

Einfluss von Arsenit auf die epigenetische Regulation und posttranslationale Modifikation von Histon H3 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. Tatjana Lumpp

1. Referentin: Prof. Dr. Andrea Hartwig

2. Referent: Prof. Dr. Mirko Bunzel

Tag der mündlichen Prüfung: 05.05.2025

*Für alle, die mich auf diesem Weg begleitet, inspiriert und
unterstützt haben.*

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

Tatjana Lumpp

INHALTSVERZEICHNIS

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	7
2.1	Die epigenetische Regulation	7
2.1.1	Posttranslationale Histonmodifikation	9
2.1.2	DNA-Methylierung	13
2.1.3	<i>Non-coding</i> RNAs	14
2.2	Arsen	15
2.2.1	Geochemisches Vorkommen, Anwendung und Exposition	15
2.2.2	Toxikokinetik: Aufnahme, Verteilung und zelluläre Mechanismen der Toxizität	16
2.2.3	Toxikodynamik: Molekulare Mechanismen und Pathophysiologie	19
2.3	Arsenit-induzierte epigenetische Dysregulation	28
3	Fragestellung	31
4	Material und Methoden	34
4.1	Zellkultur	34
4.1.1	Zelllinien und Kultivierungsbedingungen	34
4.1.2	Kryokonservierung und Inkulturnahme der Zellen	35
4.1.3	Arsenitbehandlung und Nachinkubation	35
4.2	Untersuchungen zur Zytotoxizität	36
4.2.1	ATP-Gehalt	36
4.2.2	Lebendzellzahl	36
4.3	Zelluläre und nukleäre Aufnahme von Arsen mittels GF-AAS	37
4.3.1	Intrazelluläre Aufnahme	37
4.3.2	Kernaufnahme	38
4.3.3	Auswertung	38
4.3.4	Analytische Leistungsgrenzen der Arsenbestimmung	39
4.4	Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie	39
4.5	Genexpressionsanalyse	40
4.5.1	mRNA-Isolierung und Quantifizierung	40

4.5.2	cDNA-Synthese	41
4.5.3	<i>Specific Target Amplification</i> und Exonukleaseverdau	41
4.5.4	Primerverdünnung und Probenvorbereitung	42
4.5.5	96x96 <i>Dynamic Array</i> IFC qPCR-Analyse	43
4.5.6	Datenanalyse	43
4.6	Genspezifische Analyse von Histonmodifikationen mittels ChIP-qPCR.....	44
4.6.1	<i>Crosslinking</i> und Zellpelletierung.....	44
4.6.2	Zellkernaufschluss und Chromatinfragmentierung.....	45
4.6.3	Chromatinimmunopräzipitation	45
4.6.4	DNA-Aufreinigung.....	46
4.6.5	Präamplifikation und Exonukleaseverdau	46
4.6.6	Quantifizierung mittels qPCR	46
4.6.7	Datenanalyse	47
4.6.8	Bestimmung der Fragmentierungseffizienz.....	47
4.6.9	Etablierung der ChIP-qPCR-Primer	48
4.7	Globale Analyse von Histonmodifikationen mittels <i>Western Blot</i>	49
4.7.1	Zellpelletierung und Histonextraktion	49
4.7.2	Proteinquantifizierung	50
4.7.3	Elektrophoretische Auftrennung der Histone mittels SDS-PAGE.....	50
4.7.4	Proteintransfer mittels <i>Western Blot</i>	50
4.7.5	Immunodetektion mittels Chemilumineszenz	51
4.7.6	Semiquantitative Auswertung.....	52
4.8	Globale Analyse von Histonmodifikationen mittels LC-MS/MS	52
4.8.1	Histonextraktion	53
4.8.2	Probenvorbereitung und LC-MS/MS-Analyse.....	53
4.8.3	Datenauswertung.....	54
4.9	Ermittlung der Enzymaktivität von HDACs und HATs mittels ELISA	55
4.9.1	HDAC-Assay.....	55
4.9.2	HAT-Assay	56
4.10	Statistische Auswertung.....	57
5	Ergebnisse und Diskussion	59
5.1	Beständigkeit Arsenit-induzierter Zellreaktionen	59
5.1.1	Analyse der Zytotoxizität von Arsenit.....	60
5.1.2	Einfluss von Arsenit auf die Zellzyklusverteilung	62
5.1.3	Zelluläre Aufnahme und subzelluläre Lokalisation von Arsenit	63
5.1.4	Veränderung des Genexpressionsprofils durch Arsenitexposition	65
5.2	Arsenit-induzierte epigenetische Veränderungen: Modifikation von Histon H3.....	78
5.2.1	Genspezifische Veränderungen von ausgewählten H3-Modifikationen in DNA-Reparaturgenen durch Arsenit.....	78
5.2.2	Genomweite Arsenit-vermittelte Dysregulation ausgewählter Histon H3-Modifikationen.....	86
5.2.3	Lysin-spezifische Veränderungen der Modifikationslandschaft von Histon H3 durch Arsenit.....	91

5.3	Einfluss von Arsenit auf <i>Writer</i> und <i>Eraser</i> der Histonacetylierung.....	98
5.3.1	Modifikation der HDAC-Aktivität durch Arsenit	98
5.3.2	Beeinflussung der HAT-Aktivität durch Arsenit	100
6	Zusammenfassende Diskussion	103
7	Literaturverzeichnis	118
A	Anhang.....	136
A.1	Chemikalien sowie Mess- und Analysengeräte.....	136
A.1.1	Chemikalien	136
A.1.2	Puffer und Lösungen.....	139
A.1.3	Kits	142
A.1.4	Antikörper.....	143
A.1.5	Mess- und Analysengeräte.....	144
A.1.6	Software	146
A.1.7	Verbrauchsmaterialien	147
A.2	Ergänzende Daten	149
A.2.1	Übersicht der dokumentierten Histonmodifikationen.....	149
A.2.2	Genliste der HT-RT-qPCR.....	150
A.2.3	Detaillierte Ergebnisse der HT-RT-qPCR.....	153
A.2.4	Informationen zu den CHIP-qPCR-Primern	159
A.2.5	Kontrollen der CHIP-qPCR-Analysen.....	160
A.2.6	Repräsentative Blots der analysierten Histonmodifikationen.....	161
A.2.7	Weitere Ergebnisse der LC-MS/MS-Analyse.....	163
A.3	Abkürzungsverzeichnis.....	164
A.3.1	Allgemeine Abkürzungen	164
A.3.2	Abkürzungen von Proteinen und Genen	167
A.4	Abbildungsverzeichnis	171
A.5	Tabellenverzeichnis.....	174
A.6	Publikationsliste.....	176

1 ZUSAMMENFASSUNG

Anorganische Arsenverbindungen sind nachgewiesene Humankanzerogene, die ubiquitär in der Umwelt präsent sind. Insbesondere die dreiwertige Form Arsenit weist die höchste toxikologische Relevanz für den Menschen auf. Die Belastung des Grundwassers mit Arsenit stellt folglich ein bedeutendes globales Gesundheitsrisiko dar. Die zugrunde liegende kanzerogene Wirkung ist multifaktoriell und aktuell nur unvollständig verstanden. Ein zentraler Faktor ist die Beeinträchtigung von DNA-Reparaturprozessen, bedingt durch eine funktionelle und transkriptionelle Inhibition diverser beteiligter Proteine. Die Aktivitätsinhibition wird dabei meist auf eine Interaktion des thiolaffinen Arsenits mit spezifischen Zink-bindenden Motiven der DNA-Reparaturproteine zurückgeführt. Hingegen wurden mechanistische Zusammenhänge zwischen der transkriptionellen Repression der korrespondierenden Gene bisher nicht identifiziert. Jedoch ist bekannt, dass Arsenit die Expression zahlreicher Gene moduliert, die in die unterschiedlichsten zellulären Prozesse involviert sind. Von Relevanz ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass Arsenit eine Dysregulation zellulärer epigenetischer Prozesse induziert, die die transkriptionelle Regulation steuern. Neben der DNA-Methylierung sind vor allem posttranslationale Histonmodifikationsmuster als Arsenit-sensitive regulatorische Strukturen zu nennen. Diese beeinflussen unmittelbar die Chromatinorganisation sowie das *Chromatin remodeling*, wodurch sie die Zugänglichkeit genomischer Elemente und folglich auch die Transkription definieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der akute Einfluss von Arsenit unter *in vitro*-Bedingungen auf posttranslationale Histonmodifikationen untersucht. Der Fokus lag dabei auf der Charakterisierung von Acetylierungs- und Methylierungsmustern von Histon H3. Zusätzlich wurde eine Arsenit-freie Zellregenerationsphase nach Beendigung der Exposition in den experimentellen Aufbau inkludiert, um auch die zeitliche Dynamik der entsprechenden zellulären Reaktionen erfassen zu können.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Persistenz des durch Arsenit induzierten zellulären Stresses nach akuter Exposition in der humanen Lungentumorzelllinie A549 analysiert und dabei die geeigneten Inkubationsbedingungen für die nachfolgenden epigenetischen Untersuchungen festgelegt. Hierzu wurden neben der durch Arsenit vermittelten Zytotoxizität auch der Einfluss auf die Zellzyklusprogression und die intrazelluläre Aufnahme untersucht. Zudem wurden die Analysen mit einem Hochdurchsatz-Genexpressionsprofiling ausgewählter Gene der zellulären Stressantwort und epigenetischen Regulation komplementiert. Die akute Exposition der Zellen mit Arsenit führte zu einer persistenten Zytotoxizität, da auch durch eine anschließende Arsenit-freie Nachinkubation von bis zu zwei Tagen kein zellregeneratives Verhalten beobachtet werden konnte. Im nicht-zytotoxischen bis sub-zytotoxischen Bereich von $\leq 20 \mu\text{M}$ Arsenit wurde kein Effekt auf die Zellzyklusregulation nachgewiesen, unabhängig vom Vorliegen einer zweitägigen Zellregenerationsperiode. Dabei wurde

eine konzentrationsabhängige zelluläre Arsenakkumulation unmittelbar nach der 24-stündigen Inkubation detektiert, wobei 48 h nach der Arsenitexposition nur noch intrazelluläre Spuren Mengen von Arsen nachweisbar waren. Insgesamt führte die akute Behandlung der A549-Zellen zur Ausbildung eines für Arsenit charakteristischen Reaktionsspektrums. Dazu zählen die Induktion der oxidativen Stressantwort und die Inhibierung von DNA-Reparaturprozessen, während zahlreiche Genexpressionsveränderungen über den gesamten Nachinkubationszeitraum bestehen blieben. Mit zunehmender Zellregenerationszeit verstärkten sich diese Effekte insbesondere bei Genen, die an der DNA-Reparatur und epigenetischen Regulation beteiligt sind. Die Tatsache, dass 48 h nach der Behandlung kaum noch intrazelluläres Arsen nachweisbar war, legte die Vermutung nahe, dass eine einmalige akute Arsenitexposition im mikromolaren Konzentrationsbereich potenziell zur Ausbildung eines zellulären epigenetischen Gedächtnisses führt oder dass Arsenit beständige Veränderungen essenzieller Zielstrukturen auslöst.

Der zweite Teil dieser Arbeit umfasst detaillierte Untersuchungen der Arsenit-induzierten Dysregulation posttranslationaler Modifikationen von Histon H3. Dabei wurden primär die Acetylierungs- und Methylierungsmuster analysiert, sowohl an der Gesamtfraktion von Histon H3 als auch an spezifischen Genloci ausgewählter DNA-Reparaturgene. Die akute Exposition von A549-Zellen mit 20 μM Arsenit führte auf genspezifischer Ebene zu einer signifikanten Hypoacetylierung von H3K18 in den Promotorregionen von *MPG*, *MLH1*, *MSH2* und *XPA*, wobei der Promotor von *MSH2* eine erhöhte Sensitivität gegenüber Arsenit zeigte. Bereits ab einer Konzentration von 5 μM Arsenit konnte hier eine konzentrationsabhängige Verringerung von H3K18ac nachgewiesen werden, welche mit dessen transkriptioneller Repression korrelierte. Gleichzeitig wurde bei H3K9 eine Hypoacetylierung in den Promotorbereichen von *MPG* und *MLH1* bei 20 μM Arsenit ermittelt. Auf genspezifischer Ebene zeigte sich jedoch kein persistentes, sondern ein transient verändertes Verhalten der beiden Histonmodifikationen, da sich das entsprechende Vorkommen nach einer Zellregenerationszeit von 48 h wieder normalisierte. Für H3K9ac und H3K18ac ließ sich somit eine unmittelbare Hypoacetylierung in mehreren DNA-Reparaturgenen nach der Behandlung dokumentieren, während für H3K4me3 und H3K27me3 keine Veränderungen des Methylierungsstatus in den analysierten Genregionen festgestellt wurden. Die transiente Hypoacetylierung von H3K9 und H3K18 konnte auch auf genomweiter Ebene verifiziert werden, wie nachfolgende Antikörper-basierte Untersuchungen demonstrierten. Zudem wurden globale Veränderungen der Gesamthistonfraktion von H3K4me3 und H3K27me3 beobachtet, die sowohl transient, aber auch permanent auftraten. Zusätzlich konnte die Arsenit-induzierte globale Hypoacetylierung von H3K9 und H3K18 in der Zelllinie BEAS-2B, einer Nicht-Krebszelllinie aus Lungengewebe, bestätigt werden. Insgesamt zeigte sich, dass Arsenit eine transiente, gezielte Beeinflussung der Chromatinstruktur in ausgewählten Promotorregionen von DNA-Reparaturgenen hervorruft. Die anhaltende transkriptionelle Repression der DNA-Reparaturfaktoren lässt sich dadurch jedoch nicht vollständig erklären, was auf einen möglichen *Crosstalk* mit weiteren epigenetischen Prozessen, wie der DNA-Methylierung, hindeutet. Zur Ergänzung der Untersuchungen in der A549-Zelllinie wurde eine umfassende *Proteomics*-Analyse von Histon H3 durchgeführt, welche insbesondere die beobachtete Hypoacetylierung von H3K18 bestätigte. Zudem wurde ein Rückgang

von H3K14ac und H3K36me2 sowie eine Induktion von H3K27me2 ermittelt (beide Methylierungsveränderungen traten auch in der Histonvariante H3.3 auf), wodurch diese Chromatinmodifikationen als weitere Arsenit-sensitive Zielstrukturen identifiziert wurden. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von Histonmodifikationsdaten für die toxikologische Risikobewertung von Arsenit und verdeutlichen die Notwendigkeit, neben Antikörper-basierten Methoden auch massenspektrometrische Analysen systematisch einzubeziehen.

Abschließend wurden die mechanistischen Implikationen der beobachteten Hypoacetylierung untersucht, indem die Aktivität histonmodifizierender Enzyme ermittelt wurde. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass die Hypoacetylierung nicht unmittelbar auf Veränderungen der Gesamtaktivität der beteiligten Enzyme zurückzuführen war, da die Resultate eher auf das Vorliegen einer Hyperacetylierung hindeuteten. Stattdessen suggerieren die Befunde spezifische Arsenit-induzierte Veränderungen ausgewählter epigenetischer Regulatoren. Dennoch wurde ein persistent verändertes Aktivitätsprofil der Histonacetyltransferasen und Histondeacetylasen ermittelt, das mit den beständigen transkriptionellen Veränderungen korreliert und auf das Vorliegen Arsenit-sensitiver Zielstrukturen hindeutet.

Insgesamt verdeutlichen die Analysen das komplexe regulatorische Netzwerk epigenetischer Prozesse, die durch Arsenit beeinflusst werden, und unterstreichen die Notwendigkeit weiterer mechanistischer Untersuchungen, um die Arsenit-vermittelte Pathogenese zukünftig noch besser verstehen zu können und gezielte Therapieansätze für Arsenit-bedingte Erkrankungen zu ermöglichen.

Abstract

Inorganic arsenic compounds are well-established human carcinogens that are ubiquitously present in the environment. Among the various forms of inorganic arsenic, trivalent arsenite exhibits the highest toxicological relevance to humans, making arsenite contamination of groundwater a major global health risk. The underlying carcinogenic mechanisms are multifactorial and remain only partially understood. A key factor is the arsenite-induced impairment of DNA repair processes, resulting from both functional and transcriptional inhibition of various DNA repair proteins. While functional inhibition is primarily attributed to the strong thiol affinity of arsenite, which interacts with specific zinc-binding motifs of these proteins, the mechanistic basis of its transcriptional repression remains unclear. Arsenite is further known to modulate the expression of a broad spectrum of genes involved in diverse cellular pathways. Notably, arsenite induces dysregulation of cellular epigenetic processes that govern transcriptional regulation. In addition to alterations in DNA methylation, histone post-translational modifications represent particularly arsenite-sensitive regulatory structures. These modifications influence chromatin organization and chromatin remodeling, thereby determining the accessibility of genomic elements and, consequently, transcriptional activity.

In this thesis, the acute effects of arsenite exposure on histone modifications were investigated *in vitro*, with a focus on characterizing the acetylation and methylation patterns of histone H3. To capture the temporal dynamics of the underlying cellular responses, an arsenite-free recovery phase following exposure was included in the experimental design.

In the first part of this thesis, the persistence of arsenite-induced cellular stress following acute exposure of the human lung tumor cell line A549 was analyzed, and the appropriate exposure conditions for subsequent epigenetic investigations were determined. In addition to arsenite-induced cytotoxicity, effects on cell cycle phase regulation and intracellular arsenic uptake were assessed. These analyses were further complemented by high-throughput gene expression profiling of selected genes involved in cellular stress responses and epigenetic regulation. Acute arsenite exposure resulted in persistent cytotoxicity, with no regenerative cellular behavior observed even after an arsenite-free post-incubation period up to two days. In the non-cytotoxic to sub-cytotoxic range ($\leq 20 \mu\text{M}$ arsenite), no effects on cell cycle regulation were detected, irrespective of the two-day recovery phase. A concentration-dependent increase in intracellular arsenic levels was identified immediately after the 24-hour exposure, while only trace amounts were detectable 48 hours post-exposure. Overall, acute arsenite treatment of A549 cells resulted in a characteristic response pattern, including the induction of oxidative stress response pathways and inhibition of DNA repair processes. Moreover, numerous gene expression changes persisted throughout the recovery period, with some effects intensifying over time. This was particularly evident in the repression of specific DNA repair and epigenetic regulator genes. The loss of intracellular arsenic 48 hours post-exposure

suggests that a single acute low-micromolar arsenite exposure may trigger a form of cellular epigenetic memory or lead to stable modifications of critical molecular targets.

The second part of this thesis focused on detailed investigations of arsenite-induced dysregulation of histone H3 modifications. Specifically, acetylation and methylation patterns were analyzed in both bulk histone H3 and at specific gene loci of selected DNA repair genes. At the gene-specific level, a significant hypoacetylation of H3K18 was observed in the promoter regions of *MPG*, *MLH1*, *MSH2*, and *XPA* following acute exposure of A549 cells to 20 μ M arsenite. The promoter of *MSH2* exhibited an increased sensitivity to arsenite, with a concentration-dependent decrease in H3K18 acetylation, already detectable at concentrations as low as 5 μ M, and thus, correlating with the transcriptional repression of this gene. Concurrently, hypoacetylation of H3K9 was also observed in the promoters of *MPG* and *MLH1* at 20 μ M arsenite. However, these modification patterns exhibited transient rather than persistent changes, as their abundance returned to baseline after 48 hours of recovery. Thus, an immediate hypoacetylation of H3K9 and H3K18 in several DNA repair genes was observed following treatment. At the same time, no alterations in the methylation status of H3K4me3 and H3K27me3 were detected in the analyzed gene loci. The transient gene-specific hypoacetylation of H3K9 and H3K18 was further verified on a genome-wide level using antibody-based analysis. Additionally, global alterations in total histone fractions of H3K4me3 and H3K27me3 were observed, with some being transient, whereas others persisted. The arsenite-induced global hypoacetylation of H3K9 and H3K18 was further confirmed in BEAS-2B cells, a non-cancerous lung cell line. Overall, the findings indicate that arsenite induces a targeted, transient remodeling of chromatin structure in specific promoter regions of DNA repair genes. However, the persistent transcriptional repression of DNA repair factors cannot be fully explained by the identified histone modification changes, suggesting crosstalk with other epigenetic mechanisms such as DNA methylation. To complement the investigations in A549 cells, a proteomics analysis of histone H3 was performed, which confirmed the observed hypoacetylation of H3K18. Moreover, a reduction in H3K14ac and H3K36me2, and an increase in H3K27me2 (both methylation changes also present in H3.3 variant) were detected, identifying these as additional arsenite-sensitive targets. These findings emphasize the significance of histone modification data for arsenite risk assessment and the necessity of systematically integrating mass spectrometric analyses with antibody-based methods.

Finally, the mechanistic implications of the hypoacetylation were further investigated by assessing the activity of histone-modifying enzymes. The results suggest that the observed hypoacetylation was not directly attributable to alterations in total enzymatic activity but instead pointed to hyperacetylation. The findings further indicate that arsenite may selectively affect the function of specific epigenetic regulators. Nonetheless, a persistently altered activity profile of histone acetyltransferases and histone deacetylases was identified, which correlated with the sustained transcriptional changes and indicated the presence of arsenite-sensitive regulatory targets.

In conclusion, this study highlights the complexity of the regulatory network of epigenetic mechanisms affected by arsenite and underscores the necessity for further mechanistic investigations to improve the understanding of arsenite-mediated pathogenesis and to facilitate the development of targeted therapeutic strategies for arsenite-associated diseases.

2 EINLEITUNG

Das genetische Profil jeder Zelle eines Organismus ist durch eine identische Sequenz der DNA festgelegt. Ungeachtet dieser genetischen Konstanz weisen die Zellen jedoch eine hohe funktionelle Vielfalt und Diversität auf, die sich in einer Vielzahl distinkter zellulärer Identitäten und phänotypischer Ausprägungen widerspiegelt (Iurato und Igamberdiev, 2022). Die molekularen Mechanismen, die die Genotyp-Phänotyp-Interaktion regulieren, wurden erstmals von Conrad Waddington als sogenannte epigenetische Prozesse konzeptualisiert (Waddington, 1942). Der Begriff Epigenetik leitet sich aus dem griechischen *epi* (dt. auf, über) ab und bezeichnet demzufolge eine zusätzliche Informationsebene neben der Genetik. Im Gegensatz zur klassischen Genetik beschreibt die Epigenetik vererbbare zelluläre Modifikationen, die nicht auf eine Änderung der DNA-Sequenz zurückzuführen sind (Meaney, 2010). Demnach koordinieren epigenetische Mechanismen die Regulation der Genexpression, indem sie primär die transkriptionelle Aktivität der Gene determinieren (Gibney und Nolan, 2010). Die ursprünglich bestehende Hypothese, dass die sogenannten epigenetischen Abdrücke stabil und irreversibel seien, wurde inzwischen widerlegt. Vielmehr liefert die aktuelle Forschung eindeutige Hinweise auf die Dynamik und Reversibilität der Prozesse, die maßgeblich durch vorherrschende Umweltbedingungen beeinflusst werden. Dies ermöglicht eine neue Betrachtung der epigenetischen Plastizität, die das zelluläre Schicksal bestimmt (Iurato und Igamberdiev, 2022).

2.1 DIE EPIGENETISCHE REGULATION

Die transkriptionelle Regulation steuert die Genaktivität auf zwei eng miteinander verknüpften Ebenen. Einerseits initiieren und regulieren Transkriptionsfaktoren (TFs) den Transkriptionsprozess, indem sie spezifische DNA-Sequenzen, wie Enhancer- und Promotorregionen erkennen und die Rekrutierung und Aktivierung des Transkriptionsapparates vermitteln. Andererseits bildet das Chromatin mit seinen Regulatoren die strukturelle Grundlage der Transkription und entsprechend der Genexpression (Lee und Young, 2013; Lai und Pugh, 2017). Das Chromatin ist eine komplexe, makromolekulare dynamische Struktur, die im Zellkern von Eukaryoten lokalisiert ist. Die vorliegende Chromatinstruktur ermöglicht nicht nur eine effiziente Verpackung der etwa 2 m langen DNA, sondern reguliert gleichzeitig deren Zugänglichkeit in präziser räumlicher und zeitlicher Abstimmung. Das Chromatin setzt sich im Allgemeinen aus DNA, Histonen, Nicht-Histon-Proteinen und RNA zusammen (Millán-Zambrano *et al.*, 2022). Histone sind kleine, positiv geladene Proteine, die in der Regel weniger als 150 Aminosäuren (AS) aufweisen (Maze *et al.*, 2014). Strukturell sind 146 Basenpaare (bp) der DNA in 1,65 linksgängigen superhelikalen Windungen um einen

Histonkomplex gewickelt, der aus den Kernhistonen H2A, H2B, H3 und H4 besteht (Luger *et al.*, 1997). Diese Anordnung, die auch als Perlenkettenstruktur (engl. *beads-on-a-string model*) bekannt ist und erstmals 1974 von Roger Kornberg beschrieben wurde, bildet die zentrale strukturelle Einheit des Chromatins, das Nukleosom (Kornberg, 1974; Luger *et al.*, 1997; Baldi *et al.*, 2020). Der Histonkomplex setzt sich aus einem Histonoktamer zusammen, das aus einem Tetramer der Histone H3 und H4 sowie zwei H2A-H2B-Dimeren aufgebaut ist. Zusätzlich bindet das Linker-Histon H1 an die DNA zwischen benachbarten Nukleosomen und nimmt somit eine Schlüsselrolle in der weiteren Kompaktierung und Präzisierung der Chromatinstruktur ein (Luger *et al.*, 1997). Darüber hinaus tragen Histonvarianten, die sich meist nur durch wenige AS von den Kernhistonen unterscheiden, zu einer weiteren Diversifizierung und Feinregulation des Chromatins bei (Maze *et al.*, 2014; Millán-Zambrano *et al.*, 2022). Im Gegensatz zu den kanonischen Histonen werden Histonvarianten meist replikationsunabhängig synthetisiert und eingebaut, wobei die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen und Funktionen bisher nur unvollständig verstanden sind. Bekannt ist, dass bestimmte Varianten ein charakteristisches Spektrum an posttranslationalen Modifikationen (PTMs) aufweisen, wodurch sie bei der dynamischen Umstrukturierung des Chromatins, dem *Chromatin remodeling*, eine essenzielle Rolle spielen. Ein Beispiel ist die Variante H3.3 die sich in vier AS von der kanonischen Form von H3 (H3.1) unterscheidet. H3.3 wird bevorzugt mit transkriptionsaktivierenden PTMs und damit aktiven genomischen Regionen assoziiert, während H3.1 im Vergleich zu H3.3 mehr repressive Modifikationen aufweist (Maze *et al.*, 2014).

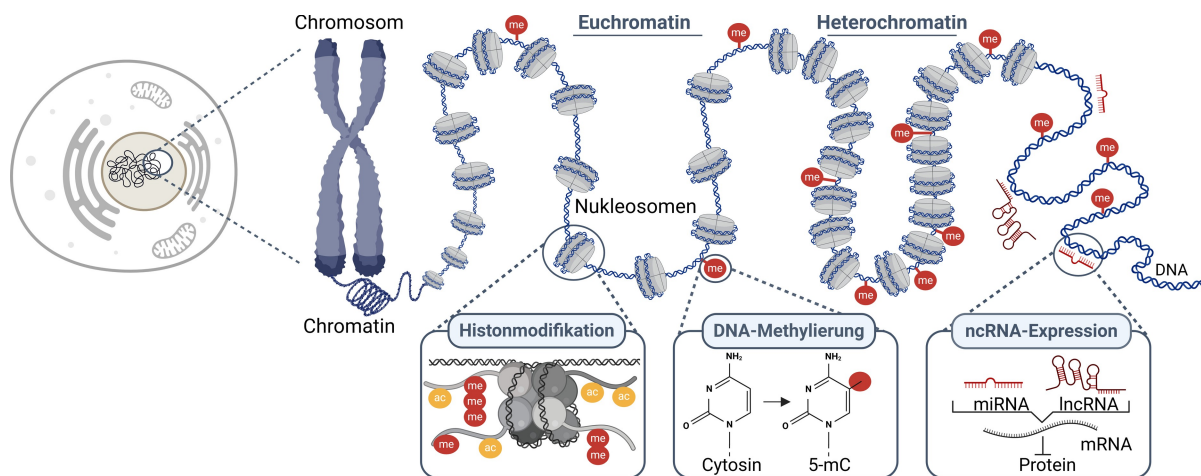


Abbildung 1 | Aufbau des Chromatins und Mechanismen der epigenetischen Regulation. Das Chromatin ist die hochstrukturierte Organisation der DNA im Zellkern und liegt in Form von Chromosomen vor. Es besteht aus wiederholten funktionellen Einheiten, den Nukleosomen, die aus einem Histonoktamerkomplex aufgebaut sind. Je nach Grad der Kompaktierung wird das Chromatin in Euchromatin (locker strukturierte, transkriptionsaktive Form) und Heterochromatin (dicht gepackte, transkriptionsinaktive Form) unterteilt. Histonmodifikationen, wie Acetylierungen (in Gelb dargestellt) und Methylierungen (in Rot dargestellt), beeinflussen die Chromatinstruktur und regulieren die Transkriptionsaktivität assoziierter Gene. Die DNA-Methylierung, bei der Cytosin zu 5-Methylcytosin (5-mC) methyliert wird, ist häufig mit einer Inhibition der Transkription assoziiert, insbesondere in Promotorregionen. *Non-coding RNAs* (ncRNAs), darunter *micro RNAs* (miRNAs) und *long non-coding RNAs* (lncRNAs), modulieren die Genexpression unter anderem durch die Bindung an *messenger RNA* (mRNA), wodurch deren Translation verhindert wird. Diese epigenetischen Mechanismen ermöglichen eine dynamische Kontrolle der Genexpression und eine funktionelle Anpassung des Chromatins an zelluläre Anforderungen (modifiziert nach Lump *et al.*, 2024). Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

Die Unterscheidung zwischen Euchromatin und Heterochromatin, entsprechend dem aktiven bzw. inaktiven Zustand, basiert auf dem Kompaktierungsgrad des Chromatins, der durch die Positionierung der Nukleosomen bestimmt wird. Aktive Promotorregionen zeichnen sich durch eine lockere, offene Chromatinstruktur mit geringer Nukleosomendichte aus, während inaktive Gene eine dichte Nukleosomenverteilung in ihren Promotorbereichen aufweisen (Parmar und Padinhatteeri, 2020; Singh und Mueller-Planitz, 2021).

Die koordinierte Regulation der Transkription wird durch ein Zusammenspiel verschiedener epigenetischer Regulationsmechanismen gewährleistet. Spezifische epigenetische Modifikationen auf allen Ebenen des Chromatins – DNA, Histon und RNA – bestimmen das vorherrschende Transkriptionsprofil. Zu den zentralen Mechanismen zählen die posttranslationale Modifikation von Histonen, die DNA-Methylierung und die Expression von nicht-codierender RNA (ncRNA, engl. *non-coding RNA*) (Choudhuri *et al.*, 2010; Gibney und Nolan, 2010). Diese Prozesse sind in einem fein abgestimmten regulatorischen Netzwerk eng miteinander verknüpft und beeinflussen sich gegenseitig (Manna *et al.*, 2023). Abbildung 1 veranschaulicht den strukturellen Aufbau des Genoms sowie die epigenetischen Mechanismen, die an der transkriptionellen Regulation beteiligt sind.

2.1.1 Posttranslationale Histonmodifikation

Histone weisen eine globuläre Domäne sowie eine N-terminale Seitenkette auf, die aus der Nukleosomenstruktur herausragt und mit dem umgebenden Chromatin-Milieu interagieren kann (siehe Abbildung 1). Sowohl die globuläre Domäne als auch die Seitenketten unterliegen verschiedenen kovalenten Modifikationen, wie Acetylierungen, die nach der Histonsynthese posttranslational an spezifische AS-Positionen übertragen werden (Millán-Zambrano *et al.*, 2022). Gemäß der nukleosomalen Anordnung der Histone ist die laterale Oberfläche der globulären Domäne weniger zugänglich für Chromatin-modifizierende Enzyme als die herausragenden Seitenketten. In diesem Zusammenhang ist jedoch die hohe Dynamik der Nukleosomen zu berücksichtigen, durch die sich Bereiche der Chromatinstruktur spontan öffnen oder schließen können. Dies ermöglicht eine temporäre Freilegung globulärer Bindungsstellen für regulatorische Proteine und Chromatin-modifizierende Enzyme, wodurch diesen ein erleichterter Zugang zur lateralen Nukleosomenoberfläche gewährt wird (Millán-Zambrano *et al.*, 2022). Derzeit sind über 30 verschiedene posttranslationale Histonmodifikationen (hPTMs) bekannt, darunter Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Lactylierung (Zhao und Garcia, 2015; Chan und Maze, 2020). Eine Auflistung der aktuell in der Literatur beschriebenen hPTMs ist dem Anhang A.2.1 zu entnehmen. Anzumerken ist, dass Histone schon während ihrer Synthese auch cotranslational modifiziert werden können, beispielsweise durch die N-terminale Histonacetylierung, die unter anderem konstitutiv bei den Histonen H1 und H4 auftritt, wobei deren spezifische Funktion bislang nicht geklärt ist (Joseph und Young, 2023).

Die durch Chromatinmodifikationen bedingte dynamische Landschaft an hPTMs wird von einer Vielzahl von Enzymen geprägt, deren Aktivität mit den zellulären Stoffwechszuständen verknüpft ist. Abhängig von ihrer Funktion lassen sich diese Enzyme in *Writer*, *Reader* und *Eraser*

unterteilen. *Writer* katalysieren die kovalente Addition der jeweiligen Modifikationen, wohingegen *Eraser* eine antagonistische Wirkung aufweisen, indem sie die Modifikationen wieder entfernen. *Reader* erkennen spezifische Domänen und leiten daraufhin Signaltransduktionskaskaden ein (Millán-Zambrano *et al.*, 2022). Die histonmodifizierenden Enzyme sind in der Regel als Multiproteinkomplexe organisiert, was ihnen eine funktionelle Diversität sowie eine zielgerichtete Modifikation von Histonen in Abhängigkeit vom chromosomalen Kontext ermöglicht (Ricketts *et al.*, 2019).

Bereits in den 1960er Jahren wurden die Acetylierung und Methylierung von Histonen als erste bekannte hPTMs identifiziert (Allfrey *et al.*, 1964). Die Histonacetylierung beschreibt die reversible Übertragung einer Acetylgruppe vom Donorsubstrat Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) auf die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrests der Histone (Allfrey *et al.*, 1964; Verdin und Ott, 2015). Diese Modifikation, insbesondere an den N-terminalen Seitenketten, nimmt eine zentrale Rolle bei der Regulation der Chromatinstruktur ein. Die negativ geladenen Acetylgruppen neutralisieren die positive Ladung der Lysinreste, was zu einer Abschwächung der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen den Histonen und der negativ geladenen DNA führt. Dies resultiert in einer Auflockerung des Chromatins, was wiederum die Zugänglichkeit der DNA für die Transkriptionsmaschinerie erleichtert (Verdin und Ott, 2015; Millán-Zambrano *et al.*, 2022). Genomweite Analysen zeigen, dass Acetylierungen hauptsächlich mit Promotorregionen und dem 5'-Ende transkribierter Gene assoziiert sind (Martin *et al.*, 2021). Als *Writer* der Histonacetylierung gelten die Histonacetyltransferasen (HATs), die auf Basis ihrer katalytischen Domänen klassifiziert werden. Zu den wichtigsten Klassen zählen die *general control non-repressed protein 5* (Gcn5)-N-Acetyltransferasen (GNATs), zu denen Gcn5 und *p300-cyclic AMP-responsive element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP)-associated factor* (PCAF) gehören, sowie die MYST-HATs. Die Abkürzung MYST steht dabei für die Anfangsbuchstaben der Namen der ersten bekannten Proteine der Proteinfamilie *monocytic leukemia zinc finger protein-related factor* (Morf), *yeast bromodomain factor 2* (Ybf2), *something about silencing 2* (Sas2) und *tat-interacting protein 60 kDa* (Tip60). Zu den MYST-HATs gehört beispielsweise auch *circadian locomotor output cycles protein kaput* (CLOCK). Darüber hinaus sind weitere Vertreter wie p300/CBP und andere nukleäre Coaktivatoren ebenfalls durch eine intrinsische HAT-Aktivität charakterisiert, wobei diese jedoch keine konservierte HAT-Domäne aufweisen. Die HAT-Multiproteinkomplexe bestehen aus spezifischen Untereinheiten, die für die Rekrutierung und Lokalisierung der HAT-Komplexe verantwortlich sind. Zu diesen Untereinheiten zählen beispielsweise Bromo-, Chromo- oder *Plant Homeodomain* (PHD)-Domänen (Lee und Workman, 2007). Strukturell hervorzuheben ist, dass einige HATs, insbesondere Vertreter der MYST-Enzymfamilie wie Tip60, Zinkfingerdomänen enthalten (Yusuf *et al.*, 2021).

Die Deacetylierung von Histonen wird durch Histondeacetylasen (HDACs) katalysiert, die, analog zu den HATs, verschiedene katalytische Untereinheiten aufweisen. Auf Basis ihrer funktionellen Domäne werden HDACs in der Regel in die HDAC-Enzymfamilie und die *silent information regulator 2* (Sir2)-ähnlichen Proteine, die Sirtuine (SIRT)-Subgruppe, unterteilt. Beide Proteinfamilien erfordern unterschiedliche katalytische Cofaktoren. Während die HDAC-Enzymfamilie Acetyl-CoA nutzt, sind SIRTs auf Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺)

angewiesen. Bisher wurden 18 HDACs identifiziert, die in vier Klassen (I-IV) eingeteilt werden. Klasse II wird zusätzlich in die Untergruppen IIa und IIb untergliedert. Klasse I umfasst HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8, die vorrangig im Nukleus aktiv sind und eine Schlüsselrolle in der Genregulation einnehmen. Klasse IIa beinhaltet HDAC4, HDAC5, HDAC7 und HDAC9, die aufgrund einer nukleären Lokalisationssequenz am N-Terminus sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma lokalisiert sind. Die Deacetylasen der Klasse IIb HDAC6 und HDAC10 kommen dagegen überwiegend im Zytoplasma vor. In Klasse III sind die NAD⁺-abhängigen SIRTs 1-7 eingeteilt, die unter anderem auch in DNA-Reparaturprozesse involviert sind. Die meisten SIRTs sind primär im Zellkern zu finden, mit Ausnahme von SIRT4 und SIRT5, die hauptsächlich in den Mitochondrien präsent sind. Andere SIRTs wie SIRT1 und SIRT2 sind neben dem Zellkern auch im Zytoplasma lokalisiert, während SIRT3 ebenfalls in den Mitochondrien zu finden ist. SIRTs zeichnen sich durch ihre funktionelle Diversität aus, da sie neben ihrer Deacetylase-Aktivität auch weitere enzymatische Funktionen, wie eine Mono-ADP-Ribosyltransferase-Aktivität, besitzen. Die Klasse IV umfasst bislang ausschließlich HDAC11. Eine besondere Rolle nimmt HDAC6 ein, da es eine Ubiquitin-bindenden Zinkdomäne besitzt, die zusätzliche regulatorische und katalytische Funktionen ermöglicht (Park und Kim, 2020).

Acetylierungen können grundsätzlich an allen Lysinresten erfolgen, wobei insbesondere die Acetylierung von Histon H3 und H4 in der Literatur als zentraler Mechanismus zur Regulation der Transkriptionsaktivität beschrieben wird (Millán-Zambrano *et al.*, 2022). Bekannte Acetylierungen in transkriptionsaktiven Promotorregionen von H3 sind unter anderem H3K9ac, H3K18ac und H3K27ac (Wang *et al.*, 2008b). Abbildung 2A veranschaulicht den Mechanismus der Histonacetylierung und -deacetylierung.

Während die Acetylierung der Histone aufgrund einer Ladungsänderung konsistent die DNA-Histon-Interaktion vermindert und dadurch die Transkription fördert, beeinflusst die Methylierung die Anlagerung von Chromatin-assoziiierenden *Reader*-Proteinen. Dies verleiht der Methylierung sowohl transkriptionsaktivierende als auch -reprimierende Eigenschaften (Morera *et al.*, 2016). Histonmethylierungen betreffen primär die basischen AS Lysin und Arginin, seltener auch Histidin. Bei einer Methylierung des Lysinrests ist das Vorliegen der ϵ -Aminogruppe mit unterschiedlichen Methylierungsgraden (Mono-, Di- und Trimethylierung) möglich. Für Arginin werden Mono- und Dimethylierungen beschrieben, wobei sich durch die vorliegende Guanidinygruppe zusätzlich symmetrische und asymmetrische Dimethylierungen ergeben. Für Histidin wurde bisher ausschließlich die monomethylierte Form nachgewiesen (Greer und Shi, 2012). Die Auswirkungen der Histonmethylierung auf die Transkription sind stets kontextabhängig zu betrachten. Unterschiedliche Methylierungsgrade an derselben AS können gegensätzliche Funktionen erfüllen. Beispielsweise zeigt die Monomethylierung von H3K27 einen aktivierenden Charakter, wohingegen der trimethylierten Form transkriptionsreprimierende Eigenschaften zugewiesen werden (Ferrari *et al.*, 2014). Zudem ist bekannt, dass bestimmte hPTMs sowohl aktivierende als auch repressive Eigenschaften aufweisen können (Greer und Shi, 2012). So wird etwa durch die Anlagerung spezifischer Effektorproteine der aktivierende Charakter der beiden hPTMs H3K4me2 und H3K4me3 in einen repressiven Charakter überführt. Auch die Kombination der Methylierungsmuster hat einen entscheidenden Einfluss auf die Effektorwirkung. Treten H3K4me3 und H3K27me3 einzeln auf, so indizieren sie eine aktivierte bzw.

reprimierte Transkription. Wenn beide hPTMs gleichzeitig an Histon H3 vorkommen, führt diese Kombination potenziell auch zu transkriptionsaktivierenden Effekten. Möglicherweise wird dies durch Multiproteinkomplex-Reader gesteuert, die mehrere Bindungsdomänen besitzen und simultan beide Methylierungsmuster erkennen können (Greer und Shi, 2012).

Die Histonmethylierung wird durch Histonmethyltransferasen (HMTs) katalysiert, die S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) als Methylendonor verwenden. Bisher wurden mehr als 50 verschiedene humane Lysin-Methyltransferasen (KMTs) beschrieben, die in zwei Hauptklassen unterteilt werden (Morera *et al.*, 2016). Die Struktur der KMTs beinhaltet entweder eine *suppressor of variegation 3-9* (SUV39) *enhancer of zeste, trithorax* (SET-) oder eine *disruptor of telomeric silencing 1* (DOT1-) Domäne. In Abhängigkeit von ihren jeweiligen katalytischen Sequenzhomologien werden die SET-Domänen KMTs in vier Subgruppen unterteilt, SET1, SET2, SUV39 und *retinoblastoma-interacting zinc-finger protein* (RIZ) (Greer und Shi, 2012; Morera *et al.*, 2016).

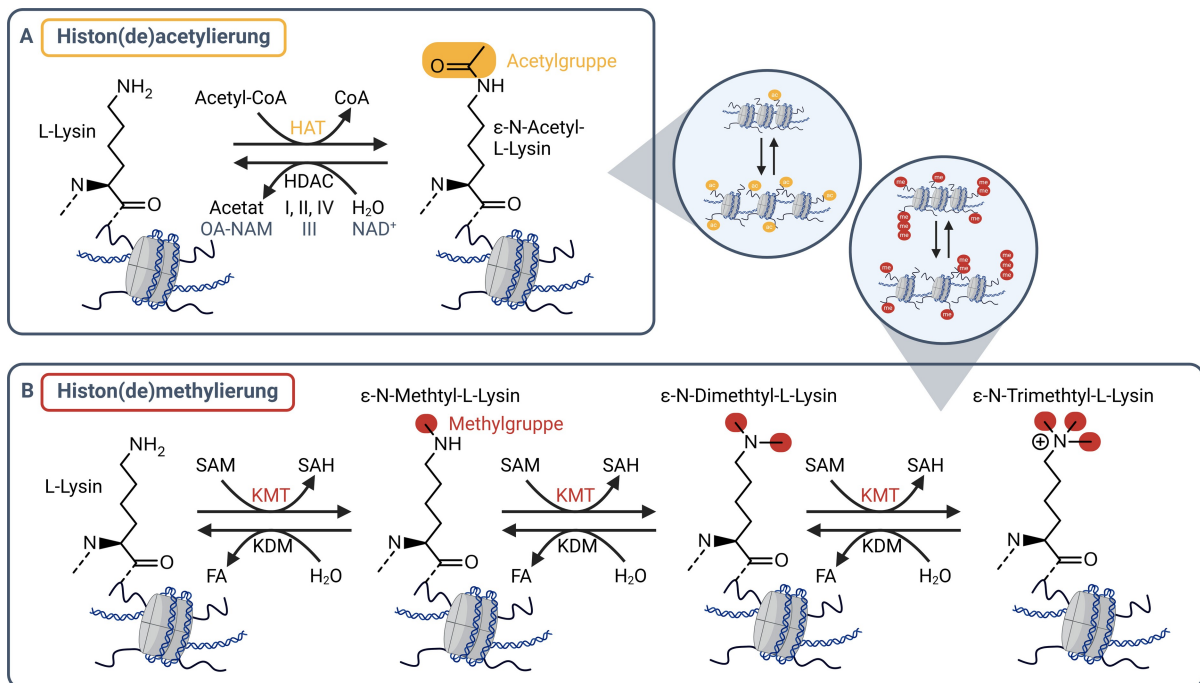


Abbildung 2 | Schematische Darstellung der Histon(de)acetylierung und Histon(de)methylierung. (A) ε-N-(De)acetylierung von Lysin: Dargestellt ist die enzymatische Übertragung einer Acetylgruppe auf den ε-N-Lysinrest von Histonproteinen durch Histonacetyltransferasen (HATs) unter Verwendung von Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) als Acetylgruppendonor. Die Entfernung dieser Modifikation erfolgt durch Histondeacetylasen (HDACs) der Klassen I, II und IV, wobei Acetat freigesetzt wird. HDACs der Klasse III (Sirtuine) unterscheiden sich mechanistisch, da sie Nicotinamadenindinukleotid (NAD⁺) als katalytischen Cofaktor benötigen. Dabei wird NAD⁺ in einem enzymatisch gekoppelten Reaktionszyklus in O-Acetyl-ADP-Ribose und Nicotinamid (OA-NAM) umgewandelt. Funktionell bewirkt eine Hyperacetylierung eine Lockerung der Chromatinstruktur, während eine verstärkte Deacetylierung die Chromatinverdichtung fördert. (B) ε-N-(De)methylierung von Lysin: Die Methylierung des ε-N-Lysinrests wird durch Lysin-spezifische Methyltransferasen (KMTs) vermittelt, die S-Adosylmethionin (SAM) als Methylgruppendonor nutzen. Dabei entstehen Mono-, Di- oder Trimethylierungsaddukte. Die Chromatinstruktur wird durch die Rekrutierung spezifischer Proteine beeinflusst, deren Funktion von der Position und dem Grad der Methylierung abhängt. Sowohl eine Lockerung der Genstruktur als auch eine Chromatinkondensation sind möglich (die dargestellten Informationen stammen aus Smith und Denu, 2009; Kim und Yeom, 2018; modifiziert nach Kumar *et al.*, 2021). Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt. FA: Formaldehyd, KDM: Lysin-spezifische Demethylase, SAH: S-Adosylhomocystein.

Diese Subgruppen besitzen strukturell mehrere unterschiedliche Domänen, die sowohl vor als auch nach der SET-Domäne lokalisiert sind und entsprechend als Prä- und Post-SET-Domänen bezeichnet werden. Beispielsweise ist die Enzymaktivität von Enzymen der SUV39 Familie essenziell durch eine Prä-SET Domäne bedingt, wie dies bei *euchromatic histone-lysine N methyltransferase 2* (EHMT2) der Fall ist. Neben weiteren KMTs mit SET-Domänen, die jedoch nicht eindeutig zugeordnet werden können, existieren auch DOT1-ähnliche KMTs, die die Methylierung der Lysinreste ohne SET-Domäne katalysieren. Zusätzlich ist die Protein-Arginin-N-Methyltransferase (PRMT)-Familie in die Methylierung von Argininresten involviert (Greer und Shi, 2012; Morera *et al.*, 2016).

Die Demethylierung der Lysinpositionen wird durch Histondemethylasen vermittelt, die in eine Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)-abhängige und eine Eisen-/ α -Ketoglutarat-abhängige Enzymfamilie unterteilt werden. Die FAD-abhängige *lysine-specific histone demethylase* (KDM)-Subfamilie umfasst die beiden Lysin-spezifischen Demethylasen KDM1A und KDM1B, die die oxidative Demethylierung unter Verwendung von FAD als Cofaktor katalysieren. Die JumonjiC-Domänen-KDMs (JmjC-KDMs) sind der Eisen-/ α -Ketoglutarat-abhängigen Familie zuzuordnen und umfassen insgesamt 21 Vertreter, die in sechs Klassen eingeteilt werden. Bei einigen Vertretern dieser Familie, wie KDM2A, KDM3A und KDM5, sind zusätzlich Zink-bindende Domänen vorhanden, die ihre Funktion ergänzen (Li *et al.*, 2024). Abbildung 2B veranschaulicht die Histonmethylierung und -demethylierung am Beispiel von Lysin schematisch.

Um die komplexen Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Modifikationen zu beschreiben, wurde das Konzept des 'Histon-Codes' eingeführt (Jenuwein und Allis, 2001). Neuere Studien zeigen jedoch, dass die zugrunde liegenden Mechanismen weit über eine einfache codierte Zuordnung einzelner Modifikationen hinausreichen. Vielmehr handelt es sich um ein multidimensionales Netzwerk, in dem Interaktionen und Kombinationsmuster der hPTMs eine dynamische und fein abgestimmte Regulation der Chromatinstruktur und der Genexpression ermöglichen. Dieses erweiterte Modell wird zunehmend als 'Histon-Sprache' bezeichnet und spiegelt die Komplexität und Flexibilität dieser Mechanismen wider (Rothbart und Strahl, 2014). Darüber hinaus modifizieren zahlreiche Chromatin-verändernde Enzyme nicht nur Histone, sondern auch weitere Proteine wie TFs, Zellzyklusregulatoren und essenzielle Proteine des Zellmetabolismus (Di Blasi *et al.*, 2021; Shvedunova und Akhtar, 2022).

2.1.2 DNA-Methylierung

Neben den Histonen trägt auch die DNA vererbare epigenetische Methylierungsmuster, die eine entscheidende Rolle für die Regulation der Genexpression und die Aufrechterhaltung der zellulären Identität einnehmen. Im Gegensatz zu Histonen, die eine Vielzahl potenzieller Modifikationsstellen aufweisen, ist die epigenetische Regulation der DNA primär auf die Methylierung der Nukleotidbase Cytosin beschränkt. Hierbei katalysieren DNA-Methyltransferasen (DNMTs) die Übertragung einer Methylgruppe von SAM auf das fünfte C-Atom von Cytosin (C), wodurch 5-Methylcytosin (5-mC) entsteht. Dabei übernehmen DNMT3A und DNMT3B die

de novo-Methylierung unmodifizierter DNA, während DNMT1 die Erhaltung bestehender Methylierungsmuster im Verlauf der DNA-Replikation sicherstellt (Moore *et al.*, 2013). Die DNA-Methylierung erfolgt bevorzugt in CpG-Dinukleotid-reichen Regionen, sogenannten CpG-Inseln, die zu etwa 72 % in Promotorregionen lokalisiert sind (Saxonov *et al.*, 2006). Eine charakteristische Eigenschaft der CpG-Inseln ist ihre im Vergleich zu anderen genomischen Regionen geringere Nukleosomendichte, die die Bindung von TFs begünstigt (Fenouil *et al.*, 2012). Aus mechanistischer Perspektive beeinflusst die DNA-Methylierung die Transkription auf zwei verschiedene Arten. Einerseits erfolgt eine direkte Beeinflussung durch sterische Blockade der TF-Bindung. Andererseits findet eine indirekte Beeinflussung statt, bei der 5-mC-spezifische, transkriptionsrepressive Proteine an die Methylierungsmuster binden und so die Genexpression hemmen (Sergeeva *et al.*, 2023). Die Demethylierung erfolgt entweder über Desaminierung oder Oxidation von 5-mC, wobei die entstehenden Produkte durch die Basenexzisionsreparatur (BER) entfernt werden können. Alternativ katalysieren *ten-eleven translocation* (TET)-Enzyme (TET1-3) die schrittweise Oxidation von 5-mC zu 5-Hydroxymethylcytosin (5-hmC). Dieses Zwischenprodukt kann entweder vollständig demethyliert oder reversibel in 5-mC zurückkonvertiert werden (Moore *et al.*, 2013). Die DNA-Methylierung stellt folglich einen dynamischen und streng regulierten Mechanismus dar, der sowohl stabile Genstilllegungs-Programme unterstützt als auch durch Demethylierung flexibel an zelluläre Anforderungen angepasst werden kann.

2.1.3 Non-coding RNAs

Nahezu das gesamte humane Genom wird transkribiert, wobei nur etwa 2 % der Transkripte in Proteine translatiert werden (Liu *et al.*, 2013a). Diese nicht-codierenden ncRNAs umfassen demnach ein umfangreiches strukturelles Spektrum und sind neben der DNA-Methylierung und der Modifikation der Histone zudem an der epigenetischen Regulation beteiligt. ncRNAs werden basierend auf ihrer Länge in *short* ncRNAs (< 200 Nukleotide), wie beispielsweise *micro* RNAs (miRNAs), und in *long* ncRNAs (lncRNAs) (> 200 Nukleotide) klassifiziert (Wei *et al.*, 2017). Während die Funktion von miRNAs primär in der Steuerung der posttranskriptionellen Genregulation durch Translationshemmung oder Abbau von *messenger* RNA (mRNA) besteht, zeichnen sich lncRNAs durch ein breiteres regulatorisches Spektrum aus. Sie interagieren mit Ziel-mRNAs, Proteinen, DNA-Sequenzen und miRNAs, wodurch sie sowohl transkriptionelle als auch posttranskriptionelle Prozesse modulieren (Djupedal und Ekwall, 2009; Kazimierczyk *et al.*, 2020). Darüber hinaus existieren zusätzliche chemische Modifikationen der ncRNAs, die den regulatorischen Prozess weiter differenzieren und die funktionelle Diversität der ncRNAs erweitern (Rong *et al.*, 2021).

Die epigenetische Regulation ist eine zentrale Determinante der Transkription und essenziell für die Erhaltung der Zellphysiologie sowie der zellulären Identität. Entscheidend ist jedoch, dass epigenetische Mechanismen nachweislich durch Umweltfaktoren beeinflusst werden können, wodurch externe Stimuli die epigenetische Landschaft der Zellen modifizieren und die Pathogenese verschiedener Krankheiten begünstigen. Eine Dysregulation der epigenetischen Prozesse wird unter

anderem mit der Entstehung neurologischer und autoimmunbedingter Erkrankungen sowie Krebserkrankungen in Verbindung gebracht (Portela und Esteller, 2010). Insbesondere die Exposition von Zellen gegenüber kanzerogenen Substanzen wie anorganischen Arsenverbindungen führt nachweislich zu epigenomischen Veränderungen, die maßgeblich zur Substanz-vermittelten Kanzerogenese beitragen können (Saintilnord und Fondufe-Mittendorf, 2021).

2.2 ARSEN

Arsen wird aufgrund seiner charakteristischen physikochemischen Eigenschaften als Metalloid klassifiziert. Mit der Ordnungszahl 33 ist Arsen der fünften Hauptgruppe des Periodensystems zugeordnet und weist eine relative atomare Masse von 74,922 Da auf (Rae, 2020). Aufgrund seiner hochreaktiven Eigenschaften, die eine Interaktion mit einer Vielzahl zellulärer Verbindungen bewirken, beeinflusst Arsen unterschiedlichste zelluläre Prozesse (Muzaffar *et al.*, 2023). Die chemische Reaktivität von Arsen ergibt sich aus der s^2p^3 -Valenzelektronenkonfiguration (Rae, 2020), die das Vorliegen mehrerer Oxidationsstufen (-3, 0, +3, +5) ermöglicht. Die Oxidationsstufen +3 (Arsenit) und +5 (Arsenat) treten dabei am häufigsten auf und gelten als die toxikologisch relevantesten Formen (IARC, 2012; Tam *et al.*, 2020).

2.2.1 Geochemisches Vorkommen, Anwendung und Exposition

Arsen ist das 20. häufigste Element der Erdkruste und damit ein ubiquitärer Bestandteil der Umwelt. Das Halbmetall ist sowohl in Böden, Gesteinen, der Luft sowie im Wasser nachweisbar, wobei die Konzentrationen regional stark variieren und besonders von geologischen sowie ökologischen Bedingungen abhängig sind. Etwa 99 % des Arsenvorkommens sind an Mineralien gebunden, darunter sulfidische, oxidische und silicatische Verbindungen. Die Freisetzung von Arsen in die Umwelt wird maßgeblich durch geologische und ökologische Prozesse wie Gesteinserosion, Verwitterung sowie Naturkatastrophen (z.B. Vulkanausbrüche und Waldbrände) beeinflusst (Chen und Costa, 2021). Etwa 90 % der globalen Arsenbelastung sind geogenen Ursprungs, wobei plattentektonische Prozesse, Gebirgsbildungen, Erosion und Sedimentationsprozesse als entscheidende Faktoren gelten (Shaji *et al.*, 2021). Darüber hinaus wird diskutiert, dass der Klimawandel durch sukzessiv steigende Grundwassertemperaturen die mikrobielle Aktivität im Wasser erhöht, sodass vermehrt anoxische Bedingungen auftreten, die eine verstärkte Freisetzung von Arsen aus Gesteinen in das Grundwasser begünstigen (Benz *et al.*, 2024). Neben dem allgegenwärtigen Vorkommen von Arsen findet auch ein anthropogener Eintrag in die Umwelt statt. Zu den bedeutendsten Quellen zählen der Bergbau, die Verbrennung fossiler Brennstoffe sowie der Einsatz von arsenhaltigen Fungiziden, Pestiziden und Holzschutzmitteln, deren Verwendung in der EU inzwischen verboten ist. Die vorangegangene Nutzung hat jedoch weiterhin signifikante Umweltbelastungen zur Folge und führt zu einer erhöhten Exposition der globalen Bevölkerung (Chen und Costa, 2021; Muzaffar *et al.*, 2023). Parallel hierzu wird Arsen speziell in Form von Arsentrioxid

(As₂O₃, ATO) in der Medizin als Krebstherapeutikum zur Behandlung promyelozytärer Leukämien verwendet. Darüber hinaus werden neue arsenbasierte Therapeutika, wie arsenkonjugierte Peptidkomplexe, intensiv erforscht. Diese sogenannten *tumor-homing peptides* weisen *in vitro* eine bis zu 1000-fach höhere Spezifität und Wirksamkeit gegenüber leukämischen Tumorzellen im Vergleich zu Zellen aus Normalgewebe auf (Carrall *et al.*, 2023).

Die Aufnahme von Arsen in den menschlichen Organismus erfolgt primär über kontaminiertes Trinkwasser, aber auch über pflanzliche und tierische Nahrungsmittel sowie in geringerem Maße über die Atmosphäre. Von besonderer Relevanz ist die Anreicherung von Arsen im Grundwasser bzw. in aquatischen Systemen, die weltweit mehr als 500 Millionen Menschen akut betrifft (Shaji *et al.*, 2021). Derzeit überschreiten mehr als 108 Länder den von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) empfohlenen Grenzwert von 10 µg As/L (10 ppb) im Grundwasser, wobei südostasiatische Länder wie Bangladesch, China, Indien, Nepal und Vietnam die höchsten Belastungen aufweisen (Shaji *et al.*, 2021). Obwohl der Grenzwert für Arsen im europäischen Grundwasser zumeist eingehalten wird, nimmt die europäische Bevölkerung dennoch täglich moderate Arsenmengen über die Nahrung auf, die von der europäischen Lebensmittelsicherheitsbehörde (EFSA, engl. *European Food and Safety Authority*) als kritisch bewertet werden (EFSA, 2024a). Im Wasser und in Getreideprodukten dominieren hauptsächlich die anorganischen Formen Arsenit und Arsenat, während in Lebensmitteln wie Fisch, Obst und Gemüse überwiegend organische Arsenverbindungen vorkommen. Insbesondere Reis weist eine hohe Akkumulation von anorganischem Arsen auf, da die anaeroben Bedingungen des Nassanbaus die Verfügbarkeit von dreiwertigem Arsen erhöhen. In proteinreichen Reissorten ist eine verstärkte Anreicherung zu beobachten, da das dreiwertige Arsen aufgrund seiner Thiolaffinität intrazellulär an Proteine bindet, wodurch seine Bioverfügbarkeit signifikant erhöht wird (Mawia *et al.*, 2021). Die tägliche alimentäre Aufnahme von Arsen in der europäischen Allgemeinbevölkerung liegt bei etwa 20–300 µg (IARC, 2012). Im Vergleich zu Trinkwasser und Lebensmitteln stellt die inhalative Aufnahme von Arsen im Allgemeinen eine deutlich geringere Expositionsquelle dar. Spezifische Faktoren wie das Leben in städtischen Gebieten oder das Rauchen können jedoch die tatsächliche Inhalationsexposition erhöhen. Für beruflich exponierte Personengruppen wie Bergbau- oder Industriearbeitende, stellt die inhalative Aufnahme von Arsen-belasteten Partikeln, darunter ultrafeine Partikel (ca. 0,1-0,2 µm), wie sie bei der Kohleverbrennung entstehen, häufig die bedeutendste Expositionsquelle dar (IARC, 2012; Tian *et al.*, 2016). Obwohl die dermale Aufnahme von Arsen nicht zur Gesamtbelastung der Allgemeinbevölkerung beiträgt, ist bekannt, dass Arsen aus kontaminierter Erde perkutan absorbiert werden kann und auch gelöste Arsenverbindungen in signifikantem Maße über die Haut aufgenommen werden können (Lowney *et al.*, 2007; Ouypornkochagorn und Feldmann, 2010).

2.2.2 Toxikokinetik: Aufnahme, Verteilung und zelluläre Mechanismen der Toxizität

Das Element Arsen ist in jedem Individuum nachweisbar, wobei dem Metalloid keine physiologische Funktion im menschlichen Organismus zugeschrieben wird (IARC, 2012). Die

Aufnahme von Arsen erfolgt primär oral, wobei mehr als 90 % des aufgenommenen anorganischen Arsens über den Gastrointestinaltrakt absorbiert und primär über den Urin ausgeschieden werden (Watanabe und Hirano, 2013). Dabei ist die Absorptionsrate abhängig von der jeweiligen zugrunde liegenden Arsenspezies, da die intrazelluläre Translokation über unspezifische Nährstofftransporter erfolgt. Nach der Resorption im Körper wird Arsen in der Leber einer Biotransformation unterzogen, die zur Bildung methylierter Produkte führt (El-Ghiaty und El-Kadi, 2023).

