildung 36 dargestellt.



**Abbildung 36: Schematische Darstellung möglicher Signalwege und Auswirkungen in der Chromat-induzierten Schadensantwort.** Chromat verursacht Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und DNA-Schäden wie Strangbrüche, Addukte, Crosslinks oder über ROS induzierte oxidative Schäden. Zusätzlich bewirkt es eine Repression verschiedener Gene. In hellem Türkis sind in der Genexpression nachgewiesene veränderte Gene dargestellt. In dunklerem Türkis sind Signalwege gefärbt, auf deren Beteiligung geschlossen wurde. Blaue Kästen zeigen die Folgen der Chromatbehandlung. Die Darstellung ist stark vereinfacht und stellt die Signalwege nicht vollständig dar. Teilweise wurde von der Übersetzung der Expressionsänderung auf die Proteinebene ausgegangen.

Durch die Reduktion von Chromat zu Cr(III) werden ROS gebildet, welche unter anderem oxidative DNA-Schäden verursachen können (Zhitkovich, 2005). Durch die entstandenen ROS wurden in der Zelle antioxidative Gene wie *GPX1* und *HMOX1* induziert. Zudem könnten die ROS zur Aktivierung von *JUN* und damit dem Transkriptionsfaktor AP-1 geführt haben (Ma, 2010). Eine Induktion von c-Jun auf Proteinebene durch Chromat in A549-Zellen ist bereits bekannt (Hodges *et al.*, 2004). AP-1 wiederum hemmt *CDKN1B* auf Genebene, wie es in der vorliegenden Arbeit ebenfalls gezeigt wurde (Bachs *et al.*, 2018). Eine Aktivierung durch AP-1 könnten die inflammatorischen Gene *IL1a*, *IL6* und *IL8* erfahren haben (Xie, 2001). Eine Induktion dieser Interleukine über NFκB ist unwahrscheinlich, da *NFKB1*, welches für einen Bestandteil von NFκB kodiert, durch Chromat reprimiert wurde. Auch *BTRC*, welches über den Abbau des NFκB-Inhibitor IKBA NFκB stabilisiert (Suzuki *et al.*, 2000), wurde weniger exprimiert. Die Induktion der inflammatorischen Gene deutet auf eine entzündliche Reaktion in den Zellen hin. Die durch Chromat entstandenen DNA-Schäden aktivierten DNA-Schadensmarker wie *DDIT3* und



*GADD45A*, auch eine Aktivierung von p53 ist denkbar. Durch p53 regulierte Gene wie *CDKN1A* und *PMAIP* wurden ebenfalls induziert. Eine Erhöhung von p53 und p21 wurde in der Literatur auch für BEAS-2B-Zellen beschrieben (Park *et al.*, 2015). Sowohl die Aktivierung von p21 als auch von *GADD45A* und *DDIT3* deutet auf einen Zellzyklusarrest hin. Die Repression von *EGFR* ist ebenfalls ein Hinweis darauf. Dies steht in Einklang mit der Analyse der Zellzyklusverteilung, bei welcher durch eine Inkubation mit 5  $\mu$ M Chromat ein G2-Arrest detektiert werden konnte. Ein Einleiten der Apoptose wurde durch *PMAIP* angezeigt. Gleichzeitig wurde die Apoptose jedoch durch die Repression von *MAP3K5*, welches für ASK1 kodiert, vermindert. Zusätzlich fand eine Hemmung von ASK1 auf Proteinebene durch die Induktion von *TXN* statt. Eine Verminderung der Apoptose kann zur Verschiebung zu unkontrollierten Zelltodmechanismen wie der Nekrose führen, welche mit schweren Entzündungsreaktionen, auch im umgebenden Gewebe einhergeht (Ryuno *et al.*, 2017). Eine inflammatorische Antwort konnte durch die Induktion der Interleukingene gezeigt werden. Eine weitere Schädigung der Zellen durch Chromat findet auf epigenetischer Ebene statt. Die Repression der epigenetischen Modulatoren könnte zu einer Dysregulation epigenetischer Modifikationen führen. So wurden die *TETs* durch Chromat reprimiert. Eine verminderte Aktivität der Demethylasen kann zu einer Hypermethylierung führen. Eine Hypermethylierung im Promotorbereich einiger DNA-Reparaturgene wurde in der Literatur beschrieben (Ali *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2018; Kondo *et al.*, 2006; Tsuboi *et al.*, 2020). Diese geht mit einer verminderten Transkription der entsprechenden Gene einher (Ali *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2018). Eine Repression von DNA-Reparaturgenen wurde ebenfalls in dieser Arbeit nachgewiesen. Diese Repression betraf Gene aller untersuchter DNA-Reparaturwege und zeigte sich ab Inkubationen von 10  $\mu$ M Chromat, bei welchen deutliche zytotoxische Effekte auftreten. Somit ist es auch möglich, dass die Zelle bereits in Zelltodmechanismen übergeht, wodurch die Zelle die DNA-Reparatur einstellt.

Im Vergleich der beiden verwendeten Zelllinien, wurden hauptsächlich Unterschiede in der Effektstärke und nicht im grundlegenden Mechanismus nachgewiesen. Die stärkere Reaktion auf Chromat in A549-Zellen trotz geringerer Empfindlichkeit in der Zytotoxizität könnten in der konstitutiven Überexpression von *HMOX1* und dem damit verbundenen Transkriptionsfaktor Nrf2 in A549-Zellen begründet sein (Kweon *et al.*, 2006). Dies zeigte sich auch dadurch, dass *HMOX1* in den A549-Zellen aufgrund der dauerhaften Überexpression durch Chromat nicht weiter induziert wurde. In BEAS-2B-Zellen war dagegen eine vermehrte Expression dieses Gens zu beobachten. Die Überexpression in A549-Zellen führt zu einer erhöhten antioxidativen Abwehr und verminderten Apoptose (Kweon *et al.*, 2006). Dies könnte somit zu einer erhöhten Reaktion auf oxidative Stimuli, wie den durch Chromat ausgelösten oxidativen Stress führen.

Die Präinkubation mit DHA wirkte sich auf das Genexpressionsprofil der A549-Zellen hauptsächlich in der Reduktion der Effektstärke aus. Differenten Signalwege konnten nicht beobachtet werden. Insgesamt zeichnete sich die Auswirkung von Ascorbinsäure daher in der extrazellulären Reduktion von Chromat und dadurch geringeren Aufnahme aus, wodurch die

zelluläre Antwort abgeschwächt wird. In BEAS-2B-Zellen wurde ebenfalls hauptsächlich die Stärke der Genexpressionsänderung durch die Präinkubation mit DHA verändert. Zudem zeigten sich neue Effekte wie die Induktion von *HSPA1A* und *IL8*. Dies zeugt von einer stärkeren inflammatorischen und oxidativen Stressantwort, welche auf eine erhöhte Reduktion von Chromat zu Cr(III) durch Ascorbinsäure zurückgehen könnte. Ob eine Beladung von Zellen mit Ascorbinsäure in einer erhöhten Produktion von ROS resultiert, wird in der Literatur unterschiedlich postuliert (Martin *et al.*, 2006; Reynolds *et al.*, 2007).

Die zeitliche Komponente hatte einen größeren Einfluss auf die Genexpressionsprofile. Die erhöhte Transkriptmenge von *DDIT3* und *GADD45A* nach der Nachinkubationszeit spricht für eine anhaltende DNA-Schädigung der Zellen, auch 72 h nach Beendigung der Inkubation. Insbesondere in den BEAS-2B-Zellen ergab sich eine erhöhte Transkriptmenge von *DDIT3* und *GADD45A* welche bei 5 µM Inkubation in der direkten Messung nach 24 h nicht signifikant erhöht waren. In beiden Zelllinien deutet zudem die vermehrte Transkription von *CDKN1A* auf die anhaltende Aktivierung von p53 hin, wodurch es auch zum Zelltod kommen kann. Die Induktion von *DDB2* könnte zudem auf die Aktivierung der NER bei der Reparatur durch Chromat verursachter DNA-Schäden hindeuten, da die Beteiligung dieses Reparaturwegs bereits bekannt ist (Wise *et al.*, 2008). Die vermehrte Transkription von *GPX1* in A549-Zellen und *JUN* in beiden Zelllinien ist zudem ein Hinweis auf ein anhaltendes oxidatives Ungleichgewicht. Die weiter bestehende Aktivierung von AP-1 steht im Zusammenhang mit der vermehrten Transkription der Interleukine. Eine Induktion dieser Entzündungsmarker könnte jedoch auch NFκB vermittelt sein. Während dieser Schlüsselsignalweg direkt nach der Inkubation eher reprimiert wurde, ist eine Beteiligung von NFκB nach der Nachinkubation aufgrund der erhöhten Transkription von *NFKB2* denkbar.

Im Langzeitversuch gibt die Aktivierung von *CDKN1A* einen Hinweis auf einen Zellzyklusarrest (Dutto *et al.*, 2015). Die vermehrte Transkription von *E2F1* wirkt dem entgegen, da das Genprodukt mit der Proliferation in Verbindung steht (Biswas & Johnson, 2012). Beide Gene können durch p53 aktiviert werden, wodurch eine Aktivierung dieses Signalwegs, wie bereits in den Kurzzeitstudien bei höheren Konzentrationen gezeigt, wahrscheinlich ist und somit Einfluss auf die Apoptose nehmen. Einen zeitabhängigen Einfluss im Cluster der oxidativen Stressantwort gab es auf *NFKB2*. Da dieses Gen für eine Vorstufe von NFκB kodiert (Savinova *et al.*, 2009), wird eine Involvierung dieses Signalwegs angezeigt. NFκB wird daher erst nach einer längeren Inkubation mit Chromat aktiviert. Ein weiteres Indiz ist die Induktion der Interleukine nach drei bis vier Wochen, welche durch NFκB aktiviert werden können. Im Kurzzeitversuch werden diese Gene wahrscheinlich durch AP-1 induziert, was im Langzeitversuch aufgrund der Repression von *JUN* vermutlich nicht der Fall ist.

Trotz des Vorhandenseins von DNA-Schäden und oxidativem Stress in der Zelle sowie einer zytotoxischen Wirkung wurden die DNA-Schadensmarker *DDIT3* und *GADD45A* reprimiert. Dies ist zurückzuführen auf eine NFκB-vermittelte Repression dieser Gene, wodurch das Überleben in Krebszellen gesichert wird (Nozaki *et al.*, 2001; Zerbini & Libermann, 2005). Eine Schädigung

der DNA durch die Langzeitbehandlung wird durch die Induktion von den DNA-Reparaturgenen *LIG1* und *RAD51* bestätigt.

Insgesamt wurden zelluläre Signalwege hauptsächlich durch die Nachinkubationszeit und längere Inkubationsdauer verändert. Die inflammatorische Antwort wurde durch die DHA-Präinkubation in BEAS-2B-Zellen leicht verstärkt. Die Nachinkubationszeit bewirkte ebenfalls eine erhöhte Transkriptmenge der Interleukine. Die niedrigen Inkubationskonzentrationen im Langzeitversuch führten zu einer Aktivierung der Interleukine nach einem mehrwöchigen Kontakt mit Chromat. Eine inflammatorische Antwort auf den Kontakt mit Chromat und die Beteiligung verschiedener zugrundeliegender Signalwege wurden in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (zusammengefasst in Kouokam *et al.*, 2022).

Während epigenetische Marker nach 24 h Inkubationszeit bei höheren Dosen reprimiert wurden, zeigte sich nach der weiteren Kultivierung und im Langzeitversuch keine Veränderung dieser Gene. Eine Dysregulation der epigenetischen Enzyme auf Genebene beschränkt sich daher auf den kürzeren Kontakt mit höheren Chromatkonzentrationen.

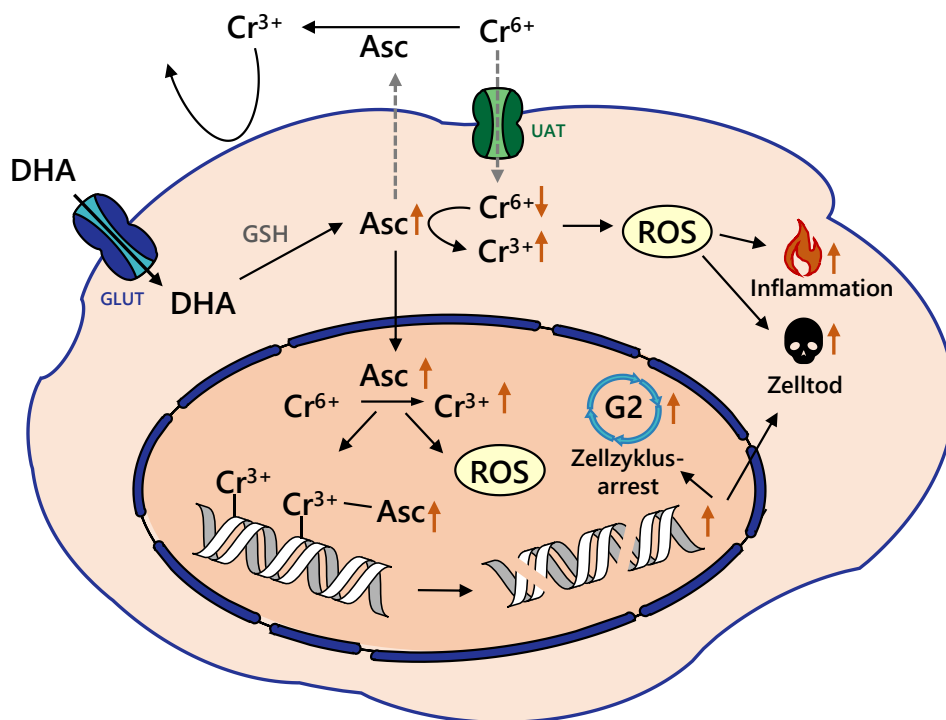
Die Gene der oxidativen Stressantwort wurden durch eine Präinkubation mit DHA kaum beeinflusst. In BEAS-2B-Zellen verstärkte sich die oxidative Stressantwort auf Genebene leicht. Durch die Nachinkubationszeit und verlängerte Chromatbehandlung wurde ebenfalls eine verstärkte Aktivierung einiger Gene beobachtet. Die oxidative Stressantwort wird auf Genebene bereits nach der 24-stündigen Inkubation aktiviert, verstärkt sich jedoch mit fortschreitender Zeit, mit und ohne Entfernung der Inkubationslösung.

Auf die Gene der apoptotischen Antwort und Zellzykluskontrolle hatte DHA einen abschwächenden Einfluss. Die Nachinkubationszeit wirkte sich hingegen verstärkend auf induktive Effekte aus. Die verlängerte Inkubationszeit bewirkte eine Veränderung des Genexpressionsprofils, da mit Ausnahme von *CDKN1A* andere Gene beeinflusst wurden als nach einer Kurzzeitinkubation.

Dieser Effekt zeigte sich auch in Genen der DNA-Schadensantwort. Die Präinkubation mit DHA zeigte eine abschwächende Wirkung auf die vermehrte Transkription der DNA-Schadensmarker. Die Nachinkubation bewirkte eine verstärkte Induktion dieser in BEAS-2B-Zellen. Eine verlängerte Inkubation führte hingegen zur Repression der Marker für DNA-Schäden. Die DNA-Reparaturgene wurden durch die Vorbehandlung mit DHA kaum verändert. Durch die Nachkultivierung und verlängerte Inkubationszeit wurden einige Reparaturgene aktiviert. An der Reparatur der durch Chromat verursachten DNA-Schäden sind viele Reparaturwege beteiligt. Die NER stellt den Hauptweg für die Entfernung von DNA-Addukten dar (Pavesi & Moreira, 2020). Des Weiteren konnte die Aktivierung der BER, Einzelstrangbruchreparatur, MMR, Crosslink-Reparatur und verschiedenen Wege der DSB-Reparatur nachgewiesen werden (Wise *et al.*, 2008). Die Induktion dieser Reparaturwege scheint jedoch kaum auf Genebene stattzufinden, da lediglich vereinzelte Reparaturgene nach der Nachinkubationszeit und Langzeit-Inkubation induziert wurden. Der zeitliche Aspekt scheint

zusätzlich eine Rolle bei der Aktivierung dieser Gene zu spielen, da sie direkt nach einer 24-stündigen Inkubation nicht induziert, sondern reprimiert wurden.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sowohl Ascorbinsäure als auch die Inkubationsdauer einen wichtigen Einfluss auf die Chromattoxizität in Zellkulturstudien haben. Die Auswirkung einer Präinkubation mit DHA ist abhängig von der verwendeten Zelllinie. Während sich die Wirkung von DHA in A549-Zellen hauptsächlich auf eine Reduzierung der Chromataufnahme durch eine extrazelluläre Reduktion beschränkte, wurde die Zytotoxizität in BEAS-2B-Zellen erhöht. Dies ging mit einem stärkeren Zellzyklusarrest und einer erhöhten inflammatorischen Antwort einher (Abbildung 37). Unterschiede zwischen den verwendeten Zelllinien können auf ihre Eigenschaft als kanzerogene bzw. nicht-kanzerogene Zellen und die konstitutionelle Überexpression von Nrf-2 in A549-Zellen zurückgeführt werden. Durch eine weitere Kultivierung nach Beendigung der Inkubation oder einer längeren Behandlungsdauer mit Chromat veränderten sich die Zytotoxizität und zelluläre Signalwege. Ein epigenetischer Einfluss in Form einer globalen Hypomethylierung manifestierte sich mit zeitlicher Verzögerung. Es ist daher von Bedeutung für folgende *in vitro* Versuche, diese Aspekte miteinzubeziehen.



**Abbildung 37:** Zusammenfassende Darstellung des Einflusses einer Präinkubation mit DHA auf die Chromat-induzierte Toxizität in BEAS-2B-Zellen. DHA wird über GLUT-Transporter in die Zelle aufgenommen und intrazellulär durch Glutathion (GSH) zu Ascorbinsäure (Asc) reduziert. Asc kann die Zelle verlassen und Cr<sup>6+</sup> extrazellulär zu Cr<sup>3+</sup> reduzieren, wodurch es weniger aufgenommen wird. Intrazellulär wird Cr<sup>6+</sup> ebenfalls vermehrt durch Asc im Zytoplasma und dem Zellkern reduziert, wodurch Reaktive Sauerstoffspezies entstehen (ROS). Es kommt zudem verstärkt zu ternären Chrom-DNA-Addukten mit Asc, welche zur vermehrten Bildung von Doppelstrangbrüchen führen. All dies führt zu einer erhöhten inflammatorischen Antwort, verstärktem G2-Arrest und höherer Zytotoxizität.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Ali, A. H., Kondo, K., Namura, T., Senba, Y., Takizawa, H., Nakagawa, Y., Toba, H., Kenzaki, K., Sakiyama, S., & Tangoku, A. (2011). Aberrant DNA methylation of some tumor suppressor genes in lung cancers from workers with chromate exposure. *Molecular Carcinogenesis*, *50*(2), 89-99.
- Ambrosi, C., Manzo, M., & Baubec, T. (2017). Dynamics and Context-Dependent Roles of DNA Methylation. *Journal of Molecular Biology*, *429*(10), 1459-1475.
- Bachs, O., Gallastegui, E., Orlando, S., Bigas, A., Morante-Redolat, J. M., Serratos, J., Fariñas, I., Aligué, R., & Pujol, M. J. (2018). Role of p27(Kip1) as a transcriptional regulator. *Oncotarget*, *9*(40), 26259-26278.
- Bakke, O., Jakobsen, K., & Eik-Nes, K. B. (1984). Concentration-dependent effects of potassium dichromate on the cell cycle. *Cytometry*, *5*(5), 482-486.
- Barceloux, D. (1999). Chromium, *Clinical Toxicology*.
- Barguilla, I., Maguer-Satta, V., Guyot, B., Pastor, S., Marcos, R., & Hernández, A. (2023). *In Vitro* Approaches to Determine the Potential Carcinogenic Risk of Environmental Pollutants. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(9), 7851.
- Benedix, R. (2020). *Bauchemie* (7 Aufl.). Wiesbaden: Springer.
- Beyersmann, D., & Hartwig, A. (2008). Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Archives of Toxicology*, *82*(8), 493-512.
- Bhowmick, R., & Gappa-Fahlenkamp, H. (2016). Cells and Culture Systems Used to Model the Small Airway Epithelium. *Lung*, *194*(3), 419-428.
- Bijur, G. N., Briggs, B., Hitchcock, C. L., & Williams, M. V. (1999). Ascorbic acid-dehydroascorbate induces cell cycle arrest at G2/M DNA damage checkpoint during oxidative stress. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *33*(2), 144-152.
- Biswas, A. K., & Johnson, D. G. (2012). Transcriptional and Nontranscriptional Functions of E2F1 in Response to DNA Damage. *Cancer research*, *72*(1), 13-17.
- Biterge, B. (2016). A Mini Review on Post-Translational Histone Modifications. *MOJ Cell Science & Report*, *3*(1).
- Blaschke, K., Ebata, K. T., Karimi, M. M., Zepeda-Martinez, J. A., Goyal, P., Mahapatra, S., Tam, A., Laird, D. J., Hirst, M., Rao, A., Lorincz, M. C., & Ramalho-Santos, M. (2013). Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature*, *500*(7461), 222-226.
- Blaszczak, W., Barczak, W., Masternak, J., Kopczyński, P., Zhitkovich, A., & Rubiś, B. (2019). Vitamin C as a Modulator of the Response to Cancer Therapy. *Molecules*, *24*(3), 453.
- Blomen, V. A., & Boonstra, J. (2011). Stable transmission of reversible modifications: maintenance of epigenetic information through the cell cycle. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *68*(1), 27-44.
- Bonilla, B., Hengel, S. R., Grundy, M. K., & Bernstein, K. A. (2020). RAD51 Gene Family Structure and Function. *Annual Review of Genetics*, *54*(1), 25-46.

- Brabson, J. P., Leesang, T., Mohammad, S., & Cimmino, L. (2021). Epigenetic Regulation of Genomic Stability by Vitamin C. *Frontiers in Genetics*, *12*, 675780.
- Bregnbak, D., Johansen, J. D., Jellesen, M. S., Zachariae, C., Menne, T., & Thyssen, J. P. (2015). Chromium allergy and dermatitis: prevalence and main findings. *Contact Dermatitis*, *73*(5), 261-280.
- Briehl, H. (2014). *Chemie der Werkstoffe* (3 Aufl.). Wiesbaden: Springer.
- Brown, S., Lockart, M. M., Thomas, C. S., Bowman, M. K., Woski, S. A., & Vincent, J. B. (2020). Molecular Structure of Binary Chromium(III)–DNA Adducts. *ChemBioChem*, *21*(5), 628-631.
- Browning, C. L., Qin, Q., Kelly, D. F., Prakash, R., Vanoli, F., Jasin, M., & Wise, J. P., Sr. (2016). Prolonged Particulate Hexavalent Chromium Exposure Suppresses Homologous Recombination Repair in Human Lung Cells. *Toxicological Sciences*, *153*(1), 70-78.
- Browning, C. L., Speer, R. M., & Wise, J. P. (2017a). Molecular Mechanisms of Chromium-Induced Carcinogenesis. In A. Mudipalli & J. T. Zelikoff (Hrsg.), *Essential and non-essential metals: Carcinogenesis, prevention and cancer therapeutics* (S. 143-180). Springer International Publishing.
- Browning, C. L., Wise, C. F., & Wise, J. P. (2017b). Prolonged particulate chromate exposure does not inhibit homologous recombination repair in North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*) lung cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *331*, 18-23.
- Bryant, H. E., Ying, S., & Helleday, T. (2006). Homologous recombination is involved in repair of chromium-induced DNA damage in mammalian cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *599*(1), 116-123.
- Bundesinstitut für Risikobewertung. (2004). *Verwendung von Mineralstoffen in Lebensmitteln. Toxikologische und ernährungsphysiologische Aspekte, Teil II*. BfR, Berlin.
- Bürzle, M., & Hediger, M. A. (2012). Chapter Eleven - Functional and Physiological Role of Vitamin C Transporters. In M. O. Bevensee (Hrsg.), *Current Topics in Membranes* (Bd. 70, S. 357-375). Academic Press.
- Caglieri, A., Goldoni, M., De Palma, G., Mozzoni, P., Gemma, S., Vichi, S., Testai, E., Panico, F., Corradi, M., & Tagliaferri, S. (2008). Exposure to low levels of hexavalent chromium: target doses and comparative effects on two human pulmonary cell lines. *Acta Biomed*, *79*(Suppl 1), 104-115.
- Ceryak, S., Zingariello, C., O'Brien, T., & Patierno, S. R. (2004). Induction of pro-apoptotic and cell cycle-inhibiting genes in chromium (VI)-treated human lung fibroblasts: Lack of effect of ERK. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *255*(1), 139-149.
- Chen, Q. Y., Murphy, A., Sun, H., & Costa, M. (2019). Molecular and epigenetic mechanisms of Cr(VI)-induced carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *377*, 114636.
- Christmann, M., & Kaina, B. (2019). Epigenetic regulation of DNA repair genes and implications for tumor therapy. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *780*, 15-28.
- Claesson-Welsh, L., & Welsh, M. (2013). VEGFA and tumour angiogenesis. *Journal of Internal Medicine*, *273*(2), 114-127.
- Corti, A., Casini, A. F., & Pompella, A. (2010). Cellular pathways for transport and efflux of ascorbate and dehydroascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *500*(2), 107-115.
- Dahl, C., Grønbaek, K., & Guldborg, P. (2011). Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. *Clinica Chimica Acta*, *412*(11), 831-836.

- Darville, M. I., Ho, Y.-S., & Eizirik, D. c. L. (2000). NF- $\kappa$ B Is Required for Cytokine-Induced Manganese Superoxide Dismutase Expression in Insulin-Producing Cells<sup>1</sup>. *Endocrinology*, *141*(1), 153-162.
- Deaton, A. M., & Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & development*, *25*(10), 1010-1022.
- DeLoughery, Z., Luczak, M. W., Ortega-Atienza, S., & Zhitkovich, A. (2014). DNA Double-Strand Breaks by Cr(VI) Are Targeted to Euchromatin and Cause ATR-Dependent Phosphorylation of Histone H2AX and Its Ubiquitination. *Toxicological Sciences*, *143*(1), 54-63.
- den Braver-Sewradj, S. P., van Benthem, J., Staal, Y. C. M., Ezendam, J., Piersma, A. H., & Hessel, E. V. S. (2021). Occupational exposure to hexavalent chromium. Part II. Hazard assessment of carcinogenic effects. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *126*, 105045.
- Ducros, V. (1992). Chromium metabolism. *Biological Trace Element Research*, *32*(1), 65-77.
- Dutto, I., Tillhon, M., Cazzalini, O., Stivala, L. A., & Prosperi, E. (2015). Biology of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A: molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. *Archives of Toxicology*, *89*(2), 155-178.
- Duval, K., Grover, H., Han, L.-H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J., & Chen, Z. (2017). Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology*, *32*(4), 266-277.
- Eastmond, D. A., MacGregor, J. T., & Slesinski, R. S. (2008). Trivalent Chromium: Assessing the Genotoxic Risk of an Essential Trace Element and Widely Used Human and Animal Nutritional Supplement. *Critical Reviews in Toxicology*, *38*(3), 173-190.
- European Food Safety Authority Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (EFSA) (2014). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for chromium. *12*(10). EFSA Journal.
- Fazzari, M. J., & Greally, J. M. (2004). Epigenomics: beyond CpG islands. *Nature Reviews Genetics*, *5*(6), 446-455.
- Fischer, B. M., Neumann, D., Piberger, A. L., Risnes, S. F., Koberle, B., & Hartwig, A. (2016). Use of high-throughput RT-qPCR to assess modulations of gene expression profiles related to genomic stability and interactions by cadmium. *Arch Toxicol*, *90*(11), 2745-2761.
- Foster, K. A., Oster, C. G., Mayer, M. M., Avery, M. L., & Audus, K. L. (1998). Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. *Experimental Cell Research*, *243*(2), 359-366.
- Franco, R., Schoneveld, O., Georgakilas, A. G., & Panayiotidis, M. I. (2008). Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett*, *266*(1), 6-11.
- Friesen, A., Fritsch-Decker, S., Hufnagel, M., Mulhopt, S., Stapf, D., Weiss, C., & Hartwig, A. (2022). Gene Expression Profiling of Mono- and Co-Culture Models of the Respiratory Tract Exposed to Crystalline Quartz under Submerged and Air-Liquid Interface Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(14), 7773.
- Fuck, W. F., Gutterres, M., Marcilio, N. R., & Bordingnon, S. (2011). The influence of chromium supplied by tanning and wet finishing processes on the formation of Cr (VI) in leather. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *28*, 221-228.
- Ge, G., Peng, D., Xu, Z., Guan, B., Xin, Z., He, Q., Zhou, Y., Li, X., Zhou, L., & Ci, W. (2018). Restoration of 5-hydroxymethylcytosine by ascorbate blocks kidney tumour growth. *EMBO reports*, *19*(8), e45401.
- Gelato, K. A., & Fischle, W. (2008). Role of histone modifications in defining chromatin structure and function. *389*(4), 353-363.

- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., & Parks, W. P. (1973). *In Vitro* Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1417-1423.
- Gibney, E. R., & Nolan, C. M. (2010). Epigenetics and gene expression. *Heredity*, 105(1), 4-13.
- Gilson, P., Drouot, G., Witz, A., Merlin, J.-L., Becuwe, P., & Harlé, A. (2019). Emerging Roles of DDB2 in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 5168.
- Guo, X., Feng, L., Lemos, B., & Lou, J. (2019). DNA methylation modifications induced by hexavalent chromium. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 37(3), 133-145.
- Haberland, V. M. M., Magin, S., Iliakis, G., & Hartwig, A. (2023). Impact of Manganese and Chromate on Specific DNA Double-Strand Break Repair Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), 10392.
- Handy, D. E., Castro, R., & Loscalzo, J. (2011). Epigenetic Modifications. *Circulation*, 123(19), 2145-2156.
- Hattori, K., Naguro, I., Runchel, C., & Ichijo, H. (2009). The roles of ASK family proteins in stress responses and diseases. *Cell Communication and Signaling*, 7(1), 9.
- Hayashi, Y., Kondo, T., Zhao, Q.-L., Ogawa, R., Cui, Z.-G., Feril, L. B., Teranishi, H., & Kasuya, M. (2004). Signal transduction of p53-independent apoptotic pathway induced by hexavalent chromium in U937 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 197(2), 96-106.
- Herbst, R. S. (2004). Review of epidermal growth factor receptor biology. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics*, 59(2), S21-S26.
- Herst, P. M., Broadley, K. W. R., Harper, J. L., & McConnell, M. J. (2012). Pharmacological concentrations of ascorbate radiosensitize glioblastoma multiforme primary cells by increasing oxidative DNA damage and inhibiting G2/M arrest. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(8), 1486-1493.
- Hodges, N. J., Ádám, B., Lee, A. J., Cross, H. J., & Chipman, J. K. (2001). Induction of DNA-strand breaks in human peripheral blood lymphocytes and A549 lung cells by sodium dichromate: association with 8-oxo-2-deoxyguanosine formation and inter-individual variability. *Mutagenesis*, 16(6), 467-474.
- Hodges, N. J., Smart, D., Lee, A. J., Lewis, N. A., & Chipman, J. K. (2004). Activation of c-Jun N-terminal kinase in A549 lung carcinoma cells by sodium dichromate: role of dissociation of apoptosis signal regulating kinase-1 from its physiological inhibitor thioredoxin. *Toxicology*, 197(2), 100-111.
- Holmes, A. L., Wise, S. S., Sandwick, S. J., & Wise, J. P., Sr. (2006). The clastogenic effects of chronic exposure to particulate and soluble Cr(VI) in human lung cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 610(1-2), 8-13.
- Holmes, A. L., Wise, S. S., Pelsue, S. C., Aboueissa, A.-M., Lingle, W., Salisbury, J., Gallagher, J., & Wise, J. P., Sr. (2010). Chronic Exposure to Zinc Chromate Induces Centrosome Amplification and Spindle Assembly Checkpoint Bypass in Human Lung Fibroblasts. *Chemical Research in Toxicology*, 23(2), 386-395.
- Holowiecki, A., O'Shields, B., & Jenny, M. J. (2016). Characterization of heme oxygenase and biliverdin reductase gene expression in zebrafish (*Danio rerio*): Basal expression and response to pro-oxidant exposures. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 311, 74-87.
- Hu, G., Li, P., Li, Y., Wang, T., Gao, X., Zhang, W., & Jia, G. (2016). Methylation levels of P16 and TP53 that are involved in DNA strand breakage of 16HBE cells treated by hexavalent chromium. *Toxicology Letters*, 249, 15-21.