Arsen in der Form von As^{3+} durchdringt die Zellmembran hauptsächlich über Aquaglyceroporinkanäle (AQPs), darunter AQP7 und AQP9, wobei letzterer primär in der Leber exprimiert wird (Liu *et al.*, 2004). Alternativ erfolgt die Aufnahme von As^{3+} auch über Hexosepermeasen wie den Glucosetransporter 1 (GLUT1) (Liu *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu gelangt As^{5+} aufgrund seiner molekularen Struktur nicht durch erleichterte Diffusion in die Zelle. Stattdessen erfolgt die energieabhängige Aufnahme über Phosphattransporter, insbesondere über das Natrium-abhängige Phosphattransportprotein 2B (NaPi-IIb), das vor allem in Leber- und Lungenzellen exprimiert wird (Villa-Bellosta und Sorribas, 2010).

Nach der Aufnahme wird intrazellulär eine Reihe komplexer biochemischer Prozesse durchlaufen, die durch reduzierende und oxidative Reaktionen sowie enzymatische Methylierungen gekennzeichnet sind (El-Ghiaty und El-Kadi, 2023). Intrazelluläres As^{5+} wird im ersten Schritt zunächst durch zelluläre Reduktasen im Cytosol zu As^{3+} reduziert (Mukhopadhyay und Rosen, 2002). Dieser Prozess kann allerdings auch extrazellulär im Blut ablaufen. As^{3+} weist eine hohe Affinität zu Thiolgruppen auf und interagiert somit bevorzugt mit Cystein-reichen Proteinen, wodurch stabile Proteinkomplexe gebildet werden (El-Ghiaty und El-Kadi, 2023). Ein zentraler Mechanismus der Arsenbiotransformation, der hauptsächlich in der Leber stattfindet, ist die enzymatische Methylierung durch die Arsenit-Methyltransferase (AS3MT). Der Arsenmetabolismus wurde erstmals von Frederik Challenger beschrieben (Challenger, 1945), während Hayakawa *et al.* den Mechanismus weiterentwickelten (Hayakawa *et al.*, 2005). Die beiden metabolischen Signalwege sind in Abbildung 3 illustrativ dargestellt. Im Challenger-Signalweg sind die Substrate für AS3MT direkt die dreiwertigen Arsenspezies As^{3+} , Monomethylarsensäure (MMA^{3+}) oder Dimethylarsensäure (DMA^{3+}), wohingegen im Hayakawa-Signalweg die jeweiligen dreiwertigen Glutathion (GSH)-Konjugate als primäre Substrate für AS3MT fungieren (El-Ghiaty und El-Kadi, 2023).

Der zelluläre Efflux der GSH-Konjugate wird maßgeblich durch Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige *ATP-binding cassette transporter* (ABC) vermittelt, den *multidrug resistance P-glycoproteins* (MRPs) MRP1, MRP2 und MRP4. MRP2, welches ausschließlich apikal lokalisiert ist, nimmt eine zentrale Rolle bei der biliären Exkretion der dreiwertigen GSH-Konjugate ein. Auch MRP1 ist in den biliären Efflux der GSH-Konjugate involviert, wobei auch eine Beteiligung am apikal-basolateralen Transport in den Blutkreislauf diskutiert wird. Neuere Studien weisen besonders auf die Bedeutung von MRP4 für den Transport der dreiwertigen Arsen-GSH-Konjugate und DMA^{5+} in den Blutkreislauf hin (Garbinski *et al.*, 2019; Hirano, 2020; El-Ghiaty und El-Kadi, 2023). Die Konjugate können über die Blutzirkulation in alle Organe transportiert werden, wodurch auch eine Ausscheidung über die Niere möglich ist. Insbesondere die fünfwertigen Methylierungsprodukte, vor allem DMA^{5+} , sind die Hauptexkretionsformen im Urin, vermutlich

aufgrund der geringen Thiolaffinität von As^{5+} . Da DMA^{5+} nach Intoxikation rasch im Urin nachweisbar ist, ist eine Weiterreaktion der dimethylierten Spezies zu einer trimethylierten unwahrscheinlich. Zusätzlich wird ein geringer Anteil an unkonjugiertem Arsen direkt über den Urin ausgeschieden, wobei in der Regel mehr As^{3+} als As^{5+} eliminiert wird (El-Ghiaty und El-Kadi, 2023). Es ist jedoch zu beachten, dass die während der Biotransformation gebildeten Metabolite je nach zugrunde liegender chemischer Form nicht zwangsläufig detoxifizierend sind, sondern in einigen Fällen eine höhere Toxizität als As^{3+} aufweisen können. Dies betrifft nicht nur die Zytotoxizität, sondern auch die Arsen-induzierte Zinkfreisetzung aus Zinkfingerstrukturen. Vor allem ist dies für MMA^{3+} , DMA^{3+} und As^{3+} von Relevanz, wobei die fünfwertigen Formen eine geringere Toxizität besitzen (Schwerdtle *et al.*, 2003a; Schwerdtle *et al.*, 2003b; El-Ghiaty und El-Kadi, 2023).

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Signalwegen wird auch eine intestinale Biotransformation der GSH-Konjugate aus dem Hayakawa-Signalweg diskutiert. Dabei wird vermutet, dass die Arsen-GSH-Konjugate über die Galle in den Darm gelangen und dort durch H_2S -produzierende Darmbakterien zu schwefelbeinhaltenden Derivaten umgesetzt werden. Diese Derivate können schließlich durch Reabsorption über den Urin ausgeschieden werden (Rubin *et al.*, 2014; El-Ghiaty und El-Kadi, 2023).

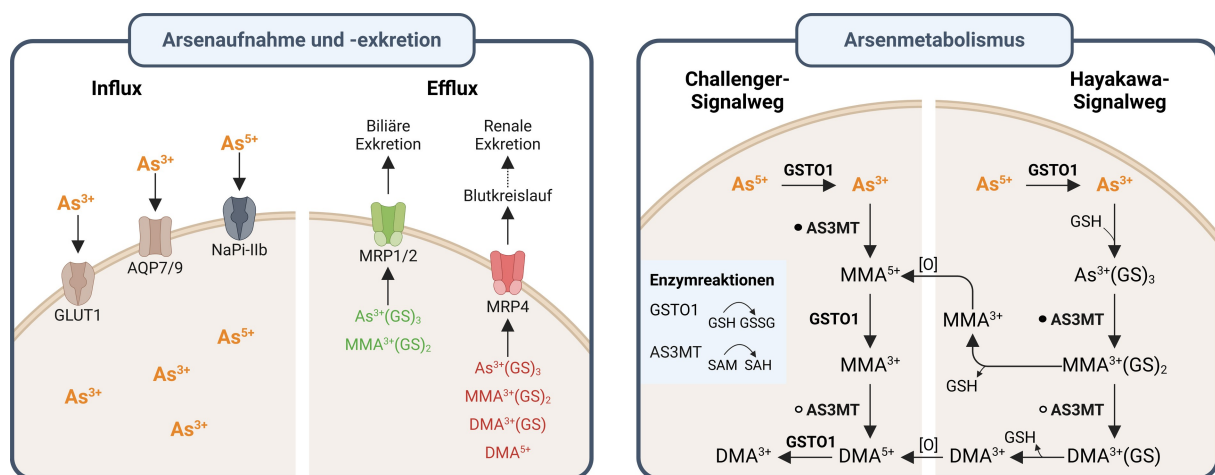


Abbildung 3 | Metabolismus von Arsen in Hepatozyten. As^{3+} wird über erleichterte Diffusion via AQP7, AQP9 oder GLUT1 aufgenommen, während As^{5+} über Phosphattransporter in die Zelle gelangt. Intrazellulär wird As^{5+} durch GSTO1 rasch zu As^{3+} reduziert. Für As^{3+} sind verschiedene Biotransformationswege bekannt, die jeweils eine primäre (•) und eine sekundäre (◦) Methylierung durch AS3MT unter Verwendung von SAM als Methylendonor beinhalten. Nach dem Challenger-Signalweg erfolgt die direkte Bildung von DMA^{5+} durch zweifache Methylierung von As^{3+} . Im alternativen Hayakawa-Signalweg wird zunächst ein GSH-Addukt gebildet, das anschließend die Methylierungsschritte durchläuft. Der Efflux von spezifischen GSH-Konjugaten wird durch verschiedene MRPs katalysiert. MRP1 und MRP2 sind primär für die Exkretion in die Galle verantwortlich, während MRP4 dreiwertige Konjugate in den Blutkreislauf transportiert, wodurch unter anderem eine nachfolgende renale Ausscheidung über den Urin ermöglicht wird (modifiziert nach El-Ghiaty und El-Kadi, 2023). Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

AS3MT: Arsenit-Methyltransferase, $\text{As}^{3+}(\text{GS})_3$: Arsenitglutathion, AQP7/9: Aquaporin 7/9, DMA^{3+} : Dreiwertige Dimethylarsinsäure, DMA^{5+} : Fünfwertige Dimethylarsinsäure, $\text{DMA}^{3+}(\text{GS})$: Dimethylarsinsäure-Glutathion, GLUT1: Glucose-Transporter 1, GSH: Glutathion (reduzierte Form), GSSG: Glutathion-Disulfid (oxidierte Form), GSTO1: Glutathion-S-Transferase Omega 1, MMA^{3+} : Dreiwertige Monomethylarsinsäure, MMA^{5+} : Fünfwertige Monomethylarsinsäure, $\text{MMA}^{3+}(\text{GS})_2$: Monomethylarsinsäure-Diglutathion, MRP1/2/4: Multidrug Resistance Associated Protein 1/2/4, SAH: S-Adenosylhomocystein, SAM: S-Adenosylmethionin.

Ein weiterer Aspekt, der für die Toxikodynamik von Arsen von Bedeutung ist, ist dessen subzelluläre Lokalisierung, die bisher jedoch kaum erforscht ist. Eine aktuelle pharmakokinetische Studie von Huang *et al.* mit ATO (As^{3+}) zeigt, dass Arsen in ATO-behandelten Zellen in den Nukleoli akkumuliert. Nach einer akuten Exposition reichern sich Schwefel- und Arsen-reiche Proteinaggregate an, die neben den Nukleoli auch im gesamten Zellkern sowie in membranfreien Kompartimenten des Zytoplasmas nachweisbar sind. Diese Akkumulation von Proteinkomplexen legt nahe, dass Arsen möglicherweise mit Aggregaten fehlgefalteter Proteine interagiert. Der genaue Mechanismus, der zu diesem Transport in den Zellkern führt, ist jedoch noch nicht bekannt (Huang *et al.*, 2022).

Im Rahmen der Detoxifizierung von Arsen sind somit der Transporter-vermittelte Efflux, die Komplexbildung mit Proteinen sowie die Sequestrierung in spezifischen Zellkompartimenten von Bedeutung. Durch die metabolische Biotransformation entstehen finale Methylierungsprodukte, die eine geringere Reaktivität aufweisen und leichter ausgeschieden werden können. Allerdings kann es bei einer exzessiven Exposition zu einer Sättigung der methylierenden Enzyme kommen, was in der Regel die Weiterreaktion zu den fünfwertigen dimethylierten Formen verhindert. Die Akkumulation der reaktiveren thiolaffinen dreiwertigen Arsenspezies resultiert demnach in vermehrten toxischen Interaktionen sowie Gewebeakkumulationen (El-Ghiaty und El-Kadi, 2023).

Zur Beurteilung der Arsenbelastung werden verschiedene Arsenmetabolite als Biomarker im Urin verwendet. Als primäre Biomarker können beispielsweise die Anteile an unmodifiziertem Arsen, MMA und DMA herangezogen werden. Darüber hinaus kann das Verhältnis der Anteile von MMA zu unkonjugiertem Arsen oder DMA zu MMA gebildet werden. Letzteres spiegelt schließlich das Verhältnis der primären zur sekundären Methylierung wider (González-Martínez *et al.*, 2024). Blut- und Urinproben dienen als Marker für eine akute Arsenexposition, während Keratin-reiche Gewebe wie Haare und Nägel zur Bewertung von Langzeitbelastungen Verwendung finden (IARC, 2012).

2.2.3 Toxikodynamik: Molekulare Mechanismen und Pathophysiologie

Arsen zählt zu den toxikologisch relevantesten Umweltkontaminanten natürlichen Ursprungs. Das toxikologische Potenzial wird maßgeblich durch die chemische Form (anorganisch oder organisch), den Oxidationszustand sowie die Dauer und Intensität der Exposition bestimmt. Aufgrund der deutlich geringeren Toxizität organischer Verbindungen sind für die Risikobewertung insbesondere anorganische Verbindungen von Relevanz. Vor allem dreiwertige anorganische Arsenverbindungen besitzen eine erhöhte Toxizität. Maßgeblich dafür ist deren hohe Affinität zu Thiolgruppen, die zu einer großen Anzahl an zellulären Reaktionspartnern und damit potenziell dysregulierten Signalwegen führt (El-Ghiaty und El-Kadi, 2023).

Klinische Merkmale einer akuten Arsenintoxikation umfassen unter anderem Erbrechen, starke Magenschmerzen und Diarrhö. Daneben können auch akute Psychosen, ein diffuser Hautausschlag sowie Kardiomyopathien und Krampfanfälle auftreten, wobei in extremen Fällen auch der Tod eintreten kann. Im Speziellen sind auch anhaltende neurologische Schäden wie periphere Neuropathien dokumentiert (Ratnaike, 2003). Bei einer chronischen Intoxikation werden in der

Literatur neurotoxische, reproduktionstoxische, hepatotoxische und nephrotoxische Effekte angeführt. Darüber hinaus wird auch ein Zusammenhang zwischen kardiovaskulärer Toxizität und *Diabetes mellitus* diskutiert (Singh *et al.*, 2011). Zudem werden Hautveränderungen wie Läsionen, Hyperpigmentierung und Hyperkeratosen beschrieben (Zeng und Zhang, 2020). Umfangreiche epidemiologische Studien und zahlreiche *in vivo*-Untersuchungen haben einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Exposition gegenüber anorganischem Arsen und einem erhöhten Tumorrisiko in verschiedenen Organen, darunter Haut, Lunge, Blase, Niere und Leber, nachgewiesen (Tam *et al.*, 2020). Daher stufen verschiedene Gremien anorganisches Arsen als bekanntes Humankarzinogen ein, darunter die deutsche Maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK)-Kommission, die *International Agency for Research on Cancer* (IARC) und die US-Umweltschutzbehörde (EPA, engl. *Environmental Protection Agency*) (Greim, 2002; IARC, 2012; NRC, 2013).

Bei der Festlegung von Grenzwerten spielt demnach die Kanzerogenität von anorganischem Arsen und dessen Metaboliten eine entscheidende Rolle. In der Literatur werden verschiedene Mechanismen beschrieben, die im Zusammenhang mit der kanzerogenen Wirkung von anorganischem Arsen stehen. Dazu zählen erhöhte (oxidative) zelluläre Stresslevel, deregulierte Zellproliferations- und Apoptoseraten sowie die Inhibierung von DNA-Reparaturprozessen (Tam *et al.*, 2020). Aufgrund der multifaktoriellen Wirkmechanismen von anorganischem Arsen bestehen erhebliche Unsicherheiten hinsichtlich der Dosis-Wirkungs-Beziehung bei niedrigen Expositionsniveaus, sodass kein sicherer Grenzwert abgeleitet werden kann. Im Jahr 2024 wurden die Ergebnisse einer Reevaluierungsstudie für die Risikobewertung der humanen diätetischen Aufnahme von anorganischem und organischem Arsen mit aktuellen Expositions- und Forschungsdaten publiziert (EFSA, 2024a; EFSA, 2024b; EFSA, 2024c). Zur Risikobewertung wendet die EFSA den *Margin of Exposure* (MOE)-Ansatz an, der auf dem Quotienten des *Benchmark Dose Lower Confidence Limit* (BMDL), einer toxikologisch relevanten Dosis, und der Exposition basiert. Aktuelle diätetische Expositionsschätzungen für anorganisches Arsen zeigen, dass die europäische Bevölkerung im Durchschnitt täglich etwa 0,03-0,15 µg/kg Körpergewicht (KG) aufnimmt, Vielverzehrer bis zu 0,07-0,33 µg/kg KG. In Bezug auf den BMDL₀₅ für Hautkrebs von 0,06 µg/kg KG pro Tag (die Dosis, bei der ein zusätzliches Hautkrebsrisiko von 5 % beobachtet wurde), ergibt sich ein MOE von 2,0-0,4 für durchschnittliche Verbraucher und 0,9-0,2 für Vielverzehrer. Ein MOE von 1,0 bedeutet, dass die Exposition dem BMDL₀₅ entspricht, also jener Dosis, bei der ein zusätzliches Hauttumorrisiko von 5 % gegenüber der Hintergrundinzidenz beobachtet wurde. Daraus lässt sich ableiten, dass nicht nur Vielverzehrer, sondern auch die Allgemeinbevölkerung bereits einem erhöhten Risiko für Hautkrebs durch Arsen ausgesetzt sind. Zudem liegen die BMDL-Werte für Lungen- und Blasenkrebs sowie ischämische Herzkrankheiten und chronische Nierenerkrankungen im Bereich von 0,12-0,17 µg/kg KG pro Tag, was ebenfalls auf ein erhöhtes gesundheitliches Risiko für die Allgemeinbevölkerung hinweist. Demnach werden schon niedrige diätetische Aufnahmemengen an anorganischem Arsen als gesundheitlich bedenklich bewertet (EFSA, 2024a). Neben den anorganischen Verbindungen wurde auch die derzeitige nahrungsbedingte humane Exposition der beiden organischen Verbindungen MMA⁵⁺ und DMA⁵⁺ sowie komplexer organischer

Arsenverbindungen, darunter Arsenobetain, Arsenozucker oder Arsenolipide, bewertet. Der durchgeführte MOE-Ansatz resultierte in einer Einstufung als unbedenklich für MMA⁵⁺ und die komplexen organischen Verbindungen, während die Aufnahme von DMA⁵⁺ als gesundheitlich bedenklich eingestuft wurden (EFSA, 2024b; EFSA, 2024c).

Anorganisches Arsen zeichnet sich im Gegensatz zu vielen anderen humankanzerogenen Substanzen durch eine geringe direkte Mutagenität aus (Mure *et al.*, 2003). Zahlreiche Studien belegen jedoch, dass Arsen ausgeprägte co-mutagene und co-kanzerogene Charakteristika besitzt. Unter anderem sind potenzierende Effekte auf DNA-schädigende Agenzien wie Benzo[a]pyren und UV-Strahlung beschrieben (Hartwig und Schwerdtle, 2002; Maier *et al.*, 2002; Speer *et al.*, 2023). Abbildung 4 zeigt einen Überblick der diskutierten zellulären Wirkweisen der kanzerogenen und co-kanzerogenen Wirkung von Arsenit.

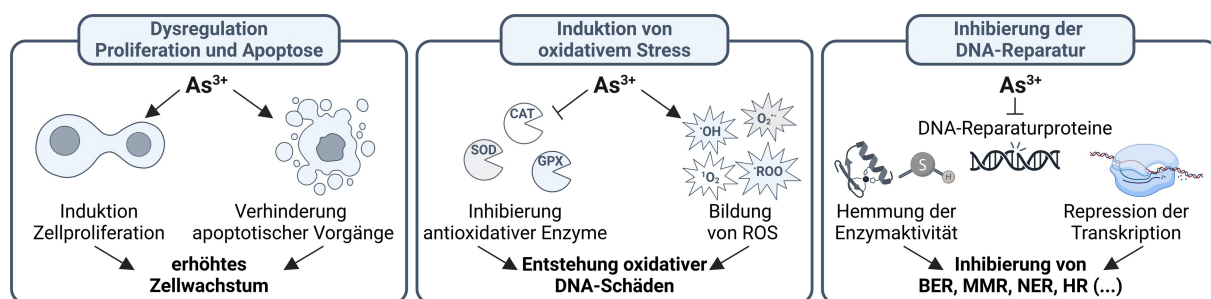


Abbildung 4 | Intrazelluläre molekulare Wirkmechanismen von Arsenit. Bekannt ist, dass Arsenit (As³⁺) die Zellproliferation fördert und dabei die Apoptose geschädigter Zellen verhindert. Zudem löst As³⁺ intrazellulären oxidativen Stress aus. Antioxidative Enzyme, darunter Superoxiddismutasen (SODs), Katalase (CAT) und Glutathion-Peroxidasen (GPXs), werden gehemmt und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden gebildet. In der Folge kommt es zu einer erhöhten Anzahl an oxidativen DNA-Läsionen. Zusätzlich inhibiert As³⁺ die DNA-Reparaturmaschinerie, zu der die Basenexzisionsreparatur (BER), die *Mismatch*-Reparatur (MMR), die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und die homologe Rekombination (HR) zählen. As³⁺ hemmt verschiedene DNA-Reparaturproteine auf funktioneller und transkriptioneller Ebene. Als Arsenit-sensitiven Zielstrukturen gelten insbesondere Zink-bindende Domänen und Thiolgruppen (Informationen stammen aus Tam *et al.*, 2020). Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

2.2.3.1 Beeinflussung der Zellproliferation und Apoptose

Das zelluläre Schicksal wird maßgeblich durch Signaltransduktionswege gesteuert, die den Zellzyklus regulieren und Apoptosemechanismen induzieren oder hemmen. Ein signifikanter Faktor der durch Arsenit vermittelten Kanzerogenese ist dessen Fähigkeit, sowohl die Regulation des Zellzyklus als auch der Apoptose zu beeinflussen (Tam *et al.*, 2020). Der Zellzyklus unterliegt einer Kontrolle durch verschiedene zelluläre Signalwege und Zellzykluskontrollpunkte, die den Übergang zwischen den verschiedenen Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2, M) überprüfen und beispielsweise bei DNA-Schäden den Zellzyklus arretieren, um die DNA-Reparatur zu ermöglichen und die genetische Stabilität der Zellen zu gewährleisten (Matthews *et al.*, 2022). Zahlreiche Studien belegen, dass Arsenit zu einem Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase führt (Zhang *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2023). Häufig wird dieser Arrest mit einer transkriptionellen Regulation verschiedener Zellzyklusregulatoren assoziiert, darunter die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs, engl. *cyclin dependent kinases*), Cycline

und CDK-Inhibitoren. Eine Deregulation des Tumorsuppressors p53 scheint ebenfalls an den durch Arsenit verursachten Veränderungen der Zellzyklusmechanismen beteiligt zu sein (Kumar *et al.*, 2023). Neben der direkten Beeinflussung des Zellzyklus über Zellzyklusregulatoren wird durch Arsenit auch die Aktivierung zahlreicher Signalwege ausgelöst, die für die Zellproliferation und das Zellüberleben entscheidend sind. Hierzu gehören insbesondere der *epidermal growth factor receptor* (EGFR)-Signalweg sowie der *mitogen activated kinase* (MAPK)-Signalweg. Gleichzeitig werden zelltodauslösende Signalwege wie der *c-Jun NH2-terminal kinase* (JNK)-Signalweg durch die Beeinflussung verschiedener TFs, darunter *activator protein 1* (AP-1) und *nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in b-cells* (NF- κ B), vermehrt inhibiert (Tam *et al.*, 2020). Ein zentraler Auslöser dieser Mechanismen ist die durch Arsenit induzierte oxidative Stressantwort, die als treibender Faktor für die Störung der Zellzyklusregulation, die Verhinderung von Apoptose und die Förderung der Zellproliferation gilt (Tam *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021).

2.2.3.2 Induktion von oxidativem Stress

Zahlreiche Studien belegen, dass anorganisches Arsen sowie seine dreiwertigen methylierten Metabolite die Entstehung von oxidativem Stress fördern, indem sie eine zelluläre Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*) sowie reaktiver Stickstoffspezies (RNS, engl. *Reactive Nitrogen Species*) induzieren (Hu *et al.*, 2020; Tam *et al.*, 2020). Zu den wichtigsten Arsen-induzierten ROS gehören das Superoxid-Anion-Radikal ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxyl-Radikale (OH^{\cdot}), Singulett-Sauerstoff (1O_2) sowie Peroxyl-Radikale (ROO^{\cdot}) (Flora, 2011). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind bislang nicht vollständig geklärt, jedoch werden sowohl direkte als auch indirekte Prozesse diskutiert. Direkte Prozesse betreffen vor allem die mitochondriale ROS-Entstehung. Arsen greift dabei mechanistisch in die mitochondriale Elektronentransportkette ein, indem es die Aktivität der Succinatdehydrogenase inhibiert und damit die oxidative Phosphorylierung entkoppelt. Infolgedessen werden durch die mitochondrialen Komplexe I und III Elektronen auf den molekularen Sauerstoff übertragen, was zur Bildung von Superoxid-Anionen führt (Hu *et al.*, 2020). Diese werden auch als primäre ROS bezeichnet, da sie zur Bildung sekundärer ROS, wie $^{\cdot}OH$, beitragen können (Flora, 2011). Darüber hinaus spielt ebenso die NADPH-Oxidase 2 (Nox2) eine wesentliche Rolle bei der Arsen-vermittelten ROS-Generierung in Endothelzellen (Ellinsworth, 2015). Zusätzlich werden während des Arsenmetabolismus intermediäre Peroxyl-Radikale gebildet. Die Arsenmetabolite besitzen zudem die Fähigkeit, redoxaktives Eisen aus Ferritin freizusetzen, wodurch die Fenton-Reaktion ablaufen kann, die die Freisetzung weiterer ROS induziert (Hu *et al.*, 2020). Des Weiteren wird die indirekte Beeinflussung des zellulären Redoxgleichgewichts durch Arsen durch Interaktion mit antioxidativen Enzymen wie der Superoxiddismutase (SOD), der Katalase (CAT) und mit GSH-assoziierten Enzymen wie den GSH-Peroxidasen (GPX) beschrieben. Vorliegende Studien zeigen, dass je nach Dosis und Expositionsdauer sowohl inhibierende als auch verstärkende Effekte zu beobachten sind (Flora, 2011; Hu *et al.*, 2020). Besonders die zelluläre Verfügbarkeit des Antioxidans GSH, das eine zentrale Rolle bei der Neutralisierung von ROS und damit der Aufrechterhaltung des Redoxgleichgewichts

einnimmt, wird durch Arsen deutlich minimiert. GSH ist ein Elektronendonator, der vor allem in den Arsenmetabolismus involviert ist. Eine chronische Exposition kann somit in einer Erschöpfung des GSH-Haushaltes resultieren, wodurch die antioxidative Abwehrkapazität der Zellen deutlich reduziert wird (Tam *et al.*, 2020).

Arsenit-induzierte ROS modulieren verschiedene zelluläre Signalwege, darunter den *nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)-Antioxidant Response Element (ARE)*-Signalweg. Dieser stellt einen zentralen Bestandteil des zellulären antioxidativen Schutzsystems dar und steuert die Expression einer Vielzahl antioxidativer und detoxifizierender Enzyme. Unter physiologischen Bedingungen wird Nrf2 durch Bindung an *kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)* ubiquitiniert und proteasomal abgebaut. Arsenit inhibiert diesen Mechanismus durch Bindung an die Zink-bindende Ringfingerdomäne von Keap1 wodurch dessen Ubiquitin-Ligase-Aktivität gehemmt wird. In der Folge wird der proteosomale Abbau von Nrf2 verhindert, dessen Translokation in den Zellkern gefördert und die Aktivierung ARE-regulierter Zielgene ermöglicht. Zusätzlich fördert Arsenit die Nrf2-Aktivierung durch p62-Akkumulation, die Keap1 sequestriert und dessen Autophagozytose induziert. Zudem wird Nrf2 über die HATs p300/CBP acetyliert, was zu einer Erhöhung der DNA-Bindungskapazität von Nrf2 führt (Hu *et al.*, 2020).

Neben dem Nrf2-ARE-Signalweg beeinflusst Arsenit weitere Signalwege wie den MAPK-, NF- κ B-, p53- oder den AP-1-Signalweg (Hu *et al.*, 2020). Untersuchungen an Lungenzellen demonstrieren, dass Arsenit durch Überexpression und Phosphorylierung von EGFR die Zellproliferation fördert, was zur Aktivierung von pERK und Cyclin D1 führt (Andrew *et al.*, 2009). ERK spielt zudem eine Rolle bei der oxidativ stressbedingten Aktivierung von NF- κ B. Weitere Studien zeigen, dass schon niedrige Arsenitkonzentrationen *extracellular signal-regulated kinase (ERK)*, *E2F transcription factor 1 (E2F1)* und AP-1 aktivieren, wodurch die DNA-Bindungsaktivität von AP-1 und NF- κ B gesteigert wird. Dies kann in einer Überexpression proliferationsstimulierender Gene wie *fos proto-oncogene (FOS)*, *jun proto-oncogene (JUN)* und *myc proto-oncogene (MYC)* resultieren (Tam *et al.*, 2020).

Ebenso stellt die Tyrosinphosphorylierung von Proteinen einen vulnerablen Angriffspunkt für Arsenit-vermittelte Effekte dar und spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Rezeptorkinasen-vermittelten Signaltransduktion. Die Tyrosinphosphorylierung als essenzielle PTM erhöht die katalytische Aktivität von Kinasen und generiert Andockstellen für nachgeschaltete Signalproteine, die die Weiterleitung intrazellulärer Signale ermöglichen. Arsenit-induzierte ROS und RNS sind dazu in der Lage, die Funktion von Tyrosinphosphatasen zu beeinträchtigen, indem sie die redoxsensitiven Cysteinreste im aktiven Zentrum dieser Enzyme oxidativ modifizieren (Hu *et al.*, 2020; Tam *et al.*, 2020).

Arsenit-induzierter oxidativer Stress wird in der Literatur zudem mit einer Dysregulation metabolischer Prozesse assoziiert, insbesondere mit einer verstärkten aeroben Glykolyse in verschiedenen humanen Zellsystemen. In der Lungenzelllinie BEAS-2B konnte bereits eine erhöhte Expression Glykolyse-assoziiierter Gene sowie eine Akkumulation des *hypoxia-inducible factor 1A (HIF1A)* beobachtet werden, der als Hauptregulator der glykolytischen Aktivität gilt (Zhao *et al.*, 2013).

Ein entscheidender Faktor für die krebserzeugende Wirkung von Arsenit durch oxidativen Stress ist die Genotoxizität der induzierten ROS und RNS. Zahlreiche Studien belegen, dass diese Radikale direkte und indirekte DNA-Schäden verursachen können. Hydroxyl-Radikale oder Superoxid-Anionen können beispielsweise direkt mit den DNA-Basen interagieren und oxidative DNA-Basenschäden induzieren. Ein Beispiel ist die Bildung von 8-Oxo-7,8-Dihydroguanin, wobei Hydroxyl-Radikale auch zahlreiche weitere DNA-Oxidationsprodukte wie 5-Hydroxycytosin und 5-Hydroxyuracil bilden können (Guetens *et al.*, 2002). Darüber hinaus fördern ROS und RNS die Quervernetzung von DNA, Proteinen und anderen zellulären Komponenten. In der Literatur werden auch chromosomale Aberrationen, Schwesterchromatidaustausche, DNA-Strangbrüche sowie Telomerverkürzungen als Folgen oxidativen Stresses beschrieben. Diese genotoxischen Veränderungen tragen maßgeblich zur genomischen Instabilität und damit zur Tumorentstehung bei (Tam *et al.*, 2020).

ROS bzw. RNS können auch zur Inhibierung der DNA-Reparatur sowie der DNA-Schadensantwort führen, indem sie Cystein-haltige Proteine inaktivieren. Während oxidativer Stress zur Induktion des DNA-Reparaturproteins *poly (ADP-ribose) polymerase 1* (PARP-1) beiträgt (Mao *et al.*, 2011), führen spezifische ROS wie Peroxynitrit zu einer Inhibierung des DNA-Reparaturproteins (Zhou *et al.*, 2019). Die Reaktion von Superoxid-Anionen mit Stickstoffmonoxid führt zur Entstehung von Peroxynitrit. Es besteht zudem eine Verbindung zwischen der Arsenit-induzierten Aktivierung von PARP-1 und HDACs wie SIRT6, die neben ihrer deacetylierenden Funktion auch eine mono-ADP-Ribosyl-Transferaseaktivität aufweisen. Unter oxidativen Stressbedingungen reichert sich SIRT6 vermehrt an DNA-Doppelstrangbrüchen an und modifiziert PARP-1 durch Mono-ADP-Ribosylierung am Lysinrest in Position 521 (Mao *et al.*, 2011).

2.2.3.3 Inhibierung von DNA-Reparaturmechanismen

Die kanzerogene und co-kanzerogene Wirkung von Arsenit basiert maßgeblich auf dessen Fähigkeit zur Hemmung verschiedener DNA-Reparaturmechanismen. Besonders relevant ist in diesem Zusammenhang die durch oxidativen Stress induzierte DNA-Schädigung, während gleichzeitig deren Reparatur beeinträchtigt oder gänzlich verhindert wird. Persistierende oder fehlerhaft reparierte DNA-Läsionen können zu genomweiten Mutationen führen, die das Risiko für eine Tumorentstehung signifikant erhöhen (Tam *et al.*, 2020). In der Literatur wird Arsenit als potenzieller Inhibitor diverser DNA-Reparaturmechanismen beschrieben, darunter die BER, die Nukleotidexzisionsreparatur (NER), die *Mismatch*-Reparatur (MMR) sowie die Reparatur von DNA-Interstrang- und DNA-Protein-*Crosslinks*. Außerdem besitzt Arsenit die Fähigkeit die DNA-Doppelstrangbruchreparatur zu inhibieren. Die Vielzahl betroffener Prozesse verdeutlicht die zentrale Rolle der DNA-Reparaturinhibition für die Beeinträchtigung der genomischen Integrität. Arsenit besitzt das Potenzial, spezifische DNA-Reparaturgene auf transkriptioneller Ebene sowie die katalytische Aktivität entsprechender DNA-Reparaturproteine zu beeinträchtigen. Nachfolgend werden die Auswirkungen von Arsenit auf die Abläufe der BER, NER und MMR beschrieben, da diese für die vorliegende Arbeit von Relevanz sind.

Die BER ist ein zentraler DNA-Reparaturweg, der für die Entfernung kleiner oxidativer und alkylierter DNA-Basenschäden, apurinischer/apyrimidinischer (AP)-Stellen sowie für die Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen verantwortlich ist. Zu Beginn der BER erkennen spezialisierte DNA-Glykosylasen die geschädigte oder fehlerhafte Base, gefolgt von der Inzision, Exzision, Polymerisation und Ligation, wobei die strukturelle Integrität des DNA-Strangs vollständig rekonstruiert wird (Kim und Wilson, 2012). Eine detaillierte Darstellung des BER-Prozesses sowie der durch Arsenit beeinflussten Zielproteine ist in Abbildung 5 dargestellt. Arsenit verändert die BER an mehreren zellulären Endpunkten des Reparaturmechanismus, sowohl auf transkriptioneller als auch auf funktioneller Ebene. So ist bekannt, dass die Erkennung der geschädigten Basen mittels DNA-Glykosylasen, darunter 8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase-1 (OGG1) oder die N-Methylpurin-DNA-Glykosylase (MPG), durch Arsenit eingeschränkt oder gar verhindert wird (Ebert *et al.*, 2011; Ding *et al.*, 2021). OGG1 initiiert spezifisch die Reparatur von 8-Hydroxy-2'-desoxyguanosin, dessen Bildung auch selbst durch Arsenit induziert wird, während MPG spezifisch die Reparatur von N-alkylierten Basen katalysiert (Guetens *et al.*, 2002; Kim und Wilson, 2012). Studien mit der Lungentumorzelllinie A549 deuten auf einen Zusammenhang zwischen einer mikromolaren Arsenitexposition bzw. dessen Metabolite ($\geq 3,2 \mu\text{M}$ intrazellulärer Arsengehalt) und einer reduzierten Expression sowie einer verminderten enzymatischen Aktivität von OGG1 hin. Darüber hinaus identifizierten die Forschenden weitere BER-Zielproteine als sensible Angriffspunkte, darunter DNA-Ligase III α sowie *x-ray repair cross-complementing protein 1* (XRCC1) (Ebert *et al.*, 2011). Im Fall von MPG zeigte sich nach mikromolarer Arsenitbehandlung von Keratinozyten eine reduzierte Transkriptmenge sowie ein verringerter Proteingehalt. Zudem wurde in dieser Studie eine Reduktion für XRCC1 und PARP-1 auf Protein- sowie Transkriptebene nachgewiesen (Ding *et al.*, 2021). Das DNA-Reparaturprotein PARP-1 ist an zahlreichen DNA-Reparaturprozessen und zellulären Signalwegen beteiligt und stellt aufgrund seiner Zink-bindenden Domänen ein sensibles Ziel für Arsenit sowie dessen thiolaffinen Metaboliten dar. Die enzymatische Inaktivierung wird auf eine Substitution von Zink durch Arsenit in der DNA-Bindungsdomäne von PARP-1 zurückgeführt, wodurch die PARP-1-DNA-Interaktion verhindert wird (Sun *et al.*, 2014). Außerdem wurde die *in vitro*-Inhibierung von PARP-1 schon bei niedrigen nanomolaren Konzentrationen von Arsenit und dessen dreiwertigen Metaboliten beobachtet (Hartwig *et al.*, 2003; Walter *et al.*, 2007). In der Literatur werden darüber hinaus verminderte Transkript- und Proteinmengen der AP-Endonuklease 1 (APE1) oder der DNA-Polymerase β beschrieben (Sykora und Snow, 2008).

Im Vergleich zu anderen DNA-Reparaturwegen zeichnet sich die NER durch die Fähigkeit aus, ein größeres Spektrum struktureller DNA-Schäden zu erkennen und eliminieren zu können, darunter sperrige Addukte und Helix-verzerrende Läsionen. Die NER unterteilt sich in *global genome* NER (GG-NER) und *transcription-coupled* NER (TC-NER), die sich primär in der Schadenserkenkung unterscheiden. Während die GG-NER kontinuierlich die DNA auf potenzielle Helixverzerrungen absucht, wird die TC-NER nur aktiviert, wenn die RNA-Polymerase II bei der Transkriptionselongation an einer Läsion stagniert. Infolgedessen stellt die NER einen essenziellen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der genomischen Integrität der Zellen dar (Marteijn *et al.*, 2014). Der NER-Mechanismus sowie die durch Arsenit beeinflussten Proteine sind der Abbildung 5 zu

entnehmen. In der Literatur ist umfassend dokumentiert, dass Arsenit die Expression verschiedener NER-Reparaturproteine sowohl transkriptionell als auch auf Proteinebene inhibiert. Besonders betroffen ist *excision repair cross complementing 1* (ERCC1), wie sowohl Humanstudien als auch *in vitro*-Analysen zeigen (Andrew *et al.*, 2003; Andrew *et al.*, 2006). Des Weiteren führte Arsenit zu einer Hemmung der *xeroderma pigmentosum* (XP)-Proteine XPA, XPB, XPC, XPD und XPF auf mRNA-Ebene (Hamadeh *et al.*, 2002; Andrew *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2020). Während bei XPA hauptsächlich eine Reduktion der Transkriptmenge, jedoch keine Veränderung der Proteinexpression beobachtet wurde, führte Arsenit bei XPB, XPC, XPD und XPF zu einer gleichzeitigen Abnahme von mRNA- und Proteinspiegeln (Andrew *et al.*, 2003; Holcomb *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2020). Dies wirft die Frage auf, inwiefern Transkription und Translation in diesem Kontext voneinander entkoppelt sind. Von besonderer Relevanz ist in diesem Zusammenhang die Zinkfinger-DNA-Bindungsdomäne von XPA, die durch Arsenit gezielt beeinflusst wird. Frühere Studien zeigten bereits, dass Arsenit die Funktionsfähigkeit von XPA beeinträchtigt, indem Zink aus dessen Zinkfingerdomäne freigesetzt wird (Schwerdtle *et al.*, 2003a). Analog zur Wirkung auf PARP-1 ist somit bekannt, dass Arsenit das zentrale Zinkion von XPA substituiert, was zu einem funktionellen Verlust von dessen Chromatinbindungsfähigkeit führt (Zhou *et al.*, 2011). Eine zusätzliche Zinkzugabe während der Arsenitexposition in gleichen Konzentrationen führte in humanen Keratinozyten zu einer Wiederherstellung der Chromatinbindung von XPA und PARP-1 und damit ihrer Funktion. Interessanterweise war die Wiederherstellung der Reparaturkapazität NER-spezifischer DNA-Schäden (XPA-abhängig) durch Zink deutlich effektiver im Vergleich zu oxidativen BER-Schäden (PARP-1-abhängig) (Ding *et al.*, 2017). Darüber hinaus ist bekannt, dass Arsenit die mRNA-Spiegel weiterer zentraler NER-Regulatoren, darunter *damage-specific DNA binding protein 2* (DDB2), *UV excision repair protein RAD23 homolog B* (RAD23B) sowie Komponenten des TFIID-Komplexes, signifikant reduziert (Hamadeh *et al.*, 2002; Muenyi *et al.*, 2015; Holcomb *et al.*, 2017). Demgegenüber wurde für *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) eine Erhöhung der Transkript- und Proteinmenge unter Arsenit-Einfluss beschrieben (Singh *et al.*, 2011).

Die MMR ist essenziell für die Korrektur spontaner Basenfehlpaarungen sowie kleinerer Insertionen und Deletionen, die während der DNA-Replikation entstehen. Da DNA-Polymerasen im Durchschnitt alle 10^5 Nukleotide fehlerhaft polymerisieren, gewährleistet die MMR die Präzision der Replikation und somit die genomische Stabilität. Studien zeigen, dass dieser Reparaturprozess bevorzugt in aktiv transkribierten Genen stattfindet. Ein Defekt des MMR-Systems führt demnach zu einer erhöhten Mutationsrate und zur Mikrosatelliteninstabilität, einer Form der genomischen Instabilität, die charakteristisch für spezifische Tumorarten ist. Die Initiierung der MMR erfolgt durch die Erkennung von Fehlpaarungen, wobei MutS-Komplexe eine zentrale Rolle einnehmen. Diese erkennen entweder kleinere oder größere Insertionen bzw. Deletionen (Pećina-Šlaus *et al.*, 2020). Der Einfluss von Arsenit auf die MMR ist im Vergleich zur BER und NER bislang weniger erforscht, jedoch weisen Humanstudien bereits auf einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer Arsenitexposition und der Transkriptionsrepression der MMR-Gene MutL Homolog 1 (*MLH1*) und MutS Homolog 2 (*MSH2*) hin (Bhattacharjee *et al.*, 2018). Eine weitere Studie zeigte eine deutliche Reduktion der MMR-Aktivität Arsenit-exponierter HeLa-Zellen, was auf eine Hemmung der

Inzisions- und Exzisionsphase des Reparaturmechanismus zurückgeführt wurde. Die Zugabe von PCNA in Arsenit-behandelten Zellen stellte die MMR-Aktivität wieder her, was darauf hindeutete, dass Arsenit PCNA beeinträchtigt. Weitere *in vitro*-Analysen zeigten, dass die Phosphorylierung von PCNA an Tyrosin 11 durch EGFR die MMR inhibieren kann. Hierbei führte eine Arsenitbehandlung von HeLa-Zellen, sowie A549- und BEAS-2B-Lungenzellen zu einer verstärkten Induktion von EGFR, sodass *downstream* vermehrt phosphoryliertes PCNA nachgewiesen wurde (Tong *et al.*, 2015). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Arsenit die MMR nicht ausschließlich durch die Herunterregulierung spezifischer DNA-Reparaturproteine, sondern auch durch veränderte Signaltransduktionskaskaden wie die verstärkte Phosphorylierung von PCNA inhibieren kann.

Abbildung 5 veranschaulicht die Prozesse der BER, NER und MMR sowie die in der Literatur beschriebenen durch Arsenit veränderten Proteine. Zusammengefasst sind die kanzerogenen Mechanismen von Arsenit bislang nicht vollständig geklärt. Während auf der Proteinebene direkte Zinkfinger-abhängige Enzyminhibitionen diskutiert werden, verdichten sich auf transkriptioneller Ebene die Hinweise auf eine epigenetische Dysregulation der entsprechenden Gene.

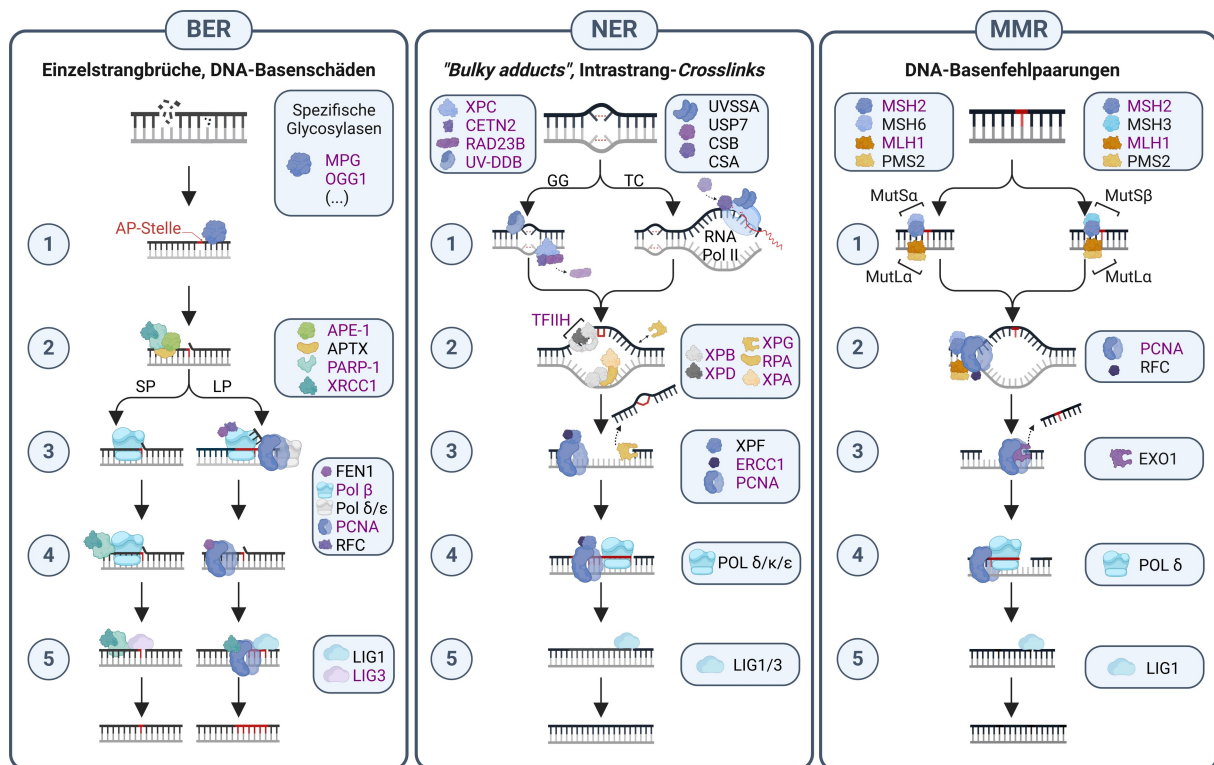


Abbildung 5 | Ausgewählte DNA-Reparaturmechanismen und deren Beeinflussung durch Arsenit. Die Abbildung zeigt die Basenexzisionsreparatur (BER), die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und die *Mismatch*-Reparatur (MMR) als zentrale Prozesse der DNA-Schadensbehebung. Violett hervorgehobene Proteine repräsentieren Zielstrukturen, deren Interaktionen mit Arsenit auf transkriptioneller und/oder funktioneller Ebene bereits nachgewiesen wurden. Mechanismus der DNA-Reparatur: (1) Schadenserkennung, (2) Inzision, (3) Exzision, (4) Polymerisation und (5) Ligation (modifiziert nach Pečina-Šlaus *et al.*, 2020; Clarke und Mostoslavsky, 2022). Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt. APE1: AP-Endonuklease 1, APTX: aprataxin, CETN2: centrin 2, CSA: cockayne syndrome group A, CSB: cockayne syndrome group B, ERCC1: excision repair cross complementing 1, EXO1: exonuclease 1, FEN1: flap endonuclease 1, LIG1/3: DNA Ligase 1/3, MLH1: MutL Homolog 1, MPG: N-Methylpurin-DNA-Glykosylase, MSH2/3/6: MutS Homolog 2/3/6, OGG1: 8-Oxoguanine-DNA-Glykosylase 1, PARP-1: poly(ADP-ribose) polymerase-1, PCNA: proliferating cell nuclear antigen, RAD23B: radiation repair 23B, RFC: replication factor C, RPA: replication protein A, TFIIH: Transkriptionsfaktor II H, UV-DDB: UV-damaged DNA binding protein, UVSSA: UV sensitivity associated protein, USP7: ubiquitin-specific protease 7, XPA/B/C/D/F/G: xeroderma pigmentosum, complementation group A/B/C/D/F/G.

2.3 ARSEMIT-INDUZIERTE EPIGENETISCHE DYSREGULATION

Zahlreiche Studien assoziieren die Kanzerogenität von Arsenit mit einer transkriptionellen Dysregulation einer Vielzahl von Genen, während die entsprechenden molekularen Grundlagen weitgehend unbekannt sind. Ein wesentlicher Faktor ist die Fähigkeit von Arsenit, epigenetische Prozesse zu beeinflussen, die für die Steuerung und Regulation der Transkription entscheidend sind (Islam *et al.*, 2022).

In der Literatur werden neben globalen Veränderungen des DNA-Methylierungsstatus auch verschiedene Chromatinmodifikationen beschrieben, wobei sowohl diverse Acetylierungs-, Methylierungs- und Phosphorylierungsmuster der Histone als auch fehlregulierte ncRNA-Expressionen in der Literatur aufgeführt sind (Ren *et al.*, 2011; Chakraborty *et al.*, 2022; Islam *et al.*, 2022). Es mehren sich die Hinweise, dass diese epigenetischen Effekte nicht nur auf globaler Ebene zu betrachten sind, sondern dass möglicherweise eine zielgerichtete genspezifische Dysregulation der Transkription zugrunde liegt. Studien zeigen, dass Arsenit weitreichende Auswirkungen auf den DNA-Methylierungsprozess hat, die sowohl global als auch DNA-Loci-spezifisch auftreten können (Chanda *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017; Bhattacharjee *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2021). Genomweit wird meist von einer vorliegenden Hypomethylierung berichtet, wie bereits eine Studie in der HepG2-Zelllinie demonstrierte (Stöber *et al.*, 2023). Die Effekte werden dabei häufig auf eine Arsenit-vermittelte transkriptionelle und funktionelle Inhibition der DNMTs zurückgeführt. Im Gegensatz dazu wurde auf genspezifischer Ebene häufig eine Arsenit-induzierte DNA-Hypermethylierung beobachtet, wie beispielsweise in Genen der oxidativen Stressantwort, darunter *NFE2L2* (codiert für Nrf2), den DNA-Reparaturgenen *ERCC1*, *ERCC2*, *MLH1*, *MSH2*, und *OGG1* sowie den Tumorsuppressorgenen *p15* und *p53* (Chanda *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017; Bhattacharjee *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2021).

Neben der DNA-Methylierung beeinflusst Arsenit auch verschiedene hPTM-Muster, insbesondere die Histonacetylierung und -methylierung. Zudem sind in der Literatur auch Veränderungen der Phosphorylierungsmuster beschrieben. Bekannte hPTM-Veränderungen betreffen unter anderem H3K4me3, H3K9me2, H3K9ac oder H3S10ph (Islam *et al.*, 2022). Jedoch wird zunehmend von Diskrepanzen in den globalen Befunden berichtet (Howe und Gamble, 2016). Neben den durch Arsenit induzierten genomweiten Effekten wurden in den letzten Jahren auch genspezifische Veränderungen assoziierender hPTMs festgestellt. Analog zur DNA-Methylierung betrifft dies bisher Gene der oxidativen Stressantwort, darunter die *heat shock proteins* (HSPs) *HSPA1A* und *HSPB8* sowie *heme oxygenase 1* (*HMOX1*) und *SOD1* (Ma *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2023) sowie DNA-Reparaturgene, darunter *MPG*, *PARP-1*, *XPA*, *XPD*, *XPF* und *XRCC1* (Zhang *et al.*, 2020; Ding *et al.*, 2021). Das veränderte Vorkommen der hPTMs wurde dabei spezifisch im Promotorbereich der jeweiligen Gene ermittelt, um eine Aussage über den potenziell vorliegenden Genexpressionsstatus zu ermöglichen. Es zeigte sich, dass die Induktion der oxidativen Stressantwortgene mit einer vermehrten Anreicherung von H3K18ac oder H3K36me3 in der Promotorregion korrelierte (Ma *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2023). Im Fall der BER-Reparaturgene *MPG*, *PARP-1* und *XRCC1* wurde ein erhöhtes Vorkommen der repressiven hPTM H3K9me2 detektiert, was

mit ihrer transkriptionellen Inhibierung übereinstimmte (Ding *et al.*, 2021). Auch im Fall der NER-Reparaturgene *XPA*, *XPD* und *XPF* wurde eine Hypoacetylierung von H3K18 ermittelt, in Übereinstimmung mit ihrer transkriptionellen Repression (Zhang *et al.*, 2020). In der Literatur wird bezüglich der mechanistischen Hintergründe der beobachteten hPTM-Veränderungen meist eine Beeinflussung von Arsenit auf die beteiligten Enzyme diskutiert (Ren *et al.*, 2011; Chakraborty *et al.*, 2022; Islam *et al.*, 2022).

Auch die Expression verschiedener ncRNAs, darunter miRNAs sowie lncRNAs, wird nachweislich durch Arsenit beeinflusst, wobei sowohl aktivierende als auch inhibierende Mechanismen diskutiert werden. Beschrieben sind unter anderem Expressionsveränderungen von miRNAs wie miR-21 oder miR-200a, die in die Karzinogenese involviert sind, sowie eine verstärkte Induktion von lncRNAs, wie lnc-Dc, die an der Arsenit-induzierten Zelltransformation beteiligt ist (Islam *et al.*, 2022).

Diese Studien leisten einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der molekularen Grundlagen der Arsenit-induzierten transkriptionellen Dysregulation spezifischer Gene. Das tatsächliche Wirkspektrum von Arsenit, insbesondere auf die hPTMs, ist jedoch noch nicht vollständig erforscht, da sich die meisten Untersuchungen auf einzelne Gene oder Signalwege beschränken. Abbildung 6 fasst die epigenetischen Effekte von Arsenit anschaulich zusammen.

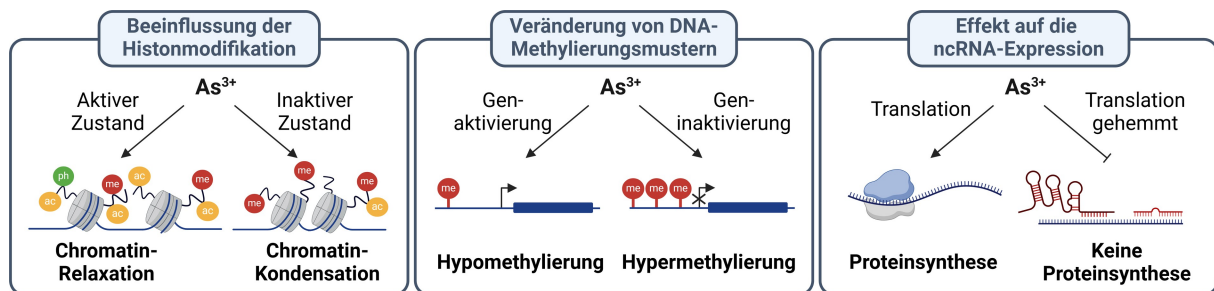


Abbildung 6 | Arsenit-vermittelte epigenetische Dysregulation. Arsenit beeinflusst verschiedene epigenetische Regulationsmechanismen. Die posttranslationale Histonmodifikation wird durch Arsenit global und genspezifisch dysreguliert. Beschrieben sind unter anderem Effekte auf die Histonacetylierung, Histonmethylierung oder Histonphosphorylierung. Sowohl die Lockerung der Chromatinstruktur (Relaxation) als auch die Verdichtung (Kondensation) können durch Arsenit induziert werden. Auch die DNA-Methylierung wird durch Arsenit beeinflusst. Analog zu der Histonmodifikation kann Arsenit zu einer globalen und auch genspezifischen Hypomethylierung (aktive Transkription) oder Hypermethylierung (inaktive Transkription) führen. Bekannt ist auch eine Beeinflussung von Arsenit auf die Expression von *non-coding* RNAs (ncRNAs). Sowohl *micro* RNAs (miRNAs) als auch *long non-coding* RNA (lncRNAs) können durch Arsenit induziert oder reprimiert werden, was translationshemmende als auch translationsaktivierende Effekte zur Folge hat. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

3 FRAGESTELLUNG

Arsen ist ein ubiquitär vorkommendes Umwelttoxin, dessen kanzerogene Wirkmechanismen bislang nicht vollständig aufgeklärt sind. Anorganische Arsenverbindungen, wie Arsenit, üben nachweislich weitreichende Effekte auf zentrale zelluläre Prozesse aus, darunter die Modulation der DNA-Reparatur, die oxidative Stressantwort und die Regulation des Zellzyklus (Tam *et al.*, 2020). Studien zeigen, dass Arsenit insbesondere durch selektive Interaktionen mit Thiolgruppen von Proteinen enzymatische Aktivitäten signifikant inhibieren kann (Shen *et al.*, 2013). Zudem wurde eine Repression der mRNA-Expression zahlreicher Gene beobachtet, insbesondere solcher, die mit der DNA-Reparatur in Verbindung stehen, was auf eine durch Arsenit veränderte Transkriptionsregulation hindeutet (Zhou *et al.*, 2021). Die epigenetische Regulation stellt hierbei einen essenziellen Mechanismus dar, der nicht nur die Transkription kontrolliert, sondern auch für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität und die zelluläre Anpassung an externe Stressfaktoren von zentraler Bedeutung ist. Zu den wichtigsten epigenetischen Mechanismen gehören die DNA-Methylierung und die Modifikation von Histonen (Gibney und Nolan, 2010). Neben den Veränderungen der DNA-Methylierungsmuster nach zellulärer Arsenitexposition häufen sich zunehmend Hinweise, dass auch die Dysregulation spezifischer hPTM-Muster eine entscheidende Rolle in der Arsenit-induzierten Zellpathologie spielen könnte (Martinez-Zamudio und Ha, 2011; Bhattacharjee und Paul, 2020).

Bisherige Forschung konzentrierte sich vor allem auf die Identifizierung globaler hPTM-Veränderungen als Ursache chromosomaler Instabilität, während sequenzspezifische Veränderungen überwiegend für DNA-Methylierungsmuster dokumentiert wurden. Mechanistisch werden hierbei hauptsächlich Interaktionen von Arsenit mit korrespondierenden histon- und DNA-modifizierenden Enzymen diskutiert (Bhattacharjee und Paul, 2020). Es mehren sich die Hinweise darauf, dass auch sequenzselektive Dysregulationen multipler hPTM-Muster auftreten, vor allem in genregulatorischen Sequenzen von DNA-Reparaturgenen (Bhattacharjee *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020; Ding *et al.*, 2021). Diese Dysregulationen könnten entscheidend zur transkriptionellen Repression der betroffenen Gene und damit der Arsenit-vermittelten Inhibierung der DNA-Reparatur beitragen. Die aktuelle Datenlage fokussiert sich primär auf die Akkumulation oder Deletion spezifischer hPTMs in Bezug auf Gene eines DNA-Reparaturwegs unmittelbar nach der Exposition, ohne die zugrunde liegende Persistenz dieser Effekte zu berücksichtigen. Dies ist für die Inkorporation epigenetischer Daten in die toxikologische Risikobewertung von besonderer Bedeutung, da epigenetische Effekte reversibel oder irreversibel sein können. Zudem fehlt meist die parallele Analyse globaler und genspezifischer Ereignisse, die für ein umfassendes Verständnis der vorliegenden Zusammenhänge erforderlich wären.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Veränderungen von hPTMs infolge von akutem, Arsenit-induziertem zellulärem Stress im niedrigen mikromolaren Konzentrationsbereich. Die Analyse

erfolgt auf transkriptioneller, genomischer und proteomischer Ebene und evaluiert die Dynamik der inhärenten epigenetischen Antwort. Die experimentelle Grundlage bilden Zytotoxizitätsuntersuchungen zur Festlegung eines geeigneten Konzentrationsbereichs und eines adäquaten Nachinkubationszeitraums. Intrazelluläre Aufnahmestudien via Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie (GF-AAS) und Genexpressionsanalysen mittels *High-Throughput Reverse Transcription Quantitative PCR* (HT-RT-qPCR) komplementieren diesen Ansatz. Darauf aufbauend werden ausgewählte hPTMs, insbesondere Acetylierungs- und Methylierungsmuster von Histon H3, sowohl global mittels *Western Blot* als auch assoziiert mit Promotorregionen spezifischer DNA-Reparaturgene (BER, NER, MMR) mittels Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)-qPCR analysiert. Ergänzend zu den meisten toxikologischen Studien, die sich auf Dysregulationen nach Kurz- oder Langzeitinkubation fokussieren, berücksichtigt diese Arbeit eine zusätzliche Arsenit-freie zelluläre Regenerationsphase unmittelbar nach der Exposition. Zur umfassenden Charakterisierung Arsenit-sensitiver Zielstrukturen von Histon H3 wurde eine proteomische Analyse der hPTM-Muster mittels *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) durchgeführt. Im Fokus steht dabei die Identifikation weiterer hPTMs, die in vorherigen Analysen nicht berücksichtigt wurden, um somit das Spektrum der durch Arsenit induzierten epigenetischen Veränderungen zu präzisieren. Dynamische Aktivitätsprofile relevanter Klassen histonmodifizierender Enzyme mit und ohne Nachinkubationsphase wurden erstellt, um mechanistische Rückschlüsse auf die potenziell beobachteten epigenetischen Veränderungen zu ermöglichen.

Diese Untersuchungen resultieren in einer fundierten Einschätzung der Persistenz zellulärer Effekte infolge akuter Arsenitexposition. Zudem liefern sie Hinweise darauf, ob hPTM-Veränderungen durch übergeordnete Mechanismen vermittelt werden oder Arsenit gezielt spezifische Modifikationen adressiert. Diese Erkenntnisse könnten somit wesentlich zum Verständnis der Pathogenese Arsenit-induzierter Krebserkrankungen beitragen.

4 MATERIAL UND METHODEN

Dieses Kapitel beschreibt detailliert die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden. Eine vollständige Materialliste findet sich im Anhang A.1.