- Hu, G., Li, P., Cui, X., Li, Y., Zhang, J., Zhai, X., Yu, S., Tang, S., Zhao, Z., Wang, J., & Jia, G. (2018). Cr(VI)-induced methylation and down-regulation of DNA repair genes and its association with markers of genetic damage in workers and 16HBE cells. *Environmental pollution*, 238, 833-843.
- Huang, S., Wang, J., Xing, L., Shen, H., Yan, X., Wang, J., & Zhang, X. (2014). Impairment of cell cycle progression by sterigmatocystin in human pulmonary cells *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*, 66, 89-95.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (1990). Chromium, nickel and welding. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 49. Lyon: WHO Press.
- Ishikawa, Y., Nakagawa, K., Satoh, Y., Kitagawa, T., Sugano, H., Hirano, T., & Tsuchiya, E. (1994). Characteristics of chromate workers' cancers, chromium lung deposition and precancerous bronchial lesions: an autopsy study. *British journal of cancer*, 70(1), 160-166.
- Islam, M. S., Leissing, T. M., Chowdhury, R., Hopkinson, R. J., & Schofield, C. J. (2018). 2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenases. *Annual review of biochemistry*, 87, 585-620.
- Ito, N., Hasegawa, R., Imaida, K., Hirose, M., Asamoto, M., & Shirai, T. (1995). Concepts in multistage carcinogenesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 21(1), 105-133.
- Iyer, R. R., Pluciennik, A., Burdett, V., & Modrich, P. L. (2006). DNA Mismatch Repair: Functions and Mechanisms. *Chemical Reviews*, 106(2), 302-323.
- Izzotti, A., Cartiglia, C., Balansky, R., D'Agostini, F., Longobardi, M., & De Flora, S. (2002). Selective induction of gene expression in rat lung by hexavalent chromium. *Molecular Carcinogenesis*, 35(2), 75-84.
- Jauhainen, A., Thomsen, C., Strömbom, L., Grundevik, P., Andersson, C., Danielsson, A., Andersson, M. K., Nerman, O., Rörvik, L., Ståhlberg, A., & Åman, P. (2012). Distinct Cytoplasmic and Nuclear Functions of the Stress Induced Protein DDIT3/CHOP/GADD153. *PLoS One*, 7(4), e33208.
- Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 13(7), 484-492.
- Jones, S. A. (2005). Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-61. *The Journal of Immunology*, 175(6), 3463-3468.
- Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures—a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*, 14(4), 910-919.
- Kondo, K., Takahashi, Y., Hirose, Y., Nagao, T., Tsuyuguchi, M., Hashimoto, M., Ochiai, A., Monden, Y., & Tangoku, A. (2006). The reduced expression and aberrant methylation of p16(INK4a) in chromate workers with lung cancer. *Lung Cancer*, 53(3), 295-302.
- Kouokam, J. C., Meaza, I., & Wise, J. P. (2022). Inflammatory effects of hexavalent chromium in the lung: A comprehensive review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 455, 116265.
- Kreuz, S., & Fischle, W. (2016). Oxidative stress signaling to chromatin in health and disease. *Epigenomics*, 8(6), 843-862.
- Kumar, S., Sathwara, N., Gautam, A. K., Agarwal, K., Shah, B., Kulkarni, P. K., Patel, K., Patel, A., Dave, L. M., Parikh, D. J., & Saiyed, H. N. (2005). Semen Quality of Industrial Workers Occupationally Exposed to Chromium. *Journal of Occupational Health*, 47(5), 424-430.
- Kurashova, N. A., Madaeva, I. M., & Kolesnikova, L. I. (2020). Expression of HSP70 Heat-Shock Proteins under Oxidative Stress. *Advances in Gerontology*, 10(1), 20-25.
- Kweon, M. H., Adhami, V. M., Lee, J. S., & Mukhtar, H. (2006). Constitutive overexpression of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 in A549 cells contributes to resistance to apoptosis

- induced by epigallocatechin 3-gallate. *Journal of Biological Chemistry*, 281(44), 33761-33772.
- Lee, B., Morano, A., Porcellini, A., & Muller, M. T. (2011). GADD45 $\alpha$  inhibition of DNMT1 dependent DNA methylation during homology directed DNA repair. *Nucleic Acids Research*, 40(6), 2481-2493.
- Legoff, L., D'Cruz, S. C., Tevosian, S., Primig, M., & Smagulova, F. (2019). Transgenerational Inheritance of Environmentally Induced Epigenetic Alterations during Mammalian Development. *Cells*, 8(12), 1559.
- Levina, A., Harris, H. H., & Lay, P. A. (2006). Binding of chromium(VI) to histones: implications for chromium(VI)-induced genotoxicity. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11(2), 225-234.
- Liebermann, D. A., & Hoffman, B. (2008). Gadd45 in stress signaling. *Journal of Molecular Signaling*, 3(1), 1-8.
- Lim, T. H., T. Sargent, r., & Kusubov, N. (1983). Kinetics of trace element chromium(III) in the human body. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 244(4), R445-R454.
- Liu, Q., Wang, L., Chen, H., Huang, B., Xu, J., Li, Y., Héroux, P., Zhu, X., Wu, Y., & Xia, D. (2019). Prometryn induces apoptotic cell death through cell cycle arrest and oxidative DNA damage. *Toxicology Research*, 8(6), 833-841.
- Losman, J.-A., Koivunen, P., & Kaelin, W. G. (2020). 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenases in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 20(12), 710-726.
- Lou, J., Wang, Y., Yao, C., Jin, L., Wang, X., Xiao, Y., Wu, N., Song, P., Song, Y., Tan, Y., Gao, M., Liu, K., & Zhang, X. (2013). Role of DNA methylation in cell cycle arrest induced by Cr (VI) in two cell lines. *PLoS One*, 8(8), e71031.
- Lou, J., Wang, Y., Chen, J., Ju, L., Yu, M., Jiang, Z., Feng, L., Jin, L., & Zhang, X. (2015). Effects of soluble and particulate Cr(VI) on genome-wide DNA methylation in human B lymphoblastoid cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 792, 12-18.
- Luczak, M. W., Green, S. E., & Zhitkovich, A. (2016). Different ATM Signaling in Response to Chromium(VI) Metabolism via Ascorbate and Nonascorbate Reduction: Implications for *in Vitro* Models and Toxicogenomics. *Environ Health Perspect*, 124(1), 61-66.
- Luczak, M. W., Krawic, C., & Zhitkovich, A. (2019). p53 Activation by Cr(VI): A Transcriptionally Limited Response Induced by ATR Kinase in S-Phase. *Toxicol Sci*, 172(1), 11-22.
- Ma, Q. (2010). Transcriptional responses to oxidative stress: Pathological and toxicological implications. *Pharmacology & Therapeutics*, 125(3), 376-393.
- Martin, B. D., Schoenhard, J. A., Hwang, J.-M., & Sugden, K. D. (2006). Ascorbate is a pro-oxidant in chromium-treated human lung cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 610(1), 74-84.
- Monteiro, C., Santos, C., Bastos, V., & Oliveira, H. (2019). Cr(VI)-induced genotoxicity and cell cycle arrest in human osteoblast cell line MG-63. *Journal of Applied Toxicology*, 39(7), 1057-1065.
- Moore, G. E., Gerner, R. E., & Franklin, H. A. (1967). Culture of Normal Human Leukocytes. *JAMA*, 199(8), 519-524.
- Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23-38.

- Mortada, W. I., El-Naggar, A., Mosa, A., Palansooriya, K. N., Yousaf, B., Tang, R., Wang, S., Cai, Y., & Chang, S. X. (2023). Biogeochemical behaviour and toxicology of chromium in the soil-water-human nexus: A review. *Chemosphere*, 331, 138804.
- Nickens, K. P., Patierno, S. R., & Ceryak, S. (2010). Chromium genotoxicity: A double-edged sword. *Chem Biol Interact*, 188(2), 276-288.
- Nozaki, S., Sledge, J. G. W., & Nakshatri, H. (2001). Repression of GADD153/CHOP by NF- $\kappa$ B: a possible cellular defense against endoplasmic reticulum stress-induced cell death. *Oncogene*, 20(17), 2178-2185.
- O'Brien, T. J., Ceryak, S., & Patierno, S. R. (2003). Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533(1), 3-36.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., & Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis. *Science*, 288(5468), 1053-1058.
- Olave, M. C., & Graham, R. P. (2022). Mismatch repair deficiency: The what, how and why it is important. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 61(6), 314-321.
- Park, Y. H., Kim, D., Dai, J., & Zhang, Z. (2015). Human bronchial epithelial BEAS-2B cells, an appropriate *in vitro* model to study heavy metals induced carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 287(3), 240-245.
- Parle-McDermott, A., & Ozaki, M. (2011). The Impact of Nutrition on Differential Methylated Regions of the Genome. *Advances in Nutrition*, 2(6), 463-471.
- Pascal, L. E., & Tessier, D. M. (2004). Cytotoxicity of chromium and manganese to lung epithelial cells *in vitro*. *Toxicology Letters*, 147(2), 143-151.
- Pavesi, T., & Moreira, J. C. (2020). Mechanisms and individuality in chromium toxicity in humans. *Journal of Applied Toxicology*, 40(9), 1183-1197.
- Paz, M. F., Fraga, M. F., Avila, S., Guo, M., Pollan, M., Herman, J. G., & Esteller, M. (2003). A Systematic Profile of DNA Methylation in Human Cancer Cell Lines1. *Cancer research*, 63(5), 1114-1121.
- Pechova, A., & Pavlata, L. (2007). Chromium as an essential nutrient: a review. *Veterinárni medicína*, 52(1), 1-18.
- Peng, D., Ge, G., Gong, Y., Zhan, Y., He, S., Guan, B., Li, Y., Xu, Z., Hao, H., He, Z., Xiong, G., Zhang, C., Shi, Y., Zhou, Y., Ci, W., Li, X., & Zhou, L. (2018). Vitamin C increases 5-hydroxymethylcytosine level and inhibits the growth of bladder cancer. *Clinical Epigenetics*, 10(1), 94.
- Peterson-Roth, E., Reynolds, M., Quievryn, G., & Zhitkovich, A. (2005). Mismatch Repair Proteins Are Activators of Toxic Responses to Chromium-DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology*, 25(9), 3596-3607.
- Pratheeshkumar, P., Son, Y. O., Divya, S. P., Roy, R. V., Hitron, J. A., Wang, L., Kim, D., Dai, J., Asha, P., Zhang, Z., Wang, Y., & Shi, X. (2014). Luteolin inhibits Cr(VI)-induced malignant cell transformation of human lung epithelial cells by targeting ROS mediated multiple cell signaling pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 281(2), 230-241.
- Quievryn, G., Messer, J., & Zhitkovich, A. (2002). Carcinogenic Chromium(VI) Induces Cross-Linking of Vitamin C to DNA *in Vitro* and in Human Lung A549 Cells. *Biochemistry*, 41(9), 3156-3167.
- Quievryn, G., Peterson, E., Messer, J., & Zhitkovich, A. (2003). Genotoxicity and Mutagenicity of Chromium(VI)/Ascorbate-Generated DNA Adducts in Human and Bacterial Cells. *Biochemistry*, 42(4), 1062-1070.

- Quievryn, G., Messer, J., & Zhitkovich, A. (2006). Lower mutagenicity but higher stability of Cr–DNA adducts formed during gradual chromate activation with ascorbate. *Carcinogenesis*, 27(11), 2316–2321.
- Ramazi, S., Allahverdi, A., & Zahiri, J. (2020). Evaluation of post-translational modifications in histone proteins: A review on histone modification defects in developmental and neurological disorders. *Journal of Biosciences*, 45(1), 135.
- Reddel, R. R., Ke, Y., Gerwin, B. I., McMenamin, M. G., Lechner, J. F., Su, R. T., Brash, D. E., Park, J.-B., Rhim, J. S., & Harris, C. C. (1988). Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer research*, 48(7), 1904–1909.
- Reinhold, A. K., Jentho, E., Schäfer, S. T., Bauer, M., & Rittner, H. L. (2018). Epigenetik. *Der Anaesthetist*, 67(4), 246–254.
- Reynolds, M., Stoddard, L., Bepalov, I., & Zhitkovich, A. (2007). Ascorbate acts as a highly potent inducer of chromate mutagenesis and clastogenesis: linkage to DNA breaks in G2 phase by mismatch repair. *Nucleic Acids Research*, 35(2), 465–476.
- Reynolds, M., Armknecht, S., Johnston, T., & Zhitkovich, A. (2012). Undetectable role of oxidative DNA damage in cell cycle, cytotoxic and clastogenic effects of Cr(VI) in human lung cells with restored ascorbate levels. *Mutagenesis*, 27(4), 437–443.
- Rodrigues, C. F., Urbano, A. M., Matoso, E., Carreira, I., Almeida, A., Santos, P., Botelho, F., Carvalho, L., Alves, M., Monteiro, C., Costa, A. N., Moreno, V., & Alpoim, M. C. (2009). Human bronchial epithelial cells malignantly transformed by hexavalent chromium exhibit an aneuploid phenotype but no microsatellite instability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 670(1-2), 42–52.
- Russo, R. C., Garcia, C. C., Teixeira, M. M., & Amaral, F. A. (2014). The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert review of clinical immunology*, 10(5), 593–619.
- Ryuno, H., Naguro, I., & Kamiyama, M. (2017). ASK family and cancer. *Advances in Biological Regulation*, 66, 72–84.
- Sánchez, R., Pantoja-Uceda, D., Prieto, J., Diercks, T., Marcaida, M. J., Montoya, G., Campos-Olivas, R., & Blanco, F. J. (2010). Solution structure of human growth arrest and DNA damage 45 $\alpha$  (Gadd45 $\alpha$ ) and its interactions with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Aurora A kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 285(29), 22196–22201.
- Savinova, O. V., Hoffmann, A., & Ghosh, G. (2009). The Nfkb1 and Nfkb2 proteins p105 and p100 function as the core of high-molecular-weight heterogeneous complexes. *Molecular cell*, 34(5), 591–602.
- Schnekenburger, M., Talaska, G., & Puga, A. (2007). Chromium Cross-Links Histone Deacetylase 1-DNA Methyltransferase 1 Complexes to Chromatin, Inhibiting Histone-Remodeling Marks Critical for Transcriptional Activation. *Molecular and Cellular Biology*, 27(20), 7089–7101.
- Schumacher, P., Fischer, F., Sann, J., Walter, D., & Hartwig, A. (2022). Impact of Nano- and Micro-Sized Chromium(III) Particles on Cytotoxicity and Gene Expression Profiles Related to Genomic Stability in Human Keratinocytes and Alveolar Epithelial Cells. *Nanomaterials (Basel)*, 12(8), 1294.
- Shanker, A. K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., & Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment International*, 31(5), 739–753.