4.1 ZELLKULTUR

Zur Gewährleistung steriler Bedingungen wurde die Zellkultivierung ausschließlich in einer Reinraumwerkbank mit vertikaler Strömung (*Laminar Flow*) gemäß DIN EN 12469 durchgeführt. Lösungen, Puffer und Verbrauchsmaterialien wurden vorab sterilfiltriert, autoklaviert oder heißluftsterilisiert. Vor Gebrauch wurden Puffer und Lösungen in einem Wasserbad auf 37 °C temperiert, um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten. Zudem wurden sämtliche Geräte und Materialien vor ihrem Einsatz einer Ethanolbehandlung (80 %, v/v) unterzogen. Die Kultivierungsbedingungen für die Zelllinien betragen 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit.

4.1.1 Zelllinien und Kultivierungsbedingungen

Da die Lunge ein Zielorgan für Arsen-induzierte Toxizität darstellt und Arsen Lungentumore induzieren kann (Wei *et al.*, 2019), wurden die humanen Lungenepithelzelllinien A549 und BEAS-2B als Testsysteme festgelegt. Die A549-Zelllinie wurde für alle Analysen verwendet, während die BEAS-2B-Zelllinie ausschließlich als Vergleich für die globale Bestimmung der hPTMs (*Western Blot*) diente. Vor Beginn der Analysen wurde die Authentizität der Zelllinien molekulargenetisch bestätigt.

Die humane Lungenkarzinomzelllinie A549 (ATCC® CCL-185) wurde 1972 aus einem Adenokarzinom isoliert und als Alveolarepithelzellen Typ II charakterisiert (Giard *et al.*, 1973; Foster *et al.*, 1998). Die A549-Zellen wurden von Dr. Roel Schins (Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung, Düsseldorf) bereitgestellt. Die Kultivierung erfolgte in *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640-Medium mit fetalem Kälberserum (FKS) (10 %) sowie Penicillin (100 U/mL) und Streptomycin (100 µg/mL). Die Subkultivierung erfolgte zweimal wöchentlich, wobei maximal 20 Passagen (P14-34) durchgeführt wurden. Zur Subkultivierung wurde das Medium entfernt, die Zellen mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, engl. *Phosphate Buffered Saline*) gewaschen, durch Trypsinlösung (0,25 % in PBS-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)) bei 37 °C für 3 min abgelöst und mit FKS-haltigem Medium resuspendiert. Die Zellzahl und Viabilität wurden mit dem CASY® TT-Zellzählgerät ermittelt. Anschließend wurde eine definierte Zellzahl in eine neue Zellkulturschale überführt.

Die nicht-kanzerogene Zelllinie BEAS-2B (ATCC® CRL-3588) wurde 1988 durch Transfektion von Bronchialepithelzellen mit dem Adenovirus 12-SV40 etabliert (Reddel *et al.*, 1988). Die

BEAS-2B-Zellen wurden von PD Dr. Carsten Weiss (Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe) bereitgestellt. Die Kultivierung erfolgte in serumfreiem *Keratinocyte Growth Medium* (KGM)-Medium. Die Subkultivierung fand wöchentlich statt, wobei das Medium alle 3-4 Tage erneuert wurde und maximal 10 Passagen (P45-55) verwendet wurden. Die Zellwachstumsoberfläche wurde vor der Aussaat mit Fibronectin, Kollagen und Rinderserumalbumin (BSA, engl. *Bovine Serum Albumin*) (10/30/10 µg/mL in PBS) für mindestens 30 min bei 37 °C beschichtet. Zur Subkultivierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Accutase® bei 37 °C für 3-5 min abgelöst, zentrifugiert (1300 rpm, 3 min) und in KGM resuspendiert. Die Zellzahl und Viabilität wurden mit dem CASY® TT-Zellzählgerät bestimmt und eine definierte Zellzahl in ein frisches Kulturgefäß überführt.

4.1.2 Kryokonservierung und Inkulturnahme der Zellen

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen über flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Zu Beginn wurden sie gemäß Kapitel 4.1.1 vom Zellkulturgefäß abgelöst, gezählt und anschließend je 10⁶ Zellen in 1 mL kryoprotektiver Lösung (10 % in Dimethylsulfoxid (DMSO) in FKS) resuspendiert, bevor sie in ein Kryoröhrchen überführt wurden. Mithilfe eines mit Isopropanol gefüllten Kryobehälters erfolgte eine stufenweise Abkühlung um -1 °C/min auf -80°C über Nacht, gefolgt von der Lagerung im Flüssigstickstoffreservoir (-196 °C).

Zur Inkulturnahme wurden die Zellen im Kryoröhrchen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, in Medium (37 °C) überführt, bei 1300 rpm für 3 min zur Entfernung des Kryoprotektans zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in 1 mL frischem Medium (37 °C) resuspendiert und in ein Zellkulturgefäß mit vorgewärmtem Medium (37 °C) pipettiert. Mindestens drei Passagen wurden durchgeführt, bevor die Zellen für die Experimente verwendet wurden.

4.1.3 Arsenitbehandlung und Nachinkubation

Die Zellen wurden einer akuten Exposition mit Natriumarsenit (NaAsO₂) mit und ohne Arsenit-freier Regenerationsphase ausgesetzt, um auch die Persistenz der Effekte von Arsenit bewerten zu können. Hierfür wurde eine NaAsO₂-Stammlösung (10 M) in deionisiertem Wasser (ddH₂O) hergestellt, sterilfiltriert und daraus Inkubationslösungen (1 mM, 10 mM) erstellt. Für die epigenetischen Analysen wurden die Zellen mit mikromolaren Konzentrationen (5-20 µM) behandelt. Vorangegangene Zytotoxizitäts- (0,5-50 µM) und Genexpressionsstudien (1-25 µM) erweiterten den Konzentrationsbereich und ermöglichten die Festlegung der optimalen Versuchsbedingungen.

Zu Beginn jedes Experiments wurden die Zellen gemäß 4.1.1 geerntet und gezählt. Anschließend wurde, abhängig von der jeweiligen Analyse, eine definierte Zellzahl in eine frische Zellkulturschale ausgesät und die Zellen für 24 h kultiviert, um das logarithmische Wachstum zu erreichen. Für die folgende Arsenitbehandlung wurde zunächst das verbrauchte Medium entfernt und durch ein exakt bemessenes Volumen an frischem Nährmedium ersetzt. Daraufhin wurde die erforderliche Menge an NaAsO₂-Inkubationslösung direkt in das Medium pipettiert und das Zellkulturgefäß kurz geschwenkt. Nach der 24-stündigen Behandlung wurden die Zellen für die

Experimentreihen ohne Nachinkubation entsprechend der weiterführenden Analyse pelletiert. Für die Nachinkubationsstudien erfolgte die erneute Aussaat der behandelten Zellen im gleichen Verhältnis von Zellzahl zu Gefäßgröße, gefolgt von einer 24- oder 48-stündigen Nachkultivierung (abhängig vom Experiment) in Arsenit-freiem Medium. Zeitgleich wurden unbehandelte Zellen mitgeführt, um mögliche Effekte durch das Passagieren in den Kontrollen zu berücksichtigen.

4.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR ZYTOTOXIZITÄT

Zur Beurteilung der akuten zytotoxischen Wirkung von Arsenit mit und ohne Nachinkubation wurden der intrazelluläre ATP-Gehalt sowie die Lebendzellzahl ermittelt. Die ATP-Assays wurden in Kooperation mit Katharina Gleiss im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt.

4.2.1 ATP-Gehalt

Der intrazelluläre ATP-Gehalt wurde mithilfe eines biolumineszenzbasierten ATP-Assays gemessen, bei dem in einer Luciferase-Luciferin-Reaktion ein Signal durch ATP als Cofaktor erzeugt wird. Dieses Signal korreliert dabei linear mit dem intrazellulären ATP-Gehalt, wodurch Rückschlüsse auf die Zellviabilität ermöglicht werden (Kamiloglu *et al.*, 2020). Die Analyse erfolgte in Triplikaten auf einer transparenten 96-Well-Platte. Für die ATP-Analysen ohne Nachinkubation wurden je 3×10^4 A549-Zellen in eine 96-Well-Platte ausgestreut und die Zellen für 24 h mit NaAsO_2 (0,5-50 μM) behandelt. Für die Nachinkubationsversuche wurden zunächst $6,57 \times 10^5$ Zellen in einer Zellkulturschale (\varnothing 6 cm) ausgestreut und analog behandelt, wobei nach Behandlungsabbruch ebenso 3×10^4 A549-Zellen pro Well in die ATP-Platte ausgesät wurden. Zusätzlich wurden bei den Analysen ein Blindwert (RPMI), eine Positivkontrolle (für 2 h mit 50 μM Staurosporin behandelte Zellen) und eine Arsenitkontrolle (50 μM NaAsO_2 in RPMI) mitgeführt. Nach der Behandlungs- (0 h) bzw. Nachinkubationszeit (24 h und 48 h) wurde das Medium in jeder Kavität abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und 60 μL frisches Medium pro Well hinzugegeben. Nach einer Äquilibrierungsphase von 30 min bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln wurden je 60 μL CellTiter-Glo®-Reagenz hinzugegeben und das Signal im Mikrotiterplattenlesegerät *TECAN Infinite® M200 PRO* in fünf Detektionszyklen aufgenommen. Zu Beginn eines jeden Messzyklus wurde die Platte für 2 min orbital geschüttelt und nach 8 min Ruhezeit das Biolumineszenzsignal aufgenommen. Zur Berechnung des relativen ATP-Gehalts wurde das Signal aus der dritten Messwertreihe verwendet. Das Ergebnis wurde als relativer ATP-Gehalt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle angegeben.

4.2.2 Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der relativen Zellzahl wurde die Lebendzellzahl mittels des *CASY® TT*-Zellzählgeräts ermittelt. Hierfür wurden je $4,5 \times 10^6$ Zellen auf eine Zellkulturschale (\varnothing 15 cm) in Doppelbestimmung ausgebracht, für 24 h mit NaAsO_2 (5-20 μM) behandelt und entweder

direkt gemessen oder für 48 h nachinkubiert. Anschließend erfolgte die Zellzählung gemäß Kapitel 4.1.1. Die Berechnung der relativen Zellzahl (RCC, engl. *Relative Cell Count*) erfolgte mittels

$$RCC = \frac{CC_c}{CC_0}$$

Hierbei bezeichnet CC (engl. *Cell Count*) die Anzahl der lebenden Zellen, mit den Spezialfällen CC_0 bei unbehandelten Zellen und CC_c nach einer Behandlung mit der Konzentration c .

4.3 ZELLULÄRE UND NUKLEÄRE AUFNAHME VON ARSEN MITTELS GF-AAS

Zur Ermittlung der Aufnahme von Arsen in die Zellen wurde sowohl der intrazelluläre als auch der nukleäre Arsengehalt mittels GF-AAS analysiert. Dazu wurden je $4,5 \times 10^6$ Zellen auf eine Zellkulturschale (\varnothing 15 cm) in Doppelbestimmung ausgebracht, für 24 h mit NaAsO_2 (5-20 μM) behandelt und entweder nicht oder für 48 h nachinkubiert.

4.3.1 Intrazelluläre Aufnahme

Zu Beginn wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 4 mL Trypsinlösung (0,25 % in PBS-EDTA) abgelöst und die Zellsuspension in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen mit 10 mL Medium überführt. Die Zellzahl und das Zellvolumen wurden mittels des Zellzählgeräts CASY® TT ermittelt. Jeweils 4 mL der Lösung wurden nachfolgend in ein frisches Röhrchen aliquotiert und bei 1.300 rpm und 3 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit eiskaltem PBS gewaschen, in ein frisches 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, und das Zellpellet wurde bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für die Probenvorbereitung wurden die Zellpellets einem oxidativen Aufschluss unterzogen. Hierfür wurden die Zellen in je 500 μL einer 1:1 (v:v) Lösung aus 69 % HNO_3 und 30 % H_2O_2 resuspendiert und anschließend bei geöffnetem Deckel schrittweise eingedampft. Die Temperaturerhöhung betrug 10 °C/1 h und die Starttemperatur lag bei 65 °C, wobei die Endtemperatur von 95 °C anschließend für 9 h gehalten wurde. Der Rückstand wurde schließlich in 250 μL 0,2 %-iger HNO_3 aufgenommen und für mindestens 3 h auf einem Vibrationsmischer geschüttelt. Zur Analyse wurde das Spektrometer *PinAAcle 900 T* verwendet. Bei jeder Messung wurden jeweils 20 μL einer Probe mit 5 μL Matrixmodifier (1,0 g/L Pd und 0,6 g/L Mg in 0,2 % HNO_3) durch einen *Autosampler* in das Graphitröhrchen (Endkappe) pipettiert. Tabelle 1 zeigt das Temperaturprogramm. Als Strahlungsquelle diente eine elektrodenlose Entladungslampe mit einer Emissionswellenlänge von 193,7 nm, wobei bei einer Spaltbreite von 0,7 nm gemessen wurde. Zur Quantifizierung wurde eine externe Kalibrierung im Bereich von 1-10 $\mu\text{g/L}$ mit einer AAS-Standardlösung an Arsen (1 g/L As in 0,2 % HNO_3) erstellt. Die Korrelation der Kalibriergeraden betrug stets $\geq 0,995$. Alle Analysen wurden in technischen Triplikaten durchgeführt.

Tabelle 1 | Temperaturprogramm zur Arsenanalyse mittels Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie.

Phase	Temperatur (°C)	Aufheizzeit (s)	Haltezeit (s)	Argonfluss (mL/min)
1. Trocknung	120	1	45	250
2. Trocknung	140	15	30	250
Pyrolyse	1200	10	20	250
Atomisierung	2000	0	5	0
Ausheizen	2450	1	3	250

4.3.2 Kernaufnahme

Zur Ermittlung der Arsengehalte im Nukleus wurde zunächst eine Kernextraktion vollzogen. Hierfür wurde das *EpiQuik™ Nuclear Extraction Kit I* gemäß den Herstellerangaben verwendet. Zu Beginn wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS durch Zugabe von 7,5 mL PBS gewaschen, mit einem Zellschaber abgelöst und in ein vorgekühltes 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zentrifugation der Suspension erfolgte bei 1000 rpm für 5 min und 4 °C mit einer anschließenden Abnahme des Überstands. Für die Extraktion der Zytoplasmafraktion wurde das Pellet in 1 mL eiskaltem Präextraktionspuffer *NE1* (versetzt mit 1 mM DTT (1:1000) und *Protease Inhibitor Cocktail* (PIC) (1:1000)), resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben gründlich mithilfe eines Vibrationsmischers für 10 s vermischt und darauffolgend bei 12000 rpm und 4 °C für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und bei -80 °C eingefroren. Das Kernpellet wurde direkt in 100 µL Extraktionspuffer *NE2* (versetzt mit 1 mM DTT (1:1000) und PIC (1:1000)), aufgenommen, kurz vermischt und für 15 min auf Eis inkubiert, wobei alle 3 min jede Probe für 5 s mit dem Vibrationsmischer durchgemischt wurde. Für eine Steigerung der Ausbeute wurden die Extrakte zusätzlich mit der Sonifizierungsapparatur *Branson Sonifier W-250 D* mit einer Mikrospritze in einem Eisbad sonifiziert. Die Behandlungszeit betrug dabei 30 s bei einer Amplitude von 10 % und einem gepulsten Rhythmus von 1 s an und 2 s aus. Zuletzt erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 14000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und die Kernextrakte bei -80 °C gelagert. Für die AAS-Analyse erfolgten gemäß 4.3.1 der oxidative Aufschluss und die Messung.

4.3.3 Auswertung

Für die Auswertung der AAS-Analysen wurde die intrazelluläre bzw. nukleäre Konzentration C_c bei gegebener Konzentration c in µM bestimmt via

$$C_x = \frac{m_{ZP}(As)}{V_{ZP} \times M(As)}$$

Hier bezeichnet m_{ZP} die Arsenmasse in der Zellprobe in µg, V_{ZP} das Zellvolumen in L, und $M(As)$ die molare Masse von Arsen in g/mol. Dabei wurde V_{ZP} berechnet mittels

$$V_{ZP} = ZZ \times V_{Zelle} \times F_{Kern} \times 10^{-15},$$

wobei ZZ die Zellzahl der Probe, V_{Zelle} das Volumen je Zelle und F_{Kern} der Umrechnungsfaktor zum Kernvolumen (0,24) repräsentiert. Zusätzlich ergibt sich $m_{ZP}(As)$ via

$$m_{ZP}(As) = V_P \times c_{AAS} \times VF,$$

mit dem Probenvolumen V_P in L, der gemessenen Arsenkonzentration c_{AAS} in $\mu\text{g/L}$ und dem jeweiligen Verdünnungsfaktor VF .

4.3.4 Analytische Leistungsgrenzen der Arsenbestimmung

Zur Erfassung der Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze wurde die Leerwertmethode gemäß DIN 32645 angewandt. Hierfür wurden 10 Leerwerte in je drei technischen Replikaten analysiert. Für das Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$, $\beta = 0,05$ und $k = 3$ gewählt. Dabei ergab sich für den Arsennachweis mittels GF-AAS eine Nachweisgrenze von $0,118 \mu\text{g/L}$, eine Erfassungsgrenze von $0,236 \mu\text{g/L}$ und eine Bestimmungsgrenze von $0,582 \mu\text{g/L}$.

4.4 ZELLYKLUSANALYSE MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Um zu untersuchen, ob die für die epigenetischen Untersuchungen ausgewählten Arsenitkonzentrationen die Zellzyklusregulation beeinflussen, wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Die Messungen zur Zellzyklusverteilung erfolgten in Zusammenarbeit mit Sandra Stöber im Rahmen eines gemeinsamen Projektes.

Für die Analyse wurden je $4,5 \times 10^6$ Zellen auf eine Zellkulturschale ($\varnothing 15 \text{ cm}$) in Doppelbestimmung ausgebracht, für 24 h mit NaAsO_2 ($5\text{-}20 \mu\text{M}$) behandelt und entweder nicht oder für 48 h nachinkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mittels Trypsinlösung ($0,25 \%$ in PBS-EDTA) abgelöst und durch Zentrifugation bei 1.300 rpm und 4°C für 3 min pelletiert. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit PBS. Je $1,5 \text{ mL}$ der Zellsuspension wurden in Zentrifugenröhrchen aliquotiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen in 1 mL eiskaltem PBS aufgenommen und in ein Rundbodenröhrchen überführt. Zur Fixierung wurden tropfenweise $2,5 \text{ mL}$ eiskaltes Ethanol (96%) auf einem Vibrationsmischer hinzugegeben und die Zellen mindestens über Nacht bei -20°C fixiert. Vor der Färbung wurden die Suspensionen bei 4000 rpm und 4°C für 4 min zentrifugiert, die Überstände entfernt und die Pellets in je 1 mL PBS aufgenommen. Die Färbung wurde mit je $350 \mu\text{L}$ 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Lösung für mindestens 30 min im Dunkeln auf Eis durchgeführt. Vor der Messung wurden die Proben gründlich durchmischt und am Durchflusszytometer *BD LSRII Fortessa* gemessen. Je Probe wurden 30000 Events aufgezeichnet, wobei die Exzitation von DAPI bei 405 nm mittels eines violetten Lasers gemessen wurde. Der DAPI-Farbstoff diente dabei zur prozentualen Ermittlung der Zellzyklusphasen, da dieser mit der DNA interkaliert und somit dessen Signalintensität Rückschlüsse auf die Zellzyklusphasenverteilung ermöglicht. Im Allgemeinen zeigen Zellen in der G2/M-Phase aufgrund

ihres tetraploiden Chromosomensatzes eine doppelt so hohe Signalintensität wie in der diploiden G1-Phase (Matthews *et al.*, 2022). Für das *Gating* wurde die DAPI-Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der Zellen (*Count*) in einem Histogramm aufgetragen. Abbildung 7 veranschaulicht beispielhaft die *Gating*-Einstellungen.

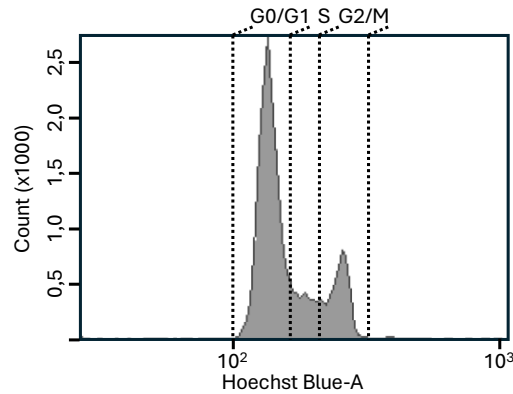


Abbildung 7 | Exemplarisches Histogramm des *Gatings* zur Bestimmung der Zellzyklusphasenverteilung. Die zelluläre DNA wurden mittels des Farbstoffs DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) angefärbt und die Fluoreszenzintensität bei 405 nm an einem Durchflusszytometer ermittelt. Dargestellt ist die Zellzahl (*count*) in Abhängigkeit von der Fluoreszenz von *Höchst Blue-A*, die der Emissionswellenlänge von DAPI entspricht. Basierend auf der Intensität des DAPI-Signals wurden die *Gates* zur Unterscheidung der Zellzyklusphasen G1/G0, S und G2/M festgelegt.

4.5 GENEXPRESSIONSANALYSE

Zur Erfassung der Genexpressionsprofile wurde eine HT-RT-qPCR angewandt (Fischer *et al.*, 2016). Diese Methode ermöglicht die simultane Analyse von 95 Genen in 96 Probenansätzen. Die analysierten Gene sind sechs übergeordneten molekularen Clustern zugehörig. Neben Genen der Metallhomöostase, Inflammation, oxidativen Stressantwort, Zellzyklusregulation und Apoptose wurden auch Gene der DNA-Reparatur und -Schadensantwort sowie der epigenetischen Regulation analysiert. Alle untersuchten Gene sind in Anhang A.2.2 aufgeführt. Die Primersequenzen wurden bereits in vorherigen Publikationen beschrieben (Fischer *et al.*, 2016; Stöber *et al.*, 2023). Zu Beginn der Analysen wurden je 5×10^5 A549-Zellen auf eine Zellkulturschale (\varnothing 6 cm ohne, \varnothing 10 cm mit Nachinkubation) in Doppelbestimmung ausgesät, für 24 h kultiviert, behandelt und für die Nachinkubation zusätzlich für 24 h bzw. 48 h weiterkultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mittels einer Trypsinlösung (0,25 % in PBS-EDTA) abgelöst und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und bei 1300 rpm und 4 °C für 3 min zentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand entfernt und die Pellets bei -80 °C gelagert.

4.5.1 mRNA-Isolierung und Quantifizierung

Zur Isolierung und Aufreinigung der mRNA wurde ein auf Säulen basierendes RNA-Isolationskit, das *NucleoSpin® RNA Plus Kit*, verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Zu Beginn wurden die Zellpellets in 350 μ L Lysepuffer resuspendiert und mittels eines Vibrationsmischers homogenisiert. Die Suspension wurde anschließend auf eine Säule zur

Entfernung genomischer DNA (gDNA), die *NucleoSpin® gDNA Removal Column*, aufgebracht und für 30 s bei 11000 g zentrifugiert. Das Eluat wurde folgend mit 100 µL *Binding Solution* versetzt, resuspendiert und auf die *NucleoSpin® RNA Plus* Säule überführt. Im Anschluss wurde bei 11000 g für 20 s zentrifugiert, der Durchgang erneut verworfen und die zurückgehaltene mRNA mit 200 µL Waschpuffer 1 gewaschen. Wieder wurde bei 11000 g für 20 s zentrifugiert und die Säule in ein neues Sammelgefäß transferiert. Anschließend wurde mit je 600 µL und anschließend mit je 250 µL Waschpuffer 2 gewaschen, gefolgt von einer Zentrifugation bei 11000 g für 20 s, danach für 2 min. Zuletzt wurde die Säule auf ein RNase-freies 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß überführt und die mRNA mit 30 µL sterilem ddH₂O durch Zentrifugation bei 11000 g für 1 min eluiert. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde der Elutionsschritt wiederholt durchgeführt, indem das Eluat erneut auf die Säule gebracht und zentrifugiert wurde. Die mRNA-Proben wurden bei -80 °C gelagert und innerhalb von maximal 2 Wochen in *complementary DNA* (cDNA) umgeschrieben. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte photometrisch mittels der NanoQuant™-Platte am Mikrotiterplattenlesegerät *Tecan Infinite M200 Pro®*. Je 2 µL mRNA-Isolat in technischen Duplikaten wurden auf die entsprechende Kavität der Platte pipettiert und eine Absorptionsmessung bei 260 nm zur Quantifizierung sowie 280 nm zur Reinheitsbestimmung durchgeführt. Die Reinheit wurde anhand des Quotienten aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt, wobei nur Proben mit einem Wert von $\geq 2,0$ verwendet wurden.

4.5.2 cDNA-Synthese

Zur Umschreibung der mRNA in cDNA wurde das *qScript™ cDNA Synthesis Kit* verwendet. Hierfür wurden jeweils 1 µg RNA in 15 µL ddH₂O (PCR-Qualität) in technischen Duplikaten in einen PCR 8er-Streifen vorgelegt. Dazu wurden je 1 µL *iScript Reverse Transkriptase* und 4 µL 5× Reaktionsmix hinzugegeben. Die Proben wurden durchmischt, zentrifugiert und die Synthese der cDNA in einem Thermocycler gemäß Tabelle 2 durchgeführt. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2 | Temperaturprogramm zur Durchführung der cDNA-Synthese.

Prozessschritt	Zeit (min)	Temperatur (°C)
Priming	5	25
Reverse Transkription	30	42
Inaktivierung	5	85
Endtemperatur	∞	4

4.5.3 *Specific Target Amplification* und Exonukleaseverdau

Zur Erhöhung des cDNA-Gehalts wurde vor der eigentlichen qPCR-Analyse eine Präamplifikation (STA, engl. *Specific Target Amplification*) der Zielsequenzen durchgeführt. Hierfür wurde zunächst eine Mischung aus allen verwendeten Primern hergestellt. Zur Herstellung des *Pooled Primer Mix* (PPM) wurde ein Primerstammset verwendet, das aus *forward* und *reverse* Primern

im 1:1 Verhältnis bestand, mit einer Endkonzentration von 100 µM. Je 1 µL jeder Stammlösung wurden gemischt und mit DNA-Suspensionspuffer auf 200 µL Gesamtvolumen aufgefüllt, sodass die Endkonzentration eines jeden Primerpaares 500 nM betrug. Gelagert wurde der PPM bei -20 °C.

Für die Präamplifikation wurden pro Ansatz 2,5 µL *TaqMan PreAmp Master Mix (2×)*, 0,5 µL PPM und 0,75 µL ddH₂O in PCR-Qualität mit 1,25 µL cDNA der Proben zusammen pipettiert. Zusätzlich wurden zwei Kontrollen, eine RNA-Probe pro Zelllinie (noRT) und eine Kontrolle mit dem gleichen Volumen an ddH₂O in PCR-Qualität (NTC-STA), mitgeführt. Die Lösungen wurden anschließend ausreichend durchmischt, zentrifugiert und im Thermocycler gemäß Tabelle 3 präamplifiziert.

Tabelle 3 | Temperaturprogramm der Präamplifikation.

Prozessschritt	Zeit (min)	Zyklen	Temperatur (°C)
Initiale Denaturierung	10	-	95
Denaturierung	15	12×	95
Annealing und Elongation	4	12×	60
Endtemperatur	∞	-	4

Direkt nach Beendigung der Präamplifikation wurde ein Exonukleaseverdau (EXO) mittels dem *Exonuclease I* Kit angeschlossen, um ungebundene Primer und Nukleotide aus den Proben zu entfernen. Hierfür wurden je Ansatz 4 µL Exonuklease I (20 U / µL), 0,2 µL Reaktionspuffer und 1,4 µL steriles Wasser in PCR-Qualität hinzugefügt, gemischt, zentrifugiert und anschließend die Proben gemäß Tabelle 4 thermisch behandelt. Nach dem Verdau und der Inaktivierung der Exonuklease wurden je Ansatz 18 µL TE-Puffer hinzugegeben. Zuletzt wurden alle Proben gründlich durchmischt und zentrifugiert. Die Lagerung der Präamplifikate erfolgte bei -20 °C.

Tabelle 4 | Temperaturprogramm zur Durchführung des Exonukleaseverdaus.

Prozessschritt	Zeit (min)	Temperatur (°C)
Verdau	40	37
Inaktivierung	15	80
Endtemperatur	∞	4

4.5.4 Primerverdünnung und Probenvorbereitung

Vor der Applikation der Primer und Proben auf den *Dynamic Array Integrated Fluidic Circuit (IFC)*-Chip erfolgte jeweils ein Vorbereitungsschritt. Für die Primervorbereitung wurde zunächst eine *Assay Mix Solution* aus dem Primerstammset erstellt. Je Ansatz wurden 25 µL 2× *Assay Loading Reagent* mit 22,5 µL DNA-Suspensionspuffer sowie je 2,5 µL der jeweiligen 100 µM Primerpaare aus dem Primerstammset vermischt. Zusätzlich zu den 95 Primerpaaren wurde ein Ansatz mit 2,5 µL ddH₂O (PCR-Qualität) als *No Reaction Control (NRC)* mitgeführt. Dieser Reaktionsmix wurde

bei -20 °C gelagert. Zur Probenvorbereitung wurden je Ansatz 3 µL *SsoFast Evagreen Supermix with Low ROX (2×)* mit 0,3 µL *DNA Binding Dye Solution (20×)* vermischt und je 2,7 µL der Präamplifikate aus 4.5.3 hinzu pipettiert. Zudem wurde auch hier eine NRC aus ddH₂O (PCR-Qualität) mitgeführt.

4.5.5 96x96 Dynamic Array IFC qPCR-Analyse

Die qPCR-Analyse erfolgte auf einem IFC-Chip, wobei vor dessen Verwendung zunächst ein *Priming* des Mikrofluidiksystems durchgeführt wurde. Hierfür wurden beide Akkumulatoren des Chips mit *Control Line Fluid* befüllt und dieser in den *IFC Controller HX* überführt sowie das Programm *Prime* gestartet. Innerhalb von 2 h nach dem *Priming* wurde der Chip mit Hilfe einer Multikanalpipette luftblasenfrei beladen. In jede Assaykavität wurden 5 µL *Assay Mix Solution* pipettiert, während in die Probenkavitäten ebenfalls jeweils 5 µL Probe hinzugefügt wurden. Der Chip wurde erneut in den *IFC Controller HX* überführt und das Programm *Load* ausgewählt, welches die Primer und Proben durch die mikrofluidischen Kanäle in die Reaktionskammern leitet und durchmischt. Vor Analysenbeginn wurden eventuell vorhandene Staubpartikel auf der Oberfläche der Reaktionskammern entfernt und der Chip in das *BioMark™*-System überführt und gemäß Tabelle 5 analysiert.

Tabelle 5 | Temperaturprogramm zur Durchführung der cDNA-Synthese.

Prozessschritt	Zeit (s)	Temperatur (°C)
Annealing	5	25
cDNA-Synthese	30	42
Enzyminaktivierung	5	85
Endtemperatur	∞	4

4.5.6 Datenanalyse

Die Rohdaten wurden zunächst mit Hilfe der Software *Fluidigm Real-Time PCR Analysis* evaluiert. Anhand der durch den Fluoreszenzfarbstoff *EvaGreen®* erzeugten Signale der Zielamplifikate wurden der *Cycle of Quantification* (C_q) und der zugehörige C_q -Wert als C_q ermittelt und auf das Signal des Farbstoffs *Low ROX* normiert. Nach einer Basislinienkorrektur wurden die Schmelzkurven überprüft und die Daten als *Heatmap* visualisiert. Hierbei wurden eventuelle Fehlbeladungen berücksichtigt und auch alle Negativkontrollen, reine RNA, *No Template Control* (NTC), NTC-STA und NRC überprüft. Weiter wurden die vorprozessierten C_q exportiert und mittels der Software *GenEx* (Version 5) weiterverarbeitet. Hierbei wurde ein *Cut-off*-Bereich festgelegt, sodass alle Werte mit $C_q > 28$ entfernt wurden. Die im Programm integrierten Funktionen *GeNorm* und *Normfinder* wurden zur Selektion der Referenzgene herangezogen. Für die Normierung wurden die Referenzgene *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB* und *HPRT1* verwendet. Die finale Evaluation erfolgte gemäß der $\Delta\Delta C_q$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001), bei der die relative Genexpression (RGE) via

$$RGE = 2^{-(\Delta C_{q,c} - \Delta C_{q,0})}$$

bestimmt wird, wobei die erhaltenen C_q -Werte zunächst auf die Referenzgene normiert werden (ΔC_q). Dabei stellt sich $\Delta C_{q,c}$ bei der Konzentration c und $\Delta C_{q,0}$ der unbehandelten Kontrolle dar *via*

$$\Delta C_{q,x} = C_{q,ZG} - C_{q,RG}$$

Hierbei bezeichnet $C_{q,ZG}$ die C_q -Werte der Zielgene (ZG) und $C_{q,RG}$, die der Referenzgene (RG). Anschließend wurde das arithmetische Mittel der technischen Duplikate der RGE gebildet. Zuletzt wurden die RGE -Werte auf die unbehandelte Kontrollprobe normiert (Expressionswert 1,0) und als \log_2 -Werte dargestellt.

4.6 GENSPEZIFISCHE ANALYSE VON HISTONMODIFIKATIONEN MITTELS CHIP-qPCR

Um zu analysieren, ob eine Kurzzeitinkubation von A549-Zellen mit Arsenit gezielte Veränderungen in der DNA-Histon-Interaktion ausgewählter DNA-Reparaturgene bewirkt, wurde die CHIP-qPCR-Methode angewendet. Die Analysen erfolgten in Kooperation mit Eda Tekin im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit. Für die Analysen wurden je $4,5 \times 10^6$ Zellen auf eine Zellkulturschale (\varnothing 15 cm) in Einfachbestimmung ausgebracht, für 24 h mit NaAsO_2 (5-20 μM) behandelt und entweder nicht oder für 48 h nachinkubiert.

4.6.1 Crosslinking und Zellpelletierung

Für die Durchführung der CHIP wurde das *SimpleCHIP® Plus Sonication Chromatin IP* Kit verwendet. Zu Beginn wurde ein *Crosslinking* der Proteine an die DNA in den lebenden Zellen durchgeführt, um den Chromatinzustand zum gewählten Zeitpunkt der Probennahme zu konservieren. Hierfür wurde das Medium durch 10 mL frisches Zellkulturmedium (37 °C) ersetzt und die Schalen für 3 min im Inkubator (37 °C) äquilibriert. Jeweils 270 μL stabilisierter Formaldehyd (FA) (37 %) wurden ins Medium gegeben und die Zellen für exakt 10 min bei RT auf einer Schwenkplatte inkubiert. Direkt im Anschluss wurde das *Crosslinking* durch die Zugabe von 1 mL Glycinlösung (10 \times , 37 °C) für 5 min unter Schwenken gestoppt. Die Lösung wurde abgesaugt und der Zellrasen zweimal mit je 20 mL eiskaltem PBS (pH 7,2) gewaschen. Nach der Zugabe von je 2 mL PBS, versetzt mit 10 μL PIC (200 \times), wurden die chromatinfixierten Zellen mithilfe eines Zellschabers vom Schalenboden abgelöst und in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt, das auf Eis gelagert wurde. Zuletzt wurden die Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 1000 g pelletiert, der Überstand entfernt und die Proben bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.6.2 Zellkernaufschluss und Chromatinfragmentierung

Zur Probenvorbereitung für die nachfolgende ChIP wurden zunächst die Nuklei isoliert und das quervernetzte Chromatin mittels Sonifikation fragmentiert. Hierfür wurden die chromatinfixierten Zellen in 1 mL *ChIP Sonication Cell Lysis Buffer* (1×) (versetzt mit 5 µL PIC (200×)) aufgenommen, resuspendiert und die Zellsuspension in ein 1,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Nach einer 10-minütigen Inkubation der Zellsuspension auf Eis wurden die Proben für 5 min bei 4 °C und 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet erneut in 1 mL *ChIP Sonication Cell Lysis Buffer* (1×) mit 10 µL PIC (200×) resuspendiert sowie für 5 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand entfernt und das lysierte Pellet in 1 mL *ChIP Sonication Nuclear Lysis Buffer* (1×) mit 5 µL PIC (200×) aufgenommen. Die Suspension wurde für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend die Fragmentierung mittels Ultraschallbehandlung am *Branson Sonifier W-250D* durchgeführt. Die Proben befanden sich hierbei in einem konischen 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß und standen während der Sonifikation in einem Eisbad. Für die Zelllinie A549 betragen die optimalen Bedingungen zur Sonifizierung eine Amplitude von 10 %, eine Sonifikationszeit von 2:30 min und eine gepulste Behandlung von 1 s an zu 1 s aus. Nach der Fragmentierung wurden die Zelllysate bei 21000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand, der die fragmentierte Chromatinlösung enthielt, in ein frisches 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß überführt. Zusätzlich wurden 50 µL jeder Probe aliquotiert, um die Fragmentierungseffizienz (siehe Kapitel 4.6.8) zu bestimmen. Die fragmentierten Chromatinlysate wurden bei -80 °C maximal 4 Wochen gelagert.

4.6.3 Chromatinimmunopräzipitation

Zunächst wurden die Chromatinstammlösungen erstellt, die aus jeweils 100 µL Chromatinlösung und 400 µL ChIP-Puffer (1×) mit 2 µL PIC (200×) pro Ansatz bestanden. Somit wurden pro durchzuführende Präzipitation 500 µL der jeweiligen Stammlösung in ein 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß aliquotiert. Zusätzlich wurden von jeder Stammlösung 10 µL entnommen, die als Inputproben fungierten. Diese repräsentieren 2 % des gesamten Chromatingehalts und ermöglichen die Normalisierung der generierten ChIP-qPCR-Ergebnisse, indem sie den Ausgangsgehalt der DNA vor der Immunopräzipitation widerspiegeln. Bis zur weiteren Verwendung wurden diese bei -20 °C gelagert. Pro 500 µL Chromatinaliquot wurde darauffolgend der entsprechende Antikörper (AK) gemäß Tabelle 6 und im Anhang A.1.4 hinzugegeben und die Proben bei 4 °C über Nacht unter Rotation inkubiert, was eine ausreichende Reaktionszeit für die AK-Zielbindung sicherstellte. Neben den Ziel-hPTMs H3K4me3, H3K9ac, H3K18ac und H3K27me3 wurden auch AK-Kontrollen mitgeführt. Als Negativkontrolle diente ein unspezifischer IgG-AK und als Positivkontrolle wurde ein H3-AK verwendet. Nach der AK-Inkubation über Nacht wurden die Proben kurz zentrifugiert, je 30 µL *ChIP-Grade Protein G Magnetic Beads* hinzugegeben und für 2 h bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Bestandteile wurde ein mehrstufiger Waschprozess durchgeführt. Hierfür wurden die Proben kurz zentrifugiert, auf einem Magnetrack platziert, nach 2 min der klare Überstand entfernt und dreimal mit 1 mL Niedrigsalzwaschlösung bei 4 °C für 5 min unter Rotation gewaschen.

Danach folgte ein Waschschrift mit 1 mL Hochsalzwaschlösung. Zur Elution des Chromatins wurden 75 µL steriles ddH₂O und 75 µL 150× *ChIP Elution Buffer* pro Probe zugegeben und diese für 30 min bei 65 °C und 1200 rpm inkubiert. Gleichzeitig wurden die 2 %-Inputproben bei RT analog behandelt. Weiter wurden alle Proben, inklusive der Inputproben, bei 10000 g für 10 s zentrifugiert, magnetisch pelletiert und der Überstand (die präzipitierte Chromatinlösung) in ein neues 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß überführt. Zuletzt wurden die Proben bei 65 °C für 2 h mit je 6 µL NaCl (5 M) und 2 µL Proteinase K inkubiert, um die Protein-DNA-Crosslinks aufzulösen.

Tabelle 6 | Verdünnungsschema der verwendeten Antikörper für die Chromatinimmunopräzipitation.

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Mock IgG	Kaninchen	1:250	Cell Signaling Technology
H3	Kaninchen	1:50	Cell Signaling Technology
H3K9ac	Kaninchen	1:50	Cell Signaling Technology
H3K18ac	Kaninchen	1:50	Cell Signaling Technology
H3K4me3	Kaninchen	1:50	Cell Signaling Technology
H3K27me3	Kaninchen	1:50	Cell Signaling Technology

4.6.4 DNA-Aufreinigung

Zur Aufreinigung der DNA wurden die Proben mit 750 µL DNA-Bindungspuffer versetzt und in zwei Durchgängen (je 450 µL) auf die DNA-Säulen gegeben. Nach einer Zentrifugation für 30 s bei 14000 rpm wurde der Durchfluss verworfen. Anschließend erfolgte ein Waschprozess mit 750 µL DNA-Waschpuffer, wobei zweimal zentrifugiert wurde, um eventuelle Waschpufferrückstände zu entfernen. Für die Elution wurden je 50 µL DNA-Elutionspuffer auf die Säulen gegeben und die DNA durch eine 30 s Zentrifugation auf höchster Stufe in ein frisches Mikroreaktionsgefäß eluiert. Um eine vollständige Elution sicherzustellen, wurde eine Reelution durchgeführt. Die aufgereinigten DNA-Proben wurden bei -20 °C gelagert.

4.6.5 Präamplifikation und Exonukleaseverdau

Zur Erhöhung des DNA-Gehalts wurde vor der qPCR-Analyse eine STA der Zielsequenzen sowie eine EXO gemäß 4.5.3 durchgeführt. Abweichend wurde ein PPM aus den ChIP-Primern hergestellt und verwendet.

4.6.6 Quantifizierung mittels qPCR

Für die DNA-Gehaltsbestimmung mittels qPCR wurde zu Beginn ein Mastermix aus je 10 µL ddH₂O mit 8 µL *Sso Fast Evagreen Supermix with Low Rox* pro Ansatz hergestellt. Entsprechend wurden in technischer Duplikation je 18 µL pro Well in einen 8-ter Streifen vorgelegt und anschließend je 1 µL Primer sowie 1 µL Probe hinzugefügt. Die Detektion erfolgte im Thermocycler *CFX96 Real-Time*

System gemäß Tabelle 7. Eine maximale Abweichung der C_q der technischen Replikate von < 5 % wurde berücksichtigt.

Tabelle 7 | Temperaturprogramm der qPCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse.

Prozessschritt	Zeit (s)	Zyklen	Temperatur (°C)
Initiale Durchmischung	180	-	95
Denaturierung	15	40×	96
Annealing und Elongation	60	40×	60
Schmelzkurvenanalyse	3		60
	1 °C / 3 s		95

4.6.7 Datenanalyse

Die Auswertung erfolgte nach der *Percent Input*-Methode, bei der der DNA-Gehalt der Zielsequenz im Zielimmunpräzipitat mit der Gesamtmenge in der Inputprobe verglichen wird. Die ermittelten C_q der Ziel-AKS wurden auf die C_q der Inputproben normiert, um den prozentualen Anteil der Zielsequenzen im DNA-Histon-Komplex zu ermitteln (Solomon *et al.*, 2021). Für die Analyse wurde zunächst das arithmetische Mittel der C_q technischer Duplikate gebildet. Anschließend erfolgte die Berechnung des prozentualen Anteils der Zielsequenz im ChIP-Isolat, definiert als

$$IP = 2^{\left((C_q(IP) - \log_2(VF)) - C_q(ZG)\right)} \times 100 \%.$$

Dabei stellt $C_q(IP)$ den C_q des 2 %-igen Inputs dar, der mit Hilfe des Verdünnungsfaktors (VF) von 50 auf 100 % Chromatin skaliert wurde, während $C_q(ZG)$ dem C_q des Zielgens ZG entspricht.

4.6.8 Bestimmung der Fragmentierungseffizienz

Zur Sicherstellung einer einheitlichen DNA-Fragmentgrößenverteilung wurde die Fragmentierung jeder Probe mittels Gelelektrophorese überprüft. Die Chromatinfragmente sollten eine Größe von 0,1-1 kb aufweisen (Caride *et al.*, 2023). Analysiert wurden die 50 μ L Aliquote aus Abschnitt 4.6.2. Nach Ribonuklease A (RNAse A)-Verdau (100 μ L ddH₂O, 6 μ L NaCl (5 M), 2 μ L RNAse A; 37 °C, 30 min) und *Decrosslinking* mit 2 μ L Proteinase K (65 °C, 2 h) wurde die DNA gemäß Kapitel 4.6.4 aufgereinigt. Der gDNA-Gehalt wurde photometrisch mit der NanoQuant™-Platte am Mikrotiterplattenlesegerät *Tecan Infinite M200 Pro*® bestimmt. Die Reinheit wurde anhand des Quotienten der Absorption bei 260 nm zu 280 nm bestimmt, wobei nur Proben mit Werten zwischen 1,8-2,0 verwendet wurden. Für die Elektrophorese wurden 100 ng gDNA mit 2 μ L *Gel Loading Dye Purple* (6×) in 10 μ L ddH₂O gemischt und auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 100 V für 75 min, wobei das Signal mittels des *Luminescent Image Analyzer LAS-3000* detektiert wurde.

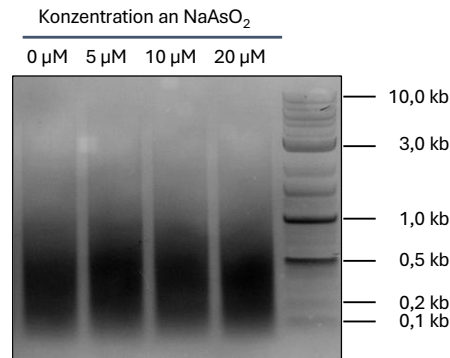


Abbildung 8 | Exemplarische Fragmentierungsüberprüfung der A549-Zelllinie. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch (2 % Agarosegel) aufgetrennt. Das Beispiel zeigt die Überprüfung einer Experimentreihe, in der alle dargestellten Proben die Anforderungen an eine optimale Fragmentgrößenverteilung erfüllen.

4.6.9 Etablierung der ChIP-qPCR-Primer

Zur Untersuchung genspezifischer hPTM-Muster wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein Primersset für spezifische DNA-Reparaturgene und Kontrollgene für die ChIP-qPCR-Analyse erstellt und etabliert. Je zwei Gene aus den DNA-Reparaturmechanismen BER, NER und MMR wurden ausgewählt, die im Zusammenhang mit potenziellen epigenetischen Veränderungen infolge einer Arsenitbehandlung bereits diskutiert wurden. Im Detail wurden zunächst Primer für *MPG* und *XRCC1* (BER), *XPA* und *XPC* (NER) sowie *MLH1* und *MSH2* (MMR) designiert. Als Kontrollprimer wurden *GAPDH*, *MB*, *MYOD1* und *RPL30* ausgewählt, wobei die Primerpaare für *GAPDH*, *MYOD1* und *RPL30* von Cell Signaling Technology bezogen wurden. Das Primerdesign erfolgte mit Hilfe der Software *Beacon Designer* (Version 8.20). Ein wichtiges Kriterium, um potenzielle Rückschlüsse auf die transkriptionelle Regulation der hPTM treffen zu können, war die Auswahl des entsprechenden Genlocus \pm 500 bp um die Transkriptionsstartstelle (TSS). Des Weiteren wurden eine Schmelztemperatur von $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, ein GC-Gehalt von 40-60 %, eine Nukleotidlänge von 18-24 bp, sowie eine definierte Amplikonlänge von 80-160 bp berücksichtigt. Zudem wurden Homologien zu anderen Genen, die Ausbildung von Sekundärstrukturen bei gleicher *Annealing*-Temperatur sowie eine potenzielle Selbstkomplementarität am 3'-Ende vermieden. Alle verwendeten ChIP-qPCR-Primersequenzen sind Anhang A.2.4 zu entnehmen.

Alle Primerpaare wurden vor ihrer Verwendung auf ihre Spezifität und Effizienz geprüft, einschließlich der kommerziell erworbenen. Als Testproben wurden hierbei Lysate von Chromatinfragmenten der A549-Zellen verwendet. Wie auch bei der eigentlichen ChIP-qPCR-Analyse wurden diese zunächst einer STA und einem EXO unterzogen (siehe Kapitel 4.6.5). Für die Ermittlung der Primerspezifität wurde in einem ersten Schritt eine Amplifikation mittels konventioneller qPCR analog zu Kapitel 4.6.6 durchgeführt. Die entstehenden Amplifikate wurden im Anschluss anhand ihrer jeweiligen Schmelzkurven verifiziert. In einem zweiten Schritt erfolgte erneut eine konventionelle qPCR unter den gleichen Bedingungen. Jedoch wurde die Amplikongröße der jeweiligen PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese gemäß Kapitel 4.6.8 überprüft, wobei die DNA-Leiter *GelPilot® 50 bp Ladder (50-500 bp)* als Referenzmarker diente. Hierbei wurde visuell überprüft, dass keine Nebenprodukte entstanden und die ermittelten Amplikonlängen den theoretischen Werten entsprachen. Für die

Zuordnung der Amplikongrößen wurde die Software *Aida Image Analyzer* (Version v.3.27) verwendet. Die ausreichende Spezifität der Primerpaare wurde in drei unabhängigen Analysen bestätigt. Nach erfolgreicher Verifizierung der Primerspezifität wurde auch die Primereffizienz validiert. Hierfür wurde zur Spezifitätsbestimmung abweichend eine Verdünnungsreihe der fragmentierten und präamplifizierten Chromatinlysate mittels qPCR analysiert. Die Verdünnungsschritte betragen hierbei 1:5, 1:10, 1:50, 1:100 und 1:200. Für die Auswertung wurden primerspezifische Kalibriergeraden mittels linearer Regression erstellt, wobei hier der Logarithmus der relativen Konzentration des *Templates* (Abzisse) gegen den ermittelten C_q (Ordinate) aufgetragen wurde. Die Effizienz E wurde gemäß (Raymaekers *et al.*, 2009) ermittelt *via*

$$E = 10^{-\frac{1}{m}} - 1.$$

Dabei ist m die resultierende Steigung der Kalibriergeraden. Akzeptiert wurde E in einem Bereich von $0,9 \leq E \leq 1,1$ und mit einem Korrelationskoeffizienten (R^2) von $R^2 \geq 0,99$. Die ausreichende Effizienz der Primer wurde in drei unabhängigen Analysen bestätigt.

4.7 GLOBALE ANALYSE VON HISTONMODIFIKATIONEN MITTELS *WESTERN BLOT*

Zur Bestimmung des globalen Vorkommens der hPTMs erfolgte eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, engl. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) mit anschließendem *Western Blotting* und Immunodetektion. Hierfür wurde aus den Zellproben zunächst die Histonfraktion extrahiert, die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt und die hPTMs mittels spezifischer AKs nachgewiesen. Für die Analysen wurden je $4,5 \times 10^6$ A549-Zellen bzw. BEAS-2B-Zellen auf eine Zellkulturschale (\varnothing 15 cm) in Einfachbestimmung ausgebracht, für 24 h mit NaAsO_2 (5-20 μM) behandelt und gegebenenfalls für 48 h nachinkubiert.

4.7.1 Zellpelletierung und Histonextraktion

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit einer Trypsinlösung (0,25 % in PBS-EDTA) abgelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 1300 rpm für 3 min wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet zweimal mit 5 mL eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 1 mL eiskaltem PBS resuspendiert, erneut bei 4 °C und 600 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellpellets bei -80 °C gelagert. Die Histonextraktion erfolgte mit dem *Core Histone Isolation Kit* gemäß Herstellerangaben. Hierfür wurden die Zellen in 1,5 mL eiskaltem Lysepuffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und dabei regelmäßig mittels eines Vibrationsmischers auf niedriger Stufe durchmischt. Im Anschluss wurden die Zelllysate bei 4 °C und 600 g für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 750 μL Lysepuffer resuspendiert. Die Zelllyse wurde mithilfe einer Trypanblaufärbung lichtmikroskopisch überprüft. Der Lyseschritt wurde mit 750 μL Lysepuffer

wiederholt und anschließend wurden die Pellets mit 375 μL Extraktionsreagenz versetzt, 1 h auf Eis inkubiert und bei 4 °C und 10000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand (Histonextrakt) wurde in ein Mikroreaktionsgefäß (1,5 mL) überführt und mit 150 μL eiskaltem Neutralisierungspuffer mit 1 mM Dithiothreitol (DTT) versetzt. Die Histonisolate wurden durchmischt und bei -80 °C gelagert.

4.7.2 Proteinquantifizierung

Für die Analyse der Proteingehalte wurde ein kolorimetrischer 660 nm-Assay unter Verwendung des *Pierce™ 660 nm* Proteinassayreagenzes durchgeführt. Dieser spezielle Farbstoff-Metall-Komplex bindet an Proteine unter sauren Bedingungen, wodurch sich dessen Absorptionsmaximum auf 660 nm verschiebt. Zur Proteinquantifizierung wurde eine Sechspunktkalibrierung mit BSA (0,25-1,00 mg/mL) vorgenommen. Zu Beginn wurden je 10 μL Kalibriertlösung oder Probe in technischen Replikaten in eine transparente 96-Well Platte vorgelegt. Zudem wurden *Blank*-Kontrollen sowohl für die Kalibrierung (10 μL ddH₂O) als auch für die Proben (10 μL Extraktionsreagenz) mitgeführt. Pro Kavität wurden anschließend 150 μL *Pierce™ 660 nm* Proteinassayreagenz hinzugegeben, die Platte in das Mikrotiterplattenlesegerät *TECAN Infinite® M200 PRO* überführt, 1 min geschüttelt und nach einer Inkubationszeit von 5 min die Absorption kolorimetrisch bei 660 nm gemessen. Innerhalb des verwendeten Kalibrierbereichs bestand ein linearer Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration und Absorption mit einer Korrelation von $R^2 < 0,995$ und einer tolerierten Abweichung von $< 5\%$ der technischen Replikate.

4.7.3 Elektrophoretische Auftrennung der Histone mittels SDS-PAGE

Die SDS-PAGE ist eine bioanalytische Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Das anionische Detergens SDS überlagert die intrinsischen Ladungen der AS der Proteine, sodass die Auftrennung ausschließlich gewichtsabhängig erfolgt (Schagger, 2006). Die Proben wurden auf 4 μg Protein/20 μL in ddH₂O verdünnt, mit 5 μL *ROTI® Load (4x)* versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Für die PAGE wurde ein diskontinuierliches Gelsystem mit einem 6 % Sammelgel und 15 % Trenngel (Zusammensetzung siehe Anhang A.1.2) verwendet. Die Gele wurden in *PeqLab®*-Kammern eingespannt, mit Laufpuffer befüllt und anschließend beladen. Neben den Histonextrakten wurden auch 5 μL eines Molekulargewichtsmarkers (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, 10-180 kDa) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 37 mA für 1,25 h bei RT.

4.7.4 Proteintransfer mittels *Western Blot*

Der Proteintransfer erfolgte auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran mittels *Semi-Dry Blotting* für 1,25 h bei 2,5 mA/cm² Gelfläche. Die PVDF-Membran und die *Whatman*-Papiere wurden zuvor 15 min in Transferpuffer äquilibriert, wobei die Membran zu Beginn für 1 min in Methanol aktiviert wurde. Nach dem *Western Blotting* wurde der Proteintransfer mittels einer reversiblen

Ponceau-S-Färbung überprüft. Hierzu wurde die Membran für 10 min in Ponceau-S-Färbelösung (0,5 %) geschwenkt, mit ddH₂O gewaschen und das Ergebnis digital mit dem *Luminescent Image Analyzer LAS-3000* dokumentiert. Banden im Bereich von 10-20 kDa wurden für die Auswertung herangezogen. Die Färbung wurde anschließend mit ddH₂O und Blockierlösung wieder entfernt. Abbildung 9 zeigt eine Beispielsanalyse sowie die entsprechende Zuordnung der Histonfraktionen.

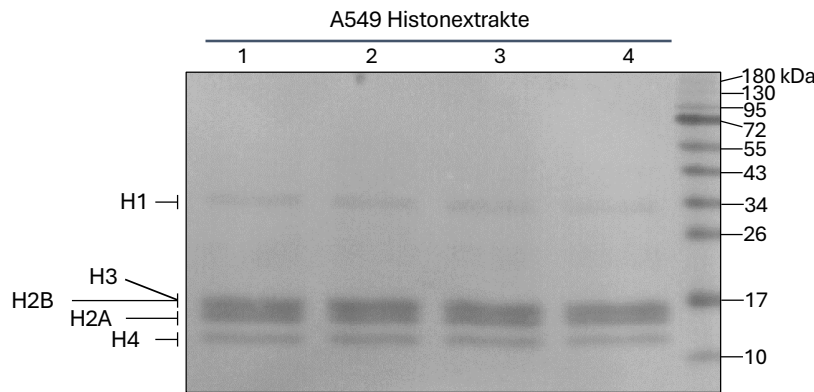


Abbildung 9 | Exemplarische Ponceau-S-Färbung der Histonfraktionen der A549-Zelllinie. Die Banden für Histon H1 (~32 kDa), H3, H2B, H2A (~13-16 kDa) und H4 (~12 kDa) sind zu erkennen.

4.7.5 Immunodetektion mittels Chemilumineszenz

Alle verwendeten AKs und Verdünnungen sind Tabelle 8 und Anhang A.1.4 zu entnehmen. Um unspezifische AK-Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran zunächst für 1-2 h in Blockierlösung (5 % Magermilchpulver in 0,1 % *Tris Buffered Saline* (TBS)-*Tween* (T) (TBS-T) inkubiert. Auch die AK-Verdünnungen wurden mit dieser Blockierlösung hergestellt. Anschließend erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4 °C mit den Primär-AKs (H3K18ac, H3K9ac, H3K4me3, H3K27me3) im Rotator. Am Folgetag wurden die Membranen dreimal für je 5 min mit TBS-T (0,1 %) gewaschen, gefolgt von einer 1-stündigen AK-Inkubation mit einem mit Meerrettichperoxidase (HRP, engl. *horseradish peroxidase*) gekoppelten Sekundär-AK bei RT unter Rotation. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde das Chemilumineszenzsignal durch eine Inkubation der Membran für 1 min mit dem *Amersham™ ECL Prime* Reagenz (1:1 (v/v) Luminol und H₂O₂) induziert. Die überschüssige Lösung wurde entfernt und das Signal mittels des *Luminescent Image Analyzer LAS-3000* detektiert. Die Detektion von β-Actin und H3 erfolgte analog. Um Signalinterferenzen zu vermeiden, stammte der H3-AK aus einer anderen Spezies als die hPTM-AK. Zusätzlich wurde vor der H3-Detektion das hPTM-Signal durch ein *Stripping* entfernt. Hierfür wurde die Membran für 5 min in *Strip-Puffer A* (pH 2,0) geschwenkt, kurz mit ddH₂O gewaschen und für 10 min in *Strip-Puffer B* (pH 11,0) sanft geschüttelt. Vor der AK-Inkubation wurde die Membran für etwa 30 min in Blockierlösung inkubiert.

Tabelle 8 | Übersicht der im *Western Blot* zur globalen Histonbestimmung eingesetzten Antikörper.

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
H3	Maus	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
H3K4me3	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology
H3K9ac	Kaninchen	1:2000	Cell Signaling Technology
H3K18ac	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology
H3K27me3	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology
β-Actin	Maus	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
α-r-IgG-HRP	Maus-anti-Kaninchen	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
α m-IgG Fc BP HRP	Maus-anti-Maus	1:1000	Santa Cruz Biotechnology

4.7.6 Semiquantitative Auswertung

Die semiquantitative Auswertung des hPTM-Vorkommens erfolgte mittels der Software *Aida Image Analyzer* (Version v.3.27). Hierbei wurden die Peakflächen des jeweiligen hPTM-Zielproteins ZP $x_{ZP} \in \{\text{H3K4me3, H3K9ac, H3K18ac oder H3K27me3}\}$ auf die Peakflächen der jeweiligen Ladekontrolle LK $x_{LK} \in \{\beta\text{-Actin, Histon H3, Ponceau}\}$ gemäß der entsprechenden Konzentration $c \in C$ normiert und die relative Intensität als *RI* bestimmt mittels

$$RI_{c,x_{ZP},x_{LK}} = \frac{NDL_{c,x_{ZP},x_{LK}}}{NDL_{0,x_{ZP},x_{LK}}}.$$

Hierbei bezeichnet $NDL_{c,x_{ZP},x_{LK}}$ das *Normalized Density Level*, welches mit Hilfe der Bandenintensitäten $I_{c,x}$ bezüglich einer Konzentration c und einem Protein x definiert ist als

$$NDL_{c,x_{ZP},x_{LK}} = I_{c,x_{ZP}} \times \frac{I_{0,x_{LK}}}{I_{c,x_{LK}}}.$$

Zuletzt wird das arithmetische Mittel je hPTM nach $RI_{c,x_{ZP}} := \frac{1}{3} \sum RI_{c,x_{ZP},x_{LK}}$ gebildet.

4.8 GLOBALE ANALYSE VON HISTONMODIFIKATIONEN MITTELS LC-MS/MS

Die Identifizierung der globalen Peptidlandschaft von Histon H3 erfolgte mittels LC-MS/MS mit Fokus auf der Untersuchung der Lysinpositionen und entsprechenden Acetylierungs- und Methylierungsmustern. Die Analysen erfolgten in Kooperation mit Dr. Delphine Pflieger, Hassan Hijazi und Sabine Brugière und wurden an der *Université Grenoble Alpes*, Frankreich, durchgeführt und ausgewertet. Hierfür wurden je $4,5 \times 10^6$ A549-Zellen pro Zellkulturschale (\varnothing 15 cm) in Dreifachbestimmung ausgebracht und für 24 h mit NaAsO_2 (5-20 μM) behandelt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber in PBS abgelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mittels Zentrifugation bei 1300 rpm für 3 min bei 4 °C pelletiert. Die Pellets wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend bei -80 °C gelagert.