- Siegfried, Z., & Simon, I. (2010). DNA methylation and gene expression. *WIREs Systems Biology and Medicine*, 2(3), 362-371.
- Singh, N., Nambiar, D., Kale, R. K., & Singh, R. P. (2013). Usnic Acid Inhibits Growth and Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Lung Carcinoma A549 Cells. *Nutrition and Cancer*, 65(sup1), 36-43.
- Speer, R. M., Wise, S. S., Croom-Perez, T. J., Aboueissa, A.-M., Martin-Bras, M., Barandiaran, M., Bermúdez, E., & Wise, J. P. (2019). A comparison of particulate hexavalent chromium cytotoxicity and genotoxicity in human and leatherback sea turtle lung cells from a one environmental health perspective. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 376, 70-81.
- Stöber, S., Lumpp, T., Fischer, F., Gunesch, S., Schumacher, P., & Hartwig, A. (2023). Effect of Long-Term Low-Dose Arsenic Exposure on DNA Methylation and Gene Expression in Human Liver Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(20), 15238.
- Sun, H., Zhou, X., Chen, H., Li, Q., & Costa, M. (2009). Modulation of histone methylation and MLH1 gene silencing by hexavalent chromium. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 237(3), 258-266.
- Sun, Q., Huang, S., Wang, X., Zhu, Y., Chen, Z., & Chen, D. (2015). N6-methyladenine functions as a potential epigenetic mark in eukaryotes. *BioEssays*, 37(11), 1155-1162.
- Suzuki, H., Chiba, T., Suzuki, T., Fujita, T., Ikenoue, T., Omata, M., Furuichi, K., Shikama, H., & Tanaka, K. (2000). Homodimer of two F-box proteins  $\beta$ TrCP1 or  $\beta$ TrCP2 binds to I $\kappa$ B $\alpha$  for signal-dependent ubiquitination. *Journal of Biological Chemistry*, 275(4), 2877-2884.
- Takahashi, Y., Kondo, K., Hirose, T., Nakagawa, H., Tsuyuguchi, M., Hashimoto, M., Sano, T., Ochiai, A., & Monden, Y. (2005). Microsatellite instability and protein expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1, of lung cancer in chromate-exposed workers. *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, 42(3), 150-158.
- Thompson, C. M., Fedorov, Y., Brown, D. D., Suh, M., Proctor, D. M., Kuriakose, L., Haws, L. C., & Harris, M. A. (2012). Assessment of Cr(VI)-Induced Cytotoxicity and Genotoxicity Using High Content Analysis. *PLoS One*, 7(8), e42720.
- Tomkinson, A. E., Vijayakumar, S., Pascal, J. M., & Ellenberger, T. (2006). DNA Ligases: Structure, Reaction Mechanism, and Function. *Chemical Reviews*, 106(2), 687-699.
- Toraño, E. G., García, M. G., Fernández-Morera, J. L., Niño-García, P., & Fernández, A. F. (2016). The Impact of External Factors on the Epigenome: In Utero and over Lifetime. *BioMed Research International*, 2016, 2568635.
- Tsuboi, M., Kondo, K., Soejima, S., Kajiura, K., Kawakita, N., Toba, H., Kawakami, Y., Yoshida, M., Takizawa, H., & Tangoku, A. (2020). Chromate exposure induces DNA hypermethylation of the mismatch repair gene MLH1 in lung cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 59(1), 24-31.
- Tully, D. B., Collins, B. J., Overstreet, J. D., Smith, C. S., Dinse, G. E., Mumtaz, M. M., & Chapin, R. E. (2000). Effects of Arsenic, Cadmium, Chromium, and Lead on Gene Expression Regulated by a Battery of 13 Different Promoters in Recombinant HepG2 Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 168(2), 79-90.
- Tutty, M. A., Holmes, S., & Prina-Mello, A. (2023). Cancer Cell Culture: The Basics and Two-Dimensional Cultures. In D. Movia & A. Prina-Mello (Hrsg.), *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* (S. 3-40). Springer US.
- Upadhyay, S., & Palmberg, L. (2018). Air-Liquid Interface: Relevant *In Vitro* Models for Investigating Air Pollutant-Induced Pulmonary Toxicity. *Toxicological Sciences*, 164(1), 21-30.

- Vucic, D., Dixit, V. M., & Wertz, I. E. (2011). Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *12*(7), 439-452.
- Wakeman, T. P., Kim, W.-J., Callens, S., Chiu, A., Brown, K. D., & Xu, B. (2004). The ATM-SMC1 pathway is essential for activation of the chromium[VI]-induced S-phase checkpoint. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *554*(1), 241-251.
- Wang, Y., Wu, W., Yao, C., Lou, J., Chen, R., Jin, L., Wu, N., Gao, M., Song, P., Tan, Y., & Liu, K. (2016). Elevated tissue Cr levels, increased plasma oxidative markers, and global hypomethylation of blood DNA in male Sprague-Dawley rats exposed to potassium dichromate in drinking water. *Environmental Toxicology*, *31*(9), 1080-1090.
- Wang, Z., Wu, J., Humphries, B., Kondo, K., Jiang, Y., Shi, X., & Yang, C. (2018). Upregulation of histone-lysine methyltransferases plays a causal role in hexavalent chromium-induced cancer stem cell-like property and cell transformation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *342*, 22-30.
- Wang, Z., & Yang, C. (2023). Chapter Eight - Epigenetic and epitranscriptomic mechanisms of chromium carcinogenesis. In M. Costa (Hrsg.), *Advances in Pharmacology* (Bd. 96, S. 241-265). Academic Press.
- Weber, A., Wasiliew, P., & Kracht, M. (2010). Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Science Signaling*, *3*(105), cm1-cm1.
- Wei, Y., Schatten, H., & Sun, Q.-Y. (2014). Environmental epigenetic inheritance through gametes and implications for human reproduction. *Human Reproduction Update*, *21*(2), 194-208.
- Wilson, R. C., & Doudna, J. A. (2013). Molecular Mechanisms of RNA Interference. *Annual Review of Biophysics*, *42*(1), 217-239.
- Wisdom, R., Johnson, R. S., & Moore, C. (1999). c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *The EMBO Journal*, *18*(1), 188-197.
- Wise, J. P., Young, J. L., Cai, J., & Cai, L. (2022). Current understanding of hexavalent chromium [Cr(VI)] neurotoxicity and new perspectives. *Environment International*, *158*, 106877.
- Wise, J. P., Sr., Wise, S. S., Holmes, A. L., LaCerte, C., Shaffiey, F., & Aboueissa, A. M. (2010). The cytotoxicity and genotoxicity of hexavalent chromium in Stellar sea lion lung fibroblasts compared to human lung fibroblasts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *152*(1), 91-98.
- Wise, S. S., Holmes, A. L., & Wise, J. P., Sr. (2006). Particulate and soluble hexavalent chromium are cytotoxic and genotoxic to human lung epithelial cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *610*(1-2), 2-7.
- Wise, S. S., Holmes, A. L., & Wise, J. P., Sr. (2008). Hexavalent Chromium-Induced DNA Damage and Repair Mechanisms. *Reviews on Environmental Health*, *23*(1), 39-58.
- Wise, S. S., & Wise, J. P. (2012). Chromium and genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *733*(1), 78-82.
- Wise, S. S., Aboueissa, A. E.-M., Martino, J., & Wise, J. P., Sr. (2018). Hexavalent Chromium-Induced Chromosome Instability Drives Permanent and Heritable Numerical and Structural Changes and a DNA Repair-Deficient Phenotype. *Cancer research*, *78*(15), 4203-4214.
- Wong, V., Armknecht, S., & Zhitkovich, A. (2012). Metabolism of Cr(VI) by ascorbate but not glutathione is a low oxidant-generating process. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *26*(2), 192-196.

- Wu, F., Sun, H., Kluz, T., Clancy, H. A., Kiok, K., & Costa, M. (2012). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) protects against chromate-induced toxicity *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258(2), 166-175.
- Wu, J., Shi, Y., Asweto, C. O., Feng, L., Yang, X., Zhang, Y., Hu, H., Duan, J., & Sun, Z. (2017). Fine particle matters induce DNA damage and G2/M cell cycle arrest in human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(32), 25071-25081.
- Xie, H., Wise, S. S., & Wise, J. P. (2008). Deficient repair of particulate hexavalent chromium-induced DNA double strand breaks leads to neoplastic transformation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 649(1), 230-238.
- Xie, H., Holmes, A. L., Young, J. L., Qin, Q., Joyce, K., Pelsue, S. C., Peng, C., Wise, S. S., Jeevarajan, A. S., Wallace, W. T., Hammond, D., & Wise, J. P. (2009). Zinc chromate induces chromosome instability and DNA double strand breaks in human lung cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 234(3), 293-299.
- Xie, H., Holmes, A. L., Wise, S. S., Young, J. L., Wise, J. T., & Wise, J. P., Sr. (2015). Human Skin Cells Are More Sensitive than Human Lung Cells to the Cytotoxic and Cell Cycle Arresting Impacts of Particulate and Soluble Hexavalent Chromium. *Biological Trace Element Research*, 166(1), 49-56.
- Xie, K. (2001). Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 12(4), 375-391.
- Xiong, J., Liu, X., Cheng, Q. Y., Xiao, S., Xia, L. X., Yuan, B. F., & Feng, Y. Q. (2017). Heavy Metals Induce Decline of Derivatives of 5-Methylcytosine in Both DNA and RNA of Stem Cells. *ACS chemical biology*, 12(6), 1636-1643.
- Yang, S.-M., Kim, B. J., Norwood Toro, L., & Skoultchi, A. I. (2013). H1 linker histone promotes epigenetic silencing by regulating both DNA methylation and histone H3 methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(5), 1708-1713.
- Ye, J., & Shi, X. (2001). Gene expression profile in response to chromium-induced cell stress in A549 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 222(1), 189-197.
- Yin, R., Mao, S. Q., Zhao, B., Chong, Z., Yang, Y., Zhao, C., Zhang, D., Huang, H., Gao, J., Li, Z., Jiao, Y., Li, C., Liu, S., Wu, D., Gu, W., Yang, Y. G., Xu, G. L., & Wang, H. (2013). Ascorbic acid enhances Tet-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals. *Journal of the American Chemical Society*, 135(28), 10396-10403.
- Yin, X., Chen, K., Cheng, H., Chen, X., Feng, S., Song, Y., & Liang, L. (2022). Chemical Stability of Ascorbic Acid Integrated into Commercial Products: A Review on Bioactivity and Delivery Technology. *Antioxidants*, 11(1), 153.
- Young, J. I., Züchner, S., & Wang, G. (2015). Regulation of the Epigenome by Vitamin C. *Annual Review of Nutrition*, 35(1), 545-564.
- Zerbini, L. F., & Libermann, T. A. (2005). Life and Death in Cancer GADD45 alpha and gamma are Critical Regulators of NF-kappaB Mediated Escape from Programmed Cell Death. *Cell Cycle*, 4(1), 18-20.
- Zhang, Y., Zhang, Y., Zhong, C., & Xiao, F. (2016). Cr(VI) induces premature senescence through ROS-mediated p53 pathway in L-02 hepatocytes. *Scientific Reports*, 6(1), 34578.
- Zhang, Y., Zheng, P., Su, Z., Hu, G., & Jia, G. (2021). Perspectives of Genetic Damage and Epigenetic Alterations by Hexavalent Chromium: Time Evolution Based on a Bibliometric Analysis. *Chemical Research in Toxicology*, 34(3), 684-694.

- Zhang, Z., Leonard, S. S., Wang, S., Vallyathan, V., Castranova, V., & Shi, X. (2001). Cr (VI) induces cell growth arrest through hydrogen peroxide-mediated reactions. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 222(1-2), 77-83.
- Zhao, L., Islam, R., Wang, Y., Zhang, X., & Liu, L.-Z. (2022). Epigenetic Regulation in Chromium-, Nickel- and Cadmium-Induced Carcinogenesis. *Cancers*, 14(23), 5768.
- Zhao, Z., & Shilatifard, A. (2019). Epigenetic modifications of histones in cancer. *Genome Biology*, 20(1), 245.
- Zheng, P., Kang, Y., Han, S., Feng, H., Ha, F., Long, C., Zhou, D., Hu, G., Chen, Z., Wang, Z., Wang, T., & Jia, G. (2021). A Novel Transcriptome Integrated Network Approach Identifies the Key Driver lncRNA Involved in Cell Cycle With Chromium (VI)-Treated BEAS-2B Cells. *Frontiers in Genetics*, 11, 597803.
- Zhitkovich, A. (2005). Importance of Chromium–DNA Adducts in Mutagenicity and Toxicity of Chromium(VI). *Chemical Research in Toxicology*, 18(1), 3-11.
- Zhitkovich, A., Peterson-Roth, E., & Reynolds, M. (2005). Killing of Chromium-Damaged Cells by Mismatch Repair and its Relevance to Carcinogenesis. *Cell Cycle*, 4(8), 4050-4052.
- Zhitkovich, A. (2011). Chromium in Drinking Water: Sources, Metabolism, and Cancer Risks. *Chemical Research in Toxicology*, 24(10), 1617-1629.
- Zhitkovich, A., Reynolds, M., & Armknecht, S. (2012). Dual role of ascorbate in chromium genotoxicity. *Toxicology Letters*, 211, S72.
- Zhitkovich, A. (2020). Nuclear and Cytoplasmic Functions of Vitamin C. *Chemical Research in Toxicology*, 33(10), 2515-2526.
- Zhitkovich, A. (2021). Ascorbate: antioxidant and biochemical activities and their importance for *in vitro* models. *Archives of Toxicology*, 95(12), 3623-3631.



# 8 ANHANG

## 8.1 Chemikalien und Instrumente

### 8.1.1 Chemikalien

Tabelle 9: Verwendete Chemikalien und deren Hersteller.

Bezeichnung	Hersteller
(L)-Dehydroascorbinsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
2'-DeoxyAdenosin 99 %	Alfa Aesar/ Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
2'-Deoxycytidin $\geq$ 99 %	Sigma-Aldrich (Steinheim)
2'-deoxycytidine 99 %	Alfa Aesar/ Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
2'-Deoxy-Guanosin	Alfa Aesar/ Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco; USA)
2x Assay Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco, USA)
2x TaqMan© PreAmp Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt)
Acetonitril für HPLC MS-Grade	VWR (Radnor, USA)
Agarose Neeo Ultra-Qualität	Roth (Karlsruhe)
Albumin Fraktion V low endotoxin (BSA)	Roth (Karlsruhe)
Ascorbat-Oxidase (von <i>Cucumis sp.</i> )	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bisulfit-Primer	Eurofins Scientific (Luxemburg)
Borsäure $\geq$ 99,8 %	Roth (Karlsruhe)
Calciumchlorid-Dihydrat $\geq$ 95 %	Roth (Karlsruhe)
CASY-TON®	OMNI Life Science (Bremen)
Chromstandard für AAS 1000 mg/L	Roth (Karlsruhe)
Collagen (rat-tail)	Roche (Rotkreuz)
D(+)-Glucose, wasserfrei $\geq$ 99,5 %	Roth (Karlsruhe)
DAPI (CyStain® DNA/Protein)	Sysmex (Kobe, JP)
DDB	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Diethylentriaminopentaessigsäure	VWR (Radnor, USA)

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
di-Kaliumhydrogenphosphat $\geq 99\%$	Roth (Karlsruhe)
di-Natriumhydrogenphosphat $\geq 99\%$	Roth (Karlsruhe)
di-Natriumhydrogenphosphat $\geq 99,9\%$	Roth (Karlsruhe)
DMSO $\geq 99,9\%$	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DNA Away	Roth (Karlsruhe)
DNA-Suspensionspuffer	TEKnova (Hollister, USA)
dNTP-Mix 10 mM	Quiagen (Hilden)
EDTA $\geq 99\%$	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure 100 %	Merck (Darmstadt)
Ethanol (reinst), 99,9 %	Roth (Karlsruhe)
Ethanol (vergällt), 96 %	BrüggemannAlcohol (Heilbronn)
Exonuklease Reaktionspuffer	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Exonuklease I, 20 U/ $\mu$ L	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
FACSFlow	BD (Heidelberg)
FACSRinse	BD (Heidelberg)
Fetales Kälberserum	Gibco (Carlsbad, USA)
Fibronectin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Gel Loading Dye, purple (6x)	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
Gel Red <sup>®</sup>	Biotium (Haywards, USA)
HEPES $\geq 99,5\%$	Roth (Karlsruhe)
IFC Control Line Fluid	Fluidigm (San Francisco, USA)
Kaliumchlorid $\geq 99,5\%$	Roth (Karlsruhe)
Kaliumdichromat $\geq 99,5\%$	Roth (Karlsruhe)
KGM	Lonza (Basel)
L(+)-Ascorbinsäure, Natriumsalz $\geq 99\%$	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid $\geq 98,5\%$	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid 50 mM	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Magnesiumnitrat 10 g / L	PerkinElmer (Waltham)
Magnesiumsulfat	VWR (Radnor, USA)
Methanol für HPLC	VWR (Radnor, USA)
Methansulfonsäure $\geq 99,9\%$	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumacetat $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumacetat-Trihydrat $\geq 99,9\%$	VWR (Radnor, USA)
Natriumchlorid $\geq 99,5\%$	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid $\geq 99,5\%$	Roth (Karlsruhe)
Nukleosid-Digestion Mix	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
Orthophosphorsäure 85 %	VWR (Radnor, USA)

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
PCR-Puffer (10x)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
PCR-zertifiziertes Wasser	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Penicillin/Streptomycin-Lösung (Penicillin: 5000 U/mL; Streptomycin: 5 mg/L)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Platinum Taq DNA Polymerase	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Primer-Paare	Fluidigm (San Francisco) Eurofins Scientific (Luxemburg)
Purple 100 bp Ladder	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
RPMI-1640	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Salpetersäure 69 %	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure 30 %	Roth (Karlsruhe)
SsoFast™ EvaGreen© Supermix with Low ROX	BioRad (München)
Taq $\alpha$ 1	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Taq $\alpha$ 1 - Puffer	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
TE-Puffer	TEKnova (Hollister, USA)
Thymidin 99 %	Alfa Aesar/ Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat $\geq$ 99 %	Roth (Karlsruhe)
TRIS $\geq$ 99,9 %	Roth (Karlsruhe)
Trypsin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck (Darmstadt)

## 8.1.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 10: Verwendete Puffer und Lösungen und deren Zusammensetzung.

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Färbelösung für Ascorbinsäure-Messung	250 $\mu$ L DDB (2 mM) 250 $\mu$ M Natriumacetat (200 mM) 200 $\mu$ L Ascorbat-Oxidase 300 $\mu$ L bidest H <sub>2</sub> O
Krebs-HEPES-Puffer	30 mM HEPES 130 mM Natriumchlorid 4 mM Kaliumhydrogenphosphat 1 mM Magnesiumsulfat 1 mM Calciumchlorid 0,5 mM Glucose

<b>Puffer/Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Methansulfonsäurelösung	162 µL Methansulfonsäure 98,3 mg Diethylentriaminopentaessigsäure In 50 mL bidest H <sub>2</sub> O
Natriumacetat-Puffer	50 mL Natriumacetat pH=4
PBS	100 mM Natriumchlorid 4,5 mM Kaliumchlorid 7 mM Natriumhydrogenphosphat 3 mM Kaliumhydrogenphosphat pH=7,4
PBS-EDTA	0,5 mM EDTA in PBS pH=7,4
TBE-Puffer	89 mM TRIS 89 mM Borsäure 2 mM EDTA pH=8
Trypsin-Lösung	0,25 % Trypsin in PBS-EDTA

### 8.1.3 Verwendete Kits

Tabelle 11: Verwendete Kits und deren Hersteller.

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay	Promega (Madison, USA)
EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit	Quiagen (Hilden)
Monarch gDNA Purification Kit	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up kit	Machery-Nagel (Düren)
Nucleo Spin® RNA Plus Kit	Machery-Nagel (Düren)
Nucleoside Digestion Mix	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
qScript™ cDNA Synthesis Kit	QuantaBio (Beverly, USA)

## 8.1.4 Instrumente & Software

Tabelle 12: Verwendete Instrumente und Software und deren Hersteller.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Atomabsorptionsspektrometer PinAAcle 900T	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Autoklav D-150	Systemec GmbH (Linden)
Biofreezer Herafreeze Top	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Biomark	Fluidigm (San Francisco, USA)
Brutschrank Heracell 150i	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
CASY® TTC Cell Counter & Analyser System	Roche (Mannheim)
Centrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)
Cryo 1 °C Cooler	VWR (Darmstadt)
Feinwaage BP 61 S	Sartorius (Göttingen)
Heißluftsterilisator	Memmert (Büchenbach)
Heizschüttler Thermomixer C	Eppendorf (Hamburg)
HPLC-Trennsäule, Luna 5 u C18(2), 250 x 4,60 mm	Phenomenex (Aschaffenburg)
HPLC-Vorsäule Luna 5 u C18(2) 100 A, 30 x 4,6 mm	Phenomenex (Aschaffenburg)
HPLC-Pumpe Ultimate 3000	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
HPLC-Sampler Ultimate 3000 (semipräparativ)	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
HPLC-RS Fluoreszenzdetektor Ultimate 3000	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
HPLC-RS VWD-Detektor Ultimate 3000	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
IFC Controller HX	Fluidigm (San Francisco, USA)
LAS-3000 Luminescent Image Analyzer	Fujifilm (Tokio, JP)
Megafuge 1.0	Heraeus (Hanau)
Mikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss AG (Feldbach)
Multipipette 30-300 µL	Eppendorf (Hamburg)
Multipipette RANIN Pipet Lite XLS® 0,5-10 µL	Mettler Toledo (Gießen)
NanoQuant Platte	Tecan Group (Crailsheim)
PCR Workstation Pro	Peqlab (Erlangen)
pH-Meter 3210	WTW (Weilheim)
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Pipette 1000-5000 µL	Eppendorf (Hamburg)
Pipette 100-1000 µL	Eppendorf (Hamburg)
Pipette 10-100 µL	Eppendorf (Hamburg)
Pipette 1-10 µL	Eppendorf (Hamburg)
Pipette 20-200 µL	Eppendorf (Hamburg)
Pipette 2-20 µL	Eppendorf (Hamburg)

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Pipette 0,5-2,5 µL	Eppendorf (Hamburg)
Pipette 500-5000 µL	Brand (Wertheim)
Reinstwasseranlage Mill-Q	Merck-Millipore (Darmstadt)
Software "AIDA Imaga Analyzer"	Raytest (Straubenhardt)
Software "Chromeleon"	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Software "Fluidigm Real Time PCR Analysis"	Fluidigm (San Francisco, USA)
Software "GenEx"	MultiD Analyses (Göteborg, SE)
Software "Tecan iControl 1.10"	Tecan Group (Crailsheim)
Sterilwerkbank HERAsafeKS	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
T100 Thermal Cycler	BioRad (München)
Tecan Infinite M200 PRO	Tecan Group (Crailsheim)
Tischzentrifuge für Eppendorfgefäße	VWR (Darmstadt)
Vortex-Genie 2T	Scientific Industries (New York, USA)
Waage VWR 1502	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	Memmert (Schwabach)

### 8.1.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 13: Verwendete Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
1,2 mL Sample Cups	Perkin Elmer (Waltham, USA)
2,5 mL Sample Cups	Perkin Elmer (Waltham, USA)
96-well Platten white bottom	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Casy-Cups	Roche (Mannheim)
Dichtscheibe Sil/PTFE 0,9 mm	CZT (Kriftel)
Dynamic Array IFC	Fluidigm (San Francisco, USA)
Einmalspritzen Omnifix (10 mL)	Braun (Melsungen)
Eppendorf-Reaktionsgefäß (2 mL)	Eppendorf (Hamburg)
Graphitrohr	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Handschuhe TouchNTuff	Ansell (Brüssel, BE)
HPLC-Gewindeglasflaschen	CZT (Kriftel)
Mikroinsert 0,2 mL 31 x 5 mm	LLG Labware (Meckenheim)
Kanülen 1,2 x 40 mm	Braun (Melsungen)
Kryoröhrchen mit Gewinde	Sarstedt (Nümbrecht)
Mikroreaktionsgefäß (1,5 mL)	Brand (Wertheim)

---

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Multiply® $\mu$ -Strip (0,2-Kette) + Deckel	Sarstedt (Nümbrecht)
Multiply® Pro-Gefäße (0,5 mL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Parafilm	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Pipettenspitzen 0,5-10 $\mu$ L	Brand (Wertheim)
Pipettenspitzen 100-1000 $\mu$ L	Brand (Wertheim)
Pipettenspitzen 20 $\mu$ L	Mettler-Toledo (Gießen)
Pipettenspitzen 2-200 $\mu$ L	Brand (Wertheim)
Pipettenspitzen 500-5000 $\mu$ L	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen 500-5000 $\mu$ L	Brand (Wertheim)
Schraubkappen für HPLC-Gewindeglasflaschen	CZT (Kriftel)
Sterilfilter	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Sterilindikatorband Autoklav	Roth (Karlsruhe)
Sterilindikatorband Heißluftsterilisator	Roth (Karlsruhe)
Wägeschiffchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturflasche 150 cm <sup>2</sup>	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturflasche 25 cm <sup>2</sup>	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturschalen (150 mm, 100 mm, 60 mm, 35 mm)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL)	LLG Labware (Meckenheim)

---

## 8.2 Ergänzende Daten

### 8.2.1 Genliste der ht-RT-qPCR

Tabelle 14: Übersicht über die in der ht-RT-qPCR untersuchten Gene und deren codierte Proteine.

<b>Gen</b>	<b>Codiertes Protein</b>
<i>ACTB</i>	B-actin (ACTB)
<i>APAF1</i>	apoptotic protease activating factor (APAF1)
<i>ATM</i>	ataxia telangiectasia mutated (ATM)
<i>ATR</i>	ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR)
<i>B2M</i>	beta-2-microglobulin (B2M)
<i>BAX</i>	bcl2-associated x protein (BAX)
<i>BRCA1</i>	breast cancer 1, early onset (BRCA1)
<i>BRCA2</i>	breast cancer 2, early onset (BRCA2)
<i>BTRC</i>	transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase, beta ( $\beta$ -TrCP)
<i>CAT</i>	catalase (CAT)
<i>CCL22</i>	C-C motif chemokine ligand 22 (CCL22)
<i>CCND1</i>	cyclin D1 (CCND1)
<i>CDKN1A</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)
<i>CDKN1B</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27)
<i>CDKN2A</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16)
<i>CDKN2B</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15)
<i>CDKN2D</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19)
<i>COX2</i>	prostaglandin G/H synthase 2 (PTGS2/COX2)
<i>DDB2</i>	damage-specific DNA binding protein 2 (DDB2)
<i>DDIT3</i>	growth arrest and DNA damage-inducible protein (GADD153)
<i>DNMT1</i>	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1 (DNMT1)
<i>DNMT3a</i>	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3a (DNMT3a)
<i>DNMT3b</i>	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3b (DNMT3b)
<i>E2F1</i>	E2F transcription factor 1 (E2F1)
<i>EGFR</i>	epidermal growth factor receptor (EGFR)
<i>EHMT2</i>	euchromatic Histone-lysine N-methyltransferase (G9a)
<i>EP300</i>	E1A binding protein (p300)
<i>ERCC2</i>	excision repair cross-complementation group 2 (XPB)
<i>ERCC4</i>	excision repair cross-complementation group 4 (XPF)
<i>ERCC5</i>	excision repair cross-complementation group 5 (XPG)
<i>FOXO1</i>	forkhead box O1 (FOXO1)
<i>FOXO3</i>	forkhead box O3 (FOXO3)



<b>Gen</b>	<b>Codiertes Protein</b>
<i>FTH1</i>	ferritin, heavy polypeptide 1 (FTH1)
<i>G6PD</i>	glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)
<i>GADD45A</i>	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (GADD45A)
<i>GAPDH</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)
<i>GCLC</i>	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit (GCL)
<i>GPX1</i>	glutathione peroxidase 1 (GPX1)
<i>GPX2</i>	glutathione peroxidase 2 (GPX2)
<i>GSR</i>	glutathione reductase (GSR)
<i>GUSB</i>	glucuronidase, beta (GUSB)
<i>HDAC1</i>	Histone deacetylase 1 (HDAC1)
<i>HDAC2</i>	Histone deacetylase 1 (HDAC2)
<i>HDAC3</i>	Histone deacetylase 1 (HDAC3)
<i>HDAC10</i>	Histone deacetylase 1 (HDAC10)
<i>HMOX1</i>	heme oxygenase (decycling) 1 (hMO-1)
<i>HPRT1</i>	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)
<i>HSPA1A</i>	heat shock 70kDa protein 1A (HSP70)
<i>IL1a</i>	interleukin 1 alpha (IL1a)
<i>IL1b</i>	interleukin 1 betha (IL1b)
<i>IL6</i>	interleukin 6 (IL6)
<i>IL8</i>	interleukin 8 (IL8)
<i>JUN</i>	jun proto-oncogene (c-JUN)
<i>KDM3A</i>	lysine-specific demethylase 3A (KDM3A)
<i>KEAP1</i>	kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1)
<i>LIG1</i>	ligase I, DNA, ATP-dependent (LIG1)
<i>LIG3</i>	ligase III, DNA, ATP-dependent (LIG3)
<i>MAP3K5</i>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 (MAP3K5/ASK1)
<i>MBD4</i>	methyl-CpG binding domain protein 4 (MBD4)
<i>MDM2</i>	mouse double minute 2 homolog proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase (MDM2)
<i>MECP2</i>	Methyl CpG binding protein 2 (MeCP2)
<i>MGMT</i>	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)
<i>MLH1</i>	mutL homolog 1 (MLH1)
<i>MSH2</i>	mutS homolog 2 (MSH2)
<i>MT1X</i>	metallothionein 1X (MT1X)
<i>MT2A</i>	metallothionein 2A (MT2A)
<i>MYC</i>	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (c-MYC)