4.8.1 Histonextraktion

Die Isolierung der Histone erfolgte mittels Säureextraktion (Garcia *et al.*, 2008). Zu Beginn wurden die Zellpellets in 1 mL eiskaltem *Nuclear Isolation Buffer* (NIB) mit NP-40 (0,3 % (v/v)) und Natriumbutyrat (10 mM) resuspendiert und die Suspension in einen vorgekühlten Stoßhomogenisator überführt. Die Proben wurden homogenisiert und für 40 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in ein 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Kernpellet mit 1 mL NIB mit 10 mM Natriumbutyrat ohne NP-40 gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Waschschrift wurde noch einmal wiederholt sowie der Überstand entfernt. Die Kernhistone wurden durch Zugabe von 50 µL 0,2 M Schwefelsäure bei 4 °C für 1 h extrahiert und das Säureextrakt wurde durch Zentrifugation bei höchster Stufe für 5 min bei 4 °C isoliert und in ein frisches 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Proteine wurden darauffolgend tropfenweise mit 12,5 µL 100 %-iger eiskalter Trichloressigsäure (TCA) bis zu einer finalen Konzentration von 20 % TCA (v/v) auf einem Vibrationsmischer versetzt und anschließend für 2 h bei 4 °C unter Rotation präzipitiert. Nach einer Zentrifugation auf höchster Stufe für 15 min bei 4 °C wurde der Überstand entfernt, die präzipitierten Proteine mit 1 mL eiskalter Salzsäure (HCl) (0,1 % in Aceton) bedeckt und für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 1 mL eiskaltem Aceton (100 %) gewaschen. Nach Lufttrocknung wurden die Proteine in 60 µL ddH₂O (MS-Qualität) aufgenommen und je 20 µL in frische 1,5 mL Mikroreaktionsgefäße aliquotiert. Je zwei Aliquote wurden anschließend im Evaporator eingedampft und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zur Reinheitsüberprüfung wurden die Proteine quantifiziert, per SDS-PAGE (analog zu 4.7.3 und 4.7.4) analysiert und mit kommerziellem Histonextrakt verglichen. Die Gele wurden mit Coomassie-Färbelösung (0,1 %) angefärbt und über Nacht mit Entfärbelösung behandelt. Zusätzlich wurde ein Immunoblot für H3K18ac durchgeführt (analog zu 4.7.5).

4.8.2 Probenvorbereitung und LC-MS/MS-Analyse

Nach der Histonextraktion erfolgte eine *in vitro*-Propionylierung und Analyse nach Geshovski *et al.* (Geshkovski *et al.*, 2025). Die Proben wurden zunächst zweistufig propionyliert, sowohl auf Protein- als auch auf Peptidebene. Die chemische Derivatisierung mittels N-Propionylierung führt zu einer Erhöhung der Hydrophobizität der Peptide sowie zur Bildung eines charakteristischen Peptidspektrums. Durch die chemische Modifikation werden freie Amingruppen unmodifizierter sowie monomethylierter Lysinreste zusätzlich zu den freien N-Termini der Peptide propionyliert, sodass der anschließende Trypsinverdau nur an nicht-endogen modifizierten Argininresten stattfindet. Unerwünschte O-Propionylierungen an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten wurden mit Hydroxylamin (0,5 M, pH 12) und Ammoniumhydroxid entfernt und die Reaktion durch Zugabe von reiner Trifluoressigsäure (TFA) gestoppt. Im Anschluss wurden die Proben mit *BioSPE® Solid Phase Extraction* (SPE)-Pipettenspitzen aufgereinigt und anschließend vakuumgetrocknet. Die Analyse erfolgte mit einem LC-MS/MS-System, bestehend aus der *Vanquish Neo LC* und dem Massenspektrometer *Orbitrap Ascend Tribrid*. Für die LC-Analyse wurden die derivatisierten

Histonpeptide zunächst in Acetonitril (ACN) (5 %) und TFA (0,1 %) auf einer C18-Säule (25 cm × 75 µm, 1,7 µm Partikelgröße, 120 Å Porengröße, Aurora) nach dem Gradienten in Tabelle 9 aufgetrennt (Puffer A: 0,1 % FA in H₂O (MS-Qualität); Puffer B: Acetonitril (ACN) mit 0,08 % FA). Im Anschluss wurde die massenspektrometrische Analyse im datenabhängigen Modus (DDA, engl. *Data-Dependent Acquisition*) durchgeführt. Die Erfassungsparameter der Analyse sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 9 | **Verwendeter Gradient zur flüssigchromatographischen Auftrennung der Peptide auf einer C18-Säule mit einer Flussrate von 300 nL/min.**

Zeit (min)	Gradient (% Lösung B)
0	2,5
1,5	2,5
7	8,8
62	38,8
70	51,3
71	90,3
80	90,3

Tabelle 10 | **Parameter der massenspektrometrischen Analyse mittels DDA.** AGC: *Automatic Gain Control*, DDA: *Data Dependent Acquisition*, HCD: *Higher-energy Collisional Dissociation*, NCE: *Normalized Collision Energy*.

Global	Polarität	positiv
	Fragmentierung	HCD
	Bereich	30 bis 1300 m/z
Full MS Scan	Auflösung	120000
	Absolutes AGC-Limit	4e5
	Maximale Injektionszeit	Auto
	Dynamische Exklusion	10 s
	Isolierungsmodus	Quadrupol
MS/MS Scans	Auflösung	30000
	Absolutes AGC-Limit	5e4
	Maximale Injektionszeit	59 ms
	NCE	30
	Isolierungsfenster	1,5 m/z

4.8.3 Datenauswertung

Für die Datenanalyse wurden die Rohdaten in Peaktabellen umgewandelt und mittels *MASCOT*-Software (Version v2.8) analysiert. Dabei erfolgte die Identifikation anhand einer Histon- und Kontaminationsdatenbank (El Kennani *et al.*, 2017). Die zu identifizierenden Modifikationen wurden hierbei, wie nachfolgend beschrieben, festgelegt. Eine Propionylgruppe am N-Terminus wurde als feste Modifikation definiert, während eine Propionyl-, Acetyl- oder Butyrylgruppe am Lysinrest (Butyryl entspricht der Kombination aus Methyl und Propionyl an derselben Lysinseitenkette) sowie dimethylierte als auch trimethylierte Lysinreste ebenso nachgewiesen wurden. Hierbei betragen die Massentoleranzen für die Peptide und Fragmente 5 ppm bzw. 20 ppm. Die Identifikationsergebnisse (DAT-Dateien) wurden in die *Proline*-Software importiert, um die Ergebnisse zu überprüfen und

weiterzuverarbeiten. Für die Validierung wurde sichergestellt, dass nur Peptide mit einem *Mascot-Rang 1*, einem *Cut-Off-Score* ≥ 30 und einer Mindestlänge von 6 AS berücksichtigt wurden. Für die markierungsfreie Quantifizierung wurde die MS1-Intensität eines Peptids anhand der höchsten gemessenen Signalstärke im MS1-Spektrum bestimmt, die dem höchsten Punkt des chromatographischen Peaks entspricht. Zusätzlich kam die Funktion *Match-between-Runs* zum Einsatz, um Peptide über verschiedene Messungen hinweg zuzuordnen und so die Analyse zu verbessern. Das relative Vorkommen (*RA*, engl. *Relative Abundance*) der Peptide wurde *via*

$$RA = \frac{\sum I_{ZPS}}{\sum I_{PS}}$$

berechnet wobei I_{ZPS} die Intensität der (modifizierten) Zielproteinsequenz *ZPS* darstellt und I_{PS} die Intensität aller modifizierten Formen der gleichen Peptidsequenz *PS*. Die Analyse der Daten erfolgte mittels interner Skripte (<https://github.com/HijaziHassan/histonePTM>).

4.9 ERMITTLUNG DER ENZYMAKTIVITÄT VON HDACs UND HATs MITTELS ELISA

Zur Untersuchung des Einflusses von Arsenit auf histonmodifizierende Enzyme wurden Enzymaktivitätsbestimmungen mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) durchgeführt. Diese Assays basieren auf der Modifikation immobilisierter Enzymsubstrate durch aktive HDACs bzw. HATs, wobei die Produkte mittels spezifischer AKs kolorimetrisch nachgewiesen werden. Hierfür wurden je $4,5 \times 10^6$ Zellen auf eine Zellkulturschale (\varnothing 15 cm) in Doppelbestimmung ausgebracht, für 24 h mit NaAsO_2 (5-20 μM) behandelt und entweder nicht oder für 48 h nachinkubiert. Die Probenvorbereitung (Kernextraktion) erfolgte gemäß Abschnitt 4.3.2.

4.9.1 HDAC-Assay

Die HDAC-Aktivität wurde mithilfe des *Epigenase™ HDAC Activity/Inhibition Direct Assay Kit (Colorimetric)* gemäß Herstellerangaben bestimmt, wobei die Aktivitäten der HDAC-Klassen I (HDAC1-3,8), II (HDAC4-7,9,10) und IV (HDAC11) simultan erfasst wurden. Nach der Bestimmung der Proteingehalte der Kernextrakte gemäß Kapitel 4.7.2 wurden die Proben auf 5 μg Protein/3 μL Extraktionspuffer verdünnt, entsprechend Tabelle 11 in die Kavitäten pipettiert und mit einer Abdeckfolie luftdicht verschlossen. *Blank* und Positivkontrollen (2 μM Trichostatin A (TSA)) wurden parallel analysiert. Nach einer 90-minütigen Inkubation bei 37 °C und dreimaligem Waschen mit 150 μL Waschpuffer (WP) wurden 50 μL Ziel-AK *HO4* (1:1000 in WP) hinzugegeben und die Platte für 60 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen folgte eine Inkubation mit 50 μL Detektions-AK *HO5* (1:2000 in WP) für 30 min. Zuletzt wurden 100 μL Reagenzlösung (1 min, RT) und danach 100 μL Stopplösung hinzugefügt. Die Signaldetektion erfolgte bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von

655 nm am *TECAN Infinite® M200 PRO* Mikrotiterplattenlesegerät. Zur Auswertung wurde das prozentuale Verhältnis der Behandlung zur Negativkontrolle abzüglich des *Blanks* berechnet.

Tabelle 11 | Pipettierschema des Histondeacetylase (HDAC)-Aktivitätsassays.

Substanz	Blank (μL)	Probe (μL)	Inhibierte Probe (μL)
HDAC-Assay-Puffer <i>HO1</i>	49	46	41
HDAC Substrat <i>HO2</i> (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	1	1	1
Kernextrakt (Probe)	-	3	3
Trichostatin A (TSA) (20 μM)	-	-	5

4.9.2 HAT-Assay

Die HAT-Enzymaktivität wurde mithilfe des *EpiQuik™ HAT Activity/Inhibition Assay Kits* gemäß Herstellerangaben nachgewiesen. Zu Beginn der Analyse wurden 50 μL HAT-Substratlösung *HT2* pro Kavität pipettiert, die Kavitäten mit Folie verschlossen und für 30 min bei RT äquilibriert. Anschließend wurde dreimal mit 150 μL Waschpuffer *HT1* gewaschen und darauffolgend HAT-Assay-Puffer *HT5*, Acetyl-Coenzym A *HT4* und die Proben (5 μg Protein im Kernextrakt) gemäß Tabelle 12 hinzu pipettiert und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Erneut wurde dreimal mit 150 μL *HT1* Waschpuffer gewaschen und im Anschluss mit 50 μL Ziel-AK *HT6* (1:100) für 60 min auf einer Rüttelplatte bei 120 rpm inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit je 150 μL Waschpuffer *HT1* wurden 50 μL Detektions-AK *HT7* (1:1000) hinzugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Zuletzt erfolgte die Detektion nach einem fünfmaligen Waschschrift mit je 150 μL Waschpuffer *HT1*. Hierfür wurde mit 100 μL Reagenzlösung *HT8* für 2 min bei RT inkubiert und direkt nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 50 μL Stopplösung *HT9* hinzugefügt sowie die Platte in das Mikrotiterplattenlesegerät *TECAN Infinite® M200 PRO* überführt. Die Messung der Absorption erfolgte bei 450 nm nach 2 min. Zur Auswertung wurde das prozentuale Verhältnis der Behandlung zur Negativkontrolle abzüglich des *Blanks* gebildet.

Tabelle 12 | Pipettierschema des Histonacetyltransferase (HAT)-Aktivitätsassays.

Substanz	Blank (μL)	Probe (μL)
HAT-Assay-Puffer <i>HT5</i>	30	26
Acetyl-Coenzym A <i>HT4</i>	-	2
Kernextrakt	-	2

4.10 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Alle Analysen wurden, sofern nicht anders angegeben, in mindestens drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse sind jeweils als Mittelwerte der unabhängigen Versuche mit den zugehörigen Standardabweichungen dargestellt. Eine Ausnahme bilden die LC-MS/MS-Auswertungen: Hier wurden drei biologische Replikate betrachtet, deren Mittelwerte jeweils mit dem 95 %-Konfidenzintervall angegeben sind.

Zur Beurteilung signifikanter Unterschiede kamen geeignete statistische Verfahren zum Einsatz. Für Vergleiche zwischen einer Kontrolle und mehreren Behandlungen innerhalb einer Nachinkubationsperiode wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) mit anschließendem Dunnett's Post-hoc-Test verwendet. Für Analysen über zwei Nachinkubationsperioden wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (*two-way ANOVA*) mit Šídák- oder Dunnett's Post-hoc-Test durchgeführt. Paarweise Vergleiche zwischen einer Kontrolle und einer Behandlung wurden mithilfe des Welch-Tests analysiert. Um eine methodische Konsistenz in den statistischen Auswertungen zu gewährleisten, wurde der Welch-Test bei den CHIP-qPCR-Analysen nicht nur in den initialen Experimenten mit einer Kontrolle und einer Behandlung, sondern auch in den entsprechenden Folgeanalysen verwendet.

Die statistischen Analysen wurden mit der Software *GraphPad Prism* (Version 10.4.1) durchgeführt. Die p-Werte wurden wie folgt als statistisch signifikant bewertet: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) und $p < 0,0001$ (****).

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Arsenit ist ein bekanntes Umweltkanzerogen, dessen molekulare Wirkmechanismen bisher nicht vollständig verstanden sind (Chen und Costa, 2021). Ein zentraler Toxizitätsmechanismus von Arsenit ist die Inhibierung von DNA-Reparaturprozessen durch die transkriptionelle Repression relevanter Gene (Zhou *et al.*, 2021), möglicherweise vermittelt durch epigenetische Modifikationen wie posttranslationale Veränderungen des Acetylierungs- und Methylierungsstatus von Histon H3 (Zhang *et al.*, 2020; Ding *et al.*, 2021). Diese Effekte treten bereits nach einmaliger akuter *in vitro*-Exposition auf, doch bleibt unklar, ob sie reversibel sind und ob Arsenit sie eher global oder gezielt induziert. Vor diesem Hintergrund untersucht der erste Teil dieser Arbeit zelluläre toxikologische Endpunkte nach akuter Arsenitexposition, sowohl direkt als auch nach einer anschließenden Zellregenerationsphase. Der zweite Teil analysiert die zelluläre epigenetische Antwort unter den zuvor etablierten Bedingungen mit Fokus auf genspezifische hPTMs und deren Assoziation mit DNA-reparaturrelevanten Genen. Ergänzend erfolgen mechanistische Studien zur Aufklärung der zugrunde liegenden molekularen Prozesse. Das Ziel ist ein vertieftes Verständnis der epigenetischen Mechanismen, die potenziell an der Pathogenese Arsenit-induzierter Krebserkrankungen beteiligt sind, sowie die Schaffung einer Grundlage für eine präzisere toxikologische Risikobewertung der analysierten epigenetischen Parameter.

5.1 BESTÄNDIGKEIT ARSEINIT-INDUZIERTER ZELLREAKTIONEN

Um das Ausmaß und die Persistenz des durch Arsenit induzierten zellulären Stresses zu bestimmen, wurden zunächst Zytotoxizitätsprofile von NaAsO₂ in der A549-Zelllinie erstellt. Basierend auf vorherigen Studien wurden die Zellen für 24 h mit NaAsO₂ in einem Konzentrationsbereich von 0,5 µM bis 50 µM behandelt (Matthäus *et al.*, 2023; Stöber *et al.*, 2023). Für die Nachinkubationsstudien wurden die Zellen unmittelbar nach der Behandlung zusätzlich für 24 h oder 48 h in Medium ohne Arsenit weiterkultiviert. Als initialer Parameter für das akute zytotoxische Potenzial von Arsenit diente der intrazelluläre ATP-Gehalt, anhand dessen die optimalen Behandlungsbedingungen identifiziert wurden. Zur Validierung der gewählten Konzentrationen wurden anschließend eine Lebendzellzahlbestimmung, eine Arsenaufnahmestudie via AAS sowie eine Analyse der Zellzyklusphasenverteilung mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Für eine detaillierte Untersuchung der zellulären Stressantwort auf transkriptioneller Ebene erfolgte eine HT-RT-qPCR. Während bei der Ermittlung des ATP-Gehalts und der Genexpression beide Nachinkubationszeiträume berücksichtigt wurden, fokussierten sich alle weiteren Analysen ausschließlich auf die zweitägige Regenerationsphase.

5.1.1 Analyse der Zytotoxizität von Arsenit

Das akute zytotoxische Potenzial einer Substanz lässt sich mittels verschiedener experimenteller Ansätze erfassen. In dieser Arbeit wurde die akute Zytotoxizität anhand zweier toxikologischer Endpunkte evaluiert. Zum einen wurde die metabolische Aktivität über den zellulären ATP-Gehalt ermittelt, zum anderen erfolgte eine Quantifizierung der Lebendzellzahl.

Abbildung 10 zeigt die Resultate der ATP-Bestimmung für die A549-Zelllinie unmittelbar nach der Behandlung sowie nach einer ein- bzw. zweitägigen Regenerationsphase. Die Messdaten wurden jeweils relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben. Ohne Nachinkubation wurde im Konzentrationsbereich von 0,5 μM bis 15 μM keine signifikante Zytotoxizität beobachtet. Ab 20 μM sank der intrazelluläre ATP-Gehalt moderat, wobei dieser bei 20 μM und 25 μM stets noch über 80 % betrug. Bei 50 μM wurde eine signifikante Reduktion auf ca. 60 % detektiert. Die nachinkubierten Zellen zeigten unabhängig vom Nachinkubationszeitraum ein nahezu identisches Verhalten. Weder eine Zytotoxizitätsverstärkung noch eine Regeneration der ATP-Gehalte wurden festgestellt.

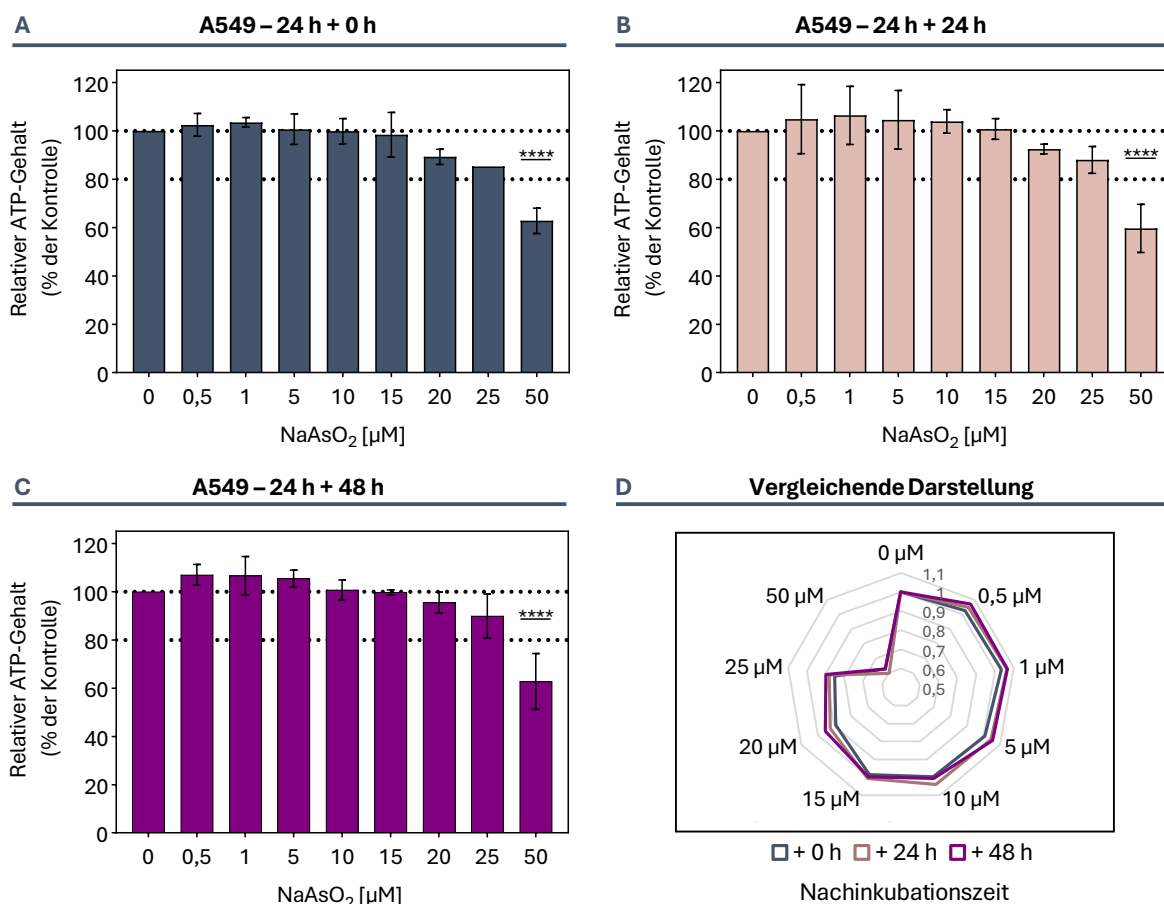


Abbildung 10 Einfluss von Natriumarsenit auf den ATP-Gehalt in A549-Zellen. Die Zellen wurden gegenüber Natriumarsenit (NaAsO₂) für 24 h exponiert und entsprechend 0 h (A), 24 h (B) oder 48 h (C) einer Arsenit-freien Nachinkubation unterzogen. Der ATP-Gehalt wurde gemessen und relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben. Zudem wurde ein Vergleich der erhaltenen Ergebnisse in Form eines Kartendiagramms (D) durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten in technischen Triplikaten. Die Signifikanz zwischen der Kontrolle und der Behandlungen wurde innerhalb einer Nachinkubationsperiode mittels *one-way* ANOVA und Dunnett's Post-hoc-Test ermittelt: **** ($p < 0,0001$).

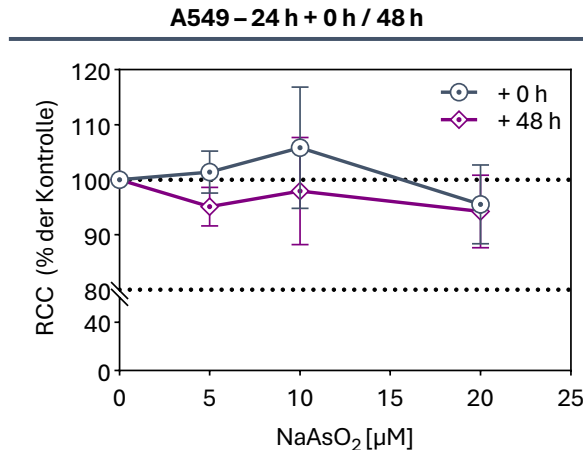


Abbildung 11 | Einfluss von Natriumarsenit auf die relative Lebendzellzahl von A549-Zellen. Die Zellen wurden gegenüber Natriumarsenit (NaAsO₂) für 24 h exponiert und entsprechend keiner (0 h) oder einer 48 h Arsenit-freien Nachinkubation unterzogen. Die Lebendzellzahl wurde gemessen und relativ zur Negativkontrolle angegeben (RCC, engl. *Relative Cell Count*). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die Signifikanz zur Negativkontrolle wurde innerhalb einer Nachinkubationsperiode mittels *one-way* ANOVA und Dunnett's Post-hoc-Test ermittelt.

Die zytotoxischen Effekte im Bereich von 5 µM bis 20 µM NaAsO₂ wurden mit einer zusätzlichen Zellregenerationszeit von 48 h weitergehend untersucht. In Abbildung 11 sind die Ergebnisse der Lebendzellzahlbestimmung mit und ohne zweitägige Nachinkubation dargestellt. Die ermittelten Zellzahlen wurden auf die unbehandelte Kontrollgruppe normiert. Analog zur Analyse des ATP-Gehalts zeigten sich im getesteten Konzentrationsbereich von 5 µM bis 20 µM keine statistisch signifikanten Veränderungen des RCCs, weder unmittelbar nach der Behandlung noch nach einer zusätzlichen 48 h Regenerationsphase. Alle erhaltenen Messergebnisse lagen konsistent innerhalb von 94 % bis 106 % im Vergleich zur Kontrolle. Entsprechend wurden im gewählten Dosisbereich keine akut toxischen Zellreaktionen beobachtet, weshalb für die epigenetischen Analysen ausschließlich Konzentrationen \leq 20 µM eingesetzt wurden. Die durchgeführten Analysen ergaben eine vergleichbare konzentrationsabhängige Zunahme der Zytotoxizität mit steigender Konzentration an Arsenit, wobei keine zeitabhängigen Änderungen des zytotoxischen Verhaltens der A549-Zelllinie innerhalb der zweitägigen zellulären Regenerationsphase beobachtet wurden.

In der Literatur wurde die zytotoxische Wirkung von Arsenit schon mehrfach in verschiedenen Zelllinien und unter unterschiedlichen Inkubationsbedingungen, überwiegend mittels Methylthiazol-Tetrazolium-Assay, untersucht. Der vorliegende konzentrationsabhängige Rückgang der Zellviabilität korreliert mit den beschriebenen zytotoxischen Effekten einer 24-stündigen Behandlung von A549-Zellen im mikromolaren Bereich (Ebert *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2023), wobei eine Studie bereits ab 20 µM von einem signifikanten Rückgang der Zellviabilität auf 86 % berichtet (Yin *et al.*, 2022). Hinsichtlich des zellulären Nachinkubationsverhaltens liegen bislang nur wenige vergleichbare Studien vor. Komissarova *et al.* untersuchten die akute Zytotoxizität von NaAsO₂ in der Osteosarkomzelllinie U2OS unter vergleichbaren Inkubationsbedingungen. Dabei wurden nach 24-stündiger Behandlung im Konzentrationsbereich von 0,01 µM bis 10 µM Unterschiede im zytotoxischen Verhalten der Zellen

nach entsprechender ein- bzw. zweitägiger Arsenit-freien Nachinkubation im Vergleich zur Wirkung unmittelbar nach Behandlungsende beobachtet. Der hier angewandte *Neutral Red*-Assay zeigte eine verstärkte zytotoxische Wirkung durch eine Nachinkubation der Zellen. Eine Behandlung der U2OS-Zelllinie mit 1 μM führte unmittelbar zu einer Zellviabilität von über 99 %, die nach 24 h Nachinkubation auf etwa 79 % und nach 48 h auf rund 59 % sank (Komissarova *et al.*, 2005). Die Diskrepanz zu den Ergebnissen dieser Arbeit könnte auf die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien zurückzuführen sein, da die U2OS-Zellen in der Vergleichsstudie eine höhere Sensitivität gegenüber NaAsO_2 demonstrierten. Darüber hinaus besitzen die U2OS-Zellen im Vergleich zu den A549-Zellen vermutlich eine unterschiedliche Kapazität zur oxidativen Stressbewältigung und zur Apoptose-Regulation. Insbesondere Nrf2 wird in der A549-Zelllinie überexprimiert, was eine höhere antioxidative Kapazität als andere Zelllinien nahelegt (Kweon *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008a).

5.1.2 Einfluss von Arsenit auf die Zellzyklusverteilung

Zur Analyse der Zellzyklusphasenverteilung wurde eine durchflusszytometrische Untersuchung durchgeführt. Die A549-Zelllinie wurde hierfür 24 h lang mit NaAsO_2 im gewählten Konzentrationsbereich von bis zu 20 μM NaAsO_2 behandelt und anschließend einer zweitägigen Zellregenerationsphase unter Arsenit-freien Bedingungen unterzogen.

Die Ergebnisse zur Zellzyklusverteilung sind in Abbildung 12 dargestellt. Direkt nach der Inkubation lagen etwa 66 % der Zellen in der G0/G1-, 9 % in der S- und 25 % in der G2/M-Phase vor (Abbildung 12A). Mit der Nachinkubation ergaben sich Anteile von rund 69 % für die G0/G1-Phase, 11 % für die S-Phase und 20 % für die G2/M-Phase (Abbildung 12B). Weder direkt nach der Behandlung noch nach der zweitägigen Zellregenerationsphase zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den ermittelten Zellzyklusphasen zwischen der Kontrolle und den verschiedenen Behandlungen.

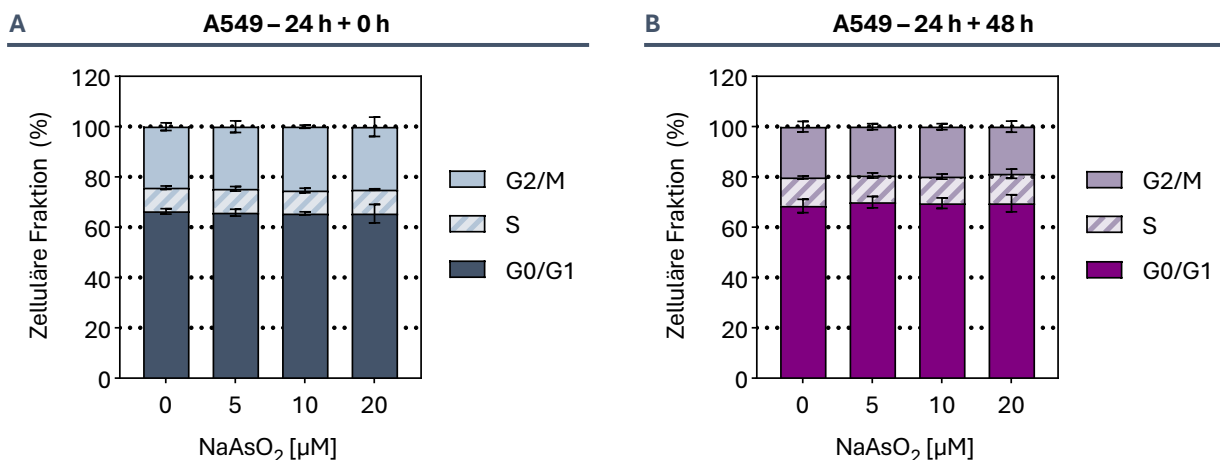


Abbildung 12 | Zellzyklusphasenverteilung von A549-Zellen nach Inkubation mit Natriumarsenit. Die Zellen wurden gegenüber Natriumarsenit (NaAsO_2) für 24 h exponiert und entsprechend 0 h (A) oder 48 h (B) einer Arsenit-freien Nachinkubation unterzogen. Die Zellzyklusverteilung wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die Signifikanz zur Negativkontrolle wurde innerhalb einer Nachinkubationsperiode mittels *one-way* ANOVA und Dunnett's Post-hoc-Test ermittelt.

Dabei ist anzumerken, dass zwischen den beiden Negativkontrollgruppen kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt wurde. Weder die NaAsO_2 -Behandlung noch die Nachinkubation beeinflussten die Zellzyklusverteilung unter den gegebenen Bedingungen.

Der Einfluss von NaAsO_2 auf die Zellzyklusprogression ist derzeit umfassend dokumentiert. Eine Behandlung unterschiedlicher Zelllinien mit NaAsO_2 führte in vielen Studien zu einem konzentrationsabhängigen G2/M-Arrest, gekennzeichnet durch einen Anstieg des Zellanteils in der G2/M-Phase bei gleichzeitiger Reduktion der G0/G1-Phase (Jiang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2021). Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen zeigte eine Studie mit NaAsO_2 -behandelten A549-Zellen bereits ab einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ (24-stündige Inkubation) eine signifikante Erhöhung des G2/M-Anteils. Allerdings wurde ein anderes Nährmedium (DMEM statt RPMI) verwendet, sodass externe Faktoren wie das verwendete Medium die Sensitivität der Zelllinie beeinflusst haben könnten (Jiang *et al.*, 2013). Hinsichtlich des Nachinkubationsverhaltens existieren bislang nur wenige Studien. Eine Untersuchung an V79-Zellen des chinesischen Hamsters ergab jedoch bereits, dass NaAsO_2 einen mitotischen Arrest sowie Apoptose induziert, wobei die Apoptoserate mit verlängerter Arsenit-freier Nachinkubation (bis zu 5 Tage) signifikant abnahm (Sciandrello *et al.*, 2002).

5.1.3 Zelluläre Aufnahme und subzelluläre Lokalisation von Arsenit

Aufbauend auf den Zytotoxizitäts- und Zellzyklusanalysen wurde eine Untersuchung der intrazellulären Aufnahme sowie der subzellulären Verteilung von Arsenit durchgeführt. Zur Ermittlung der Gesamtaufnahme bzw. der intrazellulären Arsenkonzentration wurden die A549-Zellen über einen Zeitraum von 24 h mit NaAsO_2 ($5 \mu\text{M}$ bis $20 \mu\text{M}$) behandelt. Für potenzielle Rückschlüsse auf das Regenerationsverhalten wurden die Zellen zudem für weitere 48 h unter Arsenit-freien Bedingungen weiterkultiviert. Die intrazelluläre Arsenkonzentration wurde sowohl unmittelbar nach der Behandlung (0 h) als auch nach einer Regenerationsphase (48 h) ermittelt. Zusätzlich zur Gesamtkonzentration erfolgte eine Analyse der nukleären Arsenkonzentration direkt im Anschluss an die NaAsO_2 -Inkubation. Beide Analysen wurden mittels GF-AAS durchgeführt.

Die Resultate der Aufnahmestudien sind in Abbildung 13 dargestellt. Eine akute Exposition der A549-Zelllinie mit NaAsO_2 führte zu einer konzentrationsabhängigen Akkumulation von Arsen in der Zelle (Abbildung 13A). Bei einer Behandlung mit $5 \mu\text{M}$ NaAsO_2 wurden etwa $18 \mu\text{M}$ Arsen pro Zelle detektiert. Nach Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ und $20 \mu\text{M}$ stieg die Konzentration nahezu linear auf rund $43 \mu\text{M}$ bzw. $97 \mu\text{M}$ Arsen pro Zelle an. Während unmittelbar nach der Behandlung eine signifikante Arsenakkumulation nachgewiesen wurde, zeigte sich nach 48 h ein nahezu vollständiger Verlust. So lag nach der Behandlung mit $5 \mu\text{M}$ NaAsO_2 die Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze, während bei $10 \mu\text{M}$ und $20 \mu\text{M}$ ungefähr $0,5 \mu\text{M}$ bzw. $0,9 \mu\text{M}$ Arsen pro Zelle detektiert wurden. Dies entspricht einer Reduktion auf ca. 1,2 % bzw. 0,9 %. Unmittelbar nach Behandlungsende zeigte sich auch eine konzentrationsabhängige Akkumulation von Arsen im nukleären Kompartiment (Abbildung 13B). Nach der Inkubation mit $5 \mu\text{M}$ NaAsO_2 lag die nukleäre Arsenkonzentration bei etwa $4 \mu\text{M}$ pro Zelle und stieg bei $10 \mu\text{M}$ bzw. $20 \mu\text{M}$ auf rund $9 \mu\text{M}$ bzw. $30 \mu\text{M}$ an.

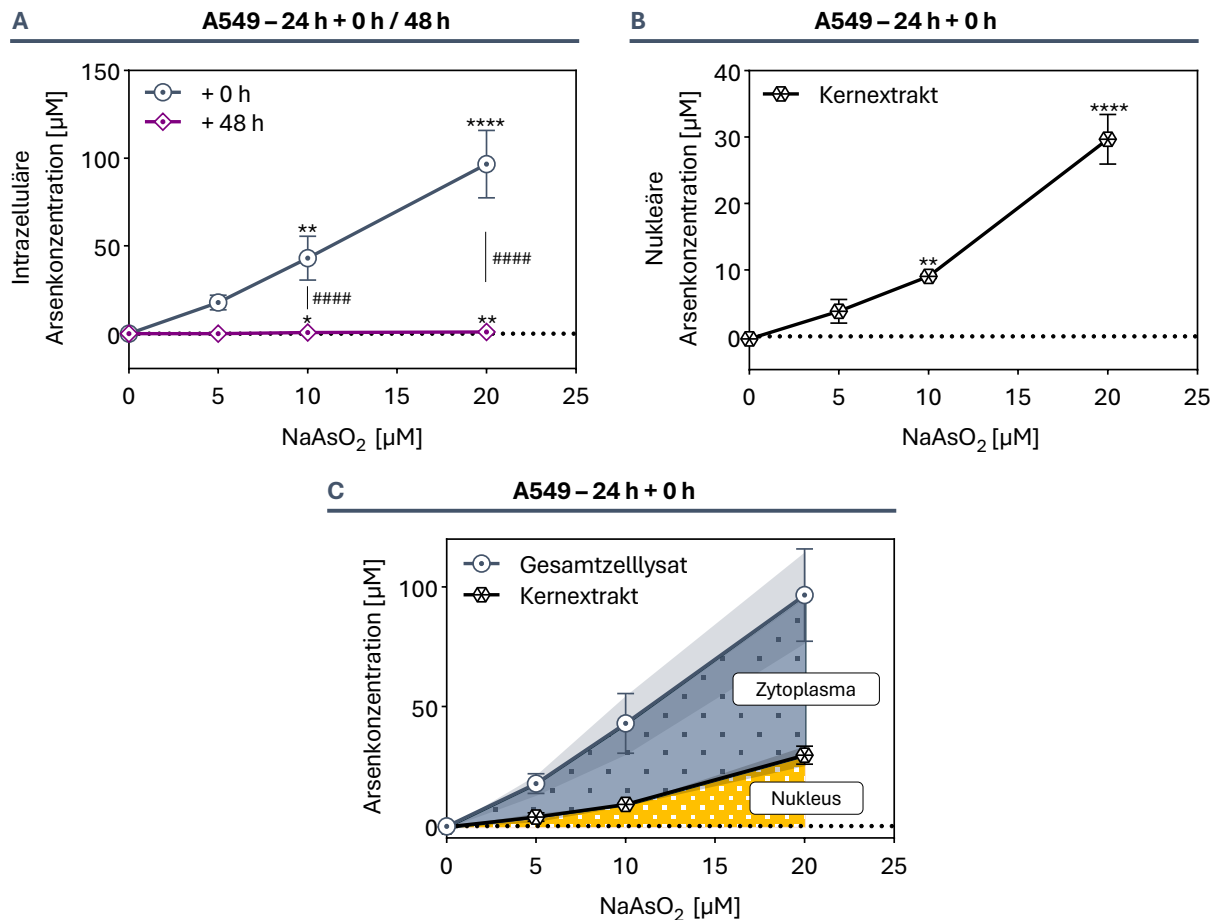


Abbildung 13 | **Aufnahmestudien von Natriumarsenit in A549-Zellen.** Die Zellen wurden gegenüber Natriumarsenit (NaAsO₂) für 24 h exponiert und entsprechend keiner (0 h) oder einer Arsenit-freien Nachinkubation (48 h) unterzogen. Im Anschluss wurden die intrazelluläre und nukleäre Arsenkonzentrationen mittels GF-AAS bestimmt. Abgebildet ist die Arsenkonzentration pro Zelle mit und ohne Regenerationsphase (**A**) sowie der ermittelte Anteil im Zellkern nach der 24-stündigen Behandlung (**B**). Zudem wird der theoretische zytoplasmatische und nukleäre Anteil basierend auf dem Kernanteil der Gesamtzellkonzentration gezeigt (**C**). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die Signifikanz zur Negativkontrolle innerhalb einer Nachinkubationsperiode wurde mit *one-way* ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test ermittelt: */**/**** (p < 0,05/0,01/0,001). Für den Vergleich zwischen den beiden Nachinkubationsperioden (0 h vs. 48 h) wurde die Signifikanz mittels *two-way* ANOVA mit Šidák-Post-hoc-Test bestimmt: ##### (p < 0,0001).

Der Vergleich zwischen der Gesamtkonzentration und der nukleären Akkumulation verdeutlicht, dass bei den niedrigeren Konzentrationen von 5 µM und 10 µM etwa ein Fünftel des aufgenommenen Arsens im Zellkern lokalisiert vorlag (Abbildung 13C). Bei einer Behandlung mit 20 µM akkumulierte hingegen rund ein Drittel des intrazellulären Arsens im Kern.

Die intrazelluläre Bioverfügbarkeit von NaAsO₂ in der A549-Zelllinie wurde bereits in zahlreichen Studien umfassend untersucht. Dabei kamen verschiedene experimentelle Testsysteme sowie eine Vielzahl unterschiedlicher Inkubationsbedingungen zum Einsatz (Ebert *et al.*, 2011; Meyer *et al.*, 2018; Matthäus *et al.*, 2023). Nachgewiesen wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg des intrazellulären Arsengehalts sowohl auf Zellpopulationsebene als auch auf Einzelzellebene. Analysen mittels *Single-Cell Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* detektierten nach einer Behandlung von A549-Zellen für 24 h mit 25 µM NaAsO₂ einen durchschnittlichen Arsengehalt von 10,4 ± 1,2 fg pro Zelle (Meyer *et al.*, 2018). Im Vergleich dazu ergaben die in dieser Arbeit

durchgeführten AAS-Analysen bei einer Behandlung mit 20 μM leicht höhere Werte von $21,1 \pm 4,2$ fg pro Zelle. Hierbei gilt zu beachten, dass die massenspektrometrische Methode deutlich sensitiver ist als die hier verwendete AAS-Analyse.

Der nahezu vollständige Verlust der intrazellulären Arsenkonzentration nach der 48-stündigen Regenerationsphase deutet auf eine effiziente Exkretion von Arsenit hin. Dies könnte zum einen über spezifische ABC-Transporter wie MRP1, MRP2 und MRP4 erfolgen, die aktiv das intrazelluläre Arsenit primär in Form von GSH-Konjugaten aus der Zelle transportieren. Zum anderen ist auch eine extrazelluläre Freisetzung aufgrund des generierten Konzentrationsgradienten nach dem Wechsel des Nährmediums für die Nachinkubation über passive Transporter möglich. Insbesondere die eigentlichen Aufnahmetransporter AQP7, AQP9 und GLUT1 könnten hierbei als Kanäle für den passiven Efflux von Arsenit fungieren. Studien zeigen, dass die A549-Zelllinie diese Transporter exprimiert, darunter MRP1, MRP2, MRP4 sowie GLUT1 und AQP9 (Miao *et al.*, 2009; Furugen *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2023). Zusätzlich sind Verdünnungseffekte aufgrund der fortlaufenden Zellproliferation als weiterer Faktor für den intrazellulären Verlust von Arsenit zu berücksichtigen.

Hinsichtlich der Akkumulation von Arsen in spezifischen Zellkompartimenten liegen bislang nur wenige Studien vor. Huang *et al.* untersuchten die subzelluläre Verteilung von ATO in der leukämischen HL-60-Zelllinie mittels *Nanoscale Secondary Ion Mass Spectrometry*. Nach einer Behandlung mit 8 μM ATO für 12 h wurde eine signifikante Anreicherung von Arsen im Nukleus festgestellt, vor allem im Nukleolus nicht-apoptotischer Zellen. Dabei konnten Arsen-Schwefel-Proteinaggregate in verschiedenen subzellulären Kompartimenten, einschließlich des Nukleolus und des Nukleus, nachgewiesen werden, was unter anderem auf eine Komplexbildung mit nukleären Proteinen hindeutet. Zudem verglichen Huang *et al.* die Aggregat-Akkumulation nach einer 12-stündigen und 24-stündigen ATO-Behandlung. Hierbei konnte gezeigt werden, dass nach 12 h deutlich mehr Aggregate im Zellkern vorliegen als nach 24 h (Huang *et al.*, 2022). Diese Ergebnisse zeigen, dass dreiwertige Arsenverbindungen im Zellkern akkumulieren können, während zugleich Hinweise darauf vorliegen, dass Arsenit trotz seiner Proteinbindung wieder aus dem Zellkern transportiert werden kann, wie auch in dieser Arbeit beobachtet wurde.

Aufgrund des nahezu vollständigen Verlusts des intrazellulären Arsengehalts 48 h nach der Behandlung erfolgte eine weiterführende Genexpressionsanalyse. Der Fokus lag auf der Identifikation potenziell persistenter Arsenit-induzierter zellulärer Effekte, ungeachtet der Tatsache, dass nur noch Spuren Mengen von Arsen nach 48 h in der Zelle nachgewiesen wurden. Eine transkriptionelle Effektpersistenz könnte auf die Entstehung eines epigenetischen Zellgedächtnisses hindeuten.

5.1.4 Veränderung des Genexpressionsprofils durch Arsenitexposition

Zur Untersuchung des transkriptionellen Nachinkubationsverhaltens von A549-Zellen nach einer akuten Exposition mit Arsenit wurde eine HT-RT-qPCR-Methode angewandt. Diese Methode ermöglichte eine simultane Analyse von 95 Genen in 96 Proben (Fischer *et al.*, 2016; Stöber *et al.*, 2023). Das untersuchte Gencluster umfasste zentrale Gene der zellulären Stressantwort, darunter die

oxidative Stressantwort, Inflammation, Zellzyklusregulation, Metallhomöostase, DNA-Reparatur und DNA-Schadensantwort sowie Gene der epigenetischen Regulation.

Um einen Überblick über die zeitabhängigen Nachwirkungen einer akuten Arsenitbehandlung auf Transkriptionsebene zu erhalten, wurde eine explorative Analyse der Ergebnisse bei der höchsten getesteten Konzentration von 25 μM NaAsO_2 durchgeführt. Die relativen Genexpressionsänderungen (RGE) wurden simultan für alle 95 Gene visualisiert, um potenzielle zeitabhängige Trends ableiten zu können. In Abbildung 14 sind die erhaltenen Daten in Form eines Volcano-Plots dargestellt, der sowohl die Stärke der RGE als auch die statistische Signifikanz der Veränderungen widerspiegelt. Die Verteilung der Datenpunkte zeigte einen deutlichen Trend zur Effektverstärkung mit zunehmender Zellregenerationszeit, da die Streubreite der Datenpunkte mit verlängerter Nachinkubation zunahm. Dies spiegelte sich in einer Verbreiterung der parabolischen Form durch die veränderte Verteilung der Datenpunkte mit zusätzlicher Regenerationszeit wider. Gleichzeitig erhöhte sich die Anzahl an biologisch signifikant veränderten Genen, erkennbar an einer verdichteten Anhäufung von Datenpunkten, die den statistischen Schwellenwert von $p < 0,005$ überschreiten und eine \log_2 -fache RGE von < -1 aufweisen, was einer Reduktion der Genexpression um mindestens 50 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle entspricht. Zudem wurde anhand der asymmetrischen Verteilung der Datenpunkte ein verändertes Verhältnis zwischen induzierten und reprimierten Genen beobachtet. Während die Datenpunkte bei $p < 0,05$ ohne Nachinkubation hauptsächlich eine signifikant erhöhte Expressionsrate aufzeigten, führte eine zusätzliche Nachinkubation von ein bis zwei Tagen zu einer Erhöhung der Anzahl signifikant herabregulierter Gene mit $p < 0,05$. Im Folgenden werden die durch Arsenit induzierten Veränderungen der Genexpression in Abhängigkeit von einer zusätzlichen Arsenit-freien Nachinkubation detailliert beschrieben, um mechanistische Implikationen zu diskutieren und die zeitabhängigen zellulären Anpassungsprozesse umfassend zu bewerten.

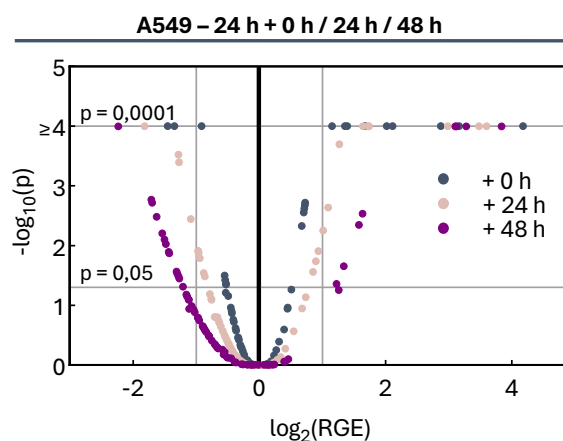


Abbildung 14 | Einfluss von 25 μM Natriumarsenit mit Nachinkubation auf das Genexpressionsprofil in A549-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit 25 μM Natriumarsenit behandelt und entsprechend 0 h, 24 h oder 48 h einer Arsenit-freien Nachinkubation unterzogen. Im Anschluss wurde eine High-Throughput-RT-qPCR für 95 Gene durchgeführt. Analysiert wurden mindestens drei unabhängige Experimente in Doppelbestimmung. Dargestellt ist die relative Änderung der Genexpression zur unbehandelten Kontrolle gegen den p-Wert, der mittels *two-way* ANOVA und Dunnett's Post-hoc-Test generiert wurde. Zur Vereinfachung wurden die p-Werte $< 0,0001$ als 0,0001 dargestellt.

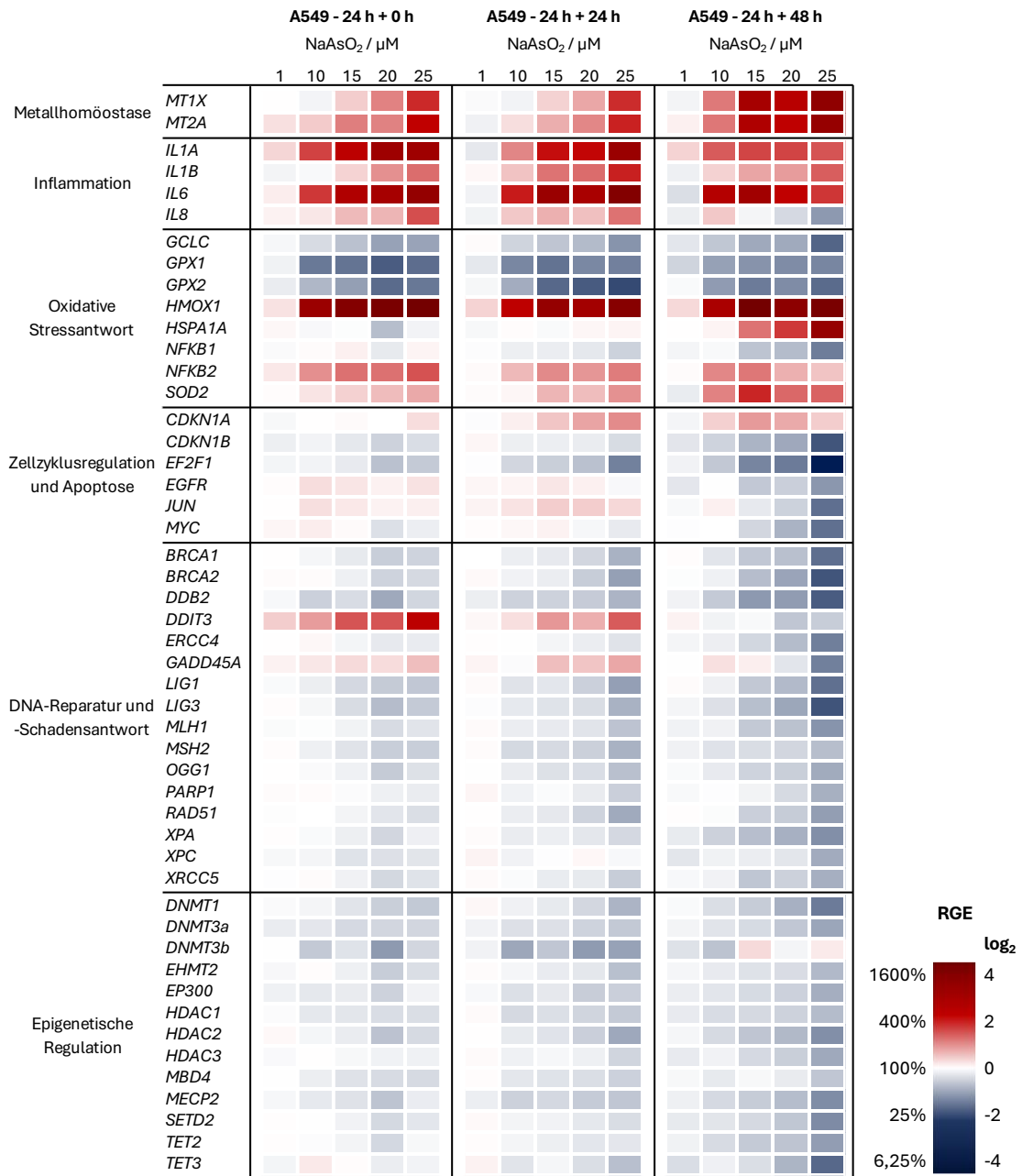


Abbildung 15 | Genexpressionsprofile von A549-Zellen nach akuter Arsenitexposition und Nachinkubation.

Die Zellen wurden für 24 h mit NaAsO₂ im Konzentrationsbereich von 1 μM bis 25 μM behandelt und anschließend entweder keiner Nachinkubationsphase (0 h) oder einer Arsenit-freien Zellregenerationsphase (24 h bzw. 48 h) unterzogen. Die Genexpression wurde mittels *High Throughput*-RT-qPCR erfasst und als log₂-fache Änderungen der relativen Genexpression (RGE) dargestellt. Eine Geninduktion wird durch rote und eine Genrepression durch blaue Farbmarkierung visualisiert. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt wurden.

Abbildung 15 zeigt eine globale *Heatmap* der Resultate ausgewählter Gene, gruppiert in funktionelle Cluster. Eine vollständige Übersicht aller analysierten Gene sowie die detaillierten Ergebnisse sind in Anhang A.2.2 und A.2.3 aufgeführt. Die präsentierten Gene weisen Transkriptionsveränderungen mit einem log₂-fachen Wert von ± 1 auf, was einer Verdopplung oder Halbierung der basalen Transkriptmenge entspricht. Zusätzlich wurden auch Gene nahe an diesem Schwellenwert berücksichtigt, sofern sie eine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung zeigten. Die

Nachinkubation der mit Arsenit behandelten A549-Zellen, insbesondere für 48 h, führte zu Veränderungen in den Expressionsniveaus zahlreicher Gene, die an verschiedenen zellulären Reaktionsmechanismen beteiligt sind. Hervorzuheben ist, dass die meisten signifikanten Änderungen der RGE primär ab 10 μM NaAsO₂ begannen, wobei Trends teilweise bereits ab 1 μM beobachtet wurden. Nachfolgend werden die Änderungen der Genaktivitäten der einzelnen Cluster beschrieben.

In Bezug auf die Metallhomöostase zeigte sich eine dosisabhängige, persistente Induktion der Metallothionein (MT)-Gene *MT1X* und *MT2A*, die 48 h nach Exposition am stärksten ausgeprägt war (Abbildung 16A). Während sich unmittelbar nach der Behandlung nach 24 h ein ähnliches Verhalten abzeichnete, wurde nach einer Zellregenerationszeit von 48 h eine deutliche Effektverstärkung festgestellt. Bei der höchsten getesteten Konzentration von 25 μM NaAsO₂ erhöhte sich die Transkriptmenge von *MT1X* direkt nach der Behandlung um das 3-fache, nach 48 h sogar um das 10-fache im Vergleich zum Basalgehalt. Ähnlich stieg die Expression von *MT2A* unmittelbar nach der Behandlung um das 4-fache an und erreichte nach 48 h ein etwa 9-faches Niveau.

Die Induktion der MTs stellt eine dynamische zelluläre Schutzreaktion gegenüber Arsenit-induzierter Toxizität dar. Während diese Cystein-reichen Proteine redoxaktive Metallionen abfangen und dadurch die Zelle indirekt vor oxidativem Stress und ROS-vermittelten DNA-Schäden schützen, besitzen sie zudem die Fähigkeit zur Arsenbindung, wenngleich die Affinität der MTs im Vergleich zu anderen Metallen wie Cadmium oder Zink deutlich geringer ausfällt (Rahman und De Ley, 2017).

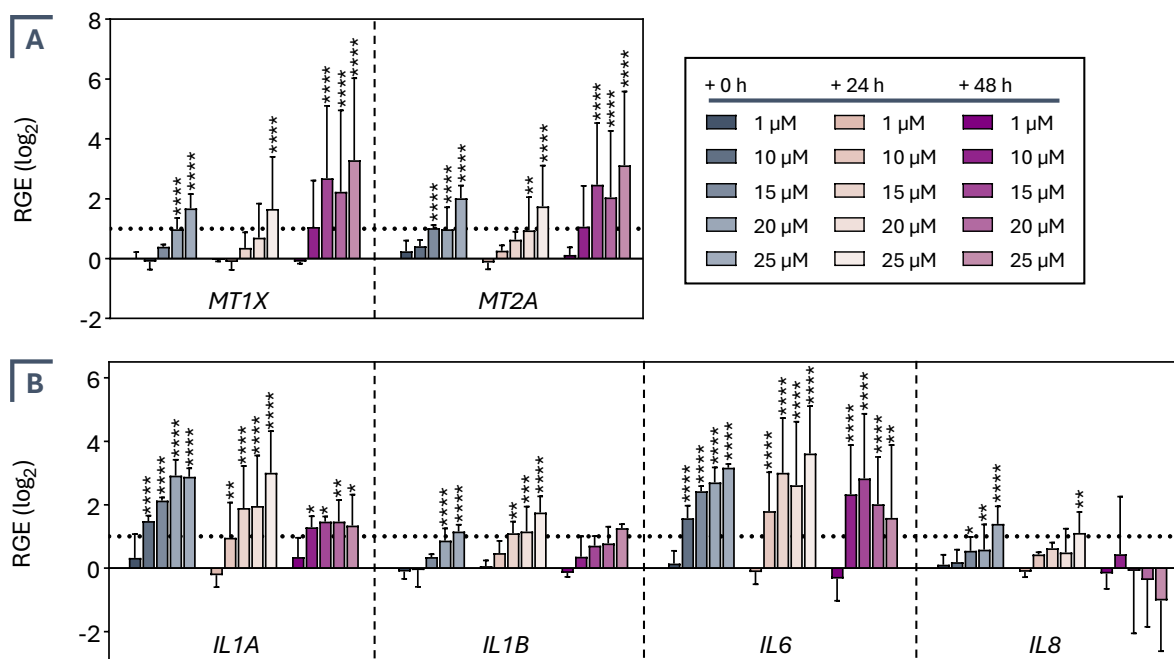


Abbildung 16 | Einfluss von Natriumarsenit auf die Expression von Genen der Metallhomöostase und Inflammation in A549-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit Natriumarsenit behandelt und anschließend 0 h, 24 h oder 48 h einer Arsenit-freien Nachinkubation unterzogen. Abgebildet sind zum einen Gene aus dem Bereich der Metallhomöostase (A), als auch Gene, die für inflammatorische Proteine codieren (B). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die Signifikanz zwischen der Negativkontrolle und den Behandlungen wurde innerhalb einer Nachinkubationsperiode in Bezug auf alle getesteten Gene mit two-way ANOVA und Dunnett's Post-hoc-Test bestimmt: */**/****/***** ($p < 0,05/0,01/0,001/0,0001$).

Vermutet wird, dass Arsenit die Biosynthese der MTs über die Induktion des *metal regulatory transcription factor 1 (MTF1)* reguliert, indem dieser an das *metal response element* von *MT1* bindet und dadurch dessen Transkription initiiert (Qu und Waalkes, 2015). Zudem ist bekannt, dass Arsen-induzierte Effekte auf die Expression von MTs bis zu 48 h nach der Exposition persistieren können (Albores *et al.*, 1992). Dieser Aspekt wurde auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt und weist auf eine anhaltende zelluläre regulatorische Wirkung von Arsenit hin. Da die MTs verstärkt nach 48 h gebildet werden, könnte eine zweitägige Nachinkubation die Arsenit-MT-Interaktion begünstigen. Falls dies zutrifft, bleibt jedoch unklar, wie Arsen aus der Zelle transportiert wird, da nach 48 h kaum noch intrazelluläres Arsen nachweisbar war.

Neben der Induktion von Genen, die an der Metallhomöostase beteiligt sind, führte die NaAsO₂-Behandlung von A549-Zellen zu einer signifikanten proinflammatorischen Antwort. Dies manifestierte sich durch ein erhöhtes Transkriptionsniveau inflammatorischer Mediatoren, insbesondere der Interleukine (ILs) (Abbildung 16B). Nach einer akuten Exposition mit Arsenit zeigten die inflammatorischen Marker *IL1A*, *IL1B*, *IL6* und *IL8* eine dosisabhängige Induktion, die sich im Verlauf der Nachinkubationsphase unterschiedlich verhielt. Während *IL1A*, *IL1B* und *IL6* über den gesamten Nachinkubationszeitraum eine persistierende mRNA-Zunahme aufwiesen, zeigte *IL8* ein transient verändertes Expressionsverhalten mit einer Rückkehr zum Basalzustand nach 48 h.

IL1A erreichte bei der höchsten getesteten Konzentration von 25 µM NaAsO₂ direkt nach der Behandlung eine etwa 7-fache Erhöhung der Transkription, die nach einer 24-stündigen zellulären Erholungsphase auf das 8-fache anstieg. Nach 48 h reduzierte sich die Transkription jedoch deutlich auf eine etwa 3-fache Erhöhung. Ein ähnliches Muster zeigte *IL1B*, dessen Transkriptmenge nach der Exposition zunächst um etwa das 2-fache zunahm und nach 24 h eine 3-fache Induktion erreichte. Nach 48 h fiel die Transkriptmenge wieder auf das 2-fache zurück, wobei keine statistische Signifikanz mehr vorlag. Insgesamt wies *IL6* die stärkste Induktion auf. Unmittelbar nach der Behandlung stieg der mRNA-Gehalt ungefähr auf das 9-fache an und erreichte nach 24 h bei 25 µM NaAsO₂ eine etwa 12-fache Erhöhung. Nach 48 h nahm die Effektstärke bei höheren Konzentrationen jedoch deutlich ab, sodass bei der höchsten Dosis nur noch eine etwa 3-fache Induktion festgestellt wurde. Dennoch blieb die erhöhte Expression von *IL6* über den gesamten Nachinkubationszeitraum ab einer Konzentration von 10 µM erhalten. Im Gegensatz dazu zeigte *IL8* ein transientes Genexpressionsverhalten. Direkt nach der Behandlung wurde ein etwa 3-facher Anstieg beobachtet, welcher sich nach 24 h auf das 2-fache reduzierte. Nach 48 h erreichte die *IL8*-Transkriptmenge nahezu vollständig den Basalgehalt. Dieses Muster deutet darauf hin, dass die *IL8*-Expression primär durch die akute Exposition beeinflusst wird und nicht langfristig aufrechterhalten bleibt.