<b>Gen</b>	<b>Codiertes Protein</b>
<i>NFKB1</i>	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p50/p105)
<i>NFKB2</i>	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)
<i>NFKBIA</i>	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (IKBA)
<i>OGG1</i>	8-oxoguanine DNA glycosylase (hOGG1)
<i>PARP1</i>	Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1)
<i>PLK3</i>	polo-like kinase 3 (PLK3)
<i>PPM1D</i>	protein phosphatase, mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> dependent, 1D (PPM1D)
<i>PRDX1</i>	peroxiredoxin 1 (PRX1)
<i>RAD50</i>	RAD50 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ) (RAD50)
<i>RAD51</i>	RAD51 recombinase (RAD51)
<i>RRM2B</i>	ribonucleotide reductase M2B (TP53 inducible) (p53R2)
<i>SETD2</i>	SET domain containing 2, histone-lysine N-methyltransferase (SETD2)
<i>SIRT2</i>	sirtuin 2 (SIRT2)
<i>SLC30A1</i>	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1 (ZnT1)
<i>SOD1</i>	superoxide dismutase 1, soluble (SOD1)
<i>SOD2</i>	superoxide dismutase 2, mitochondrial (SOD2/MnSOD)
<i>TET1</i>	ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 1 (Tet1)
<i>TET2</i>	ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 2 (Tet2)
<i>TET3</i>	ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 3 (Tet3)
<i>TGFb</i>	transforming growth factor betha (TGFb)
<i>TNFa</i>	tumor necrosis factor alpha (TNFa)
<i>TNFRSF10B</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b (DR5)
<i>TXN</i>	thioredoxin (TXN)
<i>TXNRD1</i>	thioredoxin reductase 1 (TXNRD)
<i>VEGFA</i>	vascular endothelial growth factor A (VEGFA)
<i>XPA</i>	xeroderma pigmentosum, complementation group A (XPA)
<i>XPC</i>	xeroderma pigmentosum, complementation group C (XPC)
<i>XRCC5</i>	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (XRCC5)

## 8.2.2 Chromatogramm mit Nukleosid-Standards

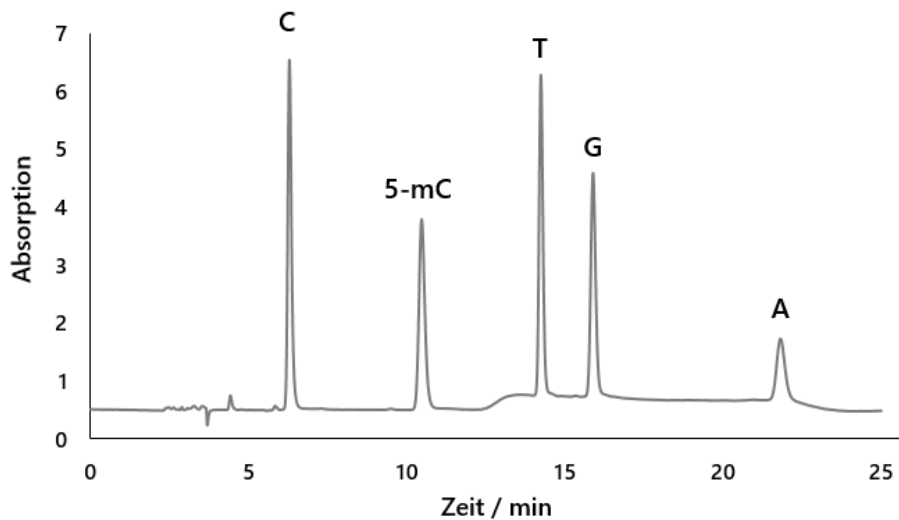


Abbildung 38: Chromatogramm der Auftrennung von Nukleosid-Standards. Die Auftrennung erfolgte an der HPLC auf einer Luna 5u C18(2) 100A Säule und die Detektion der Absorption fand bei 272 nm statt. C: Cytidin, 5mC: 5-Methyl-Cytidin, T: Thymidin, G: Guanosin, A: Adenosin.

## 8.2.3 Nachweis-, Bestimmungs- und Erfassungsgrenze der Chrombestimmung

Die Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze wurden mit der ausführlichen Leerwertmethode entsprechend der DIN 32645 bestimmt. Es wurden 5 Leerwerte hergestellt und deren Chromgehalt jeweils dreimal bestimmt. Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha = 0,01$  und  $k = 3$  gewählt. Die Grenzen sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Tabelle 15: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze der Chrombestimmung mittels GF-AAS nach der ausführlichen Leerwertmethode der DIN 32645.

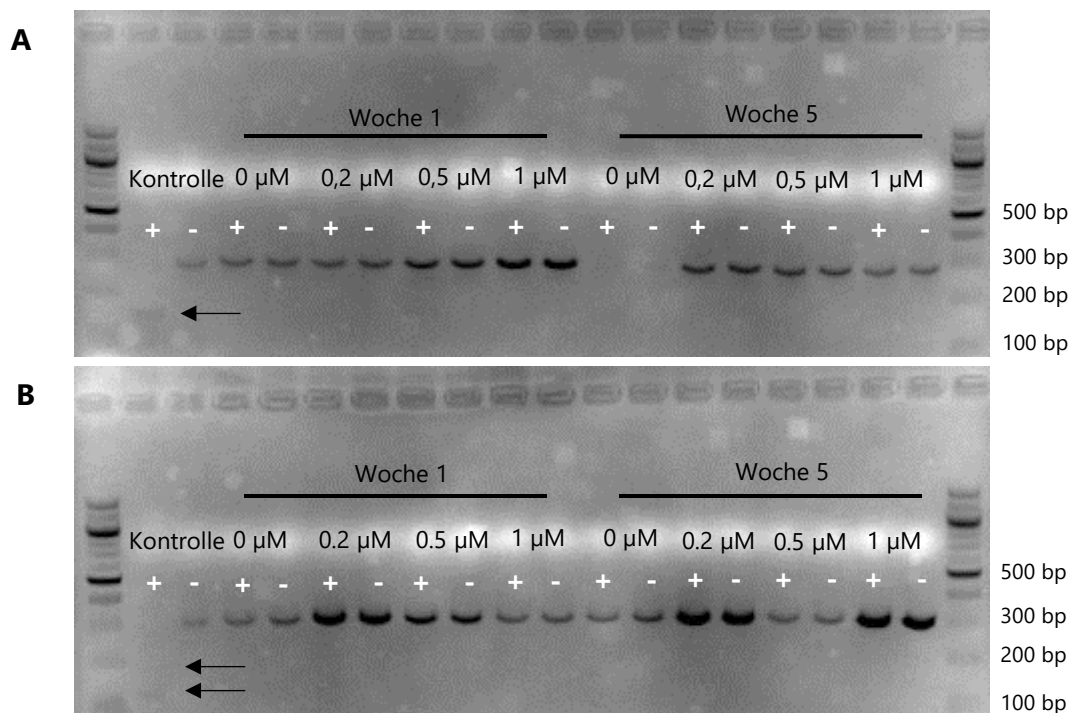
Nachweisgrenze	0,079 $\mu\text{g} / \text{L}$
Erfassungsgrenze	0,158 $\mu\text{g} / \text{L}$
Bestimmungsgrenze	0,291 $\mu\text{g} / \text{L}$

## 8.2.4 Primersequenzen der COBRA-Versuche

Die Primersequenzen für die Analyse mittels COBRA wurden mit dem Programm Meth-Primer erstellt (<https://www.urogene.org/methprimer2/>).

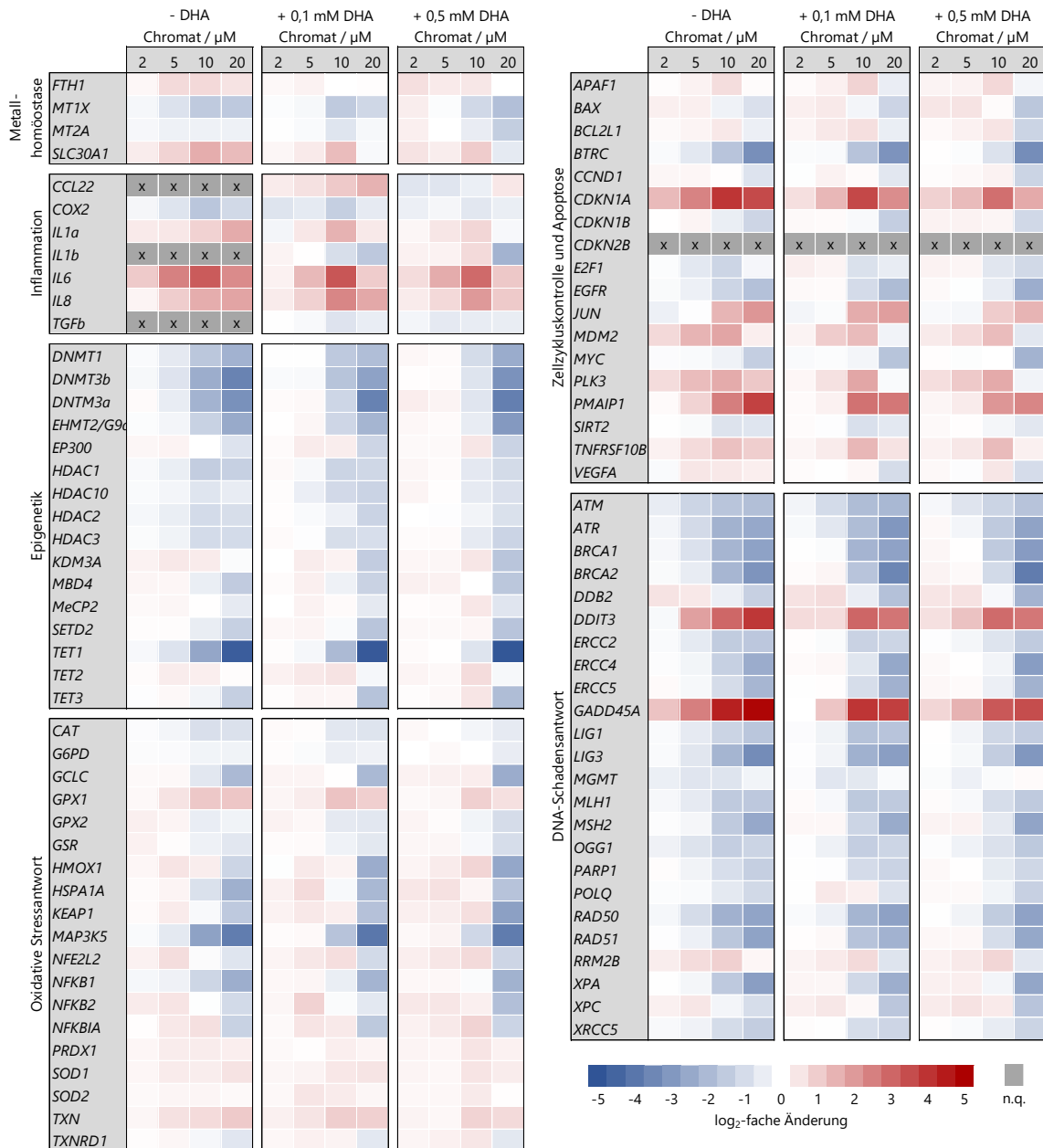
<i>MLH1</i>	<i>forward:</i>	TAAAGAGATGATTGAGAATTGGTA
	<i>reverse:</i>	AAAAAAAAAAACCTAACTAACA
<i>MSH2</i>	<i>forward:</i>	TAGTTTTGGAAGTTGATTGGGTG
	<i>reverse:</i>	ACCCCATATACTTAATCACCCCCTA

## 8.2.5 Agarosegel eines COBRA Versuchs



**Abbildung 39:** Agarosegel eines COBRA Versuchs in *MLH1* (A) und *MSH2* (B). Aufgetragen sind eine methylierte DNA-Kontrolle aus HeLa Zellen sowie die behandelten Zellproben nach einer und fünf Wochen Inkubation. Es kamen Chromatkonzentrationen von 0 µM, 0,2 µM, 0,5 µM und 1 µM zum Einsatz. Die PCR Produkte wurden jeweils mit Restriktionsenzym (+) und ohne Restriktionsenzym (-) verdaut. Die unverdaute Kontrollprobe wies die erwartete Bande des PCR Produkts auf. Die verdauten Kontrollproben zeigen diese Bande nicht, dafür aber die verdauten Fragmente. Die Intensitätsunterschiede der Banden ist auf einen unterschiedlichen DNA-Gehalt zurückzuführen und hat keinen Einfluss auf die Auswertung.

## 8.2.6 Komplette Heatmaps der Genexpressionsanalysen



**Abbildung 40: Genexpressionsprofil von A549-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Kaliumdichromat.** Die Behandlung mit Dehydroascorbinsäure (DHA) fand für 90 min bei 37 °C statt. Eine rote Färbung steht für eine Induktion, eine blaue Färbung für eine Repression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 3 Versuchen. n.q.: nicht quantifizierbar.

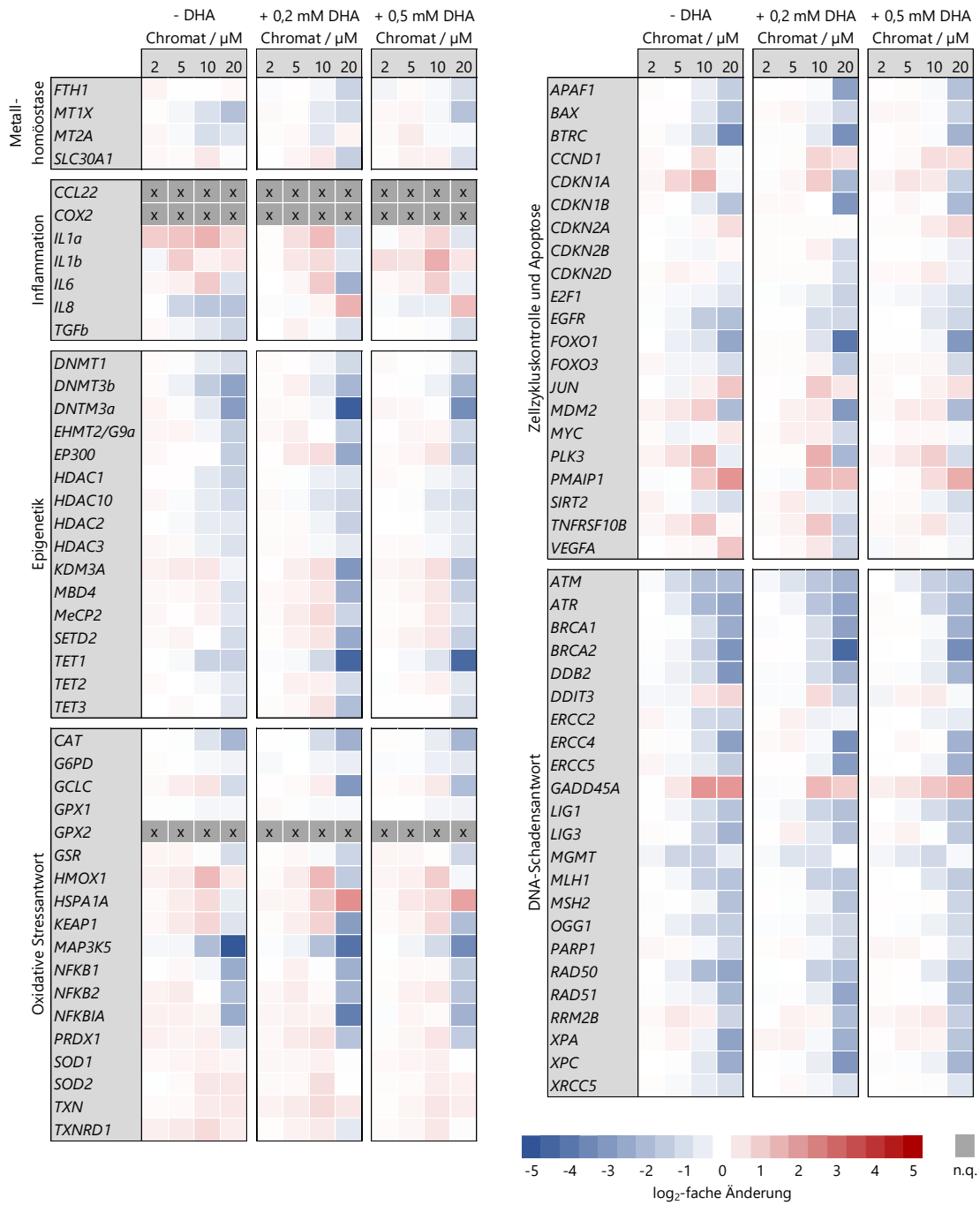


Abbildung 41: Genexpressionsprofil von BEAS-2B-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Kaliumdichromat. Die Behandlung mit Dehydroascorbinsäure (DHA) fand für 90 min bei 37 °C statt. Eine rote Färbung steht für eine Induktion, eine blaue Färbung für eine Repression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 3 Versuchen. n.q.: nicht quantifizierbar.