Viele Studien beschreiben eine proinflammatorische Wirkung von NaAsO₂ in unterschiedlichen Testsystemen (Li *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2022). Die beständige Induktion inflammatorischer Gene könnte durch die persistente Aktivierung von *IL1A* und *IL1B* erklärt werden, die als primäre Stimuli an der Initiation und Aufrechterhaltung entzündlicher Prozesse involviert sind. Diese Zytokine fördern die Expression von *IL6* und *IL8* über die MAPK-Signalwege sowie die nukleäre Translokation von NF-κB (Di Paolo und Shayakhmetov, 2016). Zusätzlich werden nachgelagerte Signalkaskaden ausgelöst, wie zum Beispiel die Aktivierung von *signal transducer and activator of transcription (STAT)*-Proteinen. So

induziert IL6 die Aktivierung von STAT3, wobei die HAT p300 in diesen Prozess involviert ist (Kundu *et al.*, 2024). Für IL8 wurde bereits eine Beteiligung an der initialen Phase der akuten inflammatorischen Antwort beschrieben, was möglicherweise den beobachteten Rückgang der Transkriptmengen 48 h nach dem Stimulus bedingt (Ghasemi *et al.*, 2011). Somit führte die akute NaAsO₂-Behandlung der A549-Zellen über einen Zeitraum von 48 h zu einer beständigen proinflammatorischen Reaktion.

Die Induktion von oxidativem Stress zählt zu den am intensivsten untersuchten Arsenit-induzierten Toxizitätsmechanismen (Hu *et al.*, 2020). Innerhalb des in dieser Arbeit untersuchten mikromolaren Konzentrationsbereichs wurde eine Vielzahl der untersuchten Gene des oxidativen Stressclusters signifikant induziert oder reprimiert. Eine Auswahl der entsprechenden Gene ist in Abbildung 17 detailliert dargestellt. Anzumerken ist, dass A549-Zellen eine dauerhaft aktivierte oxidative Stressantwort besitzen, da sie konstitutiv den TF Nrf2 überexprimieren (Kweon *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008a).

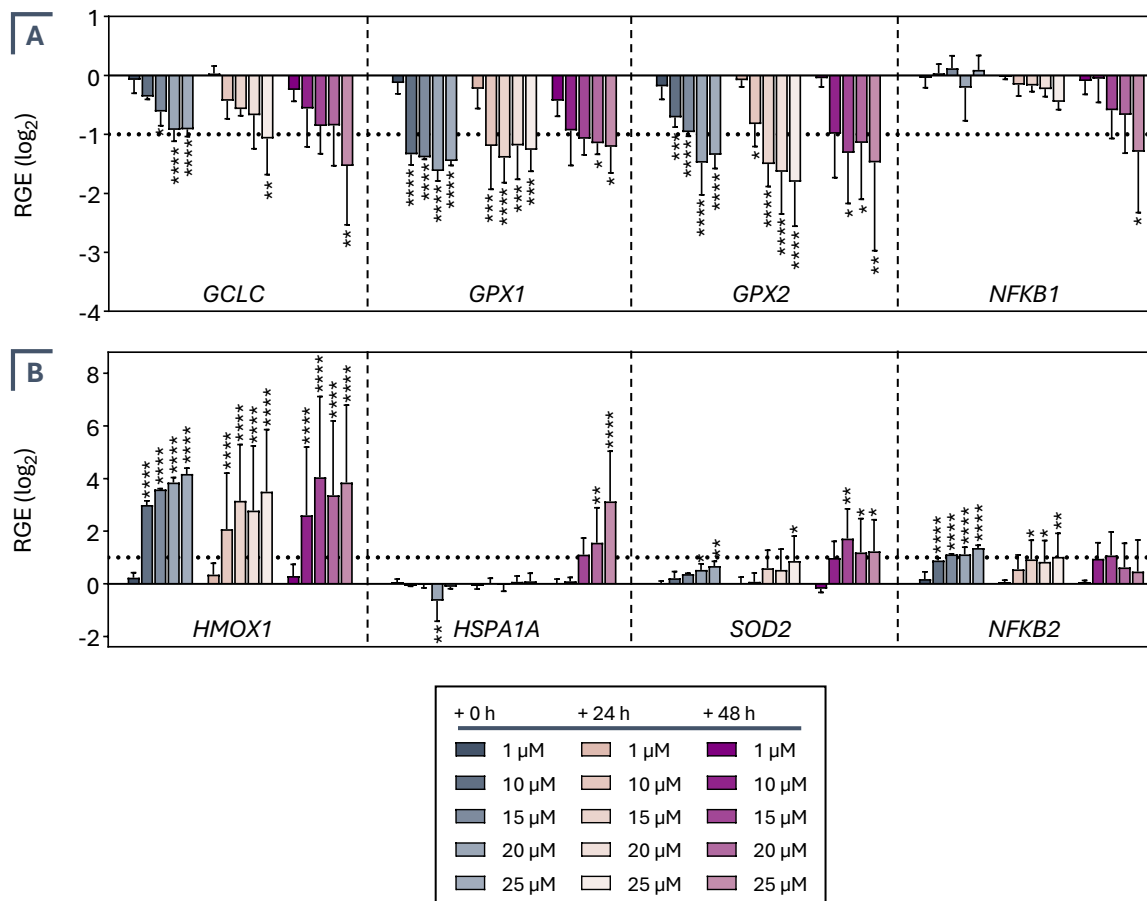


Abbildung 17 | Einfluss von Natriumarsenit auf die Expression von Genen der oxidativen Stressantwort in A549-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit Natriumarsenit behandelt und anschließend 0 h, 24 h oder 48 h einer Arsenit-freien Nachinkubation unterzogen. Abgebildet sind ausgewählte reprimierte (A) sowie induzierte (B) Gene der oxidativen Stressantwort. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die Signifikanz zwischen der Negativkontrolle und den Behandlungen wurde innerhalb einer Nachinkubationsperiode in Bezug auf alle getesteten Gene mit two-way ANOVA und Dunnett's Post-hoc-Test bestimmt: */**/****/***** (p<0,05/0,01/0,001/0,0001).

Während die Effekte auf spezifische antioxidative Gene, wie *glutamat cystein ligase catalytic subunit (GCLC)*, *GPX1*, *GPX2* und *HMOX1* über den gesamten Nachinkubationszeitraum persistierten, manifestierte sich bei Genen wie *HSPA1A*, *NFKB1* und *SOD2* eine zeitabhängige Intensivierung der entsprechenden Effekte, was auf eine dynamische Regulation der Gene hindeutet. Ab einer Dosis von 10 μM NaAsO_2 zeigte sich eine konstante Reprimierung einiger antioxidativer Gene des GSH-Redoxsystems (Abbildung 17A), welches eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der zellulären Redoxhomöostase spielt (Thompson *et al.*, 2009). Sowohl die Transkriptmengen von *GCLC* als auch die von *GPX1* und *GPX2* zeigten eine beständige Verminderung der mRNA-Gehalte um ca. 50 % bis 70 % im Vergleich zum Basalzustand. Während *GCLC* für die 73 kDa große gleichnamige katalytische Untereinheit *GCLC* der Glutamat-Cystein-Ligase codiert und essenziell für die GSH-Biosynthese ist, codieren *GPX1* und *GPX2* für die gleichnamigen Peroxidasen *GPx1* und *GPx2*, die maßgeblich an der Reduktion von H_2O_2 und Lipidperoxiden beteiligt sind und GSH als Cofaktor benötigen (Thompson *et al.*, 2009). Arsenit führte demnach zu einer konsistenten Dysregulation des GSH-abhängigen zellulären Schutzsystems. Die stärkste Induktion aller Gene wurde bei *HMOX1* beobachtet (Abbildung 17B). Ab 10 μM NaAsO_2 zeigte sich nach der Behandlung ein konzentrationsabhängiger Anstieg um das 8- bis 18-fache, der nach einer Zellregenerationszeit von bis zu 48 h mit einer etwa 6- bis 14,5-fachen Induktion weitgehend erhalten blieb.

HMOX1 codiert für *heme oxygenase 1 (HO-1)*, auch bekannt als HSP32, ein Biomarker für zellulären oxidativen Stress. Zahlreiche *in vivo*- und klinische Studien demonstrieren eine zytoprotektive Wirkung von HO-1. Unter anderem unterstützt HO-1 die Senkung des oxidativen Stresslevels und vermindert zelluläre inflammatorische Prozesse durch den Abbau von Häm (Chiang *et al.*, 2021). Da die mRNA-Gehalte von *HMOX1* im Vergleich zum Basalzustand auf einem konstant hohen Niveau persistierten, deutete dies auf eine längerfristige Veränderung des zellulären oxidativen Stresslevels durch eine akute Exposition für 24 h mit Arsenit hin. Auffällig ist, dass keine konzentrationsabhängige Veränderung der RGE unmittelbar nach der Exposition mit Arsenit bei *HSPA1A*, *SOD2* oder *NFKB1* detektiert wurde, wobei eine zusätzliche zweitägige Zellregenerationsphase zum Auftreten dosisabhängiger Effekte führte. Für *HSPA1A* wurde ausschließlich 48 h nach der Exposition ab 15 μM NaAsO_2 ein Anstieg der Transkriptmenge ermittelt, wobei bei der höchsten getesteten Konzentration von 25 μM eine etwa 9-fache Induktion detektiert wurde (Abbildung 17B). Allerdings ist anzumerken, dass unmittelbar nach der Behandlung mit 20 μM NaAsO_2 eine geringfügige, jedoch signifikante Verringerung der Transkription um 30 % beobachtet wurde. *HSPA1A* codiert für HSP72, ein stressinduzierbares Protein, welches zur 70 kDa schweren Proteinfamilie HSP70 gehört, das unter normalen Bedingungen nur niedrig exprimiert wird, jedoch durch verschiedene Stimuli potenziell induzierbar ist (Verma *et al.*, 2021). HSP70-Proteine nehmen eine zentrale Rolle in der zellulären Stressantwort ein und fördern das Überleben der Zelle durch Hemmung apoptotischer Signalwege. Darüber hinaus sichern sie das Zellüberleben indirekt, beispielsweise durch Erhöhung des GSH-Spiegels oder Proteinrückfaltung. Als molekulare Chaperone schützen HSP70-Proteine vor proteotoxischem Stress und fördern die Zellintegrität (Fulda *et al.*, 2010; Verma *et al.*, 2021). Die verzögerte Induktion von *HSPA1A* ab 15 μM NaAsO_2 deutet darauf hin, dass proteotoxische Mechanismen im gewählten Dosisbereich erst verzögert auftreten. Die Induktion von *HSP70* erfolgt in

der Regel über den TF *heat shock factor 1* (HSF1), der in seiner inaktiven Form mit HSP90 im Zytoplasma gebunden vorliegt. Bei proteotoxischem Stress binden ungefaltete Proteine an HSP90, wodurch HSF1 freigesetzt wird, sich zu einem Homotrimer formt und in den Zellkern wandert. Dort aktiviert HSF1 die Transkription von *HSP70* durch Bindung an spezifische Hitzeschock-Elemente im Promotorbereich (Fulda *et al.*, 2010). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass HSPs das Potenzial besitzen, Arsen zu binden (Huang *et al.*, 2022). Auch *SOD2* wurde mit zunehmender Regenerationszeit ab 10 μM NaAsO_2 vermehrt transkribiert, sodass zwei Tage nach Behandlungsabbruch bei 25 μM eine Erhöhung der Transkriptmenge auf mehr als das 2-fache im Vergleich zum Basalgehalt beobachtet wurde (Abbildung 17B). *SOD2* codiert für das gleichnamige mitochondriale Protein SOD2, welches als antioxidatives Enzym Superoxide in weniger toxische Produkte umwandelt, um die Zelle so vor ROS-induzierten Schäden zu schützen. Da *SOD2* analog zu *HSPA1A* zeitlich verzögert induziert wurde, deutet dies ebenfalls darauf hin, dass 48 h nach Behandlungsabbruch weiterhin vermehrt ROS gebildet werden. Insbesondere eine Überexpression von *SOD2* fördert die Tumorphysion, indem *SOD2* vermehrt H_2O_2 bildet und zur Freisetzung von Zytokinen sowie Wachstumsfaktoren beiträgt (Mayo *et al.*, 2018). Außerdem ist bekannt, dass eine Herunterregulierung von *GPX* in Kombination mit einer verstärkten Induktion von *SOD2* die Tumorphysion fördert (Miar *et al.*, 2015). Allerdings wurde eine vermehrte Zellproliferation der A549-Zelllinie nach 48 h im Rahmen der durchgeführten Zellzahlbestimmung nicht festgestellt. Auch bei *NFKB1* wurden signifikante Effekte erst 48 h nach der Exposition mit Arsenit beobachtet (Abbildung 17A). Eine Inkubation mit 25 μM NaAsO_2 führte zu einer deutlichen Reduktion der mRNA-Gehalte von *NFKB1* um etwa 60 % im Vergleich zum Basalzustand. Gleichzeitig zeigte sich für *NFKB2* eine durchgehende Induktion ab 10 μM . Die NF- κ Bs sind in diverse zellphysiologische Prozesse involviert. Als TFs beeinflussen sie die Expression zahlreicher Gene verschiedener Cluster zur Regulation der zellulären Homöostase. Neben deren Beteiligung an der inflammatorischen Antwort gelten NF- κ Bs auch als oxidative Stresssensoren, wobei sowohl anti- also auch prooxidative Eigenschaften diskutiert werden (Lingappan, 2018). In der Literatur wird ein Zusammenhang zwischen *NFKB1* und *NFKB2* sowie zwischen der transkriptionellen Regulation von *SOD2* beschrieben. Während einige Studien beide als zentrale aktivierende TFs von *SOD2* einstufen, bezeichnen andere *NFKB1* als Transkriptionsrepressor (Du *et al.*, 2013).

Insgesamt wurde in den A549-Zellen eine anhaltende oxidative Stressantwort beobachtet. Zahlreiche Studien belegen, dass Arsenit in der Lage ist, verstärkt oxidativen Stress auszulösen. Sowohl die Herunterregulierung GSH-abhängiger Enzyme als auch die Induktion oxidativer Stressmarker wie HMOX1 wurden bereits vielfach beschrieben (Flora, 2011; Hu *et al.*, 2020; Tam *et al.*, 2020). Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist allerdings die bereits erwähnte konstitutive Überexpression von Nrf2 der A549-Zelllinie zu beachten, die zur beobachteten Effektstärke beitragen kann.

Auch die transkriptionelle Aktivität zellzyklusregulierender und apoptotischer Gene wurde durch Arsenit, dosis- und zeitabhängig, verändert, wobei eine Effektverstärkung mit zunehmender Nachinkubationszeit auftrat. Abbildung 18 zeigt detailliert die Veränderungen ausgewählter Gene dieses Clusters. Für das p21-codierende Gen *CDKN1A* ließ sich unmittelbar nach der Behandlung keine signifikante Veränderung nachweisen (Abbildung 18A). Nach 24 h zeigte sich jedoch eine

konzentrationsabhängige Induktion auf etwa das 2-fache des Basalzustands, die sich nach 48 h wieder abschwächte. Im Gegensatz dazu war *CDKN1B* unmittelbar nach der Behandlung sowie 24 h später leicht reprimiert (Abbildung 18A). Nach 48 h verringerte sich der mRNA-Gehalt bei der höchsten getesteten Konzentration von 25 μM NaAsO_2 auf 30 % der Basalmenge. *E2F1* zeigte ebenfalls eine deutliche dosisabhängige Reduktion im Verlauf der Nachinkubationsphase (Abbildung 18B). Direkt nach der Behandlung betrug die Transkriptmenge bei 25 μM etwa 70 % des Basalgehalts. Nach einer Regenerationszeit von 24 h verringerte sich diese weiter auf etwa 40 %, während nach 48 h nur noch 20 % des Basalgehalts gemessen wurden. Im Gegensatz dazu zeigten die Protoonkogene *JUN* und *MYC* unmittelbar nach der Behandlung sowie nach 24 h kaum Veränderungen. Während *JUN* eine leichte Induktion aufwies, wurde nach 48 h ab 15 μM NaAsO_2 eine konzentrationsabhängige Reduktion des mRNA-Gehalts beobachtet. Bei 25 μM lag die RGE von *JUN* und *MYC* nach 48 h unter 40 % des Basalzustands. In der Literatur ist die akute Beeinflussung von Arsenit auf die Zellzyklusregulation und Apoptose vielfach beschrieben (Jiang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2021). Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass in der A549-Zelllinie ab 25 μM verzögert zellzyklushemmende Faktoren auftreten können, die zum Zeitpunkt der Untersuchungen auf transkriptioneller Ebene möglicherweise noch nicht nachweisbar waren.

Als weiterer Toxizitätsmechanismus von Arsenit wird auch eine Beeinträchtigung der DNA-Reparatur und -Schadensantwort beschrieben. In Abbildung 19 sind die ermittelten Transkriptionsveränderungen ausgewählter Gene des zugehörigen Genclusters dargestellt.

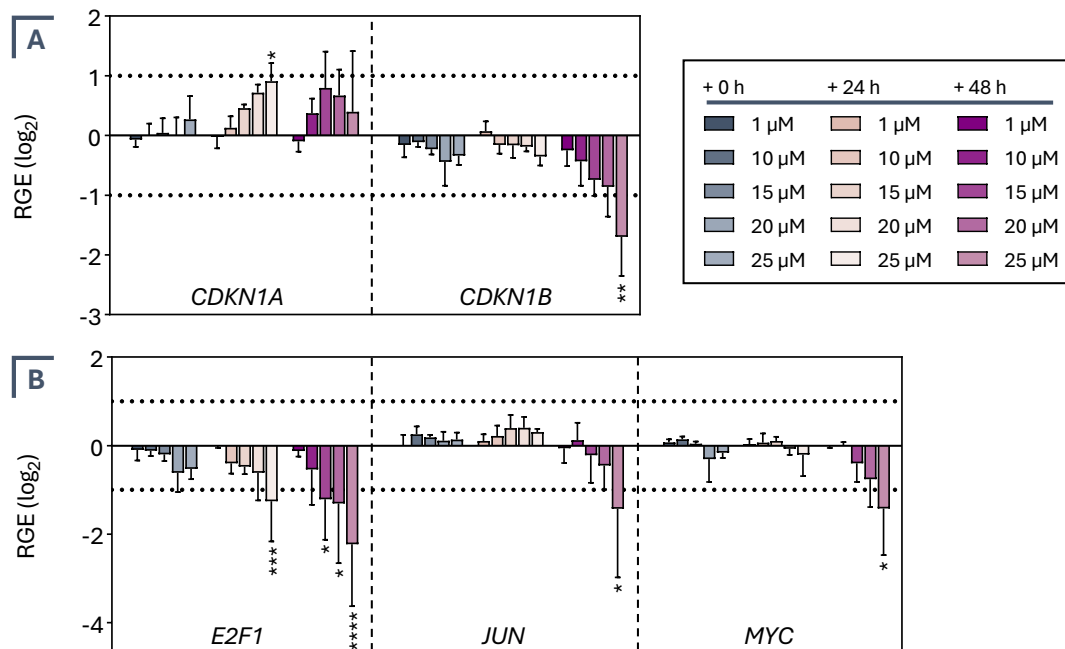


Abbildung 18 | Einfluss von Natriumarsenit auf die Expression von Genen der Zellzyklusregulation und apoptotischer Vorgänge in A549-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit Natriumarsenit behandelt und anschließend 0 h, 24 h oder 48 h einer Arsenit-freien Nachinkubation unterzogen. Abgebildet sind sowohl die Zellzyklusinhibitoren *CDKN1A* und *CDKN1B* (A) als auch ausgewählte Transkriptionsfaktoren der Zellzyklusprogression bzw. Zellproliferation (B). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die Signifikanz zwischen der Negativkontrolle und den Behandlungen wurde innerhalb einer Nachinkubationsperiode in Bezug auf alle getesteten Gene mit *two-way* ANOVA und Dunnett's Post-hoc-Test ermittelt: */**/***/**** (p<0,05/0,01/0,001/0,0001).

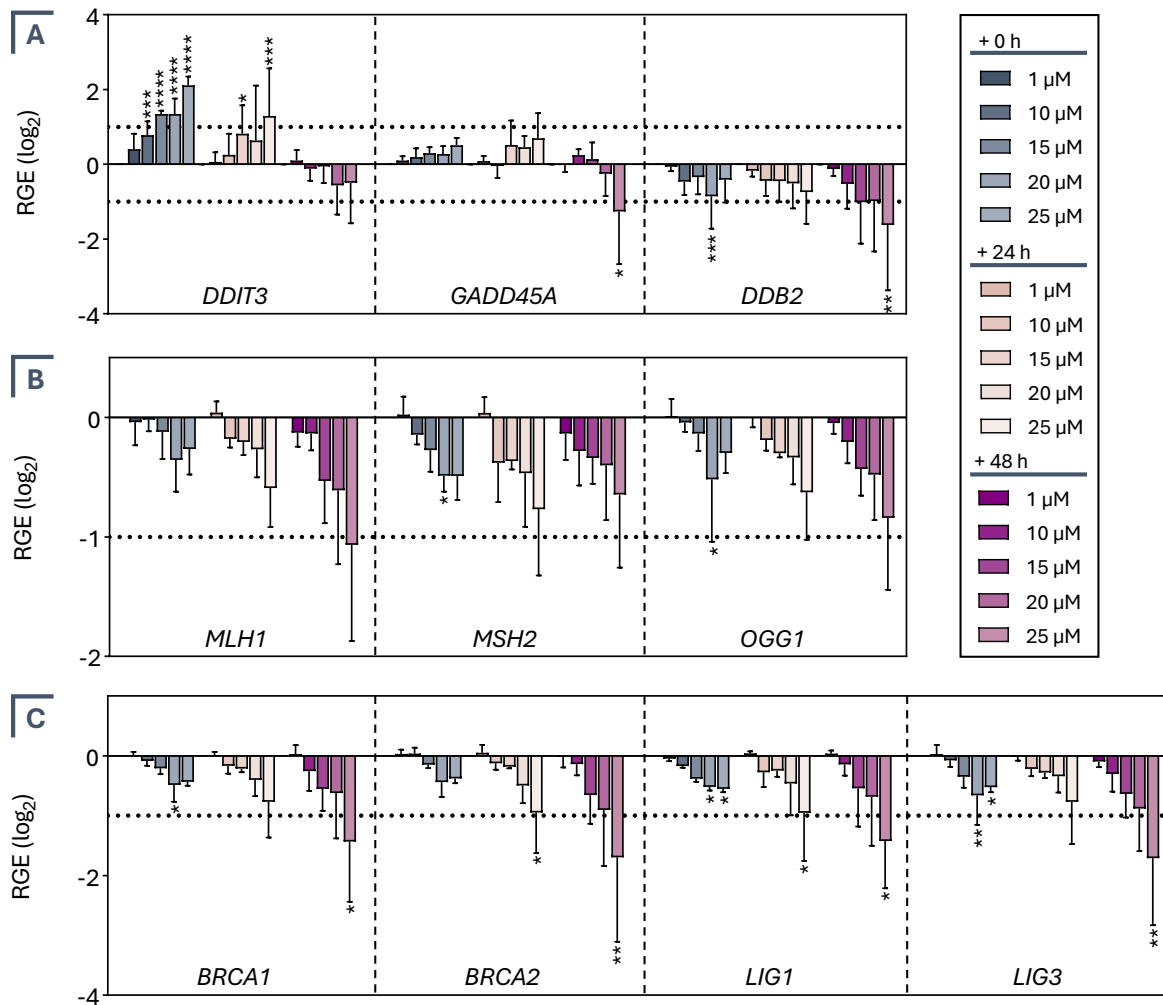


Abbildung 19 | Einfluss von Natriumarsenit auf die Expression von Genen der DNA-Reparatur und DNA-Schadensantwort in A549-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit Natriumarsenit behandelt und anschließend 0 h, 24 h oder 48 h einer Arsenit-freien Nachinkubation unterzogen. Abgebildet sind Gene, die an der DNA-Schadenssignalisierung beteiligt sind (A), sowie Gene, die für DNA-Reparaturproteine codieren (B/C). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die Signifikanz zwischen der Negativkontrolle und den Behandlungen wurde innerhalb einer Nachinkubationsperiode in Bezug auf alle getesteten Gene mit two-way ANOVA und Dunnett's Post-hoc-Test ermittelt: */**/***/**** (p<0,05/0,01/0,001/0,0001).

Die Genexpressionsprofile deuten darauf hin, dass die Zellen nach einer akuten Exposition mit Arsenit vermehrt DNA-Schäden ausgesetzt sind. Dies wurde insbesondere durch die erhöhte Expression von *DNA damage-inducible transcript 3 (DDIT3)* verdeutlicht, der als sensibler Marker für DNA-Schädigung und zellulären Stress gilt (Jauhiainen *et al.*, 2012). Bei *DDIT3* wurde eine signifikante, sukzessive Induktion beobachtet, die bei 25 μM eine 4-fache Erhöhung der Transkriptmenge im Vergleich zum Basalzustand erreichte. Der induzierende Trend war bereits ab 1 μM erkennbar (Abbildung 19A). Nach 24 h nahm der erhöhte mRNA-Gehalt jedoch ab, sodass bei 25 μM nur noch eine 2,5-fache Induktion detektiert wurde. Nach 48 h normalisierte sich die Transkription von *DDIT3* im Niedrigdosisbereich wieder, während bei höheren Konzentrationen ein repressiver Trend auftrat. Im Vergleich zeigte *growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (GADD45A)*, der als DNA-Schadenssensor gilt (Sánchez *et al.*, 2010), nur eine marginale Transkriptionserhöhung. Bemerkenswert ist, dass bei 25 μM NaAsO₂ nach 48 h eine Repression auf etwa 40 % der

ursprünglichen Transkriptmenge nachgewiesen wurde (Abbildung 19A). Diese Beobachtungen suggerieren, dass die Arsenitbehandlung DNA-Schäden induziert und diese entweder bereits repariert sind oder nicht weiter repariert werden. Demgegenüber steht die konsequente Herunterregulierung zahlreicher Gene, die für DNA-Reparaturfaktoren unterschiedlicher Reparaturmechanismen codieren, darunter *DDB2* der NER, *MLH1* und *MSH2* der MMR, *OGG1* und die *Ligasen 1* und *3* (*LIG1/3*) der BER sowie *breast cancer type 1 susceptibility protein isoform 1* und *2* (*BRCA1/2*) der homologen Rekombination (HR). Die beobachteten repressiven Effekte intensivierten sich mit zunehmender Nachinkubationszeit mit Ausnahme von *MSH2*, bei dem die Repression konsistent erhalten blieb (Abbildung 19B/C). Bei allen weiteren gezeigten Genen verringerte sich die Transkriptionsrate bei der höchsten Dosis von 25 μM um mindestens die Hälfte im Vergleich zum Basalzustand mit verlängerter Nachinkubationszeit, mit Ausnahme von *OGG1*. Besonders auffällig war die signifikante Repression von *BRCA1* und *DDB2*, die essenziell für die Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden sind. Die gleichzeitige Herunterregulierung beider Gene könnte damit zusammenhängen, dass *DDB2* unter anderem für die transkriptionelle Induktion von *BRCA1* verantwortlich ist (Takimoto *et al.*, 2002). Entsprechend könnte eine verminderte Genexpression von *DDB2* auch zu einem verminderten Vorkommen von *BRCA1*-Transkripten führen. Übereinstimmend mit der Literatur zeigen die Ergebnisse zunächst eine Induktion von DNA-Schäden unmittelbar nach der Arsenitbehandlung (Schwerdtle *et al.*, 2003b; Andrew *et al.*, 2006) sowie eine Repression zahlreicher DNA-Reparaturfaktoren (Matthäus *et al.*, 2023), wobei mit zunehmender Nachinkubationszeit fraglich ist, ob die Zellen die DNA-Schäden bereits repariert haben oder ob die Zellen die Reparatur einstellen. DNA-Reparaturprozesse benötigen in Abhängigkeit von der auftretenden DNA-Läsion häufig wenige Stunden bis zu einem Tag, um die DNA-Integrität wiederherzustellen, wobei im Fall von Arsenit eine durchgängige Herunterregulation zahlreicher DNA-Reparaturgene beobachtet wurde (Donnio und Giglia-Mari, 2025). Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die DNA-Reparaturkapazität der A549-Zellen nach der akuten Arsenitexposition und der 48-stündigen Nachinkubationsphase möglicherweise weiterhin eingeschränkt ist, was zu einer Persistenz von DNA-Schäden und einer anhaltenden verminderten DNA-Reparaturkapazität der Zellen führen könnte. An dieser Stelle ist anzumerken, dass die Tumorzelllinie A549 im Gegensatz zu einigen anderen Krebszelllinien eine p53-profiziente Wildtyp DNA-Schadensantwort besitzt, was auf eine intakte Schadenssignalkaskade der Zellen schließen lässt (Lehman *et al.*, 1991).

Im funktionellen Cluster der epigenetischen Regulation wurde fast ausschließlich eine konzentrationsabhängige Repression der untersuchten Gene beobachtet, wobei die Effektstärke meist gering ausfiel. Für einige Gene wurde analog zu den DNA-Reparaturgenen eine dosisabhängige Intensivierung der Effekte mit zunehmender Nachinkubationszeit ermittelt. In Abbildung 20 sind die RGE-Werte ausgewählter epigenetischer Gene dargestellt. Unter anderem wurden die für die DNA-Methylierung relevanten Gene *DNMT1*, *DNMT3a* und *DNMT3b* durch Arsenit beeinflusst. Während *DNMT1* und *DNMT3a* mit zunehmender Nachinkubationszeit sukzessive herunterreguliert wurden, zeigte sich bei *DNMT3b* nach 48 h ab einer Konzentration von 15 μM keine Reduktion mehr.

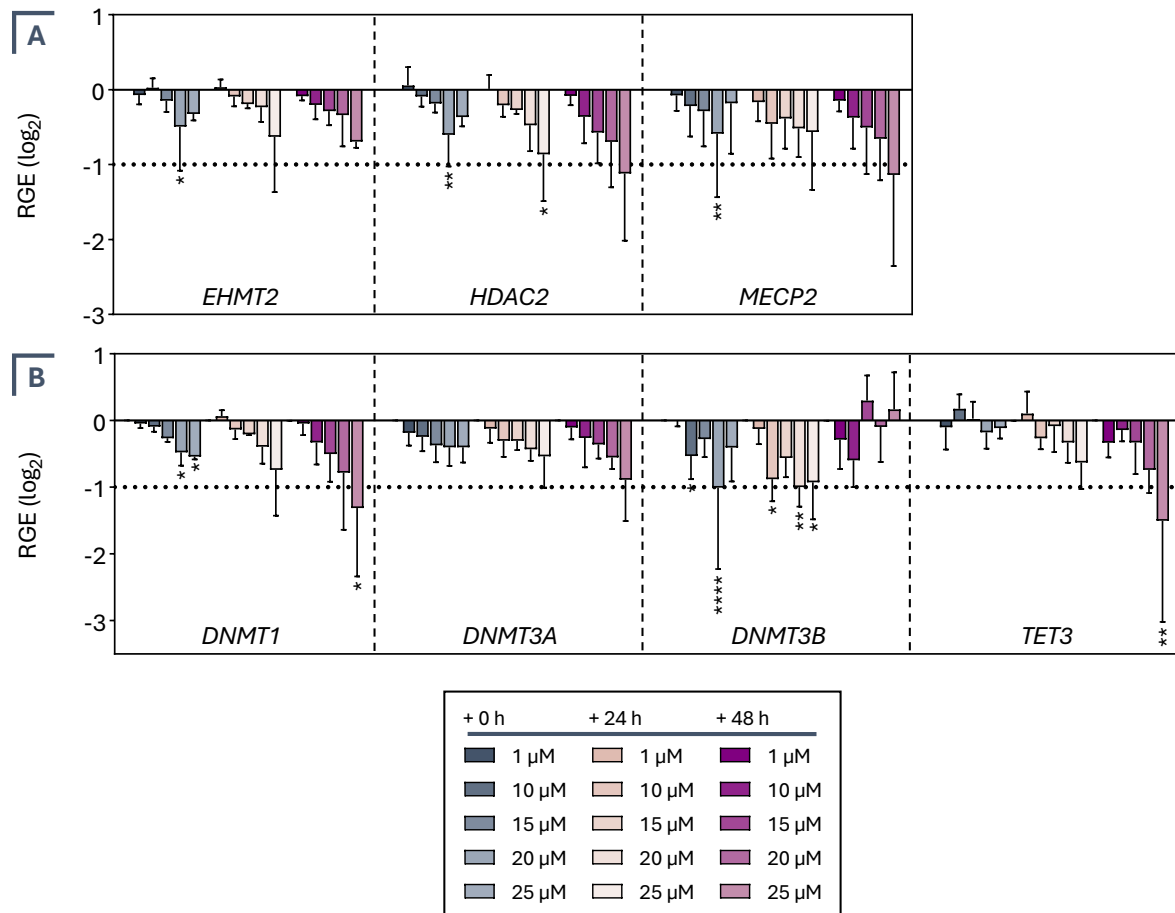


Abbildung 20 | Einfluss von Natriumarsenit auf die Expression von Genen der epigenetischen Regulation in A549-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit Natriumarsenit behandelt und anschließend 0 h, 24 h oder 48 h einer Arsenit-freien Nachinkubation unterzogen. Abgebildet sind Gene der posttranslationalen Histonmodifikation und ein DNA-methylierungsspezifischer Marker (A) sowie Gene, die am Prozess der DNA-Methylierung beteiligt sind (B). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die Signifikanz zwischen der Negativkontrolle und den Behandlungen wurde innerhalb einer Nachinkubationsperiode in Bezug auf alle getesteten Gene mit two-way ANOVA und Dunnett's Post-hoc-Test ermittelt: */**/****/***** ($p < 0,05/0,01/0,001/0,0001$).

Gleichzeitig wiesen auch die TET-Demethylasen einen repressiven Trend auf. Im Fall von *TET3* verstärkte sich die Abnahme mit voranschreitender Nachinkubationszeit bei der höchsten Konzentration von 25 µM auf etwa 35 % des Basalgehalts. Auch bei dem an der Histondeacetylierung beteiligten Gen *HDAC2* wurde eine konzentrationsabhängige Verminderung des mRNA-Gehalts detektiert, welche mit zunehmender Nachinkubationszeit ebenso einen Trend zur Effektverstärkung aufzeigte. Während unmittelbar nach der Behandlung nur eine leichte Repression von *HDAC2* zu erkennen war, sank der mRNA-Gehalt bei der höchsten Konzentration nach 24 h und 48 h auf weniger als 50 % des Basalgehalts. Eine konzentrationsabhängige Reprimierung wurde zudem für die HMT *euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2 (EHMT2)* sowie das methylspezifische Bindungsprotein *methyl-CpG binding protein 2 (MECP2)* detektiert.

Für die meisten dieser Gene wurde in der Literatur schon eine Arsenit-vermittelte Dysregulation beschrieben. Dokumentiert sind Effekte von Arsenit auf alle *DNMTs* sowie *TET2*, *HDAC2* und *MECP2*, wobei diese Studien auch belegen, dass vermutlich zelllinienspezifische Effekte auftreten (Pournara

et al., 2016; Rea *et al.*, 2017; Du *et al.*, 2018; Stöber *et al.*, 2023; Peng *et al.*, 2024). Dementsprechend stimmen die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit für diese epigenetischen Regulatoren mit der Literatur überein. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine geringfügige Verminderung von *EHMT2*, wobei eine andere Studie von einer Arsenit-vermittelten Induktion von *EHMT2* berichtet (Zhou *et al.*, 2008). In dieser Arbeit führte eine einmalige akute Arsenitexposition zu persistierenden Veränderungen in der Expression verschiedener epigenetischer Regulatoren. Diese Tatsache deutet eventuell darauf hin, dass zugrunde liegende epigenetische hPTM-Veränderungen nicht nur unmittelbar nach der Behandlung, sondern potenziell auch zu späteren Zeitpunkten intrazellulär auftreten.

Die Genexpressionsstudie demonstriert, dass eine akute niedrigmikromolare Exposition von A549-Zellen mit NaAsO₂ zu einer beständigen Induktion der oxidativen sowie inflammatorischen Stressantwort führt, wobei anzumerken ist, dass die Effektstärke mit zunehmender Nachinkubationszeit meist leicht abnahm. Initial wurde eine potenzielle Induktion von DNA-Schäden beobachtet, wobei gleichzeitig alle untersuchten DNA-Reparaturgene beständig reprimiert wurden. Sowohl die mRNA-Gehalte der DNA-Reparaturgene als auch der epigenetischen Regulation wurden persistent herunterreguliert, was die potenzielle Annahme einer längerfristigen Arsenit-induzierten Dysregulation der entsprechenden Signalwege und möglicherweise die Ausbildung eines zellulären (epigenetischen) Gedächtnis unterstreicht. Auf der Grundlage aller im ersten Teil durchgeführten Analysen wurde der Konzentrationsbereich für die nachfolgenden epigenetischen Analysen festgelegt. Von Bedeutung war in diesem Zusammenhang, dass die Überlebensfähigkeit der Zellen im ausgewählten Konzentrationsbereich erhalten bleibt, um möglicherweise dynamische zelluläre Erholungsprozesse zu erfassen (Donnio und Giglia-Mari, 2025). Da die Genexpressionsstudie bei 25 µM die stärksten Effekte aufwies und hier eine eventuelle Beeinflussung der Zellzyklusregulation sowie vermehrte apoptotische Prozesse nicht ausgeschlossen werden konnten, wurde als höchste Konzentration 20 µM NaAsO₂ zur zellulären Exposition ausgewählt.

5.2 ARSEMIT-INDUZIERTE EPIGENETISCHE VERÄNDERUNGEN: MODIFIKATION VON HISTON H3

Der Fokus der folgenden Analysen lag auf der Untersuchung des zellulären Einflusses einer akuten Arsenitexposition auf die Acetylierungs- und Methylierungsmuster von Histon H3 sowie der Persistenz dieser Effekte. Da die transkriptionelle Repression von DNA-Reparaturfaktoren eine zentrale Rolle in der Arsenit-induzierten Kanzerogenese spielt, wurden zunächst gezielte, genspezifische Analysen von hPTMs ausgewählter DNA-Reparaturgene mittels ChIP-qPCR durchgeführt. Ergänzend erfolgte die Analyse des globalen Vorkommens der ausgewählten hPTMs mittels *Western Blot*, um die gewonnenen genspezifischen Erkenntnisse mit der genomweiten Ebene zu vergleichen. Zusätzlich wurde dieser zielgerichtete Ansatz durch eine systematische Analyse der globalen Histonpeptidlandschaft mittels LC-MS/MS von akut mit Arsenit exponierten Zellen komplementiert, um potenziell weitere Arsenit-sensitive hPTM-Muster zu identifizieren.

5.2.1 Genspezifische Veränderungen von ausgewählten H3-Modifikationen in DNA-Reparaturgenen durch Arsenit

Die Untersuchungen zielten darauf ab, zu klären, ob die beobachteten Genrepressionen durch Veränderungen des hPTM-Status in den entsprechenden Promotorregionen verursacht werden. Hierfür wurden sowohl transkriptionsaktivierende Modifikationen (H3K4me3, H3K18ac, H3K9ac) als auch die repressive Chromatinmodifikation H3K27me3 analysiert, um ein breites Spektrum genregulatorischer Einflüsse zu berücksichtigen. Die Dysregulation dieser hPTMs wurde schon in mehreren *in vitro*- und *in vivo*-Studien mit einer Arsenitexposition in Verbindung gebracht (Zhou *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2021; Ma *et al.*, 2023). Insgesamt basiert die Analyse auf vorherigen Studien, in denen einzelne Gene eines DNA-Reparaturweges sowie individuelle hPTMs nach akuter Arsenitexposition in humanen Keratinozyten untersucht wurden (Zhang *et al.*, 2020; Ding *et al.*, 2021). Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Arbeit multiple hPTMs in den Promotorregionen (± 500 bp um die TSS) verschiedener DNA-Reparaturgene analysiert. Untersucht wurden die Gene *MPG* und *XRCC1* (BER), *MLH1* und *MSH2* (MMR), sowie *XPA* und *XPC* (NER), ergänzt durch Positiv- und Negativkontrollsequenzen. In früheren Studien wurde eine spezifische transkriptionelle Repression dieser Gene durch Arsenit bereits nachgewiesen (Holcomb *et al.*, 2017; Bhattacharjee *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020; Ding *et al.*, 2021). Die Protein-DNA-Interaktion wurde in der vorliegenden Arbeit mittels ChIP-qPCR analysiert, wobei zur Normalisierung die *Percent Input*-Methode angewendet wurde. Der Anteil der DNA, der einer bestimmten Zielregion zugeordnet werden kann, wird nach der Immunpräzipitation mit einem spezifischen AK relativ zum entsprechenden Anteil im Ausgangs-DNA-Gehalt (Input) angegeben und als „% des Inputs“ ausgedrückt (Solomon *et al.*, 2021). Zunächst werden die Ergebnisse für die untersuchten Histonmethylierungsmuster H3K4me3 und H3K27me3 beschrieben.

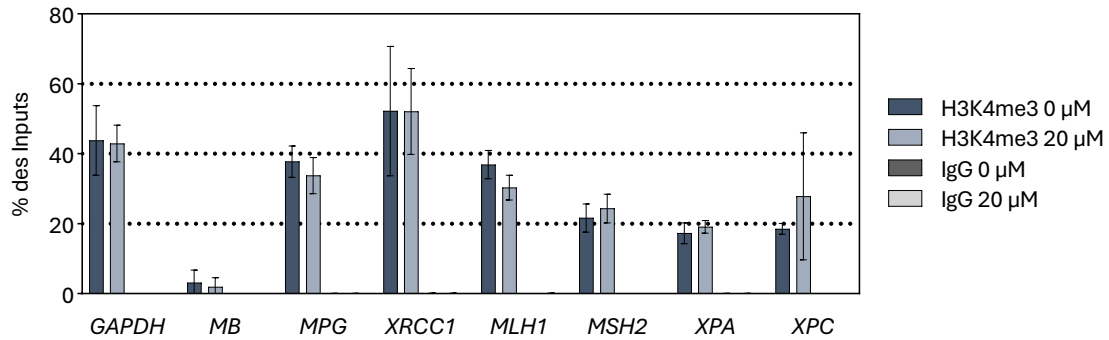


Abbildung 21 | Vorkommen von H3K4me3 in ausgewählten DNA-Reparaturgenen von A549-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit 20 μM Natriumarsenit exponiert. Dargestellt sind die ChIP-qPCR-Resultate für die Histonmodifikation H3K4me3. *GAPDH* diente hierbei als Positivkontrollsequenz, *MB* als Negativkontrollsequenz. Zusätzlich wurde ein IgG Isotyp Kontrollantikörper verwendet, um den unspezifischen Hintergrund zu erfassen. Die zugehörigen ChIP-Kontrollanreicherungen von Histon H3 am Positivkontrolllocus *RPL30* können dem Anhang A.2.5 entnommen werden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Experimenten in Einfachbestimmung. Die statistische Signifikanz der Anreicherungs-niveaus der behandelten Zellen zu den Negativkontrollen wurde mittels Welch-Test ermittelt.

Die Modifikation H3K4me3 reichert sich verstärkt, bevorzugt *upstream* der TSS, in der Promotorregion aktiver Gene an. Zusammen mit H3K4me2 ist diese hPTM typischerweise in einem Bereich von 1-2 kb um die TSS vorzufinden. Ein erhöhtes Vorkommen von H3K4me3 und H3K4me2 sowie von H3K27ac führt zur Ausbildung spezifischer Chromatindomänen, die mit einer verstärkten Zugänglichkeit für die Transkriptionsmaschinerie und regulatorische Chromatinfaktoren assoziiert werden. H3K4me3 wird daher als eine transkriptionsfördernde Modifikation angesehen. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass H3K4me3 von spezifischen *Readern*, einschließlich des TF TFIID, erkannt wird. Diese Interaktion fördert insbesondere die p53-abhängige Transkription durch die Bildung des Präinitiationskomplexes (Kent *et al.*, 2023). In Abbildung 21 ist das ermittelte Vorkommen von H3K4me3 in der A549-Zelllinie nach Behandlung mit NaAsO_2 in den ausgewählten DNA-Loci dargestellt.

Im Allgemeinen wiesen die A549-Zellen in allen analysierten DNA-Reparaturgenen ein hohes Vorkommen an H3K4me3 auf. Im Vergleich zum Negativkontrolllocus *Myoglobin (MB)* zeigte sich eine mehr als 5-fache Erhöhung der H3K4me3-Signalintensitäten in allen analysierten Genloci. Das höchste basale Vorkommen von H3K4me3 wurde im Promotor von *XRCC1* mit ca. 50 % des Inputs verzeichnet. Im Vergleich zeigten die untersuchten Loci von *MPG*, *MLH1* und *MSH2* ein basales Vorkommen von etwa 38 %, 37 % und 22 % des Inputs. Für die beiden NER-Gene *XPA* und *XPC* wurden mit ca. 17 % und 19 % des Inputs das niedrigste Vorkommen von H3K4me3 ermittelt. Eine Behandlung der Zellen für 24 h mit 20 μM NaAsO_2 führte zu keinen signifikanten Veränderungen. Stattdessen wurde ein annähernd konstantes Vorkommen dieser hPTM beobachtet. Da bei einer Konzentration von 20 μM NaAsO_2 keine Dysregulation von H3K4me3 auftrat, wurden weder weiterführende Analysen bei niedrigeren Konzentrationen noch Nachinkubationsexperimente für diese hPTM durchgeführt.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die analysierten Gene in der A549-Zelllinie grundsätzlich aktiv sind und dass der H3K4me3-Status in diesen Zellen unter den gegebenen Bedingungen durch eine Arsenitexposition in den ausgewählten DNA-Loci nicht verändert wird.

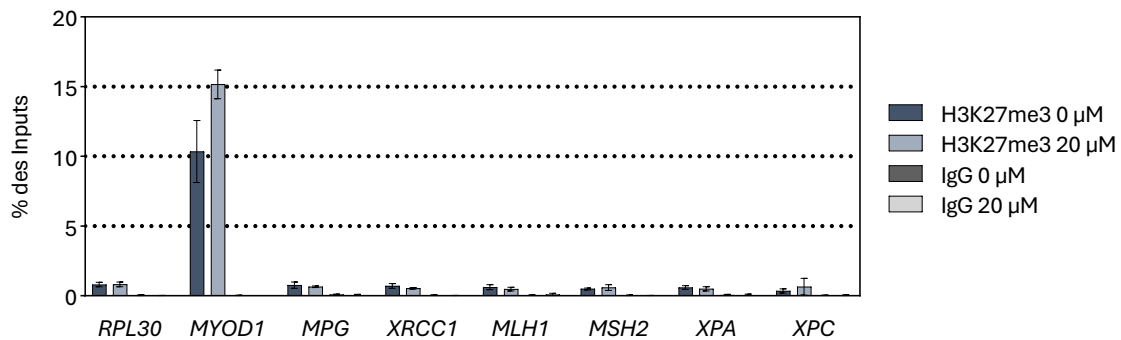


Abbildung 22 | Vorkommen von H3K27me3 in ausgewählten DNA-Reparaturgenen von A549-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit 20 μM Natriumarsenit exponiert. Dargestellt sind die ChIP-qPCR-Resultate für die Histonmodifikation H3K27me3. *MYOD1* diente hierbei als Positivkontrollsequenz, *RPL30* als Negativkontrollsequenz. Zusätzlich wurde ein IgG Isotyp Kontrollantikörper verwendet, um den unspezifischen Hintergrund zu erfassen. Die zugehörigen ChIP-Kontrollanreicherungen von Histon H3 am Positivkontrolllocus *RPL30* können dem Anhang A.2.5 entnommen werden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten in Einfachbestimmung. Die statistische Signifikanz der Anreicherungs-niveaus der behandelten Zellen zu den Negativkontrollen wurde mittels Welch-Test ermittelt.

Als weitere Methylierungsmarkierung wurde H3K27me3 untersucht. Das Vorkommen dieser hPTM ist in der Regel mit einer Repression der Transkription und damit einhergehender Genstilllegung assoziiert. Vor allem fakultative Heterochromatinregionen weisen eine hohe Akkumulation von H3K27me3 auf (Saksouk *et al.*, 2015). Genomweite *in vitro*-Lokalisationsstudien belegen, dass H3K27me3 nur marginal in aktiven Promotorregionen vorzufinden ist. Vor allem das simultane Auftreten mehrerer aktivierender Modifikationen, darunter H3K4me3, H3K18ac und H3K9ac, schließt das gleichzeitige Vorkommen von H3K27me3 in den entsprechenden Promotorregionen nahezu aus (Wang *et al.*, 2008b). Mechanistisch wurde bereits gezeigt, dass die Erkennung von H3K27me3 durch spezifische Chromatinfaktoren erfolgt. Dazu gehört der *polycomb repressive complex 1* (PRC1), der die Monoubiquitinierung von H2AK119 fördert und zu einer Chromatinkompaktierung führt, die wesentlich zur transkriptionellen Repression beiträgt (Wiles und Selker, 2017). Darüber hinaus könnte die Trimethylierung durch sterische Hinderung die Anlagerung weiterer Proteine verhindern (Margueron und Reinberg, 2011). Das ermittelte Vorkommen von H3K27me3 in den ausgewählten Loci der DNA-Reparaturgene ist der Abbildung 22 zu entnehmen.

Insgesamt zeigte sich eine sehr geringe Anreicherung dieser Chromatinmodifikation in den analysierten Promotorregionen. Das basale Vorkommen von H3K27me3 in der A549-Zelllinie lag bei allen ausgewählten DNA-Loci unter 1% des Inputs und entsprach somit dem Vorkommen am Negativkontrolllocus *60s ribosomal protein L30* (*RPL30*). Eine Behandlung der Zellen mit 20 μM NaAsO₂ veränderte das H3K27me3-Vorkommen nicht. Daher wurden weder weitere Experimente mit geringeren NaAsO₂-Konzentrationen noch Nachinkubationsversuche durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die untersuchten DNA-Reparaturgene in der A549-Zelllinie aktiv transkribiert werden und Arsenit keinen Einfluss auf das Vorkommen von H3K27me3 in den Promotorregionen der untersuchten DNA-Reparaturgene nimmt.

Neben den beiden Histonmethylierungsmustern H3K4me3 und H3K27me3 wurde auch das Vorkommen ausgewählter Histonacetylierungen, darunter die hPTM H3K18ac, genauer untersucht.

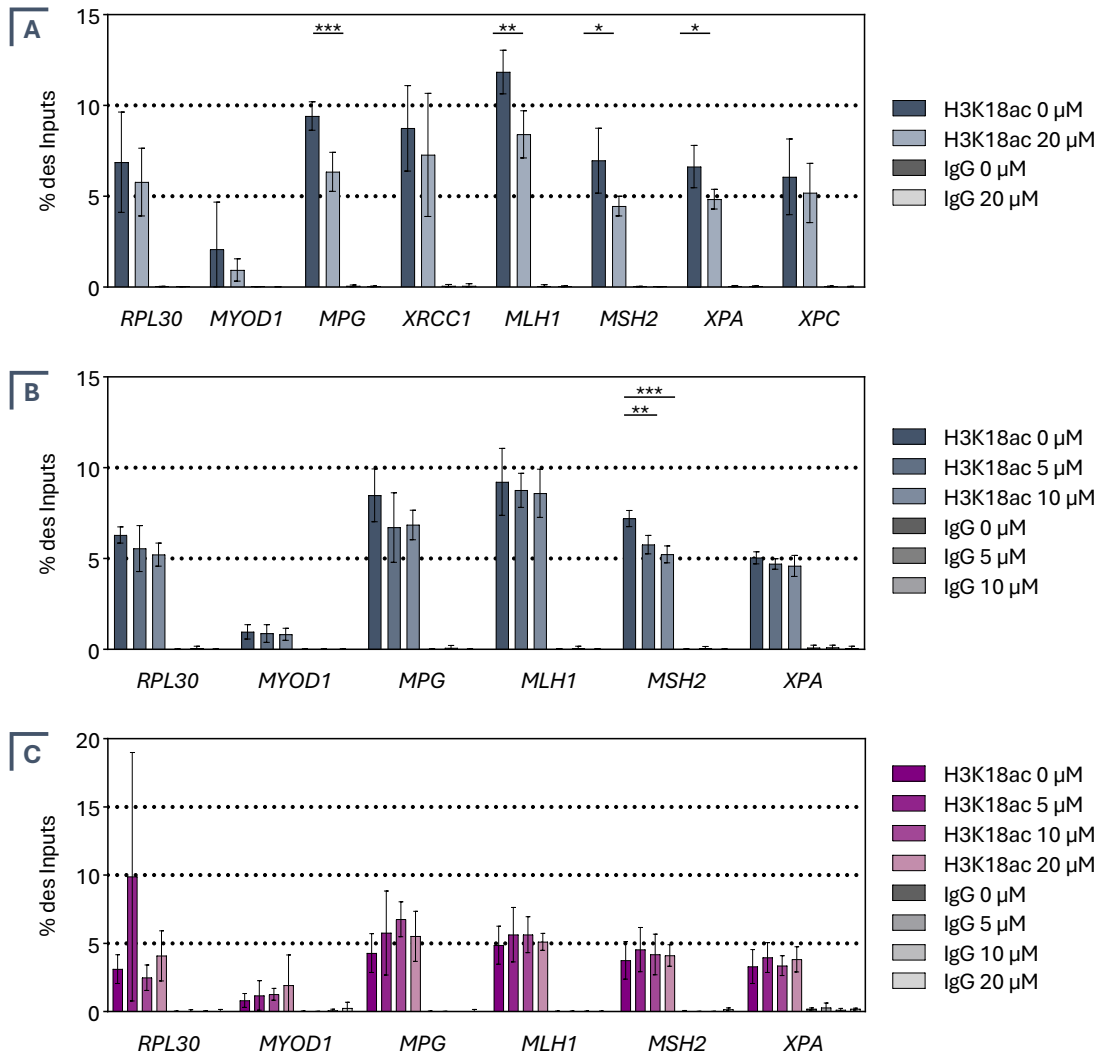


Abbildung 23 | Vorkommen von H3K18ac in ausgewählten DNA-Reparaturgenen von A549-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit 20 µM Natriumarsenit exponiert und entweder nicht (A/B) oder 48 h nachinkubiert (C). Dargestellt sind die ChIP-qPCR-Ergebnisse für die Histonmodifikation H3K18ac. *MYOD1* diente hierbei als Negativkontrollsequenz, *RPL30* als Positivkontrollsequenz. Zusätzlich wurde ein IgG Isotyp Kontrollantikörper verwendet, um den unspezifischen Hintergrund zu erfassen. Die zugehörigen ChIP-Kontrollanreicherungen von Histon H3 am Positivkontrolllocus *RPL30* können dem Anhang A.2.5 entnommen werden. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Einfachbestimmung. Die statistische Signifikanz der Anreicherungs-niveaus der behandelten Zellen zu den Negativkontrollen wurde mittels Welch-Test ermittelt: */**/**** (p < 0,005/0,01/0,001).

Die Histonacetylierung wird allgemein als eine transkriptionsfördernde Chromatinmarkierung angesehen, da sie die Zugänglichkeit der umgebenden DNA durch eine Reduktion der Nukleosomendichte erhöht. Mechanistisch wird dies auf verminderte elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Histonen und der DNA zurückgeführt (Verdin und Ott, 2015; Millán-Zambrano *et al.*, 2022). Genomweite Lokalisationsstudien von H3K18ac zeigen, dass diese hPTM überwiegend in der Nähe der TSS aktiver Gene vorzufinden ist und somit hauptsächlich im Promotor aktiv transkribierter Gene auftritt (Wang *et al.*, 2008b). Abbildung 23 zeigt das Vorkommen der hPTM H3K18ac in den ausgewählten Promotor-Loci bei unterschiedlichen Konzentrationen mit und ohne Nachinkubation, wobei in Abbildung 23A das Vorkommen von H3K18ac in den Promotorregionen mit 20 µM NaAsO₂ behandelter A549-Zellen ohne Nachinkubation dargestellt ist. Im Basalzustand zeigte

die Zelllinie in allen DNA-Reparaturloci eine signifikante Anreicherung von H3K18ac, dessen Vorkommen mindestens dem 3-fachen des Negativkontrolllocus *myogenic differentiation 1 (MYOD1)* entsprach. Das höchste Vorkommen von H3K18ac wurde für *MLH1* mit etwa 12 % des Inputs ermittelt, während alle anderen DNA-Reparaturgene mindestens eine Anreicherung von 6 % des Inputs aufwiesen. Nach der Behandlung mit Arsenit wurde eine signifikante Hypoacetylierung von H3K18 bei *MPG*, *MLH1*, *MSH2* und *XPA* nachgewiesen. Bei *MPG* reduzierte sich das Vorkommen um 32,6 %. Bei *MLH1* und *MSH2* sank der Anteil um 29,0 % bzw. 35,9 %. Bei *XPA* wurde eine Reduktion um 27,1 % ermittelt. Aufgrund der detektierten Hypoacetylierung bei einer akuten Exposition mit 20 μM NaAsO_2 wurden weiterführende Analysen der signifikant veränderten DNA-Loci (*MPG*, *MLH1*, *MSH2*, *XPA*) durchgeführt. Dazu wurden die A549-Zellen mit Konzentrationen < 20 μM behandelt und erneut das H3K18ac-Vorkommen ermittelt. In Abbildung 23B sind die Ergebnisse für die akut mit 5 μM und 10 μM Arsenit behandelten Zellen dargestellt. Ausschließlich bei *MSH2* konnte für H3K18 eine konzentrationsabhängige, statistisch signifikante Hypoacetylierung nachgewiesen werden. Das Vorkommen von H3K18ac sank bei 5 μM NaAsO_2 um 20,0 % und bei 10 μM um 27,5 %. In Anbetracht des verringerten Vorkommens von H3K18ac nach akuter Arsenitexposition wurde anschließend die Persistenz dieser Effekte untersucht. Hierfür wurden die A549-Zellen mit 5 μM bis 20 μM NaAsO_2 behandelt und darauffolgend einer zweitägigen Regenerationsphase ohne Arsenit unterzogen. Abbildung 23C zeigt das ermittelte Vorkommen von H3K18ac nach der Regenerationszeit. Die Nachinkubationsversuche ergaben 48 h nach der Exposition keine signifikanten Unterschiede im Vorkommen von H3K18ac zwischen behandelten und unbehandelten Zellen. Bei der nachgewiesenen Hypoacetylierung handelt es sich daher vermutlich um ein transientes Phänomen ohne anhaltende Wirkung.

Die Analysenergebnisse zeigen, dass eine gezielte Hypoacetylierung von H3K18 in den Promotoren von *MPG*, *MLH1*, *MSH2* und *XPA* ausschließlich unmittelbar nach der Arsenitbehandlung der A549-Zellen auftrat. Während für *XPA* bereits eine verminderte Anreicherung von H3K18ac in der Promotorregion von akut mit NaAsO_2 behandelten HaCaT-Zellen nachgewiesen werden konnte (Zhang *et al.*, 2020), liegen für H3K18ac und *MPG* bzw. die beiden MMR-Gene *MLH1* und *MSH2* bisher keine Literaturdaten vor. *In vitro*-Studien deuten jedoch darauf hin, dass ein genspezifischer Verlust von H3K18ac mit onkogenem Zellwachstum korrelieren kann, wie in Leberzellen bereits gezeigt wurde (Liu *et al.*, 2013b). Während eine genspezifische Veränderung von hPTMs durch Metallverbindungen in der Literatur bislang kaum diskutiert wurde, ist für virale tumorpromovierende Proteine wie das Adenovirus 5 eine gezielte Dysregulation von H3K18ac mechanistisch bereits nachgewiesen. Insbesondere die kleine Onkoproteineinheit E1A des DNA-Tumorvirus löste in einer Studie nach einer Infektion von Fibroblasten 95 % der basalen H3K18ac-Peaks auf und führte zu einer genspezifischen Umverteilung der H3K18ac-Anreicherung. Diese strategische Neuverteilung von H3K18ac wurde hierbei als ein wichtiger Mechanismus für die zelluläre Transformation und transkriptionelle Aktivierung angesehen, wobei die zielgerichteten Veränderungen durch die Interaktion von E1A mit spezifischen DNA-Mustern und Chromatinfaktoren erklärt wurden (Ferrari *et al.*, 2012).

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse für H3K18ac die Annahme, dass die untersuchten DNA-Reparaturgene in der A549-Zelllinie aktiv transkribiert werden. Zusätzlich zeigte sich eine

Abhängigkeit des H3K18ac-Status von der zellulären Arsenitpräsenz, da die Inkubation der Zellen mit Arsenit zu einer kurzzeitigen signifikanten Hypoacetylierung von H3K18 in Verbindung mit spezifischen DNA-Reparaturgenen führte. Nach einer Regenerationszeit von 48 h war das reduzierte Vorkommen von H3K18ac jedoch nicht mehr nachweisbar. Dies deutet auf eine Wiederherstellung der ursprünglichen hPTM-Muster hin.

Analog zu H3K18ac ist auch H3K9ac in der Promotorregion aktiver Gene vermehrt zu finden und überwiegend um die TSS lokalisiert (Wang *et al.*, 2008b). Die Acetylierung von H3K9 wird mit der Transkriptionsinitiation assoziiert, da die Bildung von H3K9ac zur Rekrutierung von TFIID beiträgt (Agalioti *et al.*, 2002). In einer Studie wurde H3K9ac zudem als empfindliche DNA-schadensabhängige hPTM identifiziert, weil H3K9ac innerhalb weniger Minuten nach Auftreten einer DNA-Schädigung deacetyliert wird, wobei in diesem Zusammenhang auch ein globaler, reversibler Verlust diskutiert wird (Tjeertes *et al.*, 2009).

In Abbildung 24 sind die Ergebnisse für H3K9ac in der A549-Zelllinie dargestellt. Im Vergleich zu den vorherigen Analysen wurde hier direkt ein größerer Dosisbereich (5 μM bis 20 μM) betrachtet. Das höchste basale Vorkommen von H3K9ac wurde sowohl für *MPG* als auch für *MLH1* mit etwa 24,5 % des Inputs ermittelt. In allen anderen untersuchten DNA-Reparaturloci betrug dies mindestens 12 %. Die Arsenitbehandlung führte ausschließlich bei der höchsten Konzentration von 20 μM zu einer signifikanten Hypoacetylierung von H3K9 in den Genen *MPG* und *MLH1*. Für *MPG* wurde eine Reduktion um 53,8 % ermittelt, wobei diese bei *MLH1* 49,7 % betrug. Dabei ist anzumerken, dass nach der Behandlung auch der Positivkontrolllocus *RPL30* eine Tendenz zum verminderten H3K9ac-Vorkommen aufzeigte. Es bleibt zu klären, ob die beobachteten Effekte spezifisch auftraten oder einen globalen Effekt widerspiegeln, der simultan bei mehreren Genen nachweisbar ist. Um zusätzlich die Persistenz dieser Effekte zu bewerten, wurden initiale Untersuchungen nach einer anschließenden Regenerationsphase von 48 h durchgeführt. Die Analysen ergaben jedoch keine Veränderungen des H3K9ac-Modifikationsstatus in den ausgewählten DNA-Loci, weshalb die Nachinkubationsversuche nicht weiterverfolgt wurden (initiale Daten werden nicht gezeigt).