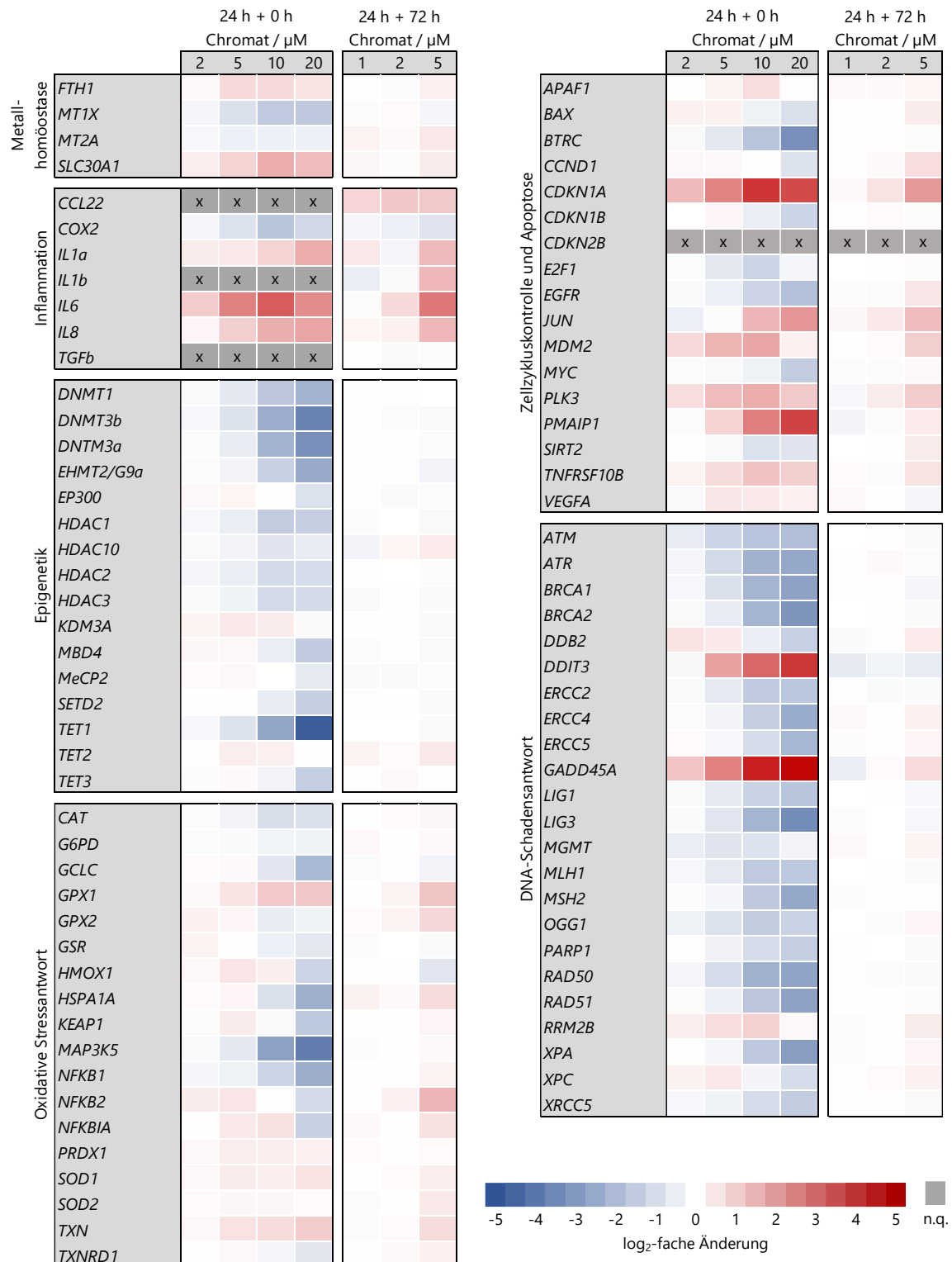


Abbildung 42: Genexpressionsprofil von A549-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Kaliumdichromat und 72-stündiger Nachinkubation. Eine rote Färbung steht für eine Induktion, eine blaue Färbung für eine Repression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 3 Versuchen. n.q.: nicht quantifizierbar.

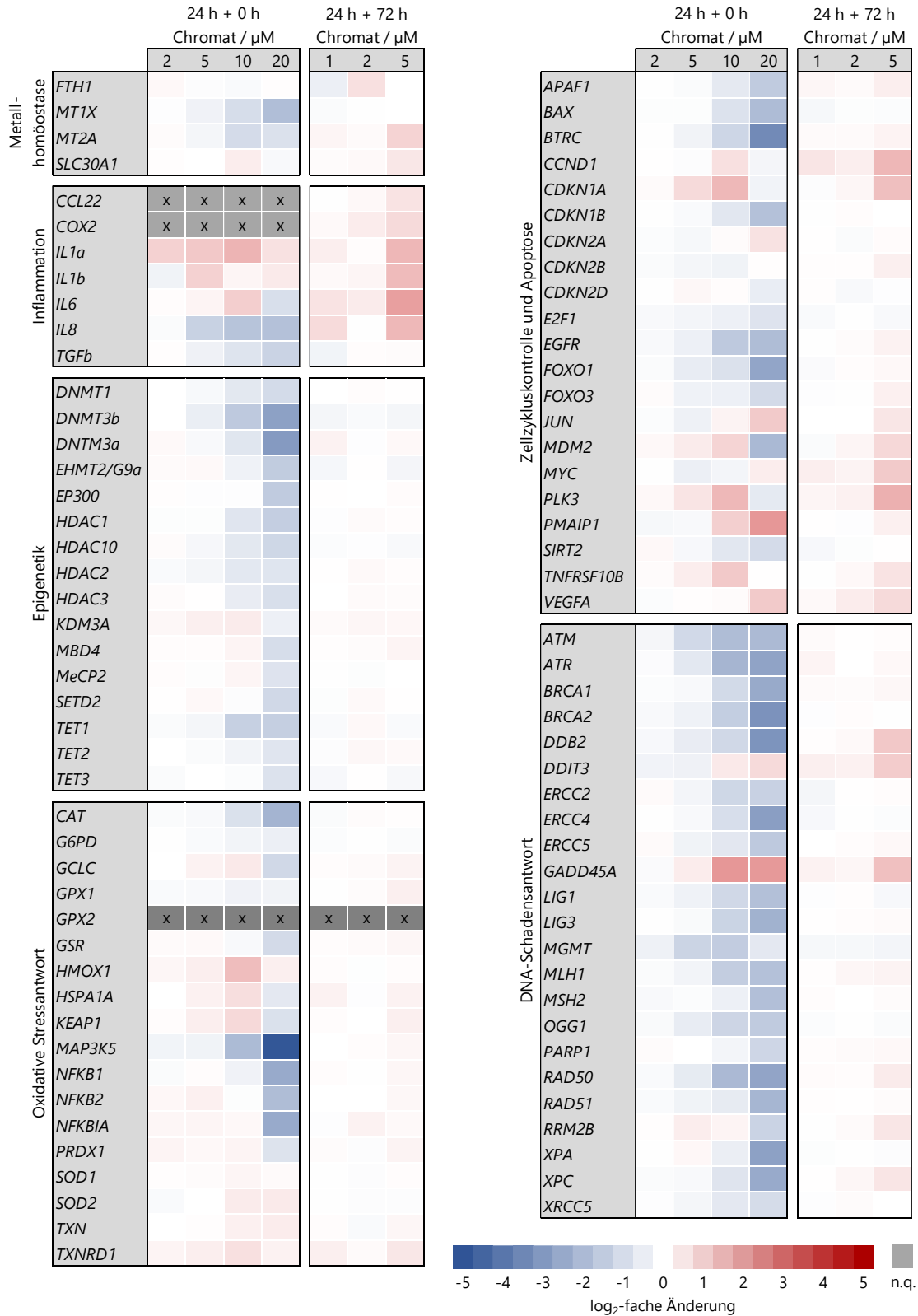


Abbildung 43: Genexpressionsprofil von BEAS-2B-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Kaliumdichromat und 72-stündiger Nachinkubation. Eine rote Färbung steht für eine Induktion, eine blaue Färbung für eine Repression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 3 Versuchen. n.q.: nicht quantifizierbar.



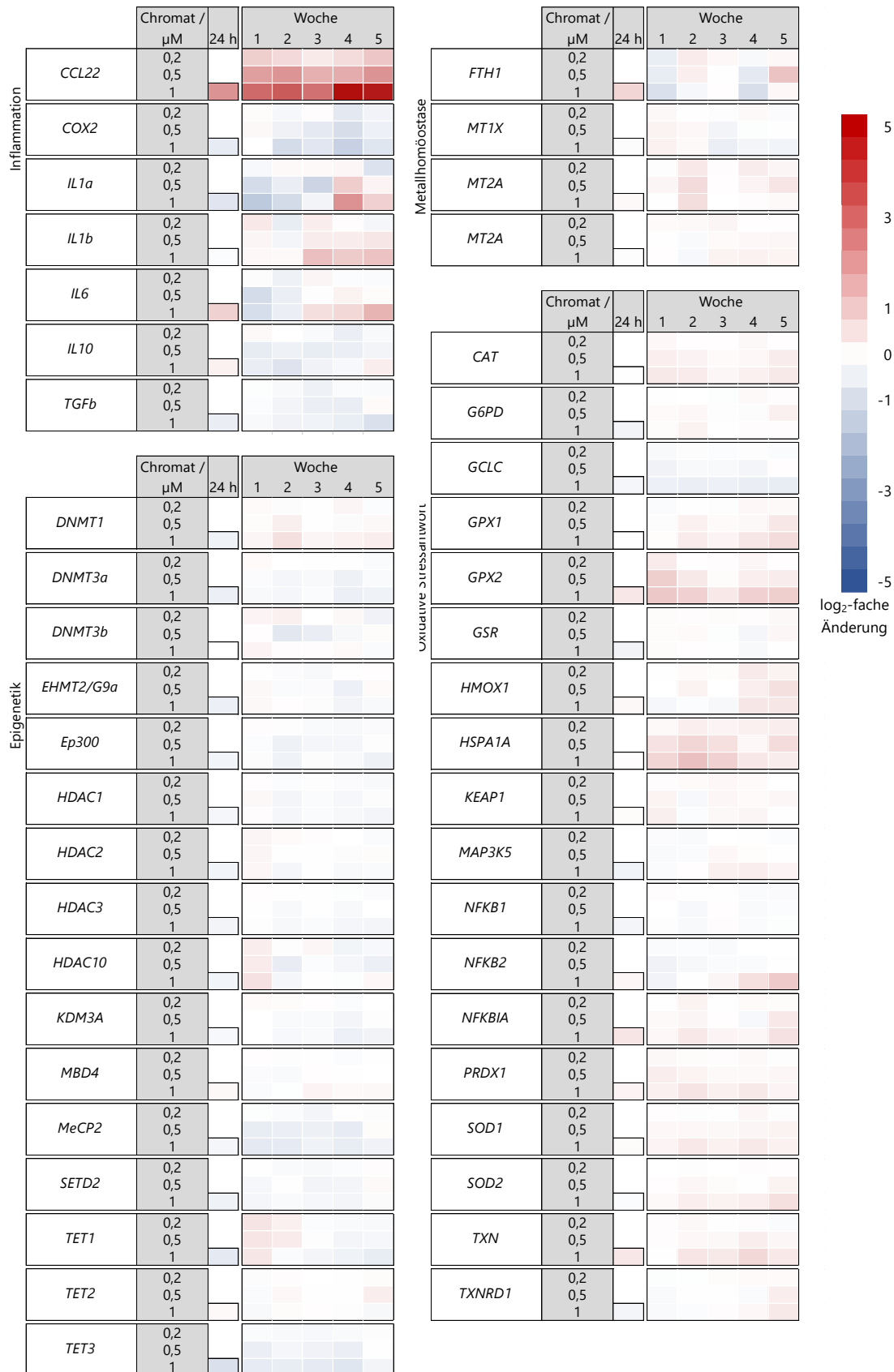


Abbildung 44: Genexpressionsprofil von A549-Zellen nach 24-stündiger sowie ein- bis fünfwöchiger Inkubation mit Kaliumdichromat. Eine rote Färbung steht für eine Induktion, eine blaue Färbung für eine Repression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 3 Versuchen.

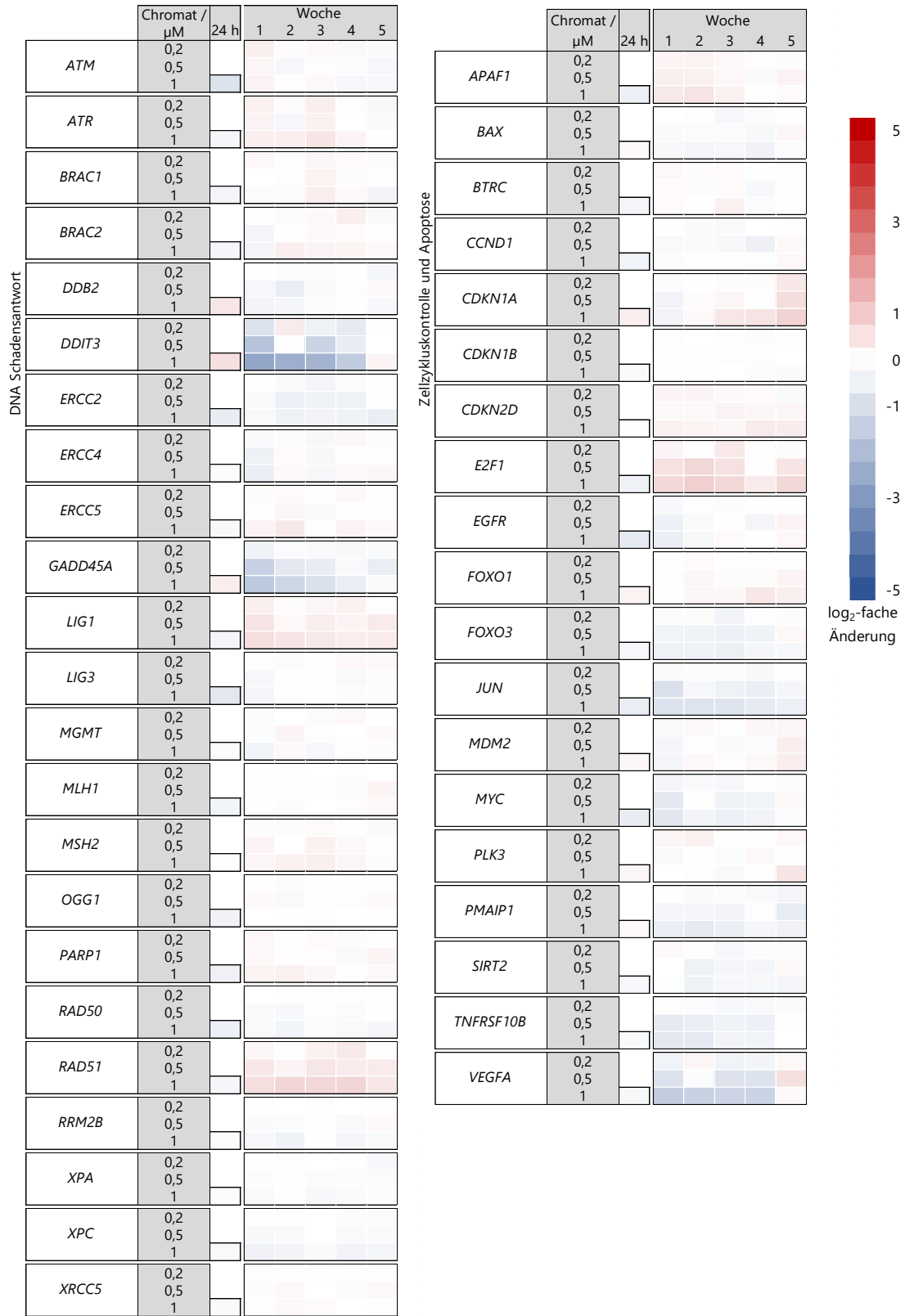


Abbildung 44 (Fortsetzung): Genexpressionsprofil von A549-Zellen nach 24-stündiger sowie ein- bis fünfwöchiger Inkubation mit Kaliumdichromat. Eine rote Färbung steht für eine Induktion, eine blaue Färbung für eine Repression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 3 Versuchen.

## 8.3 Abkürzungsverzeichnis

5caC	5-Carboxy-Cytosin
5fC	5-Formyl-Cytosin
5hmC	5-Hydroxymethyl-Cytosin
5mC	5-Methyl-Cytosin
6mA	N6-Methyl-Adenin
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
AID	Aktivitäts-induzierte Desaminase
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA-editierendes Enzym, katalytisches Polypeptid
ASK	<i>apoptosis signal regulating kinase</i>
bDNA	Bisulfit-konvertierte DNA
bidest	bidestilliert
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
COBRA	<i>Combined Bisulfite Restriction Analysis</i>
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
C <sub>q</sub>	<i>Cycle of quantification</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol-Lösung
DDB	1,2-Diamino-4,5-Dimethoxybenzol
DHA	Dehydroascorbinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
FKS	Fetales Kälberserum
FL	Färbelösung
GADD	<i>growth arrest and DNA damage</i>
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HPLC	Hochdurchsatz-Flüssigchromatographie
HR	Homologe Rekombination

ht-RT-qPCR	quantitative Hochdurchsatz-Reverse Transkriptase PCR
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IFC	<i>Dynamic Array integrated fluidic circuit</i>
KGM	<i>Keratinocyte Growth Medium</i>
lncRNA	<i>long-noncoding RNA</i>
MBD	Methylbindende Domäne
miRNA	mikroRNA
MMR	<i>Mismatch</i> Reparatur
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSSL	Methansulfonsäurelösung
ncRNA	<i>non-coding RNA</i>
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NFκB	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
NRC	<i>no reaction control</i>
NTC	<i>no template control</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PPM	<i>Pooled Primer Mix</i>
RCC	<i>Relative Cell count</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SVCT	Natrium-abhängiger Vitamin C Transporter
TET	<i>Ten-Eleven Translocation</i>

## 8.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Überblick über den Chrom-Metabolismus in der Zelle. ....	10
Abbildung 2: Überblick über die Chrom-induzierte Kanzerogenese. ....	13
Abbildung 3: Mögliche Wege der Demethylierung von 5-Methyl-Cytosin (5mC) zu Cytosin. ....	16
Abbildung 4: Regulation der Transkription durch die DNA-Methylierung. ....	17
Abbildung 5: Verschiedene Packungsdichten des Chromatins. Die DNA (dunkelgrün) ist auf die Histonoktamere (hellgrün) aufgewickelt. ....	18
Abbildung 6: Gleichung der Reaktion von DDB und DHA zu einem fluoreszierenden Chinolaxinlacton zum quantitativen Nachweis von Ascorbinsäure. ....	32
Abbildung 7: Beispielchromatogramm der Ascorbinsäure-Messung mittels HPLC. ....	33
Abbildung 8: Beispiel-Histogramm einer Zellzyklus-Messung in A549-Zellen. ....	36
Abbildung 9: Schematische Darstellung verschiedener Methylierungsgrade nach Analyse mit dem Combined Bisulfite Restriction Analysis. ....	38
Abbildung 10: Intrazellulärer Ascorbinsäuregehalt in A549-Zellen (A) und BEAS-2B-Zellen (B) .47	
Abbildung 11: ATP-Gehalte der A549-Zellen (A) und BEAS-2B-Zellen (B) nach 24-stündiger Inkubation mit Kaliumdichromat. ....	49
Abbildung 12: Intrazellulärer Chromgehalt nach 24-stündiger Behandlung mit Kaliumdichromat in A549-Zellen (A) und BEAS-2B-Zellen (B). ....	51
Abbildung 13: Zellzyklusverteilung in A549-Zellen (A) und BEAS-2B-Zellen (B) nach 24-stündiger Behandlung mit Kaliumdichromat. ....	54
Abbildung 14: Anteil von methyliertem Cytosin am Gesamt-Cytosin der DNA nach 24-stündiger Behandlung mit Kaliumdichromat in A549-Zellen (A,C) und BEAS-2B-Zellen (B,D). ....	57
Abbildung 15: Auswahl an Genen des Genexpressionsprofils in A549-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Kaliumdichromat. ....	59
Abbildung 16: Auswahl an Genen des Genexpressionsprofils in BEAS-2B-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Kaliumdichromat. ....	60
Abbildung 17: Detaillierte Darstellung der Genexpression einer Auswahl an Genen aus dem Cluster der inflammatorischen Antwort in A549-Zellen (A) und BEAS-2B-Zellen (B) nach einer 24-stündigen Behandlung mit Kaliumdichromat. ....	62
Abbildung 18: Detaillierte Darstellung der Genexpression einer Auswahl an Genen aus dem Cluster der Epigenetik in A549-Zellen (A) und BEAS-2B-Zellen (B) nach einer 24-stündigen Behandlung mit Kaliumdichromat. ....	62
Abbildung 19: Detaillierte Darstellung der Genexpression einer Auswahl an Genen aus dem	

Cluster der oxidativen Stressantwort in A549-Zellen (A) und BEAS-2B-Zellen (B) nach einer 24-stündigen Behandlung mit Kaliumdichromat. ....	64
Abbildung 20: Detaillierte Darstellung der Genexpression einer Auswahl an Genen aus dem Cluster der apoptotischen und Zellzykluskontrolle in A549-Zellen (A) und BEAS-2B-Zellen (B) nach einer 24-stündigen Behandlung mit Kaliumdichromat. ....	65
Abbildung 21: Detaillierte Darstellung der Genexpression einer Auswahl an Genen aus dem Cluster der DNA Schadensantwort in A549-Zellen (A) und BEAS-2B-Zellen (B) nach einer 24-stündigen Behandlung mit Kaliumdichromat. ....	66
Abbildung 22: Relative Zellzahl (RCC) der A549-Zellen (A) und BEAS-2B-Zellen (B) nach einer 24-stündigen Behandlung mit Kaliumdichromat und 72 h Nachinkubation. ....	70
Abbildung 23: Zellzyklusverteilung in A549-Zellen (A,C) und BEAS-2B-Zellen (B,D) nach 24-stündiger Behandlung mit Kaliumdichromat (A,B) und anschließender 72-stündiger Nachinkubation (C,D). ....	72
Abbildung 24: Anteil von methyliertem Cytosin am Gesamt-Cytosin der DNA nach 24-stündiger Behandlung mit Kaliumdichromat in A549-Zellen (A,C) und BEAS-2B-Zellen (B,D). ....	73
Abbildung 25: Auswahl an Genen des Genexpressionsprofil in A549-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Kaliumdichromat und 72-stündiger Nachinkubation. ....	75
Abbildung 26: Auswahl an Genen des Genexpressionsprofils in BEAS-2B-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Kaliumdichromat und 72-stündiger Nachinkubation. ....	76
Abbildung 27: Relative Zellzahl (RCC) der A549-Zellen nach 24-stündiger Inkubation (A) und Inkubationen für ein bis fünf Wochen (B) mit Kaliumdichromat. ....	81
Abbildung 28: Intrazellulärer Chromgehalt in A549-Zellen nach 24-stündiger Inkubation (A) und Inkubationen für ein bis fünf Wochen (B) mit Kaliumdichromat. ....	83
Abbildung 29: Zellzyklusverteilung in A549-Zellen nach 24-stündiger Inkubation (A) und Inkubationen für ein bis fünf Wochen (B) mit Kaliumdichromat. ....	84
Abbildung 30: Anteil an methyliertem Cytosin am Gesamt-Cytosin der DNA nach 24-stündiger Behandlung (A,C) und nach einer Inkubation für ein bis fünf Wochen (B,D) mit Kaliumdichromat in A549-Zellen. ....	85
Abbildung 31: Auswahl an Genen des Genexpressionsprofils in A549-Zellen nach 24-stündiger und ein- bis fünfwöchiger Inkubation mit Kaliumdichromat. ....	88

Abbildung 32: Detaillierte Darstellung der Genexpression einer Auswahl an Genen aus dem Cluster der inflammatorischen Antwort, <i>CCL22</i> (A,B) und <i>IL6</i> (C,D) in A549-Zellen nach einer 24-stündigen (A,C) und ein- bis fünfwöchigen (B,D) Behandlung mit Kaliumdichromat. ....	89
Abbildung 33: Detaillierte Darstellung der Genexpression einer Auswahl an Genen aus dem Cluster der Zellzyklus und apoptotischen Kontrolle, <i>CDKN1A</i> (A,B) und <i>JUN</i> (C,D) in A549-Zellen nach einer 24-stündigen (A,C) und ein- bis fünfwöchigen (B,D) Behandlung mit Kaliumdichromat. ....	90
Abbildung 34: Detaillierte Darstellung der Genexpression einer Auswahl an Genen aus dem Cluster der oxidativen Stressantwort, <i>GPX1</i> (A,B), <i>HMOX1</i> (C,D), <i>NFKB2</i> (E,F) und <i>SOD1</i> (G,H) in A549-Zellen nach einer 24-stündigen (A,C,E,G) und ein- bis fünfwöchigen (B,D,F,H) Behandlung mit Kaliumdichromat. ....	92
Abbildung 35: Detaillierte Darstellung der Genexpression einer Auswahl an Genen aus dem Cluster der DNA Schadensantwort, <i>DDIT3</i> (A,B), <i>GADD45A</i> (C,D), <i>LIG1</i> (E,F) und <i>RAD51</i> (G,H) in A549-Zellen nach einer 24-stündigen (A,C,E,G) und ein- bis fünfwöchigen (B,D,F,H) Behandlung mit Kaliumdichromat. ....	93
Abbildung 36: Schematische Darstellung möglicher Signalwege und Auswirkungen in der Chromat-induzierten Schadensantwort. ....	98
Abbildung 37: Zusammenfassende Darstellung des Einflusses einer Präinkubation mit DHA auf die Chromat-induzierte Toxizität in BEAS-2B-Zellen. ....	101
Abbildung 38: Chromatogramm der Auftrennung von Nukleosid-Standards. ....	126
Abbildung 39: Agarosegel eines COBRA Versuchs in <i>MLH1</i> (A) und <i>MSH2</i> (B). ....	127
Abbildung 40: Genexpressionsprofil von A549-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Kaliumdichromat. ....	128
Abbildung 41: Genexpressionsprofil von BEAS-2B-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Kaliumdichromat. ....	129
Abbildung 42: Genexpressionsprofil von A549-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Kaliumdichromat und 72-stündiger Nachinkubation. ....	130
Abbildung 43: Genexpressionsprofil von BEAS-2B-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Kaliumdichromat und 72-stündiger Nachinkubation. ....	131
Abbildung 44: Genexpressionsprofil von A549-Zellen nach 24-stündiger sowie ein- bis fünfwöchiger Inkubation mit Kaliumdichromat. ....	132

## 8.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Temperaturprogramm für die Chrombestimmung an der AAS. ....	35
Tabelle 2: Zusammensetzung des Eluenten für die Trennung der Nukleoside an der HPLC. ....	37
Tabelle 3: Temperaturprogramm der Bisulfit-Umwandlung. ....	39
Tabelle 4: Temperaturprogramm der COBRA-PCR. ....	40
Tabelle 5: Temperaturprogramm der cDNA-Synthese. ....	42
Tabelle 6: Temperaturprogramm der Präamplifikation. ....	43
Tabelle 7: Temperaturprogramm des Exonukleaseverdaus. ....	43
Tabelle 8: Programm der qPCR und Schmelzkurvenanalyse am BioMark™-System. ....	44
Tabelle 9: Verwendete Chemikalien und deren Hersteller. ....	117
Tabelle 10: Verwendete Puffer und Lösungen und deren Zusammensetzung. ....	119
Tabelle 11: Verwendete Kits und deren Hersteller. ....	120
Tabelle 12: Verwendete Instrumente und Software und deren Hersteller. ....	121
Tabelle 13: Verwendete Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller. ....	122
Tabelle 14: Übersicht über die in der ht-RT-qPCR untersuchten Gene und deren codierte Proteine. ....	123
Tabelle 15: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze der Chrombestimmung mittels GF-AAS nach der ausführlichen Leerwertmethode der DIN 32645. ....	127



# 9 PUBLIKATIONSLISTE

## Publikationen in Fachzeitschriften

Schumacher P, **Fischer F**, Sann J, Walter D, Hartwig A. Impact of Nano- and Micro-Sized Chromium(III) Particles on Cytotoxicity and Gene Expression Profiles Related to Genomic Stability in Human Keratinocytes and Alveolar Epithelial Cells. *Nanomaterials*. 2022; 12(8):1294.

Caipa Garcia AL, Kucab JE, Al-Serori H, Beck RSS, **Fischer F**, Hufnagel M, Hartwig A, Floeder A, Balbo S, Francies H, et al. Metabolic Activation of Benzo[*a*]pyrene by Human Tissue Organoid Cultures. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(1):606.

Stöber S, Lumpp T, **Fischer F**, Gunesch S, Schumacher P, Hartwig A. Effect of Long-Term Low-Dose Arsenic Exposure on DNA Methylation and Gene Expression in Human Liver Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(20):15238.

Lumpp T, Stöber S, **Fischer F**, Hartwig A, Köberle B: Role of epigenetics for the efficacy of cisplatin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(2):1130.

## Publikationen in Vorbereitung

**Fischer F**, Stöber S, Wegmann L, Lumpp T, Parsdorfer M, Schumacher P, Hartwig A: Chromium affects gene expression and DNA methylation in long-term *in vitro* experiments using A549 cells.

**Fischer F**, Veh E, Schorb S, Stöber S, Lumpp T, Schumacher P, Hartwig A: Effect of ascorbic acid on chromate-induced toxicity in A549 cells and BEAS-2B cells.

## Posterbeiträge auf Fachtagungen

**Fischer F**, Veh E, Schorb S, Schumacher P, Hartwig A: Role of ascorbic acid in the chromate-induced cytotoxicity and gene expression profiles in human lung epithelial cells. 8<sup>th</sup> German Pharm-Tox Summit, 89. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT). 06.-09.03. 2023, Ulm.

**Fischer F**, Veh E, Geisel L, Schumacher P, Hartwig A: Impact of ascorbic acid on the chromate-induced toxicity in alveolar epithelial cells. GUM Meeting 2022. 05.-07.10.2022, Würzburg.