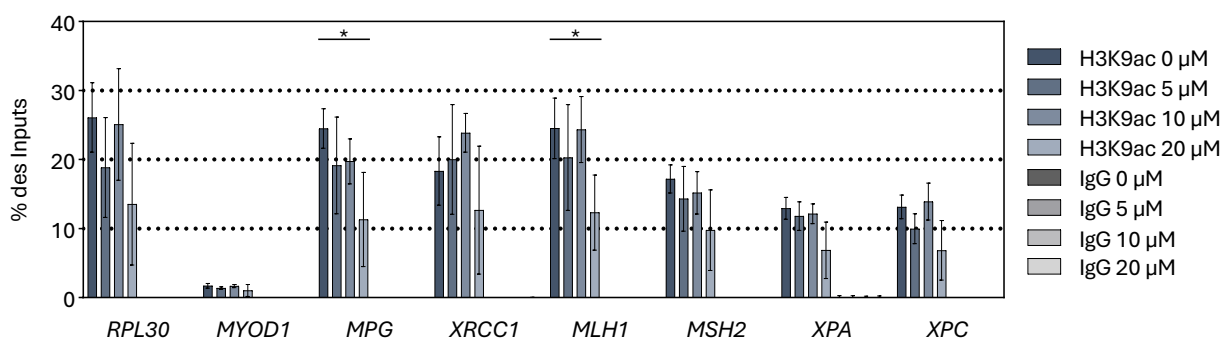


Abbildung 24 | Vorkommen von H3K9ac in ausgewählten DNA-Reparaturgenen von A549-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit 20 μM Natriumarsenit exponiert. Dargestellt sind die ChIP-qPCR-Resultate für H3K9ac. *MYOD1* diente hierbei als Negativkontrollsequenz, *RPL30* als Positivkontrollsequenz. Zusätzlich wurde ein IgG Isotyp Kontrollantikörper verwendet, um den unspezifischen Hintergrund zu erfassen. Die zugehörigen ChIP-Kontrollanreicherungen von Histon H3 am Positivkontrolllocus *RPL30* können dem Anhang A.2.5 entnommen werden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten in Einfachbestimmung. Die statistische Signifikanz der Anreicherungs-niveaus der behandelten Zellen zu den Negativkontrollen wurde mittels Welch-Test ermittelt: * ($p < 0,05$).

Insgesamt unterstützen diese Ergebnisse die Hypothese, dass vor allem Acetylierungsmuster der Histone durch Arsenit beeinflusst werden, da diese vermehrt in den Promotorregionen von DNA-Reparaturgenen vorzufinden sind. Im Fall von H3K9ac deuten die Ergebnisse ebenfalls auf eine zielgerichtete Hypoacetylierung von H3K9 durch Arsenit hin, wobei potenzielle globale Effekte nicht ausgeschlossen werden können.

Die genspezifischen Analysen der vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass Arsenit eine selektive Deacetylierung spezifischer hPTMs induzieren kann, wobei insbesondere H3K18 eine empfindliche Zielstruktur darstellt. Möglicherweise ist auch H3K9ac von der selektiven Deacetylierung betroffen. Wie zuvor erwähnt, zeigte eine frühere Studie an HaCaT-Zellen eine Abnahme des Acetylierungsstatus von H3K18 in Verbindung mit den NER-Genen *XPA*, *XPD* und *XPF* (Zhang *et al.*, 2020). Darüber hinaus demonstrieren neuere Untersuchungen, dass H3K18ac auch in Leberzellen genspezifisch durch Arsenit beeinflusst werden kann. Ma *et al.* beobachteten eine Hypoacetylierung von H3K18ac in den antioxidativen HSPs *HSPA1A* und *HSPB8* (Ma *et al.*, 2023). In einer weiteren Studie mit humanen Nierenzellen wurde das Vorkommen von H3K18ac, H3K36me3 und H3K9me2 in einer Vielzahl von Genen der oxidativen Stressantwort untersucht, darunter *HSPA1A* sowie *GCLC*, *SOD1* und *HMOX1*. Hierbei wurden ebenfalls genspezifische Veränderungen im Vorkommen der hPTMs nachgewiesen (Ma *et al.*, 2016). Neben der gezielten Veränderung der Histonacetylierung wird in der Literatur ferner über Arsenit-vermittelte genspezifische Dysregulationen des H3K9me2-Status im Promotor der BER-Reparaturgene *MPG*, *XRCC1* und *PARP-1* berichtet (Ding *et al.*, 2021). Während somit für BER- und NER-Gene genspezifische hPTM-Dysregulationen bereits diskutiert wurden, verdeutlicht die vorliegende Arbeit, dass zusätzlich auch MMR-Gene von selektiven hPTM-Veränderungen betroffen sein können.

Im Fall der durch Arsenit induzierten Veränderungen der hPTM-Muster an spezifischen Genloci bleibt unklar, welche molekularen Mechanismen diesen Prozessen zugrunde liegen. Eine Hypothese ist, dass Arsenit mit spezifischen histonmodifizierenden Enzymen wie den HATs oder HDACs direkt oder indirekt interagiert und dadurch gezielte Veränderungen der hPTMs bewirkt. Dabei ist eine vermittelte genspezifische Interaktion über TFs und Corepressoren (CoRs) möglich. Die beiden hypothetischen Wirkmechanismen sind schematisch in Abbildung 25 dargestellt.

In der Literatur wurden bereits HDACs beschrieben, die genspezifische Deacetylierungsprozesse vermitteln können. Hierbei wird insbesondere die Relevanz von Klasse III-HDACs diskutiert, da diese über eine Interaktion mit TFs nachweislich zu Loci-spezifischen Hypoacetylierungen führen können. Ein Beispiel ist SIRT7, das in *E26 transformation-specific like transcription factor 4* (ELK4)-regulierten Promotorregionen eine genspezifische Deacetylierung von H3K18ac induzieren kann (Barber *et al.*, 2012). Im Kontext einer durch Arsenit vermittelten Dysregulation von H3K18ac können möglicherweise auch andere TFs wie HIF-1 α eine wichtige Rolle spielen. HIF-1 α wird nachweislich durch Arsenit induziert und fungiert unter anderem als transkriptioneller Repressor von *MSH2* (Koshiji *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2013). Darüber hinaus ist bekannt, dass HIF-1 α durch die Prozesse der Histondeacetylierung und DNA-Methylierung beeinflusst werden kann.

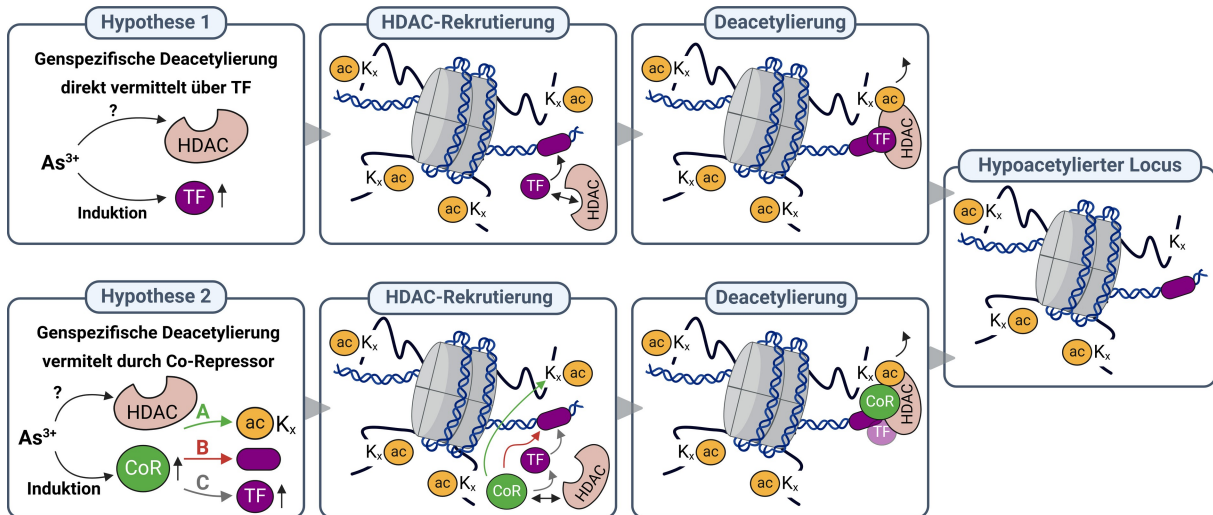


Abbildung 25 | Hypothetische Mechanismen der Arsenit-vermittelten genspezifischen Deacetylierung. Illustrativ dargestellt sind zwei potenzielle Wirkmechanismen von Arsenit (As^{3+}). **Hypothese 1:** (1) As^{3+} induziert spezifische Transkriptionsfaktoren (TFs). Zudem besitzt As^{3+} das Potenzial, direkt oder indirekt sowohl die Expression als auch die Aktivität von Histondeacetylasen (HDACs) zu beeinflussen. (2) Physische Interaktion der HDAC mit einem TF und dadurch DNA-sequenzspezifische Chromatinanlagerung. (3) Deacetylierungsprozess des umliegenden Lysinrests an Position x (K_x). (4) Loci-spezifische Hypoacetylierung von K_x . **Hypothese 2:** (1) As^{3+} induziert spezifische Corepressoren (CoRs) und beeinflusst die Aktivität der HDACs. (2) CoR-vermittelte Deacetylierung durch physische Interaktion der HDAC mit dem CoR und Loci-spezifische Rekrutierung. Diese Rekrutierung kann entweder über eine direkte Bindung an den spezifischen Lysinrest erfolgen (A) und/oder an die entsprechende Gensequenz (B). Alternativ ist auch eine indirekte Anlagerung an die DNA-Sequenz über eine CoR-TF-Bindung möglich (C). (3) Deacetylierungsprozess des umliegenden Lysinrests an Position x (K_x). (4) Loci-spezifische Hypoacetylierung von K_x . Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

Studien belegen, dass bis auf SIRT2 alle SIRTs HIF-1 α regulieren können (Dzhalilova und Makarova, 2022). Derzeit existieren vor allem Untersuchungen zu SIRT1 und dessen Interaktion mit Arsenit. Dabei ist bekannt, dass Arsenit die Proteinexpression und die Aktivität von SIRT1 verändern kann, wobei eine miR-34a-abhängige Promotormethylierung von *SIRT1* als möglicher Mechanismus diskutiert wird (Herbert *et al.*, 2014; Balarastaghi *et al.*, 2022; Ye *et al.*, 2023). Die Genexpressionsstudie der vorliegenden Arbeit untersuchte auch den Einfluss von Arsenit auf *SIRT2*, wobei hier keine Veränderungen der mRNA-Gehalte in der A549-Zelllinie festgestellt wurden (Anhang A.2.3). Für alle anderen SIRTs ist die Beeinflussung durch Arsenit noch nicht geklärt. Inwieweit die SIRTs eine Rolle im Kontext der Arsenit-induzierten Veränderungen der hPTMs einnehmen, wird die zukünftige Forschung zeigen. Möglicherweise existieren auch andere histonmodifizierende Enzyme, die mit TFs interagieren und damit genspezifische Reaktionen hervorrufen können. Neben der direkten Interaktion mit TFs ist die Vermittlung einer genspezifischen Hypoacetylierung auch über CoRs wie *tripartite motif containing 33* (TRIM33) möglich (Luo *et al.*, 2019). CoRs zählen zu den Coregulatoren, die eine DNA-sequenzspezifische Bindung chromatinmodifizierender Multiproteinkomplexe vermitteln können. Dabei ist bekannt, dass sie nicht nur direkt an TFs binden, sondern auch selbst die spezifische Anlagerung vermitteln können, weshalb auch eine direkte Bindung der Coregulatoren an spezifische Histonreste diskutiert wird (Delcuve *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2019; Nuñez *et al.*, 2024). Im Fall von TRIM33 ist bekannt, dass dieser Repressor direkt mit der DNA sowie spezifischen hPTMs einschließlich H3K18ac interagieren kann, wodurch eine sequenzspezifische Anlagerung von histondeacetylierenden Einheiten ermöglicht wird (Nuñez *et al.*, 2024). In welchem Maße diese

hypothetischen Wirkmechanismen die durch Arsenit vermittelte Hypoacetylierung tatsächlich erklären, lässt sich auf Grundlage des aktuellen Forschungsstands nicht abschließend beurteilen. Hervorzuheben ist auch, dass die detektierte Arsenit-induzierte Hypoacetylierung von H3K18 nur unmittelbar nach der 24-stündigen Arsenitbehandlung nachweisbar war. Nach einer zusätzlichen Regenerationszeit von 48 h war sie in der A549-Zelllinie nicht mehr feststellbar. Diese transiente Dynamik wirft die Frage auf, inwieweit die veränderten hPTMs die zuvor beobachtete beständige transkriptionelle Repression der DNA-Reparaturgene beeinflussen. In diesem Kontext ist ein Zusammenspiel mit anderen epigenetischen Mechanismen wie der DNA-Methylierung möglich. Ein Zusammenhang zwischen Histondeacetylierung und DNA-Methylierung wurde beispielsweise schon für die SIRT-abhängige Deacetylierung beschrieben. So deacetylieren SIRTs spezifische Lysinreste, was zur Rekrutierung des Ubiquitin-Ligase-Komplexes *ubiquitin like with PHD and ring finger domains 1* (UHRF1) und damit zur Ubiquitinierung benachbarter AS führen kann. Dies initiiert die Bindung der DNA-Methyltransferase DNMT1, induziert demnach den DNA-Methylierungsprozess des korrespondierenden Genlocus und fördert somit die Genstilllegung (Qin *et al.*, 2015). Humanstudien weisen bereits darauf hin, dass chronisch exponierte Individuen unter anderem eine Hypermethylierung in der Promotorregion der DNA-Reparaturgene *MSH2* und *MLH1* aufweisen (Bhattacharjee *et al.*, 2018; Sanyal *et al.*, 2024). Unklar ist an dieser Stelle allerdings, ob auch eine einmalige akute Arsenitexposition zu einer DNA-Hypermethylierung der entsprechenden Loci führt.

5.2.2 Genomweite Arsenit-vermittelte Dysregulation ausgewählter Histon H3-Modifikationen

Die genspezifischen Untersuchungen wurden durch eine Analyse der Gesamthistonfraktionen von H3K4me3, H3K27me3, H3K9ac und H3K18ac ergänzt. Hierzu wurden die A549-Zellen mit 5 μM bis 20 μM NaAsO₂ für 24 h exponiert und anschließend entweder direkt nach der Behandlung oder nach einer zweitägigen Zellregenerationsphase ohne Arsenit mittels *Western Blot* auf ihr genomweites Vorkommen analysiert. Die semiquantitativen Ergebnisse sind in den Abbildungen 26-29 dargestellt. Exemplarische *Blots* finden sich im Anhang unter A.2.6.

Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse für H3K4me3. Unmittelbar nach der Behandlung mit Arsenit wurde ausschließlich bei 20 μM eine signifikante Erhöhung des H3K4me3-Vorkommens um 45 % im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Die Behandlungen mit 5 μM und 10 μM führten zu keinen statistisch signifikanten Effekten, wobei jedoch ein leicht abnehmender Trend erkennbar war (Abbildung 26A). Nach einer Regenerationszeit von 48 h wurde für alle getesteten Konzentrationen ein Trend zur Signalverstärkung detektiert. Hierbei wies nur die Behandlung mit 10 μM eine statistisch signifikante Steigerung um 56,6 % auf (Abbildung 26B). Bei 5 μM und 20 μM stiegen die Werte geringfügig etwa auf das 1,3-fache an. Dementsprechend blieb das H3K4me3-Vorkommen bei 20 μM erhöht, jedoch mit leicht abnehmender Effektstärke. Diese Ergebnisse deuten auf eine dynamische, zeitabhängige Veränderung der Proteinexpression von H3K4me3 hin, mit einer möglichen Persistenz des Effekts bei der höchsten Dosis von 20 μM NaAsO₂.

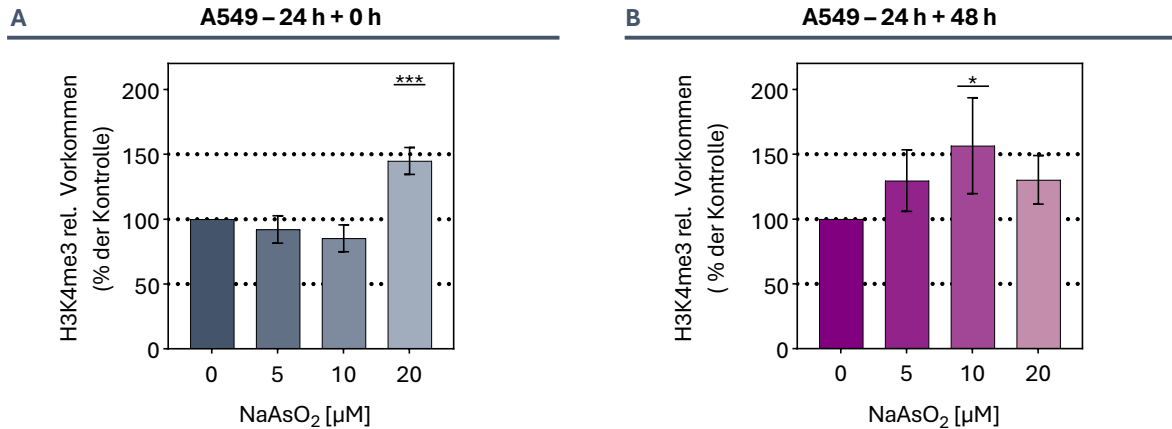


Abbildung 26 | Effekt einer Arsenitbehandlung und Nachinkubation auf das globale Vorkommen von **H3K4me3**. Die A549-Zellen wurden für 24 h mit Natriumarsenit (NaAsO₂) exponiert und anschließend einer 0 h (**A**) oder 48 h (**B**) Arsenit-freien Regenerationsphase unterzogen. Das relative (rel.) Vorkommen der Modifikation wurde mittels *Western Blot* bestimmt. Für die semiquantitative Analyse wurden die erhaltenen Signalintensitäten auf die Signale drei verschiedener Ladekontrollen normiert (Ponceau-S, Histon H3 und β -Actin). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten in Einfachbestimmung. Die Signifikanz der Behandlungen zur Negativkontrolle wurde innerhalb einer Nachinkubationsperiode mit *one-way ANOVA-Dunnett's Post-hoc-Test* ermittelt: */*** ($p < 0,05/0,001$).

Als weitere hPTM wurde H3K27me3 untersucht. Die Analysenergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt. Arsenit führte zu dosisabhängigen Veränderungen der H3K27me3-Häufigkeit, wobei ein inverses Verhalten beobachtet wurde. Während eine Behandlung mit 5 μ M zu einer geringen, aber signifikanten Erhöhung des Vorkommens um 15,1 % im Vergleich zur Kontrolle führte, zeigten höhere Konzentrationen eine Reduktion. Bei 20 μ M wurde eine signifikante Abnahme um 35,0 % beobachtet. Nach 48 h kehrte das H3K27me3-Vorkommen bei 10 μ M und 20 μ M nahezu auf den Basalgehalt zurück, während bei 5 μ M der Trend zur Erhöhung bestehen blieb. Diese Resultate implizieren, dass Arsenit transiente und potenziell persistente H3K27me3-Veränderungen verursacht.

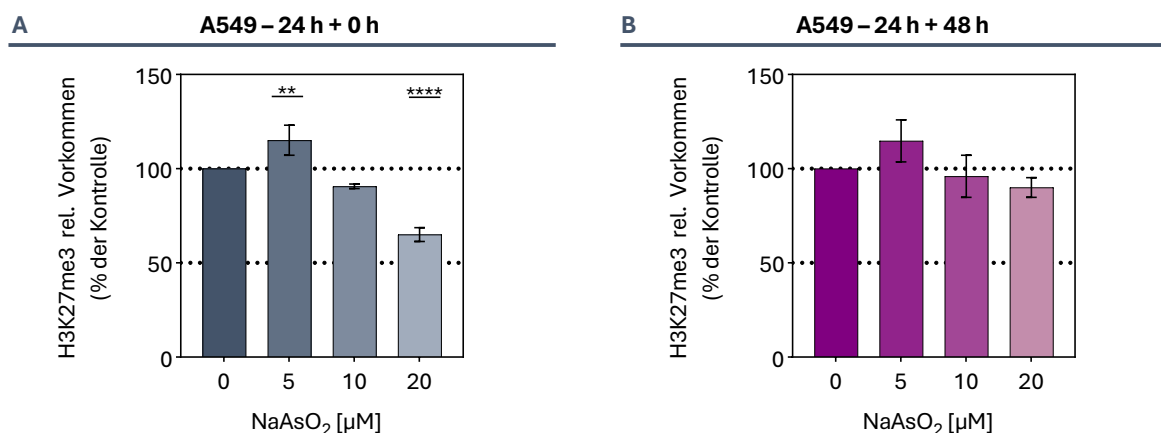


Abbildung 27 | Effekt einer Arsenitbehandlung und Nachinkubation auf das globale Vorkommen von **H3K27me3**. Die Zellen wurden für 24 h mit Natriumarsenit (NaAsO₂) exponiert und anschließend einer 0 h (**A**) oder 48 h (**B**) Arsenit-freien Regenerationsphase unterzogen. Das relative (rel.) Vorkommen der Modifikation wurde mittels *Western Blot* bestimmt. Für die semiquantitative Analyse wurden die erhaltenen Signalintensitäten auf die Signale drei verschiedener Ladekontrollen normiert (Ponceau-S, Histon H3 und β -Actin). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten in Einfachbestimmung. Die Signifikanz der Behandlungen zur Negativkontrolle wurde innerhalb einer Nachinkubationsperiode mit *one-way ANOVA-Dunnett's Post-hoc-Test* ermittelt: **/**** ($p < 0,01/0,0001$).

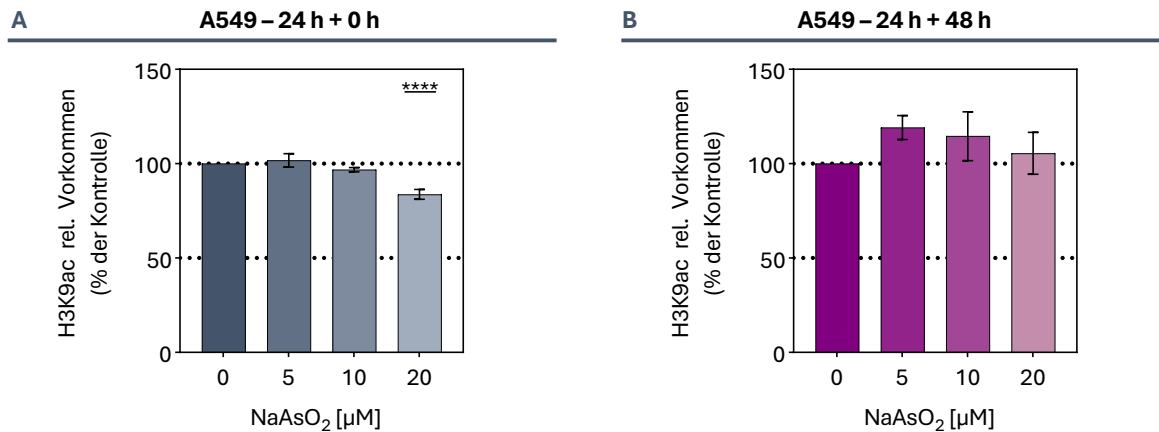


Abbildung 28 | Effekt einer Arsenitbehandlung und Nachinkubation auf das globale Vorkommen von H3K9ac. Die Zellen wurden für 24 h mit Natriumarsenit (NaAsO₂) exponiert und anschließend einer 0 h (A) oder 48 h (B) Arsenit-freien Regenerationsphase unterzogen. Das relative (rel.) Vorkommen der Modifikation wurde mittels *Western Blot* bestimmt. Für die semiquantitative Analyse wurden die erhaltenen Signalintensitäten auf die Signale drei verschiedener Ladekontrollen normiert (Ponceau-S, Histon H3 und β -Actin). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten in Einfachbestimmung. Die Signifikanz der Behandlungen zur Negativkontrolle wurde innerhalb einer Nachinkubationsperiode mit *one-way ANOVA*-Dunnett's Post-hoc-Test ermittelt: **** ($p < 0,001$).

Abbildung 28 zeigt die Ergebnisse für H3K9ac. Die akute Behandlung mit 20 μ M NaAsO₂ führte zu einer moderaten 16,3 %-igen Abnahme des Vorkommens. Bei geringeren Konzentrationen wurden keine Veränderungen festgestellt (Abbildung 28A). Nach einer zweitägigen Arsenit-freien Nachinkubation wurde bei 20 μ M eine fast vollständige Rückkehr zum Basalzustand beobachtet, wobei niedrigere Konzentrationen eine leichte Signalverstärkung aufwiesen (Abbildung 28B). Diese Befunde stehen im Einklang mit der genspezifischen Analyse und zeigen, dass Arsenit bei der höchsten Konzentration von 20 μ M eine marginale, transiente Reduktion von H3K9ac bewirkt.

Abbildung 29 zeigt die Ergebnisse für H3K18ac. Die Inkubation mit Arsenit führte zu einer konzentrationsabhängigen Hypoacetylierung von H3K18 (Abbildung 29A). Bereits bei der niedrigsten Dosis von 5 μ M wurde eine statistisch signifikante Abnahme auf 87,4 % beobachtet. Bei 10 μ M verblieben 73,9 %. Die stärkste Reduktion wurde bei der höchsten Dosis von 20 μ M beobachtet, wobei die H3K18ac-Häufigkeit lediglich 49,7 % des Basalwerts erreichte. Eine zusätzliche zweitägige Nachinkubation ohne Arsenit führte zu einer teilweisen Regeneration des Acetylierungsstatus (Abbildung 29B). Während bei 5 μ M ein moderater, aber signifikanter Anstieg um 15,6 % dokumentiert wurde, zeigte sich bei 10 μ M und 20 μ M ein leicht sinkender Trend. Analog zu den genspezifischen Untersuchungen zeigen die Ergebnisse der globalen Analyse eine konzentrationsabhängige transiente Hypoacetylierung im ausgewählten mikromolaren Konzentrationsbereich.

Zusammenfassend bestätigt die Analyse der Gesamthistonfraktionen die ursprüngliche Annahme, dass die Modifikation der Histone ein hochdynamischer Prozess ist, der durch Arsenit sowohl transient als auch persistent dysreguliert werden kann. Alle hier analysierten hPTMs wiesen unmittelbar nach der Behandlung Veränderungen in ihren Proteingehalten auf, wobei sich die Vorkommen nach der Zellregenerationsphase meist wieder nahezu dem Basalzustand angleichen.

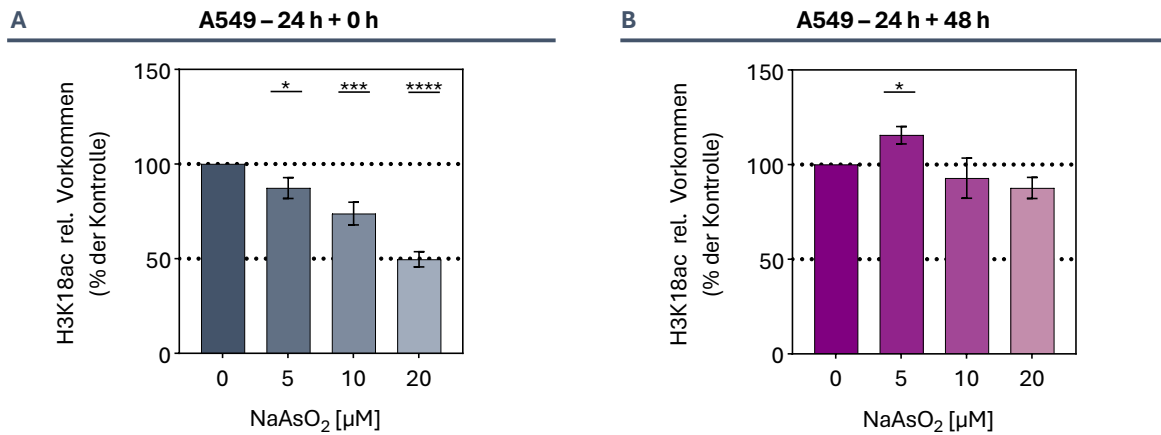


Abbildung 29 | Effekt einer Arsenitbehandlung und Nachinkubation auf das globale Vorkommen von **H3K18ac**. Die Zellen wurden für 24 h mit Natriumarsenit (NaAsO₂) exponiert und anschließend einer 0 h (A) oder 48 h (B) Arsenit-freien Regenerationsphase unterzogen. Das relative Vorkommen der Modifikation wurde mittels *Western Blot* bestimmt. Für die semiquantitative Analyse wurden die erhaltenen Signalintensitäten auf die Signale drei verschiedener Ladekontrollen normiert (Ponceau-S, Histon H3 und β -Actin). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten in Einfachbestimmung. Die Signifikanz der Behandlungen zur Negativkontrolle wurde innerhalb einer Nachinkubationsperiode mit *one-way ANOVA-Dunnett's Post-hoc-Test* ermittelt: */***/**** ($p < 0,05/0,001/0,0001$).

In Übereinstimmung mit den genspezifischen Ergebnissen wurde insbesondere unmittelbar nach der akuten Exposition der Zellen eine vorübergehende Hypoacetylierung von H3K9 und H3K18 beobachtet.

Da die stärksten Effekte für H3K9ac und H3K18ac in der Lungentumorzelllinie A549 dokumentiert wurden, stellte sich die Frage, inwieweit sich die Gesamthistonfraktion der beiden hPTMs nach akuter Arsenitbehandlung in einer Lungenzelllinie aus Normalgewebe verändert. Entsprechend wurden weiterführende Untersuchungen in der humanen Lungenepithelzelllinie BEAS-2B durchgeführt (Abbildung 30).

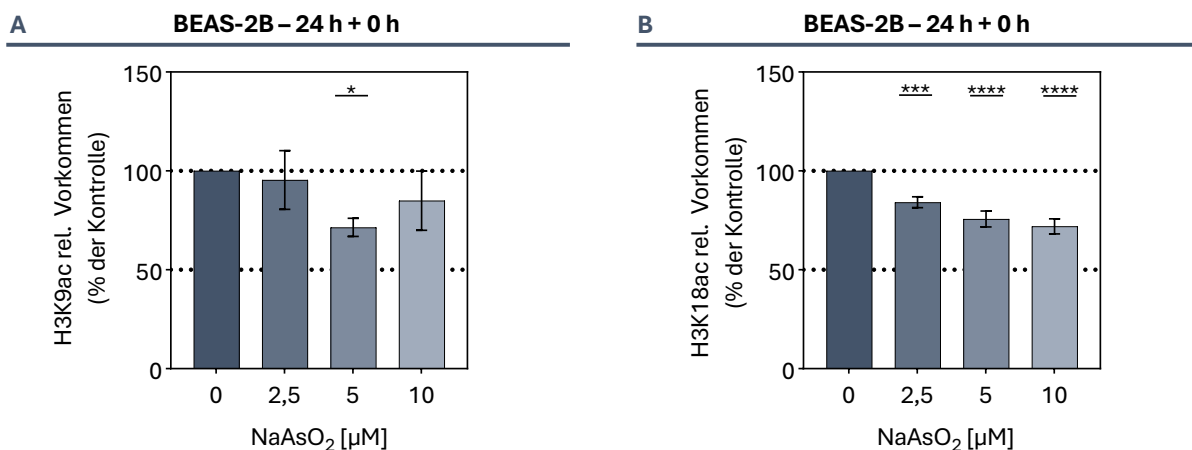


Abbildung 30 | Effekt einer Arsenitbehandlung und Nachinkubation auf das globale Vorkommen von **H3K9ac** und **H3K18ac** in BEAS-2B-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit Natriumarsenit (NaAsO₂) exponiert. Das relative (rel.) Vorkommen der Modifikationen wurde mittels *Western Blot* bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse für H3K9ac (A) und H3K18ac (B). Für die semiquantitative Analyse wurden die erhaltenen Signalintensitäten auf die Signale drei verschiedener Ladekontrollen normiert (Ponceau-S, Histon H3 und β -Actin). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten in Einfachbestimmung. Die Signifikanz der Behandlungen zur Negativkontrolle wurde innerhalb einer Nachinkubationsperiode mit *one-way ANOVA-Dunnett's Post-hoc-Test* ermittelt: */***/**** ($p < 0,05/0,001/0,0001$).

Die BEAS-2B-Zellen wurden analog zu den A549-Zellen für 24 h akut mit NaAsO₂ exponiert und anschließend mittels *Western Blot* das relative Vorkommen von H3K9ac und H3K18ac ermittelt. Die Auswahl der Arsenitkonzentrationen orientierte sich an bisher unveröffentlichten internen Daten zur Bestimmung des ATP-Gehalts. Hier wiesen die BEAS-2B-Zellen eine etwa doppelt so hohe Sensitivität gegenüber einer akuten Arsenitbehandlung im Vergleich zur A549-Zelllinie auf. Daher wurde der Konzentrationsbereich um die Hälfte reduziert (2,5 µM bis 10 µM), um äquitoxische Bedingungen zu gewährleisten. Während bei 2,5 µM kaum ein Einfluss von Arsenit auf das H3K9ac-Vorkommen nachweisbar war, zeigte sich ab einer Exposition mit 5 µM eine signifikante Reduktion um 28,5 % im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 30A). Bei 10 µM wurde ein abnehmender Trend um ca. 15,1 % beobachtet. Im Vergleich dazu zeigte sich bereits ab 2,5 µM NaAsO₂ eine signifikante konzentrationsabhängige Hypoacetylierung der Histonposition H3K18 (Abbildung 30B). Die relative Häufigkeit von H3K18ac sank bei 2,5 µM auf 84,2 % ab, während bei 5 µM und 10 µM 75,7 % bzw. 72,0 % verblieben. Entsprechend den Befunden in der A549-Zelllinie wurde auch in der BEAS-2B-Zelllinie eine Hypoacetylierung von H3K9 und H3K18 beobachtet, jedoch mit geringfügiger Ausprägung. Hierbei fiel auf, dass die Hypoacetylierung von H3K9 in den BEAS-2B-Zellen bei der höchsten getesteten Konzentration von 10 µM schwächer ausgeprägt war als bei 5 µM. Ein möglicher Grund dafür könnte das vermehrte Auftreten von apoptotischen und Zellzyklus-inhibierenden Prozessen sein. Zusätzliche unveröffentlichte interne Daten zeigen, dass in BEAS-2B-Zellen bereits ab 5 µM ein G2/M-Zellzyklusarrest auftritt. Dies könnte zu einer verstärkten Dysregulation der Histon(de)acetylierung führen. Dies erklärt möglicherweise auch den geringen Unterschied in der Abnahme der H3K18ac-Proteinspiegel bei 5 µM und 10 µM, die auf einem ähnlichen Niveau lagen. Insgesamt zeigte die Analyse in den BEAS-2B-Zellen, dass die Arsenit-induzierte Hypoacetylierung nicht nur in Krebszellen auftritt.

In der Literatur finden sich für die hier untersuchten hPTMs zahlreiche Studien, die eine globale Dysregulation der hPTMs durch Arsenit beschreiben. In einer Humanstudie zu den Auswirkungen einer chronischen Exposition gegenüber Arsen-belastetem Trinkwasser wurde eine Vielzahl an hPTM-Veränderungen beobachtet. Neben H3K9me₂ und H3K27ac veränderte sich das Vorkommen von H3K4me₃, H3K9ac, H3K18ac und H3K27me₃. Auffällig waren hierbei geschlechtsspezifische Veränderungen im Vorkommen von H3K4me₃, H3K9ac, H3K18ac und H3K27me₃, wobei auch die Expositionshöhe einen wesentlichen Einfluss auf die Veränderung der hPTMs nahm (Chervona *et al.*, 2012). Insgesamt weisen einige Studien jedoch diskrepante Veränderungen auf. Während in der Literatur eine Arsenitexposition mit einer Hyperacetylierung von H3K9 in Verbindung gebracht wird (Ramirez *et al.*, 2008), berichten andere Studien von einer Hypoacetylierung von H3K9 (Cronican *et al.*, 2013) oder von einem unverändertem Vorkommen (Ma *et al.*, 2016). Ähnliche Diskrepanzen bestehen auch für andere hPTMs wie H3K4me₃, H3K18ac und H3K27me₃ (Howe und Gamble, 2016). Somit scheinen hPTMs geschlechts- und gewebespezifisch aufzutreten, wobei auch die eingesetzten Arsenitkonzentrationen und das daraus resultierende Stressniveau der Zellen eine Rolle spielen. An dieser Stelle ist anzumerken, dass Tumorzellen im Vergleich zu Nicht-Tumorzellen desselben Gewebes bereits unterschiedliche hPTM-Verteilungen aufweisen können, wie aktuelle Untersuchungen an humanem Brustgewebe zeigen. Die

Unterschiede werden zum Teil auf auftretende enzymatische Aktivitätsunterschiede sowie auf veränderte Vorkommen beteiligter chromatinmodifizierender Enzyme zurückgeführt (Liu *et al.*, 2024). Ein möglicher Grund für die beobachteten Diskrepanzen könnte das Auftreten zelllinienspezifischer Unterschiede in den Expressionsniveaus histonmodifizierender Enzyme sein, wodurch bestimmte hPTMs möglicherweise empfindlicher auf Arsenit-induzierte Veränderungen reagieren.

Es existieren wenige Studien, die das zelluläre hPTM-Vorkommen nach einer Arsenitbehandlung mit anschließender Zellregenerationsphase untersuchen. So evaluierten Zhou *et al.* bereits die Dynamik von H3K4me3 in A549-Zellen nach einer subchronischen siebentägigen Arsenitbehandlung mit anschließender siebentägiger Nachinkubation im Konzentrationsbereich von 0,1 μM bis 1 μM NaAsO₂. Dabei wurde ein persistent erhöhtes Vorkommen von H3K4me3 innerhalb der Zellregenerationszeit beobachtet (Zhou *et al.*, 2009). Die vorliegende Arbeit komplementiert diesen Ansatz und zeigt, dass bereits eine einmalige zelluläre Arsenitexposition über 24 h im niedrigen mikromolaren Bereich ausreicht, um eine anhaltende Dysregulation spezifischer hPTMs zu induzieren. Des Weiteren demonstrieren die Daten, dass globale Veränderungen von hPTMs nicht zwingend auch auf Genebene, hier an ausgewählten DNA-Reparaturgenen, vorzufinden sind. Dies wurde in dieser Arbeit für H3K4me3 und H3K27me3 belegt. Dieser Befund entspricht den Ergebnissen von mit ATO behandelten HEK293T-Nierenzellen, in denen zwar eine globale Hypoacetylierung festgestellt wurde, am FOS-Promotor jedoch eine signifikante Hyperacetylierung auftrat (Rahman *et al.*, 2015). Allerdings konnte diese Beobachtung für die in dieser Arbeit ermittelten Veränderungen der Histonacetylierungsmuster nicht bestätigt werden. Eine Arsenitexposition führte sowohl auf globaler als auch auf genspezifischer Ebene zu einer Hypoacetylierung von H3K9 und H3K18. Der verminderte globale Acetylierungsstatus wurde jedoch nicht für alle untersuchten DNA-Reparaturgene nachgewiesen, sondern nur für ausgewählte Gene. Dies deutet auf einen gezielten, selektiven Einfluss von Arsenit auf die Regulation des hPTM-Status in DNA-Reparaturgenen hin. Um dennoch einen globalen Effekt von Arsenit auf die zugrunde liegenden histonmodifizierenden Enzyme auszuschließen, wurden im Anschluss auch die HAT- sowie HDAC-Gesamtaktivität untersucht (siehe Kapitel 5.3).

5.2.3 Lysin-spezifische Veränderungen der Modifikationslandschaft von Histon H3 durch Arsenit

Da im bisherigen Verlauf ausschließlich gezielte Untersuchungen ausgewählter PTMs von Histon H3 durchgeführt wurden, erfolgte ergänzend dazu eine umfassende Analyse des gesamten H3-Modifikationsspektrums, wobei der Fokus auf Acetylierungs- und Methylierungsmustern lag. Hierfür wurden akut Arsenit-exponierte (5 μM bis 20 μM NaAsO₂ für 24 h) und unbehandelte A549-Histonextrakte einem umfangreichen Profiling mittels LC-MS/MS unterzogen. Zunächst wurden veränderte Lysinmodifikationen identifiziert, da diese das höchste Potenzial für Arsenit-induzierte Effekte aufweisen (Ge *et al.*, 2018). Für die massenspektrometrische Analyse der posttranslationalen H3-Modifikationen wurde ein *Bottom-Up Proteomics*-Ansatz gewählt. Dabei werden die Proteine nicht in ihrer intakten Form analysiert, sondern zuvor in Peptide gespalten. Da Histone sehr Lysin- und

Arginin-reich sind, wurde keine klassische *Shotgun*-Analyse mit Trypsinverdau angewandt, sondern zuvor eine chemische Derivatisierung mittels Propionanhydrid durchgeführt. Dies ermöglicht den Trypsinverdau nur noch an nicht-endogen modifizierten Argininresten. Zudem erhöht die Propionylierung die Hydrophobizität der Peptide und verbessert somit die Auftrennung mittels *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) (Maile *et al.*, 2015; Soldi *et al.*, 2016). Entsprechend sind alle analysierten Peptide mit Arginin terminiert und beinhalten zwei bis drei Lysineinheiten. In Abbildung 31 sind die AS-Sequenz des Histons H3.1 sowie das analysierte Peptidspektrum schematisch dargestellt. Weiterhin war eine eindeutige Unterscheidung der Peptide H3K27-R40 der kanonischen Form von H3 (H3.1) und der Histonvariante H3.3 möglich, wobei diese sich an Position 31 durch Alanin bzw. Serin unterscheiden. Die resultierenden Peptide wurden anschließend mittels LC-MS/MS analysiert, um die Häufigkeit der modifizierten Formen der Peptide zu bestimmen. Insgesamt wurden spezifische Veränderungen im Acetylierungs- und Methylierungsstatus von Lysin beobachtet, was auf einen zielgerichteten regulatorischen Mechanismus von Arsenit auf die hPTMs hindeutet. Nachfolgend werden die Ergebnisse der einzelnen Peptide beginnend vom N-terminalen Ende der Histonseitenkette in aufsteigender Position der Lysineinheiten beschrieben.

Das Peptid H3K4-R8, welches Lysin K4 beinhaltet, wurde im Basalzustand der A549-Zellen ausschließlich unmodifiziert oder monomethyliert wiedergefunden. Während etwa 60 % der identifizierten Peptide keine Modifikation an K4 aufwiesen, wurde bei ca. 40 % der Peptide die monomethylierte Form H3K4me1 nachgewiesen (Abbildung siehe Anhang A.2.7). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde kein Effekt von Arsenit auf die PTM von H3K4 festgestellt. Allerdings ist anzumerken, dass die Analyse der sehr kleinen, hydrophilen H3K4me2- und H3K4me3-Peptide mit der verwendeten *Proteomics*-Methode nicht möglich war, da diese während der Aufarbeitung selektiv verloren gehen. Alternativ ist die quantitative Erfassung der Peptide durch einen hybriden chemischen Derivatisierungsansatz möglich (Maile *et al.*, 2015).

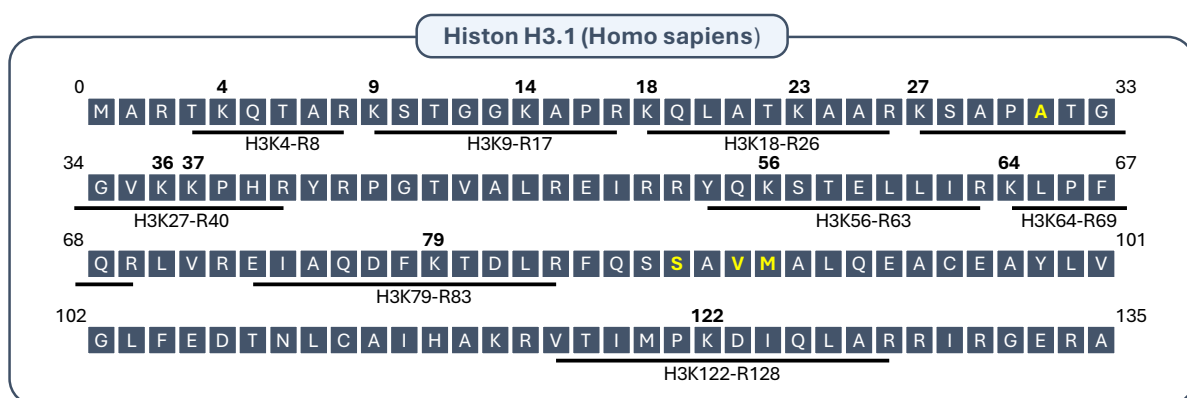


Abbildung 31 | Schematische Darstellung der Proteinsequenz des humanen Histon H3.1 Proteins. Die Aminosäuresequenz umfasst 136 Aminosäuren, wobei insgesamt 8 Peptide mit jeweils unterschiedlichen Modifikationen an den Lysinresten (K) identifiziert wurden. Alle analysierten Lysinreste sind mit ihrer zugehörigen Positionszuordnung versehen. Die Linie markiert die entsprechend mittels LC-MS/MS wiedergefundene Peptidsequenz. Die Analyse ermöglichte auch eine eindeutige Unterscheidung zwischen dem Peptid H3.1K18K23 und H3.3K18K23. Gelb hervorgehoben sind die Aminosäuren, in denen sich H3.1 von der Histonvariante H3.3 unterscheidet. Dies betrifft die Positionen 31 (S statt A), 87 (A statt S) sowie 89 (I statt V) und 90 (G statt M). Die Aminosäuresequenzen von Histon H3.1 (UniProt ID P68431) und Histon H3.3 (UniProt ID P84243) wurden von der Uniprot-Datenbank entnommen, zuletzt aufgerufen am 10.02.2025 (UniProt, 2025).

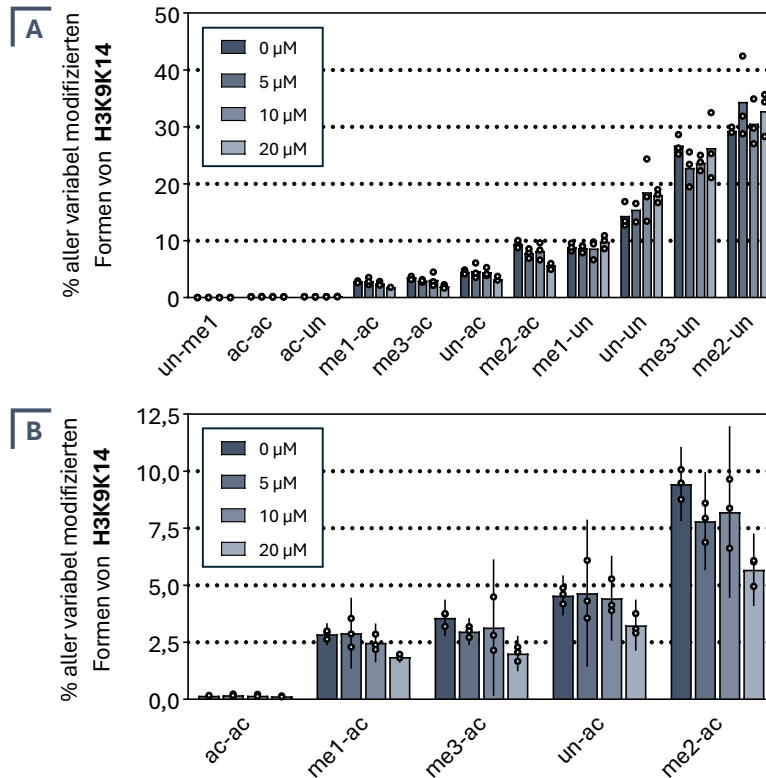


Abbildung 32 | Relatives Vorkommen der modifizierten Peptidformen von Histon H3 (K9/K14) nach Trypsinverdau. Die A549-Zellen wurden für 24 h mit 5 μM bis 20 μM Natriumarsenit (NaAsO_2) behandelt und anschließend die Histonfraktionen isoliert. Die posttranslationalen Histonmodifikationen wurden mittels LC-MS/MS analysiert. Gezeigt sind die Daten für alle identifizierten modifizierten Formen des Peptids H3K9-R17 (**A**) und eine vergrößerte Darstellung der signifikant veränderten Modifikationskombinationen \pm 95 % Konfidenzintervalle (**B**). Die Daten wurden aus biologischen Triplikaten erhalten, die als individuelle Punkte in den Graphen visualisiert werden, wobei die Balkenhöhe jeweils den korrespondierenden Mittelwert repräsentiert.

In Abbildung 32 sind die Ergebnisse für das H3K9-R17-Peptid dargestellt. Hier wurde im Vergleich zu K4 ein größeres Modifikationsspektrum der Lysine in Position K9 und K14 identifiziert. Im Basalzustand der A549-Zellen wies das Peptid überwiegend die unmodifizierte Form von K14 auf, während an K9 die di- und trimethylierten Formen überwogen. H3K9me2 und H3K9me3 wurden in Kombination mit unmodifiziertem K14 mit einer Häufigkeit von 30 % bzw. 27 % identifiziert. Danach folgte das vollständig unmodifizierte Peptid mit einer relativen Häufigkeit von etwa 15 %. Für H3K9me2 in Kombination mit H3K14ac wurde ein Anteil von 10 % ermittelt. Mit geringerer Häufigkeit folgten H3K9unmodK14ac, H3K9me3K14ac und H3K9me1K14ac, die alle ein Vorkommen von < 5,5 % aufwiesen. Qualitativ wurden zudem weitere PTMs nachgewiesen, wobei aufgrund des geringen Vorkommens (< 0,25 %) keine eindeutige quantitative Aussage getroffen werden konnte (Abbildung 32A). Der Vergleich der PTM-Kombinationen von H3K9K14 zeigte nur geringe Unterschiede der Modifikationshäufigkeiten nach Arsenitexposition. Für H3K9ac wurde insgesamt ein geringes Vorkommen detektiert, das durch die Arsenitbehandlung nahezu unverändert blieb. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei H3K14 eine deutliche Tendenz zur Hypoacetylierung, insbesondere in Kombination mit H3K9me1/me2/me3 (Abbildung 32B).

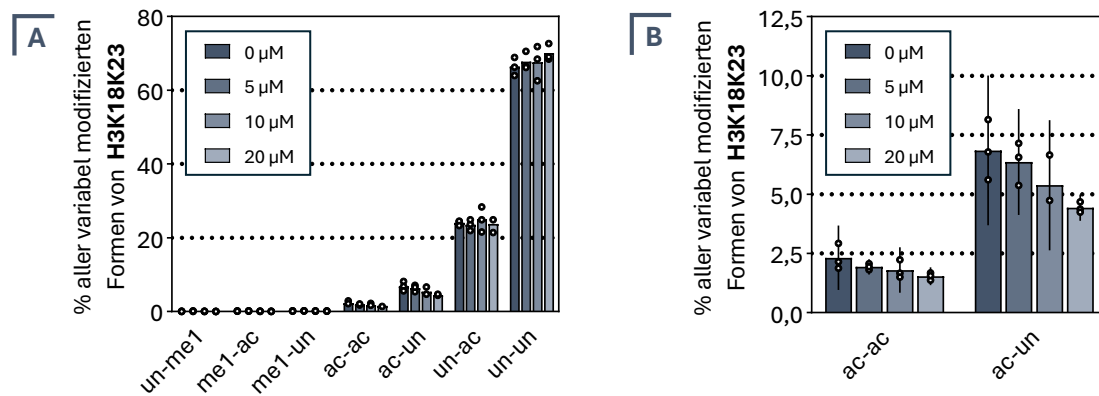


Abbildung 33 | Relatives Vorkommen der modifizierten Peptidformen von Histon H3 (K18/K23) nach Trypsinverdau. Die A549-Zellen wurden für 24 h mit 5 µM bis 20 µM Natriumarsenit (NaAsO₂) behandelt und anschließend die Histonfraktionen isoliert. Die posttranslationalen Histonmodifikationen wurden mittels LC-MS/MS analysiert. Gezeigt sind die Daten für alle identifizierten modifizierten Formen des Peptids H3K18-R26 (A) und eine vergrößerte Darstellung der beiden signifikant veränderten Modifikationskombinationen ± 95 % Konfidenzintervalle (B). Die Daten wurden aus biologischen Triplikaten erhalten, die als individuelle Punkte in den Graphen visualisiert werden, wobei die Balkenhöhe jeweils den korrespondierenden Mittelwert repräsentiert.

Abbildung 33 zeigt die Resultate für das H3K18-R26-Peptid, welches sowohl K18 als auch K23 beinhaltet. Als häufigste Peptidvariante in den unbehandelten A549-Zellen wurde hier die vollständig unmodifizierte Form mit einer relativen Häufigkeit von etwa 67 % identifiziert. Danach folgten das H3K18unmodK23ac-Peptid mit ca. 24 % und dessen inverse Form H3K18ack23unmod mit etwa 7 %. Auffällig war, dass beide Acetylierungen lediglich in 0,2 % der Peptidformen gemeinsam auftraten, was auf eine unterschiedliche Regulation der beiden hPTMs hindeutet. Qualitativ wurden zudem weitere Modifikationen nachgewiesen. Im Vergleich zu den vorherigen genannten Peptiden waren hier die Acetylierungsformen die dominierenden Spezies. Übereinstimmend mit dem Arsenit-induzierten Trend zur Hypoacetylierung von H3K14 zeigte sich dieser auch für H3K18ac, während sich das Vorkommen von H3K23ac durch die Arsenitbehandlung der A549-Zellen nicht veränderte.

In Abbildung 34 und 35 sind die Ergebnisse für die H3K27-R40-Peptide der kanonischen Form von H3 sowie der Histonvariante H3.3 dargestellt. Diese Peptide enthalten die Lysinpositionen K27, K36 und K37. Anzumerken ist, dass K37 in den Untersuchungen stets in unmodifizierter Form wiedergefunden wurde, weshalb K37 bei der weiteren Beschreibung der identifizierten Peptidformen nicht weiter berücksichtigt wird. Im Gegensatz zu den Lysinen näher am N-Terminus wurden für K27 und K36 in den A549-Zellen überwiegend methylierte Formen detektiert. Die Acetylierung dieser Positionen war hingegen mit einer relativen Häufigkeit von < 0,6 % deutlich geringer ausgeprägt. Im Basalzustand der A549-Zellen war die dimethylierte Form von K27 (H3K27me2K36unmod) die häufigste Peptidform von H3K27-R40. Dabei betrug das Vorkommen für H3 (identifiziert anhand der Peptidsequenz von H3.1) etwa 19 %, während es für die Variante H3.3 mit ca. 24 % höher lag. Daneben wurden auch andere Peptidformen nachgewiesen, darunter die vollständig unmodifizierte Form sowie verschiedene Methylierungskombinationen. Für H3 wurde K27me3K36unmod mit einer Häufigkeit von etwa 14 % als zweithäufigste Form identifiziert, während für H3.3 die dimethylierte Form K27me2K36me2 mit etwa 13 % die zweithäufigste Peptidvariante darstellte (Abbildung 34A/35A).

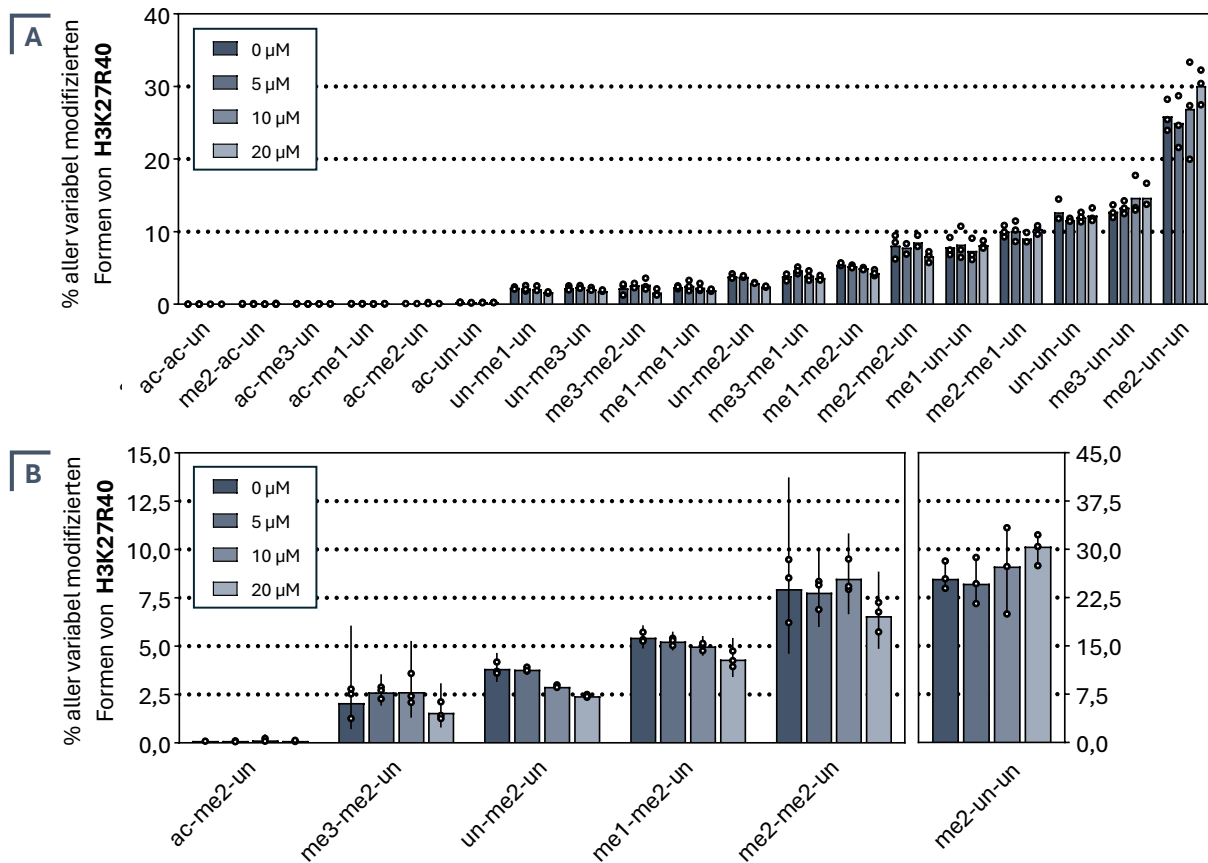


Abbildung 34 | Relatives Vorkommen der modifizierten Peptidformen von Histon H3 (K27/K36/K37) nach Trypsinverdau. Die A549-Zellen wurden für 24 h mit 5 µM bis 20 µM Natriumarsenit (NaAsO₂) behandelt und anschließend die Histonfraktionen isoliert. Die posttranslationalen Histonmodifikationen wurden mittels LC-MS/MS analysiert. Gezeigt sind die Daten für alle identifizierten modifizierten Formen des Peptids H3K27-R40 (**A**) und eine vergrößerte Darstellung der signifikant veränderten Modifikationskombinationen ± 95 % Konfidenzintervalle (**B**). Die Daten wurden aus biologischen Triplikaten erhalten, die als individuelle Punkte in den Graphen visualisiert werden, wobei die Balkenhöhe jeweils den korrespondierenden Mittelwert repräsentiert.

Beim Vergleich des basalen Vorkommens mit den Arsenit-behandelten Zellen wurden im Gegensatz zu den Peptiden näher am N-Terminus ausschließlich Veränderungen in den Methylierungsmustern beobachtet. Die stärksten Effekte wurden ab 10 µM NaAsO₂ sowohl von H3 als auch von H3.3 bei K36me₂ detektiert. Der Anteil von K36me₂ nahm ab, wobei die Effekte in Kombination mit K27unmod und K27me₁ auftraten. Dagegen wurde für K27me₂K36unmod bei der höchsten getesteten Arsenitkonzentration ein Trend zur Erhöhung des Vorkommens bei H3 und H3.3 ermittelt (Abbildung 34B / 35B).

Für die Peptide H3K56-R63, H3K64-R69, H3K79-R83 und H3K122-R128 wurde für alle Lysine fast ausschließlich die unmodifizierte Form in den unbehandelten A549-Histonextrakten wiedergefunden (Abbildungen siehe Anhang unter A.2.7). Lediglich bei H3K79 wurden daneben auch nennenswerte Anteile der monomethylierten und dimethylierten Form nachgewiesen. Eine Arsenitbehandlung der Zellen führte zu keiner Veränderung der PTMs an den genannten Lysinpositionen.

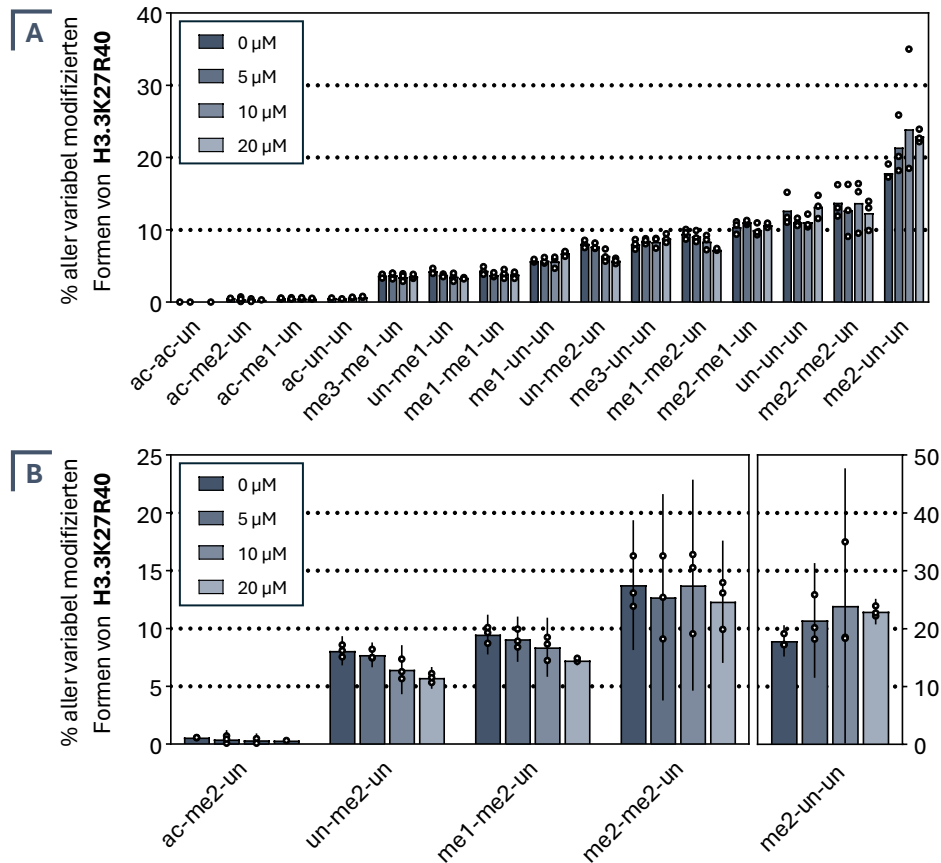


Abbildung 35 | **Relatives Vorkommen der modifizierten Peptidformen von Histon H3.3 (K27/K36/K37) nach Trypsinverdau.** Die A549-Zellen wurden für 24 h mit 5 µM bis 20 µM Natriumarsenit (NaAsO₂) behandelt und anschließend die Histonfraktionen isoliert. Die posttranslationalen Histonmodifikationen wurden mittels LC-MS/MS analysiert. Gezeigt sind die Daten für alle identifizierten modifizierten Formen des Peptids H3.3K27-R40 (**A**) und eine vergrößerte Darstellung der signifikant veränderten Modifikationskombinationen ± 95 % Konfidenzintervalle (**B**). Die Daten wurden aus biologischen Triplikaten erhalten, die als individuelle Punkte in den Graphen visualisiert werden, wobei die Balkenhöhe jeweils den korrespondierenden Mittelwert repräsentiert.

Insgesamt ermöglichten die Analysen eine detaillierte Charakterisierung der PTM-Kombinationen K9/K14, K18/K23 und K27/K36 an Histon H3, von denen einige durch Arsenit verändert wurden. In der Literatur existieren zum derzeitigen Zeitpunkt keine Studien, die ein globales Histonlandschaftsprofil von akut Arsenit-behandelten Zellen erstellt haben. Ge *et al.* (2018) führten Langzeituntersuchungen an der humanen Blasenepithelzelllinie UROtsa durch. Dabei wurde der Einfluss der biotransformierten Form von Arsenit (MMA³⁺) auf die Acetylierung von Histonen massenspektrometrisch bestimmt, wobei eine Inkubationszeit von 4 bis 14 Wochen gewählt wurde. Für H3 wurden als empfindliche Zielstrukturen K4, K9, K14, K18 und K23 identifiziert, die eine zeitabhängige Hyperacetylierung aufwiesen (Ge *et al.*, 2018). Demgegenüber zeigte die LC-MS/MS-Analyse in der vorliegenden Arbeit, dass insbesondere eine Hypoacetylierung von K14 und K18 bei einer akuten Exposition in A549-Zellen eine Rolle spielt. Zur Vervollständigung der Analyse wurde auch ein möglicher Unterschied in der Häufigkeit von H3 zu H3.3 infolge einer Arsenitexposition untersucht (Abbildung 36). Die Resultate werden auch hier als H3 und nicht als H3.1 klassifiziert, da aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit eventuell zusätzlich andere H3-Formen detektiert wurden,

die nicht eindeutig unterschieden werden konnten. Der Vergleich der summierten MS-Signale aller variabel modifizierten K27-R40-Peptidsequenzen von H3 zu H3.3 ergab jedoch keine Veränderungen. Im Mittel ergab sich eine relative Häufigkeit von H3 mit 93,4 % gegenüber H3.3 mit 6,5 % mit und ohne Arsenitbehandlung, sodass ein Einfluss auf die Gesamthäufigkeit von H3/H3.1 gegenüber H3.3 ausgeschlossen werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigten frühere Studien, dass Arsenit das Potenzial besitzt, die Transkription von kanonischen Histongenen zu beeinflussen und somit deren Inzidenz zu erhöhen. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang eine Arsenit-vermittelte verstärkte Polyadenylierung der betreffenden mRNA, die zu einer Stabilisierung der entsprechenden Transkripte führt. Dieser Polyadenylierungsprozess wurde bereits als ein kanzerogener Mechanismus von Arsenit beschrieben (Chen *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2023). Weiterführende Analysen in Arsenit-behandelten BEAS-2B-Zellen (1 μM NaAsO₂ für 48 h) zeigten, dass die durch die Polyadenylierung verstärkte Expression von H3.1 zu einer bevorzugten Bindung des Chaperons *minichromosome maintenance complex component 2* (MCM2) an H3.1 anstatt H3.3 führt. MCM2 ist unter anderem am Austausch von H3.1 durch H3.3 in besonders aktiven Chromatinregionen beteiligt. Eine Arsenit-vermittelte Überexpression von H3.1 reduziert somit die Verfügbarkeit des Chaperons für H3.3, so dass wichtige genomische Loci, darunter die Promotorregion des MT MT1F oder ribosomale DNA-Regionen, einen signifikanten Verlust von H3.3 aufweisen (Wu *et al.*, 2023). Da die Studie eine Arsenitinkubation von 48 h umfasste, könnte die verlängerte Inkubationszeit potenziell die beobachtete Diskrepanz erklären.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Arsenit potenziell an die beiden Cysteine von H3 bindet. Die AS-Sequenz von Histon H3/H3.1 enthält zwei Cysteinpositionen, C96 und C110 (siehe Abbildung 31). Durch eine Analyse der hypothetischen Massen des H3-Arsenit-Konjugats wurden allerdings keine entsprechenden Peptide identifiziert, sodass eine direkte Bindung von Arsenit an Histon H3 ausgeschlossen wurde. Dies legt nahe, dass die beobachteten hPTM-Veränderungen nicht auf eine direkte Interaktion von Arsenit mit Histon H3 zurückzuführen sind.

Somit deuten neben den genspezifischen Analysen auch die genomweiten Analysen auf einen gezielten Einfluss von Arsenit auf die posttranslationale Modifikation von Histon H3 hin.

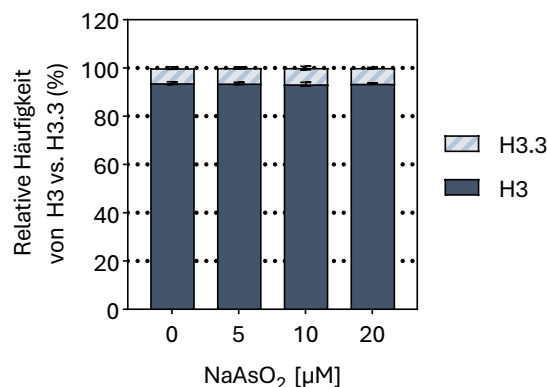


Abbildung 36 | Einfluss von Arsenit auf die relative Häufigkeit von Histon H3 vs. H3.3. Die A549-Zellen wurden für 24 h mit Natriumarsenit (NaAsO₂) behandelt, die Histone wurden isoliert und mittels LC-MS/MS detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm 95 %-Konfidenzintervalle aller summierten MS-Signale der variabel modifizierten K27-R40 Peptidsequenzen von H3 gegenüber H3.3. Die Daten wurden aus biologischen Triplikaten erhalten.

5.3 EINFLUSS VON ARSEMIT AUF *WRITER* UND *ERASER* DER HISTONACETYLIERUNG

Um mögliche Mechanismen zu identifizieren, die der beobachteten genspezifischen und globalen Hypoacetylierung zugrunde liegen, wurde der Einfluss von Arsenit auf die Aktivität von Enzymen untersucht, die für die Regulation des Histonacetylierungsstatus verantwortlich sind. Neben den *Writern* (HATs), die die Acetylgruppen auf die Histone übertragen, umfasste dies auch die *Eraser* (HDACs), die wiederum für das Entfernen der Acetylgruppen verantwortlich sind. Als antagonistische Gegenspieler sind beide Enzymklassen essenziell für die Aufrechterhaltung der Acetylierungshomöostase und tragen somit wesentlich zur Regulation der Transkription bei. Da einige dieser Enzyme kritische Cysteineinheiten in ihrer Struktur aufweisen, sind HATs und HDACs besonders anfällige Zielstrukturen für Arsenit, das aufgrund seiner hohen Thiolaaffinität potenziell mit diesen Resten interagieren kann (Shen *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018b; Han *et al.*, 2024). Zur Bestimmung der acetylierenden und deacetylierenden Gesamtaktivität der Enzyme wurde jeweils eine ELISA-basierte Methode angewandt.

5.3.1 Modifikation der HDAC-Aktivität durch Arsenit

Um den Einfluss von Arsenit auf den Histonacetylierungsstatus näher zu untersuchen, wurde die Gesamtaktivität der HDACs in unbehandelten und Arsenit-exponierten Zellkernextrakten ermittelt. Bei der verwendeten Methode wird die Aktivität verschiedener HDAC-Klassen gleichzeitig betrachtet, sodass das Ergebnis die Gesamtaktivität an Klasse I- (HDAC1,2,3 und 8), Klasse II- (4,5,6,7,9 und 10) sowie Klasse IV-Deacetylasen (HDAC11) widerspiegelt. Die NAD⁺-abhängigen Enzyme der Klasse II (SIRT1-7) wurden daher in diesen Untersuchungen nicht berücksichtigt. Für die Analyse wurden die A549-Zellen für 24 h mit NaAsO₂ behandelt und die Zellkerne entweder unmittelbar nach Behandlungsende oder nach einer zusätzlichen Regenerationsphase von 48 h extrahiert. Somit wurden nicht nur die unmittelbaren Einflüsse betrachtet, sondern auch die Persistenz der Effekte untersucht. Die Analysenergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt. Die akute Arsenitexposition führte zu einer moderaten, dosisabhängigen Reduktion der HDAC-Gesamtaktivität. Während bei den niedrigeren Konzentrationen von 5 µM und 10 µM keine statistisch signifikante Reduktion beobachtet wurde, führte eine Inkubation mit 20 µM Arsenit zu einer signifikanten Reduktion der HDAC-Aktivität auf weniger als 86 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 37A). Die für 48 h nachinkubierten Zellen wiesen ein sehr ähnliches Muster auf. Während bei 5 µM und 10 µM weiterhin kein signifikanter Rückgang der Enzymaktivität zu beobachten war, blieb die Verringerung der Enzymaktivität bei 20 µM auf ca. 86 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhalten (Abbildung 37B).

Zusätzlich zur Behandlung mit Arsenit wurde TSA als klassischer HDAC-Inhibitor als Positivkontrolle eingesetzt. Frühere Studien hatten in diesem Zusammenhang bereits gezeigt, dass Arsenit ein ähnliches HDAC-inhibierendes Potenzial wie TSA besitzt (Ramirez *et al.*, 2008). Um ein potenziell

synergistisches oder antagonistisches Verhalten diskutieren zu können, wurden die Kernextrakte der unbehandelten Kontrolle sowie der niedrigsten (5 μM) und der höchsten (20 μM) Arsenitkonzentration mit 2 μM TSA versetzt und die Enzymaktivität im Vergleich zur vollständig unbehandelten Kontrolle untersucht. Eine reine TSA-Behandlung der A549-Kernextrakte führte zu einer signifikanten Reduktion der HDAC-Gesamtaktivität auf etwa 68 % relativ zur unbehandelten Kontrolle. Im Vergleich zur Negativkontrolle (ohne Arsenit- oder TSA-Behandlung) führte die TSA-Behandlung der Kernextrakte aus Arsenit-behandelten Zellen zu einer signifikanten Reduktion der HDAC-Gesamtaktivität auf ca. 66 % bzw. 60 % (Abbildung 37C). Dies wurde ebenso für die Experimentreihen mit Nachinkubation detektiert. Eine Exposition der nachinkubierten, unbehandelten Kernextrakte mit TSA führte ebenso zu einer signifikanten Reduktion der HDAC-Enzymaktivität auf ca. 70 %, wohingegen bei den Arsenit-behandelten Kernextrakten mit 5 μM und 20 μM Arsenit ein Rückgang auf etwa 66 % bzw. 59 % der HDAC-Gesamtaktivität verzeichnet wurde (Abbildung 37D). Anzumerken ist, dass innerhalb der Behandlungsgruppen kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt wurde.

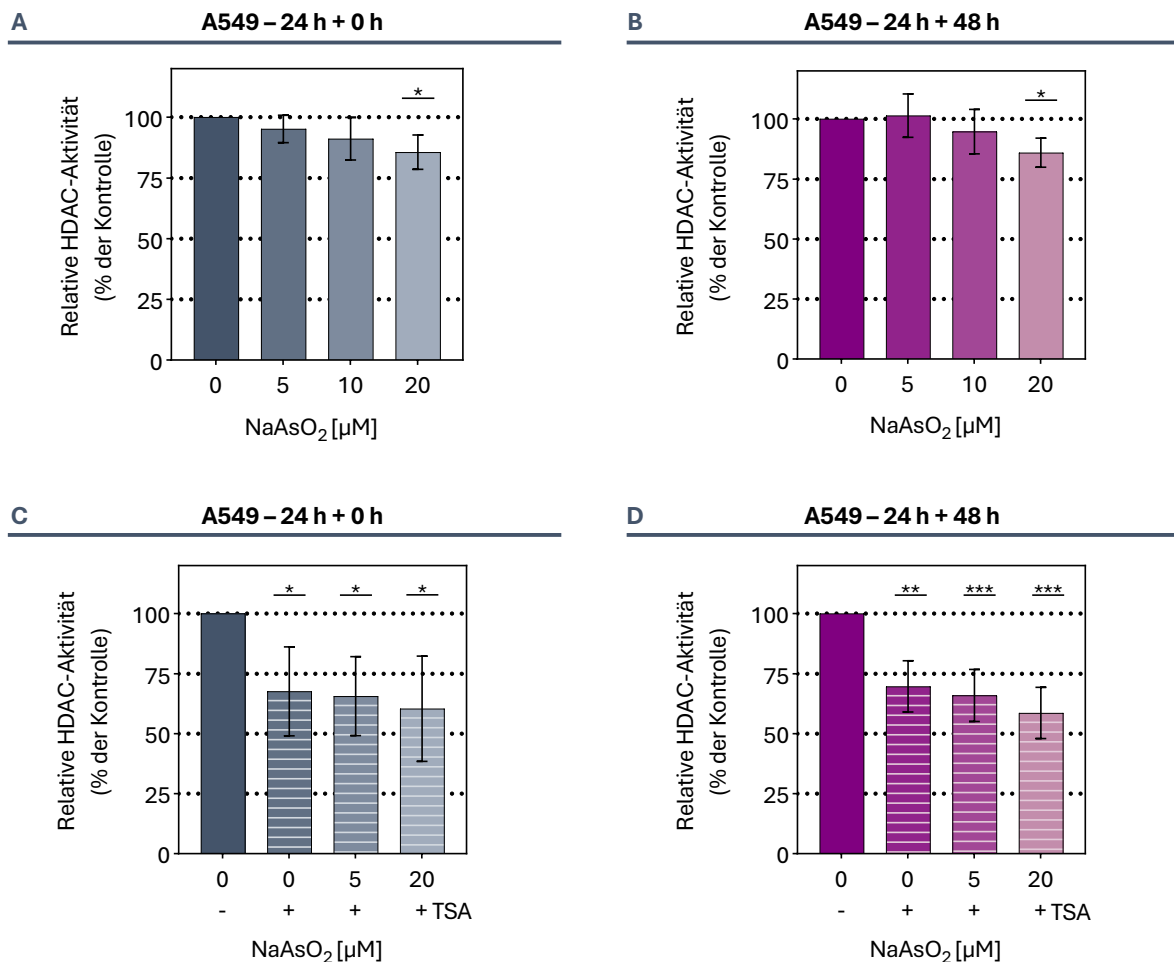


Abbildung 37 | Effekt von Natriumarsenit und einer Nachinkubation auf die HDAC-Aktivität von A549-Zellen.

Die Zellen wurden für 24 h mit Natriumarsenit (NaAsO₂) behandelt und entsprechend 0 h (A/C) oder 48 h (B/D) Arsenit-frei nachinkubiert. Während in (A/B) die Ergebnisse für die Arsenitbehandlung dargestellt sind, zeigen (C/D) die Resultate bei einer zusätzlichen Trichostatin A (TSA)-Behandlung der isolierten Zellkernextrakte mit 2 μM TSA. Die HDAC-Aktivität wurde mittels ELISA detektiert. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die statistische Signifikanz zwischen der Negativkontrolle und den Behandlungen wurde mittels *one-way* ANOVA und Dunnett's Post-hoc-Test ermittelt: */**/** (p < 0,05/0,01/0,001).

Der Einfluss von Arsenit auf HDACs wird in der aktuellen Fachliteratur wenig diskutiert. Eine Studie von Ramirez *et al.* in HepG2-Zellen demonstrierte jedoch, dass Arsenit als potenter Suppressor der HDAC-Aktivität fungieren kann. Die Untersuchungen zeigten ebenfalls, dass die durch Arsenit-induzierte Inhibition mit der Hemmung durch den klassischen HDAC-Inhibitor TSA vergleichbar ist (Ramirez *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit keine eindeutige Effektverstärkung durch TSA bei den Arsenit-behandelten A549-Kernextrakten beobachtet. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte die erhöhte Sensitivität der HepG2-Zellen gegenüber Arsenit-induziertem zellulären Stress sein, wie durch einen Vergleich mit einer anderen Studie ersichtlich wird (Stöber *et al.*, 2023). Darüber hinaus sind die unterschiedlichen Konzentrationen von TSA und Arsenit unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen vermutlich ebenso entscheidend für die beobachteten Effekte. Zusätzlich wurden in der vorliegenden Arbeit nur die Kernextrakte mit TSA behandelt, nicht jedoch die Zellen selbst. Anzumerken ist, dass eine Reduktion der Enzymaktivität auch mit einem verminderten Vorkommen der entsprechenden Enzyme korrelieren kann. Eine *in vivo*-Studie in Ratten lieferte hierfür zusätzliche Evidenz. Hier wurde sowohl auf transkriptioneller als auch auf der Proteinebene bereits eine Arsenit-vermittelte HDAC-Repression nachgewiesen (Li *et al.*, 2023). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Transkription verschiedener HDAC-Isoformen in Arsenit-behandelten A549-Zellen ermittelt. Während nach Expositionsende keine signifikanten transkriptionellen Veränderungen festgestellt werden konnten, zeigte sich nach einer zusätzlichen Zellregenerationszeit von 48 h ein moderater Rückgang der mRNA-Gehalte von *HDAC2*, sodass ein Effekt von Arsenit auf die Gen- bzw. Proteinexpression der HDACs nicht ausgeschlossen werden kann.

Insgesamt demonstrieren die Ergebnisse, dass Arsenit die Fähigkeit besitzt, die Enzymaktivität der HDACs persistent zu inhibieren, wobei für die A549-Zelllinie nur eine moderate Abnahme der Aktivität beobachtet wurde. Da jedoch in den vorherigen epigenetischen Analysen dieser Arbeit eine signifikante Hypoacetylierung detektiert wurde, die eher auf eine Erhöhung der Gesamtaktivität der HDACs hindeutete, stellte sich die weiterführende Frage, inwieweit sich die Gesamtaktivität der HATs als antagonistische Gegenspieler der HDACs verändert.

5.3.2 Beeinflussung der HAT-Aktivität durch Arsenit

Neben den HDACs nehmen auch die HATs eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung des Histonacetylierungsstatus ein. Analog zu den durchgeführten HDAC-Analysen wurde die Gesamtaktivität der HATs in Arsenit-behandelten und unbehandelten Zellkernextrakten der A549-Zelllinie ermittelt. Der Fokus der Untersuchung lag auf der Identifikation potenzieller Veränderungen der HAT-Aktivität nach einer akuten Inkubation der Zellen mit NaAsO₂ sowie einer zusätzlichen zweitägigen Regenerationsphase ohne Arsenit. Die Analysen wurden mittels einer ELISA-basierten Methode durchgeführt. Analysiert wurde die HAT-Gesamtaktivität der fünf HAT-Enzymklassen GNAT, MYST, TAFII250, P300/CBP und Kernrezeptor-Aktivatoren wie *nuclear receptor coactivator 3* (NCOA3). Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 38 dargestellt.

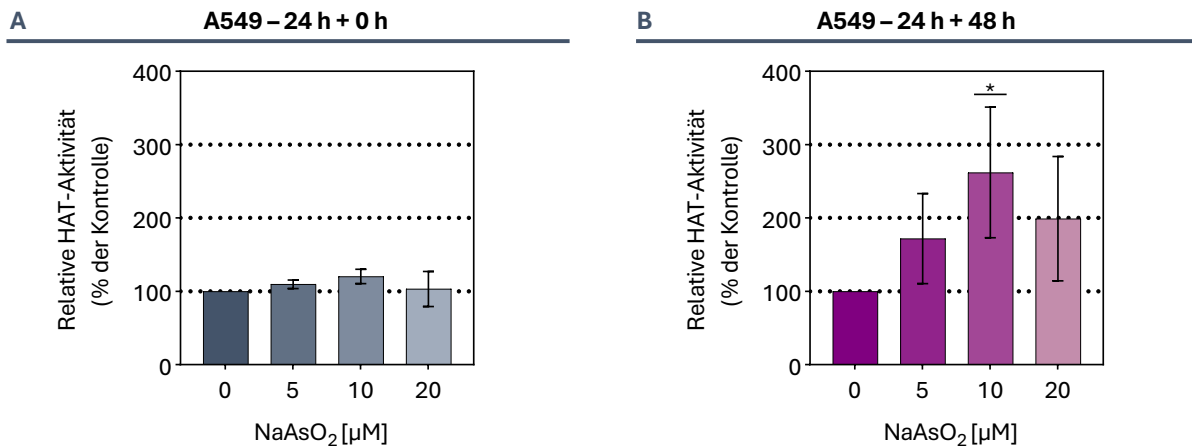


Abbildung 38 | Effekt von Natriumarsenit und einer Nachinkubation auf die HAT-Aktivität von A549-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit Natriumarsenit (NaAsO₂) behandelt und entsprechend 0 h (A) oder 48 h (B) Arsenit-frei nachinkubiert. Die HAT-Aktivität wurde mittels ELISA detektiert. Gezeigt werden die Mittelwerte ± SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die statistische Signifikanz zwischen der Negativkontrolle und den Behandlungen wurde mittels *one-way* ANOVA und Dunnett's Post-hoc-Test ermittelt: * ($p < 0,05$).

Die Kernextrakte zeigten unmittelbar nach Arsenitbehandlung eine moderate Veränderung der HAT-Aktivität. Bei 5 µM und 10 µM NaAsO₂ wurde ein schwacher aktivitätssteigerender Trend auf ca. das 1,1-fache bzw. 1,2-fache beobachtet, bei 20 µM blieb die HAT-Aktivität unverändert (Abbildung 38A). Nach zweitägiger Nachinkubation ohne Arsenit zeigte sich ein deutlicher Anstieg der HAT-Aktivität. Bei 5 µM und 20 µM NaAsO₂ lag die Zunahme bei 72 % bzw. 99 %. Der stärkste Effekt wurde bei 10 µM mit einem signifikanten Anstieg um 162 % verzeichnet (Abbildung 38B). Auffällig ist, dass dieses Phänomen erst mit einer Verzögerung von 48 h nach Beendigung der Arsenitbehandlung auftrat. Die Ergebnisse dieser Analyse deuten somit auf eine verzögerte, aber ausgeprägte Arsenit-vermittelte Erhöhung der HAT-Aktivität hin, insbesondere bei 10 µM NaAsO₂.

Vergleichbare Studien zum Einfluss von Arsenit auf die HAT-Gesamtaktivität liegen bislang nicht vor. Die beobachteten Aktivitätsänderungen deuten, analog zu den HDAC-Resultaten, nicht auf eine unmittelbare Hypoacetylierung hin. In der Literatur sind wenige HATs beschrieben, die nachweislich durch Arsenit beeinflusst werden. In Mausfibroblasten wurde bereits gezeigt, dass die HAT p300 durch Arsenit auf Transkriptions- und Proteinebene reprimiert wird (Zhu *et al.*, 2018). Da p300 H3K18 acetylieren kann, korreliert eine reduzierte Aktivität mit einem reduzierten Vorkommen von H3K18ac. Eine Studie zeigte auch, dass spezifische CoRs wie TRIM33 an der Regulation von H3K18ac und der p300-abhängigen Rekrutierung beteiligt sind (Luo *et al.*, 2019). Neben p300 ist auch *human ortholog of males absent on the first* (hMOF) eine potenziell Arsenit-sensitive HAT. *In vitro* wurde am Beispiel von ATO bereits ein Aktivitätsverlust von hMOF gezeigt, vermittelt durch eine Interaktion von Arsen mit dem C2CH-Zinkfinger (Liu *et al.*, 2015), was auch für Arsenit möglich ist.

Insgesamt sind die beobachteten Arsenit-induzierten Veränderungen des Histonacetylierungsstatus unter Berücksichtigung des gestörten Gleichgewichts der beiden antagonistischen Enzyme vermutlich nicht auf eine veränderte Gesamtaktivität der HATs oder HDACs zurückzuführen. Vielmehr deuten die erhobenen Daten darauf hin, dass Arsenit gezielt mit spezifischen HDACs, HATs oder über vermittelte epigenetische Faktoren wie CoRs interagiert.

6 ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Forschung untersucht den Einfluss von Arsenit auf epigenetische Regulationsmechanismen, mit Fokus auf der *in vitro*-Analyse Arsenit-vermittelter genomweiter und genspezifischer Veränderungen der PTMs von Histon H3, insbesondere im Zusammenhang mit der DNA-Reparatur und der Persistenz dieser Effekte.

Arsenit ist ein bekanntes Humankarzinogen, dessen molekulare Mechanismen bislang nicht vollständig aufgeklärt sind. Ein bedeutender kanzerogener Wirkmechanismus ist die Fähigkeit von Arsenit zur Inhibierung relevanter DNA-Reparaturprozesse, einschließlich der BER, MMR und NER (Tam *et al.*, 2020). Neben diversen Erkenntnissen hinsichtlich der Interaktionen von Arsenit mit DNA-Reparaturproteinen, wie dem Zinkfingerprotein PARP-1 (Hartwig *et al.*, 2003; Walter *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2014) wurde bereits aufgezeigt, dass Arsenit nicht nur DNA-Reparaturproteine funktionell beeinträchtigt, sondern auch zu einer Repression der Transkription entsprechender Zielproteine führt (Hamadeh *et al.*, 2002; Matthäus *et al.*, 2023). Neben DNA-Reparaturproteinen betrifft dies zahlreiche weitere Gene, vor allem Gene der zellulären Stressantwort (Hamadeh *et al.*, 2002; Banerjee *et al.*, 2021; Matthäus *et al.*, 2023; Stößer *et al.*, 2023). Daher liegt die Vermutung nahe, dass Arsenit auch die zugrunde liegenden epigenetischen Prozesse der Transkription modifizieren kann. Die postulierte Wirkung von Arsenit auf die epigenetische Regulation, vor allem die globale Dysregulation der DNA- und Histonmodifikation, wurde in vergangenen Studien bestätigt (Martinez-Zamudio und Ha, 2011; Bhattacharjee und Paul, 2020). Zunehmend verdichten sich die Hinweise darauf, dass auch DNA-sequenzspezifische Veränderungen diverser hPTM-Muster, einschließlich Acetylierungs- und Methylierungsmarkierungen von Histon H3, die Arsenit-induzierte transkriptionelle Dysregulation determinieren. Es wurde eine Veränderung ausgewählter hPTM-Muster nachgewiesen, die mit der Induktion von Genen der oxidativen Stressantwort sowie der Inhibition BER- und NER-relevanter Gene korreliert (Zhang *et al.*, 2020; Ding *et al.*, 2021; Ma *et al.*, 2023). Somit stellt die Modifikation der Histone ein vulnerables Ziel für Arsenit-vermittelten zellulären Stress dar. Da die Dysregulation der hPTMs maßgeblich zum kanzerogenen Potenzial von Arsenit beiträgt (Islam *et al.*, 2022), identifiziert diese Arbeit insbesondere Arsenit-sensitive hPTMs im Zusammenhang mit der DNA-Reparaturinhibition und leistet einen wichtigen Beitrag zur mechanistischen Aufklärung der Auswirkungen von Arsenit auf die Modifikation der Histone.

Zur genaueren Untersuchung der Beteiligung von Histon H3-PTMs an der Arsenit-induzierten zellulären Stressantwort wurde die humane Lungentumorzelllinie A549 als primäres Testsystem gewählt. Diese Zelllinie besitzt eine p53-profiziente Wildtyp-DNA-Schadensantwort (Lehman *et al.*, 1991), welche die Verwendung der Zellen für DNA-Reparaturstudien legitimiert. Zudem stellt die Lunge ein Zielorgan Arsenit-induzierter Toxizitätsmechanismen dar (Tam *et al.*, 2020). Zu Beginn der Experimente wurden geeignete Inkubationsbedingungen für die epigenetischen Untersuchungen

identifiziert. Dabei wurde nicht nur der Konzentrationsbereich von NaAsO_2 festgelegt, sondern auch die Dauer der Arsenit-freien Zellregenerationsphase (24 h bzw. 48 h). Die getesteten Konzentrationen orientierten sich an der humanen Arsenexposition sowie an vorangegangenen Studien (Matthäus *et al.*, 2023; Stöber *et al.*, 2023). Die europäische Allgemeinbevölkerung weist meist niedrige Arsengehalte von etwa 30 nM im Blut auf (portugiesische Studie), beruflich Exponierte bis zu 300 nM (Serrazina *et al.*, 2018). In Arsen-kontaminierten Regionen wie in Teilen von Indien oder Bangladesch wurden beispielsweise Werte bis zu 9 μM im Blut dokumentiert. Dabei ist von Bedeutung, dass der WHO-Grenzwert von 10 $\mu\text{g/L}$ Arsen im Grundwasser in diesen Gebieten teilweise bis zu 200-fach überschritten wird (Kumar *et al.*, 2016). Im Fokus der initialen Experimente stand die Persistenz Arsenit-vermittelter Zellreaktionen. Untersucht wurden zunächst die akute Zytotoxizität, die Zellzyklusphasenverteilung, die intrazelluläre Arsenaufnahme, deren subzelluläre Verteilung sowie die Genexpression. Zu Beginn wurden die A549-Zellen für 24 h mit NaAsO_2 im niedrigen mikromolaren Bereich behandelt und für ein bis zwei Tage in Arsenit-freiem Medium nachinkubiert. Die Untersuchungen zur akut zytotoxischen Wirkung von Arsenit ergaben ein gleichbleibendes Zytotoxizitätsprofil bis zu 48 h nach der Exposition. Konzentrationen $\leq 25 \mu\text{M}$ Arsenit zeigten einen statistisch nicht signifikanten Rückgang der intrazellulären ATP-Menge, wobei bei Konzentrationen $\leq 20 \mu\text{M}$ weder eine Abnahme der Lebendzellzahl noch eine Beeinflussung der Zellzyklusprogression verzeichnet wurde. Somit führte eine einmalige akute Exposition der Zellen mit NaAsO_2 ($\leq 20 \mu\text{M}$) zu einem persistierenden moderaten Zytotoxizitätslevel. Diese Daten stimmen mit den Resultaten unterschiedlicher Forschungsgruppen überein (Ebert *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2023), wobei teilweise von einer höheren Zytotoxizität in der A549-Zelllinie berichtet wird (Yin *et al.*, 2022). Während in dieser Arbeit eine unveränderte Zellzyklusverteilung (bei maximal 20 μM) beobachtet wurde, zeigten andere Studien bereits ab 10 μM NaAsO_2 einen G2/M-Arrest in der A549-Zelllinie, wobei jedoch ein anderes Nährmedium verwendet wurde (Jiang *et al.*, 2013). Komissarova *et al.* analysierten zusätzlich das Nachinkubationsverhalten in Arsenit-behandelten U2OS-Zellen und beobachteten mit zunehmender Regenerationszeit eine verstärkte Zytotoxizität (Komissarova *et al.*, 2005). Dies könnte auf Zelllinien-spezifische Nachinkubationseffekte hinweisen, wobei ein möglicher Faktor die ROS-Toleranz der Zellen ist, die in der A549-Zelllinie aufgrund ihrer konstitutiven Überexpression von Nrf2 womöglich erhöht ist (Kweon *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008a). Entsprechend ist auch der GSH-Gehalt der A549-Zelllinie deutlich höher als in anderen Epithelzellen, etwa in HepG2-Zellen (Zhang *et al.*, 2018a).

Zur genaueren Charakterisierung der zellulären Bedingungen unter den gewählten Inkubationsparametern wurde anschließend die intrazelluläre Arsenaufnahme mittels GF-AAS bestimmt. Dabei wurde nicht nur der aufgenommene zelluläre Gesamtarsengehalt analysiert, sondern auch die nukleäre Aufnahme betrachtet, um eine zusätzliche subzelluläre Lokalisierung des Halbmetalls zu ermöglichen. Unmittelbar nach der Behandlung wurde eine dosisabhängige Akkumulation der Gesamtarsenkonzentration detektiert, welche mit vorhandenen Literaturdaten der A549-Zelllinie vergleichbar war (Meyer *et al.*, 2018). Zusätzlich ergab die AAS-Analyse, dass maximal ein Drittel des Arsens im Zellkern unmittelbar vorhanden war (bei 20 μM). Frühere subzelluläre Lokalisationsstudien mit ATO zeigten, dass sich Arsen vermehrt im Nukleolus nicht-apoptotischer

Zellen anreichert (Huang *et al.*, 2022). In dieser Arbeit wurden hingegen nach einer Zellregenerationsphase von 48 h nur noch intrazelluläre Spuren Mengen von Arsen nachgewiesen. Folglich führte eine Exposition der A549-Zellen gegenüber NaAsO_2 zunächst zu einer starken Anreicherung im Zellkern und Zytoplasma, wobei eine Nachinkubation der Zellen in Arsenit-freiem Medium zu einer sukzessiven, nahezu vollständigen Abnahme der intrazellulären Arsenkonzentration nach 48 h führte. Dies deutet auf eine effiziente extrazelluläre Ausschleusung von Arsenit hin, möglicherweise bedingt durch den generierten Konzentrationsgradienten, die Verdünnungseffekte aufgrund der Zellproliferation oder die Exkretion durch vorhandene Efflux-Transporter. Eine frühere ATO-Studie zeigte ebenfalls die Exkretion von Arsen *in vitro* (Huang *et al.*, 2022). Der in dieser Arbeit detektierte Arsenverlust ist für die Einordnung der nachfolgenden Experimente von besonderer Relevanz, da eventuell persistierende Effekte nicht auf eine dauerhafte intrazelluläre Akkumulation von Arsenit zurückzuführen sein können.

Das kanzerogene Potenzial von Arsenit korreliert mit dessen Fähigkeit zur transkriptionellen Dysregulation zahlreicher Gene (Hamadeh *et al.*, 2002; Banerjee *et al.*, 2021; Matthäus *et al.*, 2023; Stöber *et al.*, 2023). Eine persistente Veränderung dieser Genexpressionsmuster könnte auf die Ausbildung eines zellulären Gedächtnisses hindeuten. Um eine beständige Transkriptionsveränderung zu prüfen, wurden Expressionsprofile zahlreicher Gene der zellulären Stressantwort und epigenetischer Regulatoren mittels HT-RT-qPCR erfasst. Hierfür wurden A549-Zellen in einem Dosisbereich von 1 μM bis 25 μM mit NaAsO_2 für 24 h behandelt und für die Nachinkubationsversuche für weitere 24 h oder 48 h ohne Arsenit weiterkultiviert. Die Behandlung der Zellen mit Arsenit führte unmittelbar nach der Exposition zu einem Genexpressionsprofil, das mit den in der Literatur mehrfach dokumentierten Toxizitätsmustern übereinstimmte (Flora, 2011; Tam *et al.*, 2020; Matthäus *et al.*, 2023). Signifikante Veränderungen traten meist ab 10 μM NaAsO_2 auf. In einigen Fällen zeigte sich bereits ab 1 μM ein entsprechender Trend. Sowohl die Induktion inflammatorischer Mediatoren als auch die Expression zellulärer Stressmarker wurden detektiert. Auch wurden vermehrt Metall-bindende MTs induziert. Daneben zeigten sich verringerte Transkriptmengen für Gene des zellulären antioxidativen Schutzsystems sowie eine moderate Reduktion aller hier untersuchten DNA-Reparaturgene. Auch die Analyse der epigenetischen Gene lieferte fast ausschließlich geringfügig verringerte mRNA-Gehalte. Interessanterweise führte eine Arsenit-freie Nachinkubation der Zellen zu einer auftretenden Effektpersistenz, wobei manche Gencluster zusätzlich eine Effektverstärkung mit zunehmender Nachinkubationszeit aufwiesen. Dieses Phänomen zeigte sich besonders deutlich im Cluster der DNA-Reparatur sowie der epigenetischen Regulation. Neben den persistierenden Transkriptionseffekten zeigten sich auch zeitlich verzögerte Zellreaktionen, insbesondere in oxidativen Stressantwortgenen. Abbildung 39 fasst die zeitabhängigen Veränderungen der Transkriptionsraten der untersuchten Gencluster zusammen. Angesichts des nahezu vollständigen Verlusts des intrazellulären Arsengehalts nach 48 h legen die Ergebnisse nahe, dass Arsenit entweder dauerhaft mit spezifischen molekularen Zielstrukturen interagiert oder bereits nach akuter Exposition eine Art Zellgedächtnis entsteht. Für die folgenden epigenetischen Analysen wurden Arsenitkonzentrationen von 5-20 μM sowie eine 48-stündige Nachinkubation gewählt, um die Überlebensfähigkeit der Zellen zu erhalten und potenziell zelluläre Erholungsprozesse zu erfassen.

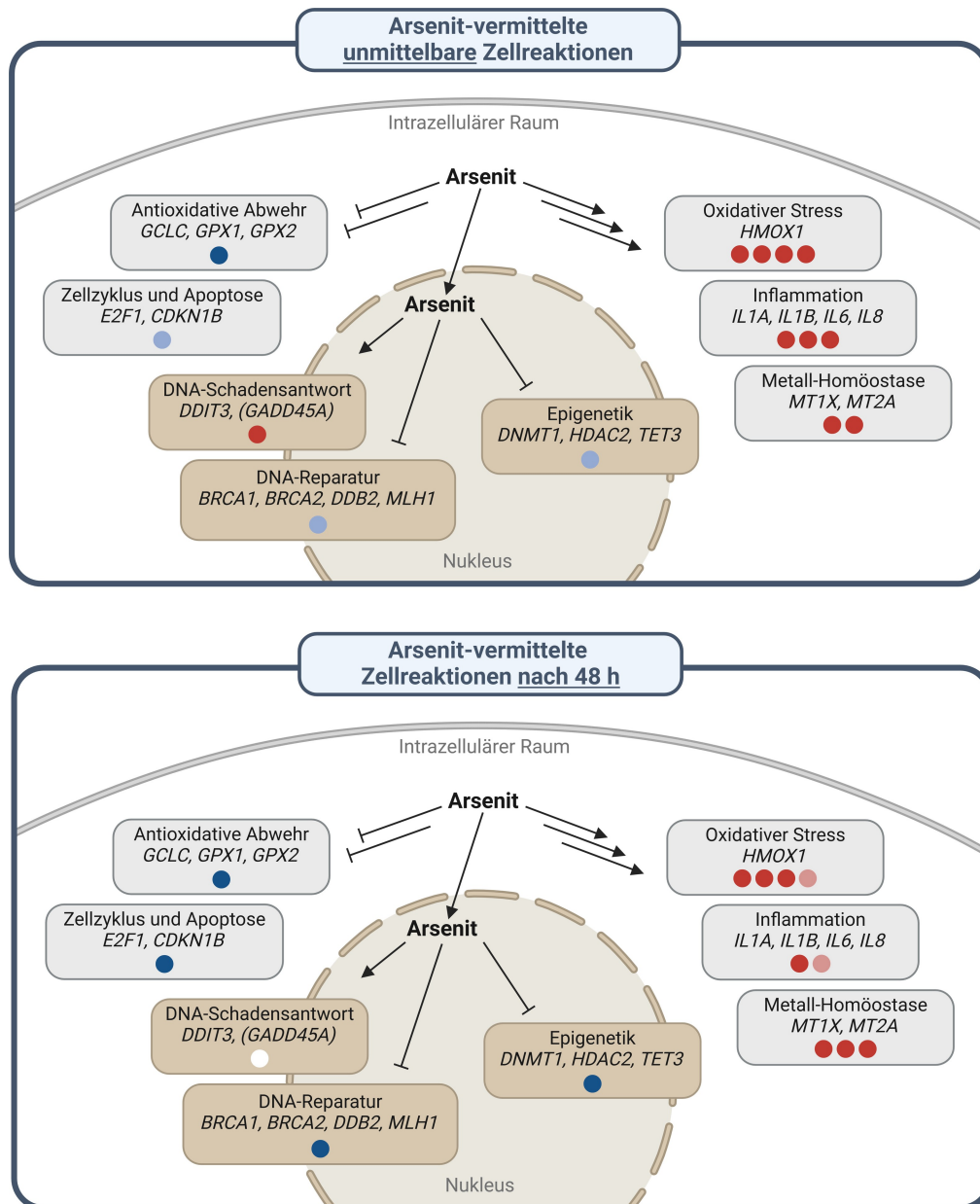


Abbildung 39 | Zeitliche Veränderungen Arsenit-vermittelter transkriptioneller Zellreaktionen.

Schematisches Schaubild der beobachteten zeitlichen Dynamik der Transkriptionsveränderungen der untersuchten Gencluster unmittelbar nach Behandlung mit Natriumarsenit (NaAsO_2) für 24 h bzw. nach einer Arsenit-freien Zellregenerationsphase von 48 h. Dargestellt sind eine Aktivierung in Rottönen, eine Inhibition in Blautönen und der Basalzustand in Weiß. Die Intensität der Farben und die Anzahl der Effektpunkte korrespondieren mit der Stärke der jeweiligen Effekte. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

Insgesamt demonstrieren die Ergebnisse, dass eine einmalige akute Exposition mit NaAsO_2 zu anhaltenden zellulären Implikationen führen kann. Besonders relevant ist die in dieser Arbeit beobachtete Fähigkeit von Arsenit, DNA-Reparaturgene persistent zu reprimieren. Die beständige transkriptionelle Repression lässt sich jedoch nicht durch eine direkte Interaktion mit Arsenit erklären. Vielmehr deutet dies auf die Beteiligung eines sekundären Mechanismus hin, der möglicherweise zur Etablierung eines zellulären Gedächtnisses beiträgt. Vor allem epigenetische Mechanismen spielen hierbei eine zentrale Rolle, da sie als Bestandteile zellulärer Adaptationsprozesse fungieren und somit die Plastizität der Zellen ermöglichen (Devaskar und Raychaudhuri, 2007).

Ein zentraler Mechanismus der epigenetischen Regulation ist die PTM der Histone, die durch die Steuerung der Chromatinstruktur maßgeblich die Transkription koordiniert (Millán-Zambrano *et al.*, 2022). Einige Studien demonstrierten bereits, dass Arsenit das Vorkommen von hPTMs beeinflussen kann (Martinez-Zamudio und Ha, 2011; Howe und Gamble, 2016; Bhattacharjee und Paul, 2020). Es häufen sich die Hinweise, dass Arsenit hPTMs insbesondere in Promotoren von DNA-Reparaturgenen verändert und dadurch potenziell eine transkriptionelle Dysregulation dieser verursacht (Zhang *et al.*, 2020; Ding *et al.*, 2021). Um den Einfluss von Arsenit auf spezifische hPTMs in der Promotorregion Arsenit-dysregulierter Gene zu untersuchen, wurde eine CHIP-qPCR-Analyse angewandt. Analysiert wurden die Promotorbereiche von *MPG* und *XRCC1* (BER), *MLH1* und *MSH2* (MMR) sowie *XPA* und *XPC* (NER) hinsichtlich des Vorkommens transkriptionsaktivierender hPTMs (H3K4me3, H3K9ac, H3K18ac) und einer transkriptionsreprimierenden Modifikation (H3K27me3). Für alle hier untersuchten Gene existieren Studien, die deren transkriptionelle Repression durch Arsenit bestätigen (Holcomb *et al.*, 2017; Bhattacharjee *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020; Ding *et al.*, 2021). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine Arsenit-induzierte Reduktion der Transkription von *MLH1*, *MSH2*, *XPA* und *XPC* gezeigt. Die genspezifischen Untersuchungen der hPTMs belegen, dass Arsenit eine DNA-sequenzspezifische Hypoacetylierung ausgewählter DNA-Reparaturgene verursacht. Bei akuter Exposition der A549-Zelllinie mit 20 μM NaAsO₂ wurde eine verminderte Acetylierung von H3K9 und H3K18 in den Promotoren von *MPG* und *MLH1* beobachtet. Zudem nahm H3K18ac auch bei *MSH2* und *XPA* ab. Die stärksten Effekte wurden dabei in der Promotorregion von *MSH2* ermittelt. Bereits ab 5 μM NaAsO₂ wurde hier eine dosisabhängige Reduktion von H3K18ac festgestellt. Nach einer zweitägigen Arsenit-freien Regenerationsphase war die Hypoacetylierung jedoch nicht mehr nachweisbar, was auf einen transienten histonmodulierenden Effekt hindeutet. Innerhalb des gewählten experimentellen Ansatzes schien insbesondere die Histonacetylierung von den Arsenit-vermittelten Effekten betroffen zu sein, da weder bei H3K4me3 noch bei H3K27me3 Veränderungen beobachtet wurden. Anzumerken ist, dass stets ein Promotor-Sequenzabschnitt betrachtet wurde, wobei sich die Primer in einem Bereich von ± 500 bp um die TSS befanden.

In der Literatur wird eine Hypoacetylierung in Promotorregionen meist mit einer verminderten Transkriptionsrate der betreffenden Gene in Verbindung gebracht (Verdin und Ott, 2015; Millán-Zambrano *et al.*, 2022). Eine frühere Studie zeigte, dass eine Arsenitbehandlung von HaCaT-Zellen zu einer Hypoacetylierung von H3K18 im Promotor von *XPA*, *XPD* und *XPF* führt (Zhang *et al.*, 2020). Dies legt nahe, dass die beobachtete Hypoacetylierung bei *XPA* möglicherweise gezielt durch Arsenit induziert wird und unabhängig von der Zellspezies auftritt. Auch hinsichtlich der beobachteten Hypoacetylierung von H3K9 und H3K18 untermauern die Ergebnisse die postulierte Annahme von Zhang *et al.*, dass Arsenit gezielt hPTMs im Promotorbereich von *MPG* verändert, was eine verringerte Transkription von *MPG* verursachen könnte. Zhang *et al.* demonstrierten bereits in der Leberzelllinie L-02, dass Arsenit zu einer vermehrten Anreicherung der repressiven hPTM H3K9me2 im Promotor von *MPG* führt (Zhang *et al.*, 2020). Da Genexpressionsänderungen meist durch das komplexe Zusammenspiel verschiedener Histonmodifikationsmuster entstehen, stützen die in dieser Arbeit ermittelten hPTM-Veränderungen die Annahme, dass Arsenit eine hPTM-vermittelte, potenziell Zelllinien-unabhängige Inhibition von *MPG* induziert. Die ebenso detektierte Hypoacetylierung der

MMR-Gene *MLH1* (H3K9 und H3K18) und *MSH2* (H3K18) lässt vermuten, dass auch die MMR von den durch Arsenit induzierten hPTM-Veränderungen betroffen ist. Besonders die Beobachtungen, dass bei *MLH1* beide untersuchten Acetylierungsmuster vermindert vorlagen und sich bei *MSH2* die Hypoacetylierung von H3K18 schon ab 5 μ M NaAsO₂ manifestierte, weisen auf eine mechanistisch bedeutende Dysregulation der Histonacetylierung hinsichtlich der MMR-Inhibition durch Arsenit hin. Die zentrale Funktion der MMR-Inhibition bei der metallinduzierten Tumorentstehung wurde schon mehrfach für andere Metallverbindungen, wie Chromat, gezeigt. Dabei ist die durch die MMR-Inhibition einhergehende Mikrosatelliteninstabilität ein entscheidender Mechanismus der Chromat-induzierten Kanzerogenität (Holmes *et al.*, 2008; Wise *et al.*, 2008). Die Relevanz der MMR-Inhibition für die Tumorentstehung durch Arsenit ist aktuell jedoch nicht geklärt.

Interessanterweise demonstrieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass Arsenit keine allgemeine Hypoacetylierung aller untersuchten Genregionen bewirkt, sondern gezielt Veränderungen induziert. Unklar ist, wie Arsenit eine genspezifische Deacetylierung ausgewählter Histonpositionen auslöst. Bekannt ist, dass einige histon(de)acetylierende Enzyme intrinsisch spezifische Modifikationsstellen im Histonprotein bevorzugen oder in manchen Fällen, wie bei der HAT hMOF, die Acetylierung ausschließlich an einer Position (H4K16 für hMOF) durchführen (Smith *et al.*, 2000). Eine Modulation der hPTM-Muster an bevorzugten DNA-Loci ist somit durch die Interaktion selektiver histonmodifizierender Enzyme mit genspezifischen Faktoren möglich. In diesem Zusammenhang spielt die Interaktion von HATs und HDACs mit sequenzspezifischen DNA-Bindungsfaktoren, darunter TFs und Coregulatoren, eine Rolle. In der Literatur werden zwei Theorien diskutiert, wie eine Substanz DNA-Loci-spezifische Veränderungen ausgewählter hPTMs verursachen kann. Einerseits ist eine genspezifische Hypoacetylierung durch eine physische Interaktion von selektiven HDACs mit TFs möglich, wodurch die Enzyme sequenzspezifisch an das Chromatin angelagert werden und zu einer Deacetylierung der bevorzugten Substrate innerhalb des Chromatinanlagerungsbereichs führen können. Dieses Phänomen wurde bereits für die Hypoacetylierung von H3K18 durch SIRT7 in ELK4-regulierten Promotorregionen beschrieben. Eine Behandlung mit dem viralen Protein E1A erhöhte die Expression von ELK4 und führte, durch SIRT7 vermittelt, zu einer gezielten Reduktion von H3K18ac an ELK4-spezifischen Genloci (Barber *et al.*, 2012). Eine weitere Möglichkeit ist die DNA-sequenzspezifische Modifikation der Histone eingeleitet durch Coregulatoren. Coregulatoren sind Proteine mit einer hohen strukturellen und funktionellen Diversität, die zellzyklusabhängig als Coaktivatoren oder CoRs der Transkription wirken. Sie besitzen die Fähigkeit, direkt an TFs zu binden, die Anlagerung von epigenetischen Multiproteinkomplexen zu vermitteln, sich direkt an spezifische Promotoren von Zielgenen anzulagern und aufgrund ihrer Bromodomäne auch direkt an spezifische Modifikationsstellen der Histonproteine zu binden (Delcuve *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2019; Nuñez *et al.*, 2024). Die letzten beiden Aspekte wurden beispielsweise schon für TRIM33 beschrieben, welches sich spezifisch an Zielgene anlagert und über dessen Bromodomäne die Erkennung sowie Bindung von H3K18ac ermöglicht (Luo *et al.*, 2019; Nuñez *et al.*, 2024). Ob Arsenit einen ähnlichen Mechanismus vermittelt, ist zum aktuellen Zeitpunkt ungewiss. Gesichert ist, dass Arsenit die Expression zahlreicher TFs induziert, wie beispielsweise für HIF-1 α gezeigt wurde (Guo *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2013). Für HIF-1 α wird in der Literatur aktuell eine Rolle in

der SIRT-Regulation diskutiert (Dzhalilova und Makarova, 2022). Die zukünftige Forschung wird zeigen, inwieweit Arsenit zielgerichtete Veränderungen von hPTM-Mustern hervorrufen kann.

Hervorzuheben ist, dass die beobachtete Hypoacetylierung nur transient, unmittelbar nach dem Behandlungsabbruch, auftrat. Im Gegensatz dazu wurde auf der Transkriptionsebene eine durchgehende, wenngleich sogar verstärkte Inhibition der DNA-Reparaturfaktoren detektiert, beispielsweise bei *MLH1*. Somit lässt sich die beobachtete durchgehende Transkriptionsreprimierung nicht vollständig mit persistent veränderten hPTM-Mustern erklären. Eine Hypothese wäre allerdings, dass ein Zusammenspiel unterschiedlicher epigenetischer Mechanismen die längerfristige transkriptionelle Repression der Gene verursacht. Möglicherweise existiert hier ein *Crosstalk* zwischen der Modifikation der Histone und der DNA-Methylierung. Hierbei besteht die Möglichkeit, dass während bzw. unmittelbar nach der Behandlung zunächst eine Veränderung der hPTMs auftritt, die die assoziierte Genregion für einen Methylierungsprozess prädisponiert und somit eine DNA-Hypermethylierung dieser Region erleichtert (Millán-Zambrano *et al.*, 2022). Tatsächlich zeigen einige Langzeitstudien, dass zum Beispiel *MLH1* oder *MSH2* in Arsenit-behandelten Zellen hypermethyliert vorliegen (Bhattacharjee *et al.*, 2018). Inwieweit dies in diesem experimentellen Aufbau ebenso zutrifft, ist Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

Zur vergleichenden Analyse der Arsenit-vermittelten genspezifischen hPTM-Veränderungen mit der genomweiten Ebene wurde ein *Western Blotting* mit anschließender Immunodetektion durchgeführt. Analog zur Genloci-spezifischen Analyse wurden die Veränderungen der Gesamthistonfraktionen von H3K4me₃, H3K9ac, H3K18ac und H3K27me₃ in den Arsenit-behandelten sowie 48 h nachinkubierten A549-Zellen ermittelt. Die NaAsO₂-Behandlung führte bei allen vier untersuchten Modifikationen zu globalen Veränderungen des hPTM-Vorkommens, was im Einklang mit vorherigen Beobachtungen aus *in vivo*- und *in vitro*-Studien steht (Chervona *et al.*, 2012; Cronican *et al.*, 2013; Howe und Gamble, 2016). Die stärksten Effekte wurden dabei unmittelbar nach dem Behandlungsende verzeichnet. Für H3K4me₃ zeigte sich bei 20 µM eine signifikante Erhöhung des Vorkommens, während sich der Anteil von H3K27me₃ reduzierte, wobei bei 5 µM eine moderate Erhöhung detektiert wurde. Analog zur genspezifischen Analyse wurde sowohl für H3K9 als auch für H3K18 eine Hypoacetylierung beobachtet. Für H3K9ac wurde ausschließlich bei 20 µM eine signifikante Reduktion ermittelt. Im Vergleich wurde für das Vorkommen von H3K18ac eine konzentrationsabhängige Reduktion bis zu 50 % des Basalgehalts detektiert, wobei der Rückgang bereits bei der niedrigsten Konzentration von 5 µM NaAsO₂ beobachtet werden konnte. Eine zusätzliche Arsenit-freie Nachinkubation der mit 20 µM NaAsO₂ behandelten Zellen führte bei allen hPTMs außer H3K4me₃ zu einer allmählichen Regeneration. Für H3K4me₃ wurde bei allen Konzentrationen eine deutliche Erhöhung des Vorkommens detektiert, insbesondere bei 10 µM. Bei H3K18 trat bei 5 µM NaAsO₂ eine geringfügige Hyperacetylierung auf. Die Daten zeigen, dass Arsenit sowohl das genspezifische als auch das globale Vorkommen der hPTMs beeinflusst, wobei hauptsächlich der Zeitpunkt unmittelbar nach der Behandlung betroffen ist. Dennoch traten bei bestimmten PTMs sowohl persistente als auch transiente Veränderungen auf, die über den Nachinkubationszeitraum hinaus in den Gesamthistonfraktionen nachweisbar waren. Diese Befunde bestätigen die Beobachtungen von Zhou *et al.*, die in A549-Zellen ebenfalls ein persistent erhöhtes

Vorkommen an H3K4me3 nach einer Arsenitbehandlung dokumentierten. Allerdings unterscheidet sich deren experimentelles Design hinsichtlich der Inkubationsdauer (siebentägige subchronische Exposition mit NaAsO₂), den eingesetzten Arsenitkonzentrationen (0,1-1 µM) und der Nachinkubationsdauer (bis zu sieben Tage) (Zhou *et al.*, 2009). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen somit die Annahme, dass Arsenit bereits nach einer einzigen akuten zellulären Exposition über 24 h zu anhaltenden Veränderungen der hPTM-Muster führen kann.

Der Vergleich der genspezifischen und globalen Beobachtungen zeigt, dass Arsenit das genomweite Vorkommen von H3K4me3 und H3K27me3 beeinflusst, obwohl in den analysierten Loci der DNA-Reparaturgene keine Veränderungen dieser hPTMs festgestellt wurden. Die untersuchten Acetylierungsmarkierungen H3K9ac und H3K18ac wiesen eine starke Korrelation zwischen lokalen und globalen Veränderungen auf. In beiden Fällen wurde eine Hypoacetylierung dokumentiert, wobei die Ergebnisse eine höhere Sensitivität von Arsenit für H3K18ac implizieren. Dies ist von besonderer Relevanz, da H3K18ac in der Literatur zunehmend als wichtiger prognostischer Faktor bei der Tumorprogression von beispielsweise Lungenkrebs gilt. Vor allem eine Hypoacetylierung von H3K18 wird mit aggressiven Phänotypen assoziiert (Halasa *et al.*, 2019). Nicht alle Studien zeigen jedoch eine Übereinstimmung zwischen genspezifischer und globaler Ebene. Rahman *et al.* postulierten, dass promotor-spezifische hPTM-Veränderungen das physiologische Schicksal der Zelle bestimmen und im Vergleich zum globalen Vorkommen eine höhere Aussagekraft für die durch Arsenit vermittelten Mechanismen der Zelltransformation und Toxizität besitzen (Rahman *et al.*, 2015).

Um die Relevanz der Dysregulation von H3K9ac und H3K18ac in Arsenit-induziertem zellulären Stress differenzierter darzustellen zu können, wurde der genomweite Einfluss des Halbmetalls auf die beiden Histonacetylierungsmuster zudem in den BEAS-2B-Zellen ermittelt, einer Lungenzelllinie aus Normalgewebe. Eine 24-stündige NaAsO₂-Inkubation im äquitoxischen Konzentrationsbereich von 2,5 µM bis 10 µM führte zu statistisch signifikanten Veränderungen beider hPTMs. Für H3K18 wurde eine konzentrationsabhängige Hypoacetylierung ab 2,5 µM verzeichnet. Im Fall von H3K9ac zeigte sich ausschließlich bei einer Behandlung mit 5 µM NaAsO₂ eine signifikante Reduktion. Entsprechend den Befunden in der A549-Krebszelllinie wurde somit auch eine Hypoacetylierung von H3K9 und H3K18 in einer Nicht-Krebszelllinie aus Lungengewebe detektiert, wobei die Effektstärke in der BEAS-2B-Zelllinie im Vergleich zu den A549-Zellen geringer ausfiel. Möglicherweise ist dies auf ein unterschiedliches basales Vorkommen an H3-Acetylierungsmustern und entsprechenden histonmodifizierenden Enzymen zurückzuführen, da Tumorzellen nachweislich ein verändertes Vorkommen an Acetylierungsmustern aufweisen können (Miziak *et al.*, 2024). Zusammenfassend demonstrierte die Analyse, dass das beobachtete Phänomen der Arsenit-induzierten Hypoacetylierung von H3K9 und H3K18 nicht nur auf Lungentumorzellen beschränkt ist, sondern auch in einer Nicht-Krebszelllinie aus Lungengewebe auftreten kann.

Zur Vervollständigung der Untersuchung Arsenit-induzierter hPTM-Veränderungen wurde ein umfassender *Proteomics*-Ansatz zur Analyse globaler PTMs von Histon H3 angewandt. Dabei wurden nicht nur weitere Zielmodifikationen von Arsenit identifiziert, sondern auch die *Western Blot*-Resultate mit den *Proteomics*-Daten verglichen. Für die Analyse wurden die A549-Zellen für 24 h akut gegenüber NaAsO₂ exponiert und die entsprechenden Histonextrakte nach

einer hybriden chemischen Derivatisierung mit Propionanhydrid und Trypsinverdau via LC-MS/MS analysiert. Dabei enthielten die analysierten Peptide bis zu drei Lysinpositionen, wodurch benachbarte Modifikationsmuster gleichzeitig erfasst wurden. Insgesamt wurden wenige, dafür jedoch spezifische Arsenit-induzierte Veränderungen des H3-Modifikationsstatus ermittelt. Die stärksten Effekte traten meist bei 20 μM NaAsO_2 auf, wobei häufig schon geringere Konzentrationen zu einem entsprechenden Trend führten. Sowohl die Acetylierung von H3K14 als auch die Dimethylierung von H3K36 wurden als weitere Arsenit-sensitive hPTM-Muster identifiziert. Die Arsenitbehandlung führte zu einer dosisabhängigen Hypoacetylierung von H3K14, wobei im Fall von H3K36me₂ ein vermindertes Vorkommen verzeichnet wurde. Während der Rückgang von H3K14ac in Kombination mit der mono-, di- und trimethylierten Variante von H3K9 nachgewiesen wurde, sank H3K36me₂ in Kombination mit der acetylierten, monomethylierten und unmodifizierten Form von H3K27. Dies legt nahe, dass Arsenit einen genspezifischen Verlust von H3K36me₂, insbesondere in der H3.3-Variante, sowie von H3K14ac in verschiedenen genomischen Loci bewirken kann. Im Gegensatz zu den *Western Blot*-Daten zeigte sich bei der *Proteomics*-Analyse keine signifikante Abnahme von H3K9ac. Da H3K14ac in den Proben deutlich häufiger vorkam als H3K9ac, könnte das zuvor mittels AKs detektierte verringerte Signal möglicherweise auf eine Abnahme von H3K14ac zurückzuführen sein. Ferner zeigte die LC-MS/MS-Analyse ein erhöhtes Vorkommen von H3K27me₂ in Kombination mit unmodifiziertem H3K36 und H3K37, ebenso vorrangig in der H3.3-Variante. Die mittels AKs detektierten Veränderungen von H3K27me₃ konnten mit der hier angewandten *Proteomics*-Methode somit nicht bestätigt werden. Hervorzuheben ist, dass die beobachteten Veränderungen von H3K18ac im Einklang mit den detektierten *Western Blot*-Resultaten standen. Für H3K18 zeigte die LC-MS/MS-Analyse ebenfalls einen deutlichen Trend zur Hypoacetylierung, womit H3K18ac als zentrales Ziel Arsenit-induzierter Toxizität hervorgehoben wird. Bei H3K4me₃ ist zu beachten, dass das analysierte Peptid sehr klein und hydrophil ist, was typischerweise zu erheblichen Verlusten während der Probenvorbereitung und der LC-MS/MS-Analyse führt. Mit der angewandten Methode konnte H3K4me₃ somit nicht analysiert werden. Für die Analyse dieser Lysin-reichen und sehr hydrophilen Seitenkettendomänen der Histone empfiehlt sich deshalb ein alternativer Derivatisierungsansatz, wie zum Beispiel ein hybrides chemisches Labeling (Maile *et al.*, 2015).

Eine Dysregulation dieser hPTMs wurde in der Literatur bisher mehrfach mit Arsenit in Verbindung gebracht (Howe und Gamble, 2016; Ma *et al.*, 2016; Bhattacharjee und Paul, 2020), wobei nach derzeitigem Kenntnisstand von keiner expliziten Veränderung der Histon H3.3 Variante H3.3K36me₂ berichtet wurde. Im Allgemeinen ist H3K36me₂ an der Regulierung der DNA-Methylierungsprozesse beteiligt, da diese hPTM unter anderem die beiden *de novo* Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B zielgerichtet rekrutieren kann. Von besonderer mechanistischer Bedeutung sind die enzyspezifischen Prolin- (P) und Tryptophan- (W) reichen PWWP-Reader-Domänen, die eine Interaktion mit H3K36me₂ sowie H3K36me₃ ermöglichen (Dukatz *et al.*, 2019). Khazei *et al.* haben in Neuronen von Mäusen bereits gezeigt, dass ein Verlust von H3.3K36me₂ zu einer verringerten Anreicherung von DNMTs an den betroffenen Genregionen führen kann, wodurch eine Dysregulation der zugrunde liegenden DNA-Methylierungsprozesse resultiert. Mechanistisch ist die Verringerung von H3.3K36me₂ bzw. H3.1K36me₂ in dieser Studie allerdings nicht auf eine veränderte Transkription

des vermittelten histonmethylierenden Enzyms, hier *SET-domain containing 2* (SETD2), zurückzuführen (Khazaei *et al.*, 2023). Der mRNA-Gehalt von *SETD2* wurde in dieser Arbeit im Rahmen der Genexpressionsanalyse in A549-Zellen analysiert und zeigte keine signifikante Abhängigkeit von Arsenit. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beteiligung von H3K36me2 an der DNA-Doppelstrangbruchreparatur, insbesondere am *non-homologous end-joining* (NHEJ). Das Vorhandensein von H3K36me2 und H3K36me3 an Doppelstrangbrüchen erleichtert die Rekrutierung der NHEJ-Proteine Ku70 und *nijmegen breakage syndrome 1* (NBS1) (Fnu *et al.*, 2011). Dies ist von besonderer Relevanz, da Arsenit durch Interaktion mit BRCA1 die HR unterdrückt und so das NHEJ fördert, wie vorherige Studien belegen (Matthäus *et al.*, 2023). Inwieweit das Halbmetall die entsprechende Dysregulation von H3K36me2 vermittelt und welche Konsequenzen die Herunterregulierung hat, bleibt an dieser Stelle unklar.

Die *Proteomics*-Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Kombination aus AK-basierten und massenspektrometrischen Analysen zur vollständigen Erfassung des hPTM-Spektrums und potenzieller Veränderungen. Dies könnte zur bestehenden Diskrepanz in der Literatur hinsichtlich der postulierten Arsenit-induzierten Veränderungen beitragen. Neben den Inkubationsbedingungen spielen auch die zelllinienspezifischen hPTM-Muster eine Rolle (Howe und Gamble, 2016). Für die toxikologische Risikobewertung von Arsenit und anderen Substanzen ist die Einbeziehung verschiedener Analysemethoden epigenetischer hPTM-Daten somit essenziell.

Die genspezifischen und globalen hPTM-Analysen dieser Arbeit weisen auf eine zielgerichtete Beeinflussung von Arsenit auf die PTM der Histone hin. Die Untersuchungen zeigen, dass bestimmte Arsenit-sensitive Lysinreste von Histon H3 existieren, deren Acetylierungs- und Methylierungsmuster durch die Präsenz dieses Halbmetalls potenziell verändert werden können. Die detektierte genspezifische und genomweite Hypoacetylierung untermauert die ursprüngliche Annahme, dass primär die Acetylierung von Histon H3 eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Arsenit aufweist. Dies ist für diese Arbeit von hoher Relevanz, da die Histonacetylierung in der Literatur als treibender Faktor für die Entwicklung eines zellulären Gedächtnisses gilt (Shvedunova und Akhtar, 2022).

Zur Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Arsenit-induzierten Hypoacetylierung und der Gesamtaktivität histon(de)acetylierender Enzyme wurden HDAC- und HAT-selektive ELISAs in den Arsenit-behandelten und nachinkubierten A549-Zellen durchgeführt. Unter Berücksichtigung des Gleichgewichts der antagonistischen Enzyme demonstrieren die Ergebnisse, dass Arsenit die HDAC- und HAT-Enzymaktivität beständig beeinflusst, wobei die beobachtete Hypoacetylierung jedoch nicht durch die veränderten Gesamtaktivitäten erklärbar ist. Bei 20 μM NaAsO₂ wurde eine persistente, moderate Herunterregulierung der HDAC-Aktivität detektiert. Frühere Studien wiesen auf eine stärkere HDAC-Inhibierung durch Arsenit in HepG2-Zellen hin im Vergleich zu den A549-Zellen dieser Arbeit (Ramirez *et al.*, 2008). Im Gegensatz zur HDAC-Aktivität zeigte sich im Rahmen der Analysen eine Arsenit-vermittelte Erhöhung der HAT-Gesamtaktivität, die nach einer zweitägigen Zellregenerationsphase ohne Arsenit besonders ausgeprägt war. In beiden Messzeiträumen traten die stärksten Effekte bei 10 μM NaAsO₂ auf. Nach derzeitigem Kenntnisstand existieren bislang keine Studien zum Einfluss von Arsenit auf die HAT-Gesamtaktivität. Die vorliegenden Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass insbesondere HATs

eine Arsenit-sensitive Zielstruktur darstellen und potenziell zur Wiederherstellung des zellulären Gleichgewichts und Zellüberlebens beitragen. Studien in neuronalen Zellen belegen zudem, dass eine verstärkte HAT-Expression, vor allem TIP60, neuroprotektive Effekte aufweisen kann. Dies äußerte sich in einer vermehrten Induktion von *Pro-Survival*-Genen, wodurch das Zellschicksal zugunsten des Zellüberlebens verlagert wird (Pirooznia und Elefant, 2013). Allerdings ist eine direkte Induktion der HAT TIP60 durch Arsenit eher unwahrscheinlich, da nachgewiesen wurde, dass Arsenit mit dessen Zinkfingermotiv interagiert und zu einem vermehrten proteosomalen Abbau des Enzyms führen kann (Tam *et al.*, 2017).

Unklar bleibt, ob Arsenit zeitabhängig die zelluläre Verfügbarkeit des Acetyl-Donors Acetyl-CoA beeinflusst und dies zu den beobachteten Effekten beiträgt. In diesem Zusammenhang zeigten Studien bereits, dass Arsenit-induzierter oxidativer Stress den zellulären Energiestoffwechsel verändern und somit Acetyl-CoA-abhängige Enzyme sekundär beeinflussen kann (Ruan *et al.*, 2022). Inwieweit sich die intrazelluläre Verfügbarkeit von Acetyl-CoA in der vorliegenden Arbeit veränderte, ist mit den hier durchgeführten Analysen nicht zu beantworten.

Insgesamt deuten die enzymespezifischen HDAC- und HAT-Daten somit eher auf eine vorliegende Hyperacetylierung als auf eine Hypoacetylierung hin. Die Diskrepanz der Befunde legt nahe, dass die zugrunde liegende Hypoacetylierung nicht auf einen generellen Enzymeffekt zurückzuführen ist, sondern möglicherweise auf eine gezielte Beeinflussung spezifischer Enzyme. Angesichts der bekannten Thiolaffinität von Arsenit könnten HDACs und HATs mit Zinkdomänen empfindlicher auf Arsenit reagieren als thiolarme Varianten. In Abbildung 40 sind exemplarisch ausgewählte Proteinstrukturen von HATs und HDACs dargestellt, die Zink-bindende Elemente besitzen. Strukturell hervorzuheben sind Cystein-reiche HATs wie p300/CBP, hMOF und TIP60 oder auch HDAC6 sowie die Klasse III HDACs (SIRT6). Vorherige Studien mit ATO demonstrierten eine inhibierende Wirkung von ATO auf die HAT-Aktivität von hMOF, vermutlich bedingt durch eine physische Interaktion von dreiwertigem Arsen mit dem hMOF C2CH-Zinkfinger (Liu *et al.*, 2015). Hypothetisch ist somit eine vergleichbare Wirkung von Arsenit möglich. Für TIP60 wurde die physische Interaktion von Arsenit mit dessen C2H2-Zinkfinger bereits experimentell bestätigt (Tam *et al.*, 2017). Während die direkte Interaktion von Arsenit mit den entsprechenden histon(de)acetylierenden Enzymen bislang kaum untersucht wurde, ist seit Längerem bekannt, dass das Halbmetall sowohl auf der mRNA- als auch auf der Proteinebene die regulatorischen Enzyme der Histonacetylierung beeinflussen kann. In Fibroblasten von Mäusen wurde bereits eine Arsenit-vermittelte Repression von p300 auf transkriptioneller und proteomischer Ebene nachgewiesen (Zhu *et al.*, 2018). Von Bedeutung ist dabei, dass die HAT p300 auch H3K18 acetylieren kann (Luo *et al.*, 2019). Eine andere Studie zeigte hingegen, dass Arsenit in Hodenzellen von Ratten eine HDAC-inhibierende Wirkung entfalten kann (Li *et al.*, 2023). Im Rahmen der zuvor durchgeführten Genexpressionsstudie der vorliegenden Arbeit wurde eine Subgruppe an HDAC- und HAT-Genen untersucht, darunter *EP300*, das für p300 codiert, sowie die Deacetylasen *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3* und *SIRT2*. Bis auf bei *HDAC2* wurden in der A549-Zelllinie keine Expressionsänderungen für diese Gene detektiert. Während sich unmittelbar nach der Behandlung ein leicht reprimierender Trend abzeichnete, nahm die Arsenit-induzierte Repression von *HDAC2* mit zunehmender Nachinkubationszeit deutlich zu.

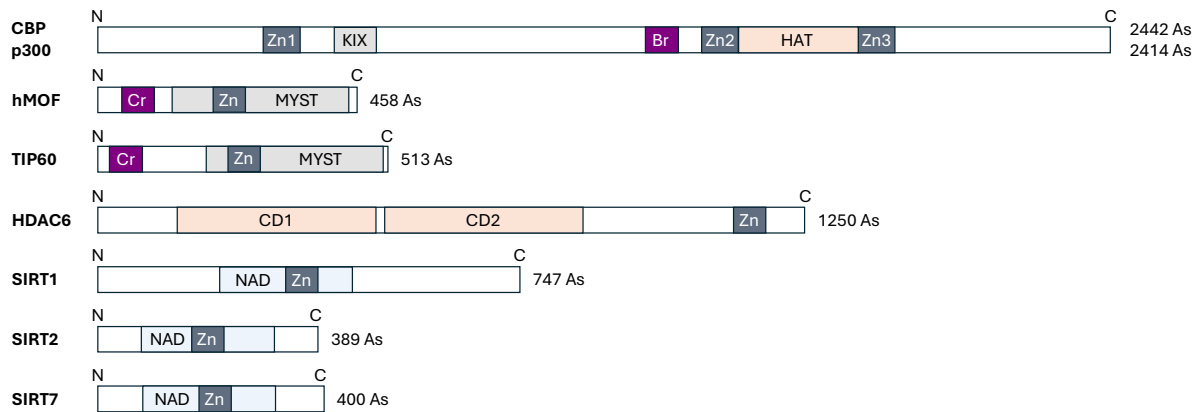


Abbildung 40 | Domänenarchitektur ausgewählter Proteine mit Zink-bindenden Elementen. Vereinfachte Darstellung der Struktur potenziell Arsenit-relevanter histonacetylierender (CBP, p300, hMOF, TIP60) und histondeacetylierender (HDAC6, SIRT1, SIRT2, SIRT7) Enzyme. Anzumerken ist, dass CBP und p300 eine hohe Sequenzhomologie aufweisen, die eine weitgehende strukturelle und funktionelle Äquivalenz ihrer Domänen bedingt. CBP und p300 beinhalten drei Zink-bindende Domänen, hier gekennzeichnet durch Zn1, Zn2 und Zn3, die reich an Cystein und Histidin sind. Zn1 und Zn3 liegen dabei in den sogenannten TAZ-Domänen (TAZ1/3). Zn2 ist in der PHD-Domäne zu finden. Im Vergleich liegt bei hMOF und TIP60 eine C2H2-Zinkfingerdomäne vor, wobei HDAC6 eine Zinkfinger-Ubiquitin-Bindungsdomäne aufweist. Daneben wird die Struktur der SIRTs (SIRT1 bis SIRT7) durch das Vorliegen einer strukturellen Cys4-Zinkbindungsdomäne charakterisiert (modifiziert nach Peng *et al.*, 2012; Klein und Denu, 2020; Van Gils *et al.*, 2021; Han *et al.*, 2024).

AS: Aminosäuren, Br: Bromodomäne, CD: HDAC Katalytische Domäne, Cr: Chromodomäne, CREB: cAMP Response Element-Binding Protein, HAT: Histonacetyltransferase-Domäne, hMOF: human ortholog of males absent on the first, MYST: MYST (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, TIP60)-HAT domain, KIX: Kinase-inducible domain interacting domain, NAD: NAD⁺ binding Rossmann fold domain, PHD: Plant Homeodomain, p300: E1A-binding protein p300, SIRT: Sirtuin, TAZ: Zinc finger transcriptional adaptors, TIP: Tat-Interacting Protein 60 kDa, Zn: Zink-bindende Domäne.

HDAC2 nimmt unter den HDACs eine besondere Rolle ein, da mittlerweile immer mehr Studien darauf hinweisen, dass HDAC2 *upstream* von wichtigen Effektorproteinen wie DNMT1, HDAC10 oder PCNA wirken und diese auch beeinflussen kann (Rountree *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2022). Besonders im Hinblick auf den *Crosstalk* mit der DNA-Methylierung ist relevant, dass die Genexpressionsanalyse eine konzentrationsabhängige Repression sowohl von HDAC2 als auch von DNMT1 durch Arsenit zeigte, wobei die Effektivität im Zeitverlauf zunahm. Dies legt nahe, dass Arsenit auch die durch HDAC2 und DNMT1 vermittelte Genstilllegung beeinflusst.

Zu beachten ist an dieser Stelle auch, dass die meisten histonmodifizierenden Enzyme, wie HDACs oder HATs, zahlreiche Nicht-Histon-Substrate aufweisen. Somit beeinflusst eine durch Arsenit vermittelte Dysregulation dieser Enzyme nicht nur die korrespondierenden Histone und die Chromatinstruktur, sondern auch Hunderte weitere Proteine, die in die unterschiedlichsten zellulären Prozesse verwickelt sind (Shvedunova und Akhtar, 2022). Zhou *et al.* identifizierten mittels LC-MS/MS über 600 verschiedene acetylierte Stellen im Proteom von HeLa-Zellen. Neben Proteinen, die essenzielle Funktionen im Zellmetabolismus, der Proteinfaltung, Translation und Chromatinorganisation ausüben, wurden auch DNA-Reparaturproteine wie RAD50 und PARP1 sowie Proteine der oxidativen Stressantwort wie Thioredoxin als acetylierte Zielstrukturen identifiziert (Zhou *et al.*, 2016). Einige Enzyme verfügen neben ihrer Acetylierungs- oder Deacetylierungsfunktion über ein erweitertes funktionelles Spektrum, wie beispielsweise die ADP-Ribosyltransferaseaktivität, die auch SIRTs aufweisen (Klein und Denu, 2020). Aufgrund der beobachteten Wirkung von Arsenit auf die chromatinmodifizierenden Enzyme ergeben sich daraus nicht nur Folgen auf die

Histon(de)acetylierung und das resultierende *Chromatin remodeling*, sondern auch weitreichende Konsequenzen, die potenziell zahlreiche zelluläre Mechanismen betreffen können.

Abbildung 41 fasst die in dieser Arbeit beobachteten Arsenit-induzierten Veränderungen der Histonmodifikationen illustrativ zusammen. Die Ergebnisse zeigen, dass Arsenit ein potenter epigenetischer Modulator von hPTMs ist, während die zugrunde liegenden Mechanismen bisher nicht vollständig verstanden sind. Diese Arbeit belegt, dass Arsenit keine unspezifischen globalen Effekte ausübt, sondern selektiv hPTM-Veränderungen induziert. Künftige Forschungsarbeiten sollten sich auf spezifische Interaktionen von Arsenit mit essenziellen hPTM-Faktoren konzentrieren, um dessen histonmodifizierende Wirkung mechanistisch besser verstehen zu können. Ob hPTMs Ursache oder Folge transkriptioneller Veränderungen sind, ist bislang unklar und bleibt ein zentrales Diskussionsthema (Henikoff und Shilatifard, 2011). Aktuelle Erkenntnisse legen nahe, dass hPTM-Muster sowohl Ursache als auch Folge der Transkription sind und dass ihre Dysregulation eine zentrale Rolle in der kanzerogenen Wirkung von Substanzen spielt (Millán-Zambrano *et al.*, 2022). Diese Arbeit zeigt ein komplexes regulatorisches Netzwerk der Arsenit-abhängigen epigenetischen Dysregulation von hPTMs auf, was die Notwendigkeit weiterer mechanistischer Untersuchungen zur vollständigen Aufklärung der kanzerogenen Wirkmechanismen von Arsenit unterstreicht.

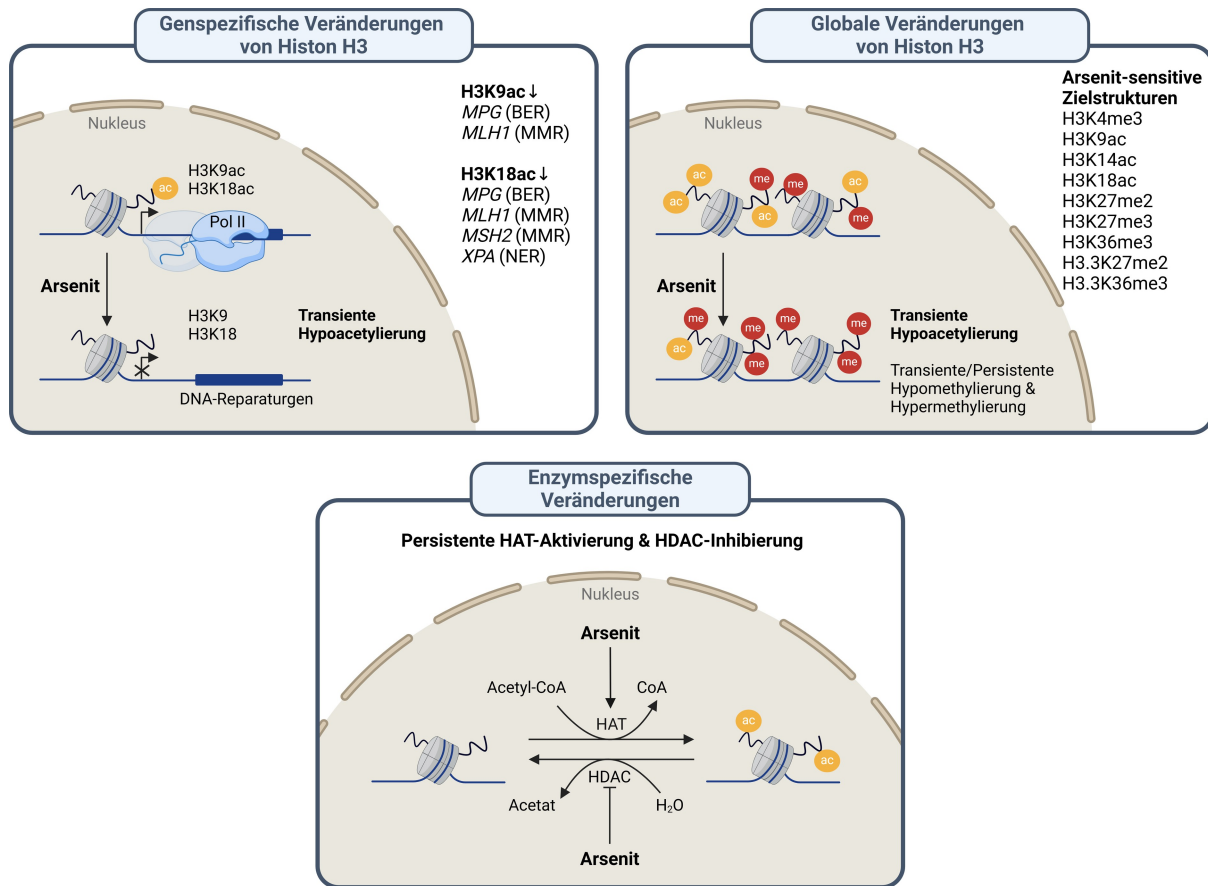


Abbildung 41 | Epigenetische Modulation posttranslationaler Modifikationen von Histon H3 durch Arsenit.

Zusammenfassende Darstellung der in dieser Arbeit beobachteten genspezifischen und globalen Effekte von Arsenit auf die Acetylierung und Methylierung von Histon H3 sowie auf die Gesamtaktivität histon(de)acetylierender Enzyme. Akut Arsenit-behandelte (24 h) A549-Zellen zeigten eine transiente Hypoacetylierung von H3K9 und H3K18 in der Promotorregion verschiedener DNA-Reparaturgene der BER, MMR und NER, die mit der transkriptionellen Repression der DNA-Reparaturfaktoren im Einklang steht. Analog wurde auch genomweit eine transiente Hypoacetylierung von H3K9 und H3K18 sowie bei H3K14 unmittelbar nach dem Behandlungsabbruch beobachtet. Zudem zeigten sich auch transient bzw. persistent veränderte Methylierungsmuster. Auf Enzymebene wurde eine persistente HAT-Aktivierung und HDAC-Inhibierung durch Arsenit verzeichnet, was nicht im Einklang mit der beobachteten unmittelbaren globalen und genspezifischen Hypoacetylierung steht, sondern eine potenziell zielgerichtete Beeinflussung von Arsenit auf die HATs bzw. HDACs suggeriert. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

Ac: Acetylierung, CoA: Coenzym A, HDAC: Histondeacetylase, HAT: Histonacetyltransferase, MLH1: MutL homolog 1, MSH2: MutS homolog 2, MPG: Methylpurin-DNA-Glykosylase, Me: Methylierung, XPA: Xeroderma pigmentosum complementation group A.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- AGALIOTI, T., CHEN, G. Y. & THANOS, D. 2002. Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell*, 111, 381-392.
- ALBORES, A., KOROPATNICK, J., CHERIAN, M. G. & ZELAZOWSKI, A. J. 1992. Arsenic induces and enhances rat hepatic metallothionein production in vivo. *Chemico-Biological Interactions*, 85, 127-40.
- ALLFREY, V. G., FAULKNER, R. & MIRSKY, A. E. 1964. Acetylation and methylation of histones and their possible role in regulation of RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51, 786-794.
- ANDREW, A. S., BURGESS, J. L., MEZA, M. M., DEMIDENKO, E., WAUGH, M. G., HAMILTON, J. W. & KARAGAS, M. R. 2006. Arsenic exposure is associated with decreased DNA repair and in individuals exposed to drinking water arsenic. *Environmental Health Perspectives*, 114, 1193-1198.
- ANDREW, A. S., KARAGAS, M. R. & HAMILTON, J. W. 2003. Decreased DNA repair gene expression among individuals exposed to arsenic in United States drinking water. *International Journal of Cancer*, 104, 263-268.
- ANDREW, A. S., MASON, R. A., MEMOLI, V. & DUELL, E. J. 2009. Arsenic activates EGFR pathway signaling in the lung. *Toxicological Sciences*, 109, 350-357.
- BALARASTAGHI, S., BARANGI, S., HOSSEINZADEH, H., IMENSHAHIDI, M., MOOSAVI, Z., RAZAVI, B. M. & KARIMI, G. 2022. Melatonin improves arsenic-induced hypertension through the inactivation of the Sirt1/autophagy pathway in rat. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 151.
- BALDI, S., KORBER, P. & BECKER, P. B. 2020. Beads on a string-nucleosome array arrangements and folding of the chromatin fiber. *Nature Structural & Molecular Biology*, 27, 109-118.
- BANERJEE, M., CARDOSO, A. F., AL-ERYANI, L., PAN, J. M., KALBFLEISCH, T. S., SRIVASTAVA, S., RAI, S. N. & STATES, J. C. 2021. Dynamic alteration in miRNA and mRNA expression profiles at different stages of chronic arsenic exposure-induced carcinogenesis in a human cell culture model of skin cancer. *Archives of Toxicology*, 95, 2351-2365.
- BARBER, M. F., MICHISHITA-KIOI, E., XI, Y. X., TASSELLI, L., KIOI, M., MOQTADERI, Z., TENNEN, R. I., PAREDES, S., YOUNG, N. L., CHEN, K. F., STRUHL, K., GARCIA, B. A., GOZANI, O., LI, W. & CHUA, K. F. 2012. SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. *Nature*, 487, 114-118.
- BENZ, S. A., IRVINE, D. J., RAU, G. C., BAYER, P., MENBERG, K., BLUM, P., JAMIESON, R. C., GRIEBLER, C. & KURYLYK, B. L. 2024. Global groundwater warming due to climate change. *Nature Geoscience*, 17.

-
- BHATTACHARJEE, P. & PAUL, S. 2020. Understanding the mechanistic insight of arsenic exposure and decoding the histone cipher. *Toxicology*, 430.
- BHATTACHARJEE, P., SANYAL, T., BHATTACHARJEE, S. & BHATTACHARJEE, P. 2018. Epigenetic alteration of mismatch repair genes in the population chronically exposed to arsenic in West Bengal, India. *Environmental Research*, 163, 289-296.
- CARIDE, A., JANG, J. S., SHI, G. X., LENZ, S., ZHONG, J., KIM, K. H., ALLEN, M., ROBERTSON, K. D., FARRUGIA, G., ORDOG, T., ERTEKIN-TANER, N. & LEE, J. H. 2023. Titration-based normalization of antibody amount improves consistency of ChIP-seq experiments. *BMC Genomics*, 24, 171.
- CARRALL, J. A., LIE, W., LAMBERT, J. M., HARRIS, H. H., LAI, B. & DILLON, C. T. 2023. Optimizing arsenic therapy by selectively targeting leukemia cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 66, 12101-12114.
- CHAKRABORTY, A., GHOSH, S., BISWAS, B., PRAMANIK, S., NRIAGU, J. & BHOWMICK, S. 2022. Epigenetic modifications from arsenic exposure: A comprehensive review. *Science of the Total Environment*, 810.
- CHALLENGER, F. 1945. Biological methylation. *Chemical Reviews*, 36, 315-361.
- CHAN, J. C. & MAZE, I. 2020. Nothing is yet set in (hi)stone: novel post-translational modifications regulating chromatin function. *Trends in Biochemical Sciences*, 45, 829-844.
- CHANDA, S., DASGUPTA, U. B., GUHAMAZUMDER, D., GUPTA, M., CHAUDHURI, U., LAHIRI, S., DAS, S., GHOSH, N. & CHATTERJEE, D. 2006. DNA hypermethylation of promoter of gene p53 and p16 in arsenic-exposed people with and without malignancy. *Toxicological Sciences*, 89, 431-437.
- CHEN, D. Q., CHEN, Q. Y., WANG, Z. J., ZHU, Y. S., KLIZ, T., TAN, W. W., LI, J. Q., WU, F., FANG, L., ZHANG, X. R., HE, R. Q., SHEN, S., SUN, H., ZANG, C. Z., JIN, C. Y. & COSTA, M. 2020. Polyadenylation of histone H3.1 mRNA promotes cell transformation by displacing H3.3 from gene regulatory elements. *Iscience*, 23.
- CHEN, Q. Y. & COSTA, M. 2021. Arsenic: a global environmental challenge. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 61, 47-63.
- CHERVONA, Y., HALL, M. N., ARITA, A., WU, F., SUN, H., TSENG, H. C., ALI, E., UDDIN, M. N., LIU, X. H., ZORODDU, M. A., GAMBLE, M. V. & COSTA, M. 2012. Associations between arsenic exposure and global posttranslational histone modifications among adults in Bangladesh. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 21, 2252-2260.
- CHIANG, S. K., CHEN, S. E. & CHANG, L. C. 2021. The role of HO-1 and its crosstalk with oxidative stress in cancer cell survival. *Cells*, 10.
- CHOUDHURI, S., CUI, Y. & KLAASSEN, C. D. 2010. Molecular targets of epigenetic regulation and effectors of environmental influences. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 245, 378-393.
- CLARKE, T. L. & MOSTOSLAVSKY, R. 2022. DNA repair as a shared hallmark in cancer and ageing. *Molecular Oncology*, 16, 3352-3379.

- CRONICAN, A. A., FITZ, N. F., CARTER, A., SALEEM, M., SHIVA, S., BARCHOWSKY, A., KOLDAMOVA, R., SCHUG, J. & LEFTEROV, I. 2013. Genome-wide alteration of histone H3K9 acetylation pattern in mouse offspring prenatally exposed to arsenic. *Plos One*, 8.
- DELCUVE, G. P., KHAN, D. H. & DAVIE, J. R. 2012. Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors. *Clinical Epigenetics*, 4.
- DEVASKAR, S. U. & RAYCHAUDHURI, S. 2007. Epigenetics - A science of heritable biological adaptation. *Pediatric Research*, 61, 1-4.
- DI BLASI, R., BLYUSS, O., TIMMS, J. F., CONOLE, D., CERONI, F. & WHITWELL, H. J. 2021. Non-histone protein methylation: Biological significance and bioengineering potential. *ACS Chemical Biology*, 16, 238-250.
- DI PAOLO, N. C. & SHAYAKHMETOV, D. M. 2016. Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nature Immunology*, 17, 906-913.
- DING, X. F., ZHOU, X. X., COOPER, K. L., HUESTIS, J., HUDSON, L. G. & LIU, K. J. 2017. Differential sensitivities of cellular XPA and PARP-1 to arsenite inhibition and zinc rescue. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 331, 108-115.
- DING, X. J., ZHANG, A. L., LI, C. Z., MA, L., TANG, S. F., WANG, Q., YANG, G. H. & LI, J. 2021. The role of H3K9me2-regulated base excision repair genes in the repair of DNA damage induced by arsenic in HaCaT cells and the effects of extract intervention. *Environmental Toxicology*, 36, 850-860.
- DJUPEDAL, I. & EKWALL, K. 2009. Epigenetics: heterochromatin meets RNAi. *Cell Research*, 19, 282-295.
- DONNIO, L. M. & GIGLIA-MARI, G. 2025. Keep calm and reboot - how cells restart transcription after DNA damage and DNA repair. *FEBS Letters*, 599, 275-294.
- DU, K. J., YU, Y. H., ZHANG, D. Y., LUO, W. J., HUANG, H. S., CHEN, J. Y., GAO, J. M. & HUANG, C. S. 2013. NF κ B1 (p50) suppresses SOD2 expression by inhibiting FoxO3a transactivation in a miR190/PHLPP1/Akt-dependent axis. *Molecular Biology of the Cell*, 24, 3577-3583.
- DU, X. Y., TIAN, M. P., WANG, X. X., ZHANG, J., HUANG, Q. Y., LIU, L. P. & SHEN, H. Q. 2018. Cortex and hippocampus DNA epigenetic response to a long-term arsenic exposure via drinking water. *Environmental Pollution*, 234, 590-600.
- DUKATZ, M., HOLZER, K., CHOUDALAKIS, M., EMPERLE, M., LUNGU, C., BASHTRYKOV, P. & JELTSCH, A. 2019. H3K36me2/3 binding and DNA binding of the DNA methyltransferase DNMT3A PWWP domain both contribute to its chromatin interaction. *Journal of Molecular Biology*, 431, 5063-5074.
- DZHALILOVA, D. S. & MAKAROVA, O. V. 2022. The role of hypoxia-inducible factor in the mechanisms of aging. *Biochemistry-Moscow*, 87, 995-1014.
- EBERT, F., WEISS, A., BULTEMEYER, M., HAMANN, I., HARTWIG, A. & SCHWERDTLE, T. 2011. Arsenicals affect base excision repair by several mechanisms. *Mutation Research*, 715, 32-41.
- EFSA 2024c. Risk assessment of complex organoarsenic species in food. *EFSA Journal*, 22, e9112.

-
- EFSA 2024b. Risk assessment of small organoarsenic species in food. *EFSA Journal*, 22, e8844.
- EFSA 2024a. Update of the risk assessment of inorganic arsenic in food. *EFSA Journal*, 22, e8488.
- EL-GHIATY, M. A. & EL-KADI, A. O. S. 2023. The duality of arsenic metabolism: impact on human health. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 63, 341-358.
- EL KENNANI, S., ADRAIT, A., SHAYTAN, A. K., KHOCHBIN, S., BRULEY, C., PANCHENKO, A. R., LANDSMAN, D., PFLIEGER, D. & GOVIN, J. 2017. MS_HistoneDB, a manually curated resource for proteomic analysis of human and mouse histones. *Epigenetics & Chromatin*, 10.
- ELLINSWORTH, D. C. 2015. Arsenic, reactive oxygen, and endothelial dysfunction. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 353, 458-464.
- FENOUIL, R., CAUCHY, P., KOCH, F., DESCOSTES, N., CABEZA, J. Z., INNOCENTI, C., FERRIER, P., SPICUGLIA, S., GUT, M., GUT, I. & ANDRAU, J. C. 2012. CpG islands and GC content dictate nucleosome depletion in a transcription-independent manner at mammalian promoters. *Genome Research*, 22, 2399-2408.
- FERRARI, K. J., SCELFO, A., JAMMULA, S., CUOMO, A., BAROZZI, I., STÜTZER, A., FISCHLE, W., BONALDI, T. & PASINI, D. 2014. Polycomb-dependent H3K27me1 and H3K27me2 regulate active transcription and enhancer fidelity. *Molecular Cell*, 53, 49-62.
- FERRARI, R., SU, T., LI, B., BONORA, G., OBERAI, A., CHAN, Y., SASIDHARAN, R., BERK, A. J., PELLEGRINI, M. & KURDISTANI, S. K. 2012. Reorganization of the host epigenome by a viral oncogene. *Genome Research*, 22, 1212-1221.
- 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. *Archives of Toxicology*, 90, 2745-2761.
- FLORA, S. J. S. 2011. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radical Biology and Medicine*, 51, 257-281.
- FNU, S., WILLIAMSON, E. A., DE HARO, L. P., BRENNEMAN, M., WRAY, J., SHAHEEN, M., RADHAKRISHNAN, K., LEE, S. H., NICKOLOFF, J. A. & HROMAS, R. 2011. Methylation of histone H3 lysine 36 enhances DNA repair by nonhomologous end-joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 540-545.
- 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, 359-366.
- FULDA, S., GORMAN, A. M., HORI, O. & SAMALI, A. 2010. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology*, 2010, 214074.
- FURUGEN, A., YAMAGUCHI, H., TANAKA, N., SHIIDA, N., OGURA, J., KOBAYASHI, M. & ISEKI, K. 2013. Contribution of multidrug resistance-associated proteins (MRPs) to the release of prostanoids from A549 cells. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 106, 37-44.
- GARBINSKI, L. D., ROSEN, B. P. & CHEN, J. 2019. Pathways of arsenic uptake and efflux. *Environment International*, 126, 585-597.

- GARCIA, B. A., THOMAS, C. E., KELLEHER, N. L. & MIZZEN, C. A. 2008. Tissue-specific expression and post-translational modification of histone H3 variants. *Journal of Proteome Research*, 7, 4225-4236.
- GE, Y. C., ZHU, J. Q., WANG, X., ZHENG, N. N., TU, C. J., QU, J. & REN, X. F. 2018. Mapping dynamic histone modification patterns during arsenic-induced malignant transformation of human bladder cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 355, 164-173.
- GESHKOVSKI, V., HIJAZI, H., MANESSIER, J., BRUGIERE, S., COURCON, M., VACHON, G., PFLIEGER, D. & CARLES, C. C. 2025. Quantitative profiling of histone variants and posttranslational modifications by tandem mass spectrometry in Arabidopsis. *Methods in Molecular Biology*, 2873, 19-38.
- GHASEMI, H., GHAZANFARI, T., YARAEI, R., FAGHIHZADEH, S. & HASSAN, Z. M. 2011. Roles of IL-8 in ocular inflammations: a review. *Ocular Immunology and Inflammation*, 19, 401-412.
- 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. *Journal of the National Cancer Institute*, 51, 1417-23.
- GIBNEY, E. R. & NOLAN, C. M. 2010. Epigenetics and gene expression. *Heredity*, 105, 4-13.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, F., JOHNSON-RESTREPO, B. & QUIÑONES, L. A. 2024. Arsenic inorganic exposure, metabolism, genetic biomarkers and its impact on human health: A mini-review. *Toxicology Letters*, 398, 105-117.
- GREER, E. L. & SHI, Y. 2012. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature Reviews Genetics*, 13, 343-357.
- GREIM, H. 2002. Arsenic and arsenic compounds (with the exception of arsine). *MAK Value Documentations*, 21, 49-106.
- GUETENS, G., DE BOECK, G., HIGHLEY, M., VAN OOSTEROM, A. T. & DE BRUIJN, E. A. 2002. Oxidative DNA damage: biological significance and methods of analysis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 39, 331-457.
- GUO, W., YANG, Z., XIA, Q., LIU, J. Y., YU, Y. H., LI, J. X., ZUO, Z. H., ZHANG, D. Y., LI, X. Y., SHI, X. L. & HUANG, C. S. 2011. Arsenite stabilizes HIF-1 α protein through p85 α -mediated up-regulation of inducible Hsp70 protein expression. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 475-488.
- HALASA, M., WAWRUSZAK, A., PRZYBYSZEWSKA, A., JARUGA, A., GUZ, M., KALAFUT, J., STEPULAK, A. & CYBULSKI, M. 2019. H3K18ac as a marker of cancer progression and potential target of anti-cancer therapy. *Cells*, 8.
- HAMADEH, H. K., TROUBA, K. J., AFSHARI, C. A. & GERMOLEC, D. 2002. Coordination of altered DNA repair and damage pathways in arsenite-exposed keratinocytes. *Toxicological Sciences*, 69, 306-316.
- HAN, H., FENG, X., HE, T., WU, Y. F., HE, T. M., YUE, Z. W. & ZHOU, W. Q. 2024. Discussion on structure classification and regulation function of histone deacetylase and their inhibitor. *Chemical Biology & Drug Design*, 103.

-
- HARTWIG, A., PELZER, A., ASMUSS, M. & BÜRKLE, A. 2003. Very low concentrations of arsenite suppress poly(adp-ribosyl)ation in mammalian cells. *International Journal of Cancer*, 104, 1-6.
- HARTWIG, A. & SCHWERDTLE, T. 2002. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol Letters*, 127, 47-54.
- HAYAKAWA, T., KOBAYASHI, Y., CUI, X. & HIRANO, S. 2005. A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Archives of Toxicology*, 79, 183-191.
- HENIKOFF, S. & SHILATIFARD, A. 2011. Histone modification: cause or cog? *Trends in Genetics*, 27, 389-396.
- HERBERT, K. J., HOLLOWAY, A., COOK, A. L., CHIN, S. P. & SNOW, E. T. 2014. Arsenic exposure disrupts epigenetic regulation of SIRT1 in human keratinocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 281, 136-145.
- HIRANO, S. 2020. Biotransformation of arsenic and toxicological implication of arsenic metabolites. *Archives of Toxicology*, 94, 2587-2601.
- HOLCOMB, N., GOSWAMI, M., HAN, S. G., SCOTT, T., D'ORAZIO, J., ORREN, D. K., GAIROLA, C. G. & MELLON, I. 2017. Inorganic arsenic inhibits the nucleotide excision repair pathway and reduces the expression of XPC. *DNA Repair*, 52, 70-80.
- HOLMES, A. L., WISE, S. S. & WISE, J. P. 2008. Carcinogenicity of hexavalent chromium. *Indian Journal of Medical Research*, 128, 353-372.
- HOWE, C. G. & GAMBLE, M. V. 2016. Influence of arsenic on global levels of histone posttranslational modifications: a review of the literature and challenges in the field. *Current Environmental Health Reports*, 3, 225-237.
- HU, Y. X., LI, J., LOU, B., WU, R. R., WANG, G., LU, C. W., WANG, H. H., PI, J. B. & XU, Y. Y. 2020. The role of reactive oxygen species in arsenic toxicity. *Biomolecules*, 10.
- HUANG, S., CHEN, K., LEUNG, J. K., GUAGLIARDO, P., CHEN, W., SONG, W., CLODE, P., XU, J., YOUNG, S. G. & JIANG, H. 2022. Subcellular partitioning of arsenic trioxide revealed by label-free imaging. *Analytical Chemistry*, 94, 13889-13896.
- IARC 2012. Arsenic, metals, fibres, and dusts. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 100C.
- ISLAM, R., ZHAO, L., WANG, Y. F., LU-YAO, G. & LIU, L. Z. 2022. Epigenetic dysregulations in arsenic-induced carcinogenesis. *Cancers*, 14.
- IURATO, G. & IGAMBERDIEV, A. U. 2022. The reversibility of cellular determination: an evolutive pattern of epigenetic plasticity. *Biosystems*, 221.
- JAUHAINEN, A., THOMSEN, C., STRÖMBOM, L., GRUNDEVIK, P., ANDERSSON, C., DANIELSSON, A., ANDERSSON, M. K., NERMAN, O., RÖRKVIST, L., STÅHLBERG, A. & ÅMAN, P. 2012. Distinct cytoplasmic and nuclear functions of the stress-induced protein DDIT3/CHOP/GADD153. *Plos One*, 7.
- JENUWEIN, T. & ALLIS, C. D. 2001. Translating the histone code. *Science*, 293, 1074-1080.

- JIANG, W. L., BLOCK, M. E. & BOOSANI, C. S. 2022. Short communication: TNF- α and IGF-1 regulates epigenetic mechanisms of HDAC2 and HDAC10. *Plos One*, 17.
- JIANG, X. J., CHEN, C. Z., ZHAO, W. & ZHANG, Z. Z. 2013. Sodium arsenite and arsenic trioxide differently affect the oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in A549 cells: an implication for the paradoxical mechanism. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36, 891-902.
- JOSEPH, F. M. & YOUNG, N. L. 2023. Histone variant-specific post-translational modifications. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 135, 73-84.
- KAMILOGLU, S., SARI, G., OZDAL, T. & CAPANOGLU, E. 2020. Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1, 332-349.
- KAZIMIERCZYK, M., KASPROWICZ, M. K., KASPRZYK, M. E. & WRZESINSKI, J. 2020. Human long noncoding RNA interactome: detection, characterization and function. *International Journal of Molecular Sciences*, 21.
- KENT, D., MARCHETTI, L., MIKULASOVA, A., RUSSELL, L. J. & RICO, D. 2023. Broad H3K4me3 domains: Maintaining cellular identity and their implication in super-enhancer hijacking. *Bioessays*, 45.
- KHAZAEI, S., CHEN, C. C. L., ANDRADE, A. F., KABIR, N., AZARAFSHAR, P., MORCOS, S. M., FRANÇA, J. A., LOPES, M., LUND, P. J., DANIEAU, G., WORME, S., ADNANI, L., NZIRORERA, N., CHEN, X., YOGARAJAH, G., RUSSO, C., ZEINIEH, M., WONG, C. J., BRYANT, L., HÉBERT, S., TONG, B., SIHOTA, T. S., FAURY, D., PULIGANDLA, E., JAWHAR, W., SANDY, V., COWAN, M., NAKADA, E. M., JEROME-MAJEWSKA, L. A., ELLEZAM, B., GOMES, C. C., DENECKE, J., LESSEL, D., MCDONALD, M. T., PIZOLI, C. E., TAYLOR, K., COCANOUGH, B. T., BHOJ, E. J., GINGRAS, A. C., GARCIA, B. A., LU, C., CAMPOS, E. I., KLEINMAN, C. L., GARZIA, L. & JABADO, N. 2023. Single substitution in H3.3G34 alters DNMT3A recruitment to cause progressive neurodegeneration. *Cell*, 186, 1162-1178.
- KIM, J. A. & YEOM, Y. I. 2018. Metabolic signaling to epigenetic alterations in cancer. *Biomolecules & Therapeutics*, 26, 69-80.
- KIM, Y. J. & WILSON, D. M., 3RD 2012. Overview of base excision repair biochemistry. *Current Molecular Pharmacology*, 5, 3-13.
- KLEIN, M. A. & DENU, J. M. 2020. Biological and catalytic functions of sirtuin 6 as targets for small-molecule modulators. *Journal of Biological Chemistry*, 295, 11021-11041.
- KOMISSAROVA, E. V., SAHA, S. K. & ROSSMAN, T. G. 2005. Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202, 99-107.
- KORNBERG, R. D. 1974. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*, 184, 868-871.
- KOSHIJI, M., TO, K. K., HAMMER, S., KUMAMOTO, K., HARRIS, A. L., MODRICH, P. & HUANG, L. E. 2005. HIF-1 α induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutS α expression. *Molecular Cell*, 17, 793-803.
- KUMAR, A., KUMAR, R., ALI, M., GAHLOT, V. & GHOSH, A. Groundwater arsenic poisoning in Buxar District, Bihar, India: health hazards. Arsenic Research and Global Sustainability: Proceedings of the Sixth International Congress on Arsenic in the Environment (As2016), June 19-23, 2016, Stockholm, Sweden, 2016. CRC Press.

-
- KUMAR, N., MATHUR, A., BUNKER, S. K. & JOHN, P. J. 2023. Cell cycle dysregulation on prenatal and postnatal arsenic exposure in skin of Wistar rat neonates. *Xenobiotica*, 53, 320-331.
- KUMAR, V., THAKUR, J. K. & PRASAD, M. 2021. Histone acetylation dynamics regulating plant development and stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78, 4467-4486.
- KUNDU, G., GHASEMI, M., YIM, S., ROHIL, A., XIN, C., REN, L., SRIVASTAVA, S., AKINFOLARIN, A., KUMAR, S., SRIVASTAVA, G. P., SABBISSETTI, V. S., MURUGAIYAN, G. & AJAY, A. K. 2024. STAT3 protein-protein interaction analysis finds P300 as a regulator of STAT3 and histone 3 lysine 27 acetylation in pericytes. *Biomedicines*, 12.
- 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, 33761-33772.
- LAI, W. K. M. & PUGH, B. F. 2017. Understanding nucleosome dynamics and their links to gene expression and DNA replication. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18, 548-562.
- LEE, K. K. & WORKMAN, J. L. 2007. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 284-295.
- LEE, T. I. & YOUNG, R. A. 2013. Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell*, 152, 1237-1251.
- LEHMAN, T. A., BENNETT, W. P., METCALF, R. A., WELSH, J. A., ECKER, J., MODALI, R. V., ULLRICH, S., ROMANO, J. W., APPELLA, E., TESTA, J. R., GERWIN, B. I. & HARRIS, C. C. 1991. P53 mutations, Ras mutations, and P53-heat shock 70 protein complexes in human lung carcinoma cell lines. *Cancer Research*, 51, 4090-4096.
- LI, D. P., LIANG, H. L., WEI, Y. F., XIAO, H., PENG, X. P. & PAN, W. Y. 2024. Exploring the potential of histone demethylase inhibition in multi-therapeutic approaches for cancer treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 264.
- LI, J. L., ZHAO, L., ZHANG, Y., LI, W., DUAN, X. X., CHEN, J. L., GUO, Y. Y., YANG, S., SUN, G. F. & LI, B. 2017. Imbalanced immune responses involving inflammatory molecules and immune-related pathways in the lung of acute and subchronic arsenic exposed mice. *Environmental Research*, 159, 381-393.
- LI, X. L., SHEN, K. N., YUAN, D. X., FAN, J. P., YANG, Y., TIAN, F. Z., QUAN, J. R., LI, C. Y. & WANG, J. L. 2023. Sodium arsenite exposure enhances H3K14 acetylation and impairs male spermatogenesis in rat testes. *Reproductive Toxicology*, 122.
- LINGAPPAN, K. 2018. NF-kappaB in oxidative stress. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 81-86.
- LIU, C. Y., XU, M. Y., LI, W., CAO, X., WANG, Y., CHEN, H. R., ZHANG, T. Q., LU, M. Y., XIE, H. & CHEN, Y. 2024. Quantitative pattern of hPTMs by mass spectrometry-based proteomics with implications for triple-negative breast cancer. *Journal of Proteome Research*, 23, 1495-1505.
- LIU, D., WU, D. L., ZHAO, L. H., YANG, Y., DING, J., DONG, L. G., HU, L. H., WANG, F., ZHAO, X. M., CAI, Y. & JIN, J. J. 2015. Arsenic trioxide reduces global histone H4 acetylation at lysine 16 through direct binding to histone acetyltransferase hMOF in human cells. *Plos One*, 10.
- LIU, G. Q., MATTICK, J. S. & TAFT, R. J. 2013a. A meta-analysis of the genomic and transcriptomic composition of complex life. *Cell Cycle*, 12, 2061-2072.

- LIU, Y., XING, Z. B., ZHANG, J. H. & FANG, Y. 2013b. Akt kinase targets the association of CBP with histone H3 to regulate the acetylation of lysine K18. *FEBS Letters*, 587, 847-853.
- LIU, Z. J., CARBREY, J. M., AGRE, P. & ROSEN, B. P. 2004. Arsenic trioxide uptake by human and rat aquaglyceroporins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316, 1178-1185.
- LIU, Z. J., SANCHEZ, M. A., JIANG, X., BOLES, E., LANDFEAR, S. M. & ROSEN, B. P. 2006. Mammalian glucose permease GLUT1 facilitates transport of arsenic trioxide and methylarsonous acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351, 424-430.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-408.
- LOWNEY, Y. W., WESTER, R. C., SCHOOF, R. A., CUSHING, C. A., EDWARDS, M. & RUBY, M. V. 2007. Dermal absorption of arsenic from soils as measured in the rhesus monkey. *Toxicological Sciences*, 100, 381-392.
- LUGER, K., MADER, A. W., RICHMOND, R. K., SARGENT, D. F. & RICHMOND, T. J. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 angstrom resolution. *Nature*, 389, 251-260.
- LUMPP, T., STÖBER, S., FISCHER, F., HARTWIG, A. & KÖBERLE, B. 2024. Role of epigenetics for the efficacy of cisplatin. *International Journal of Molecular Sciences*, 25.
- LUO, M. G., BAI, J. B., LIU, B. F., YAN, P. Q., ZUO, F. F., SUN, H. Y., SUN, Y., XU, X. H., SONG, Z. H., YANG, Y., MASSAGUÉ, J., LAN, X., LU, Z., CHEN, Y. G., DENG, H. T., XIE, W. & XI, Q. R. 2019. H3K18ac primes mesendodermal differentiation upon nodal signaling. *Stem Cell Reports*, 13, 642-656.
- MA, L., HOU, T., ZHU, K. & ZHANG, A. H. 2023. Inhibition of histone H3K18 acetylation-dependent antioxidant pathways involved in arsenic-induced liver injury in rats and the protective effect of juice. *Toxics*, 11.
- MA, L., LI, J., ZHAN, Z. B., CHEN, L. P., LI, D. C., BAI, Q., GAO, C., LI, J., ZENG, X. W., HE, Z. N., WANG, S., XIAO, Y. M., CHEN, W. & ZHANG, A. H. 2016. Specific histone modification responds to arsenic-induced oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 302, 52-61.
- MAIER, A., SCHUMANN, B. L., CHANG, X. Q., TALASKA, G. & PUGA, A. 2002. Arsenic co-exposure potentiates benzo[a]pyrene genotoxicity. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 517, 101-111.
- MAILE, T. M., IZRAEL-TOMASEVIC, A., CHEUNG, T., GULER, G. D., TINDELL, C., MASSELOT, A., LIANG, J., ZHAO, F., TROJER, P., CLASSON, M. & ARNOTT, D. 2015. Mass spectrometric quantification of histone post-translational modifications by a hybrid chemical labeling method. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14, 1148-1158.
- MANNA, S., MISHRA, J., BARAL, T., KIRTANA, R., NANDI, P., ROY, A., CHAKRABORTY, S., NIHARIKA & PATRA, S. K. 2023. Epigenetic signaling and crosstalk in regulation of gene expression and disease progression. *Epigenomics*, 15, 723-740.
- MAO, Z. Y., HINE, C., TIAN, X., VAN METER, M., AU, M., VAIDYA, A., SELUANOV, A. & GORBUNOVA, V. 2011. SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science*, 332, 1443-1446.
- MARGUERON, R. & REINBERG, D. 2011. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*, 469, 343-349.

-
- MARTEIJN, J. A., LANS, H., VERMEULEN, W. & HOEIJMAKERS, J. H. J. 2014. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15, 465-481.
- MARTIN, B. J. E., BRIND'AMOUR, J., KUZMIN, A., JENSEN, K. N., LIU, Z. C., LORINCZ, M. & HOWE, L. J. 2021. Transcription shapes genome-wide histone acetylation patterns. *Nature Communications*, 12.
- MARTINEZ-ZAMUDIO, R. & HA, H. C. 2011. Environmental epigenetics in metal exposure. *Epigenetics*, 6, 820-827.
- MATTHÄUS, T., STÖBER, S., SEREN, H. Y., HABERLAND, V. M. M. & HARTWIG, A. 2023. Arsenite impairs BRCA1-dependent DNA double-strand break repair, a mechanism potentially contributing to genomic instability. *International Journal of Molecular Sciences*, 24.
- MATTHEWS, H. K., BERTOLI, C. & DE BRUIN, R. A. M. 2022. Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23, 74-88.
- MAWIA, A. M., HUI, S. Z., ZHOU, L., LI, H. J., TABASSUM, J., LAI, C. K., WANG, J. X., SHAO, G. N., WEI, X. J., TANG, S. Q., LUO, J., HU, S. K. & HU, P. S. 2021. Inorganic arsenic toxicity and alleviation strategies in rice. *Journal of Hazardous Materials*, 408.
- MAYO, J., SAINZ, R. & QUIROS-GONZALEZ, I. 2018. MnSOD/SOD2 in cancer: the story of a double agent. *Reactive Oxygen Species*, 5, 86-106.
- MAZE, I., NOH, K. M., SOSHNEV, A. A. & ALLIS, C. D. 2014. Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. *Nature Reviews Genetics*, 15, 259-271.
- MEANEY, M. J. 2010. Epigenetics and the biological definition of gene × environment interactions. *Child Development*, 81, 41-79.
- MEYER, S., LOPEZ-SERRANO, A., MITZE, H., JAKUBOWSKI, N. & SCHWERDTLE, T. 2018. Single-cell analysis by ICP-MS/MS as a fast tool for cellular bioavailability studies of arsenite. *Metallomics*, 10, 73-76.
- MIAO, Z. F., CHANG, E. E., TSAI, F. Y., YEH, S. C., WU, C. F., WU, K. Y., WANG, C. J. & TSOU, T. C. 2009. Increased aquaglyceroporin 9 expression disrupts arsenic resistance in human lung cancer cells. *Toxicology in Vitro*, 23, 209-216.
- MIAR, A., HEVIA, D., MUNOZ-CIMADEVILLA, H., ASTUDILLO, A., VELASCO, J., SAINZ, R. M. & MAYO, J. C. 2015. Manganese superoxide dismutase (SOD2/MnSOD)/catalase and SOD2/GPx1 ratios as biomarkers for tumor progression and metastasis in prostate, colon, and lung cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, 85, 45-55.
- MILLÁN-ZAMBRANO, G., BURTON, A., BANNISTER, A. J. & SCHNEIDER, R. 2022. Histone post-translational modifications - cause and consequence of genome function. *Nature Reviews Genetics*, 23, 563-580.
- MIZIAK, P., BARAN, M., BORKIEWICZ, L., TROMBIK, T. & STEPULAK, A. 2024. Acetylation of histone H3 in cancer progression and prognosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 25.
- MOORE, L. D., LE, T. & FAN, G. P. 2013. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 38, 23-38.

- MORERA, L., LUBBERT, M. & JUNG, M. 2016. Targeting histone methyltransferases and demethylases in clinical trials for cancer therapy. *Clinical Epigenetics*, 8, 57.
- MUENYI, C. S., LJUNGMAN, M. & STATES, J. C. 2015. Arsenic disruption of DNA damage responses: potential role in carcinogenesis and chemotherapy. *Biomolecules*, 5, 2184-2193.
- MUKHOPADHYAY, R. & ROSEN, B. P. 2002. Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes. *Environmental Health Perspectives*, 110, 745-748.
- MURE, K., UDDIN, A. N., LOPEZ, L. C., STYBLO, M. & ROSSMAN, T. G. 2003. Arsenite induces delayed mutagenesis and transformation in human osteosarcoma cells at extremely low concentrations. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 41, 322-331.
- MUZAFFAR, S., KHAN, J., SRIVASTAVA, R., GORBATYUK, M. S. & ATHAR, M. 2023. Mechanistic understanding of the toxic effects of arsenic and warfare arsenicals on human health and environment. *Cell Biology and Toxicology*, 39, 85-110.
- NRC 2013. Critical aspects of EPA's IRIS assessment of inorganic arsenic: interim report.
- NUÑEZ, R., SIDLOWSKI, P. F. W., STEEN, E. A., WYNIA-SMITH, S. L., SPRAGUE, D. J., KEYES, R. F. & SMITH, B. C. 2024. The TRIM33 bromodomain recognizes histone lysine lactylation. *ACS Chemical Biology*, 19, 2418-2428.
- OUIPORNKOCHAGORN, S. & FELDMANN, J. 2010. Dermal uptake of arsenic through human skin depends strongly on its speciation. *Environmental Science & Technology*, 44, 3972-3978.
- PARK, S. Y. & KIM, J. S. 2020. A short guide to histone deacetylases including recent progress on class II enzymes. *Experimental and Molecular Medicine*, 52, 204-212.
- PARMAR, J. J. & PADINHATEERI, R. 2020. Nucleosome positioning and chromatin organization. *Current Opinion in Structural Biology*, 64, 111-118.
- PEĆINA-ŠLAUS, N., KAFKA, A., SALAMON, I. & BUKOVAC, A. 2020. Mismatch repair pathway, genome stability, and cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7.
- PENG, L. R., LING, H. B., YUAN, Z. G., FANG, B., BLOOM, G., FUKASAWA, K., KOOMEN, J., CHEN, J. D., LANE, W. S. & SETO, E. 2012. SIRT1 negatively regulates the activities, functions, and protein levels of hMOF and TIP60. *Molecular and Cellular Biology*, 32, 2823-2836.
- PENG, X. S., LI, H., WANG, D. P., WU, L., HU, J. C., YE, F. P., SYED, B. M., LIU, D. Y., ZHANG, J. S. & LIU, Q. Z. 2024. Intrauterine arsenic exposure induces glucose metabolism disorders in adult offspring by targeting TET2-mediated DNA hydroxymethylation reprogramming of HNF4α in developing livers, an effect alleviated by ascorbic acid. *Journal of Hazardous Materials*, 465.
- PIROOZANIA, S. K. & ELEFANT, F. 2013. Targeting specific HATs for neurodegenerative disease treatment: translating basic biology to therapeutic possibilities. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7.
- PORTELA, A. & ESTELLER, M. 2010. Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology*, 28, 1057-1068.
- POURNARA, A., KIPPLER, M., HOLMLUND, T., CEDER, R., GRAFSTRÖM, R., VAHTER, M., BROBERG, K. & WALLBERG, A. E. 2016. Arsenic alters global histone modifications in lymphocytes in vitro and in vivo. *Cell Biology and Toxicology*, 32, 275-284.

-
- QIN, W. H., WOLF, P., LIU, N., LINK, S., SMETS, M., LA MASTRA, F., FORNÉ, I., PICHLER, G., HÖRL, D., FELLINGER, K., SPADA, F., BONAPACE, I. M., IMHOF, A., HARZ, H. & LEONHARDT, H. 2015. DNA methylation requires a DNMT1 ubiquitin interacting motif (UIM) and histone ubiquitination. *Cell Research*, 25, 911-929.
- QU, W. & WAALKES, M. P. 2015. Metallothionein blocks oxidative DNA damage induced by acute inorganic arsenic exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 282, 267-274.
- RAE, I. D. 2020. Arsenic: its chemistry, its occurrence in the earth and its release into industry and the environment. *ChemTexts*, 6.
- RAHMAN, M. T. & DE LEY, M. 2017. Arsenic induction of metallothionein and metallothionein induction against arsenic cytotoxicity. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Vol 240*, 240, 151-168.
- RAHMAN, S., HOUSEIN, Z., DABROWSKA, A., MAYÁN, M. D., BOOBIS, A. R. & HAJJI, N. 2015. E2F1-mediated induction in arsenic trioxide-induced cellular transformation: effects of global H3K9 hypoacetylation and promoter-specific hyperacetylation. *Environmental Health Perspectives*, 123, 484-492.
- RAMIREZ, T., BROCHER, J., STOPPER, H. & HOCK, R. 2008. Sodium arsenite modulates histone acetylation, histone deacetylase activity and HMGN protein dynamics in human cells. *Chromosoma*, 117, 147-157.
- RATNAIKE, R. N. 2003. Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgraduate Medical Journal*, 79, 391-396.
- RAYMAEKERS, M., SMETS, R., MAES, B. & CARTUYVELS, R. 2009. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 23, 145-51.
- REA, M., ECKSTEIN, M., ELEAZER, R., SMITH, C. & FONDUFE-MITTENDORF, Y. N. 2017. Genome-wide DNA methylation reprogramming in response to inorganic arsenic links inhibition of CTCF binding, DNMT expression and cellular transformation. *Scientific Reports*, 7.
- 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, 1904-1909.
- REN, X. F., MCHALE, C. M., SKIBOLA, C. F., SMITH, A. H., SMITH, M. T. & ZHANG, L. P. 2011. An emerging role for epigenetic dysregulation in arsenic toxicity and carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 119, 11-19.
- RICKETTS, M. D., HAN, J., SZURGOT, M. R. & MARMORSTEIN, R. 2019. Molecular basis for chromatin assembly and modification by multiprotein complexes. *Protein Science*, 28, 329-343.
- RONG, D. W., SUN, G. S., WU, F., CHENG, Y., SUN, G. Q., JIANG, W., LI, X., ZHONG, Y., WU, L. L., ZHANG, C. Y., TANG, W. W. & WANG, X. H. 2021. Epigenetics: Roles and therapeutic implications of non-coding RNA modifications in human cancers. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 25, 67-82.
- ROTHBART, S. B. & STRAHL, B. D. 2014. Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms*, 1839, 627-643.

- ROUNTREE, M. R., BACHMAN, K. E. & BAYLIN, S. B. 2000. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nature Genetics*, 25, 269-277.
- RUAN, Y. H., FANG, X., GUO, T. Y., LIU, Y. T., HU, Y., WANG, X. N., HU, Y. X., GAO, L. Y., LI, Y. F., PI, J. B. & XU, Y. Y. 2022. Metabolic reprogramming in the arsenic carcinogenesis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 229.
- RUBIN, S. S. C. D., ALAVA, P., ZEKKER, I., DU LAING, G. & VAN DE WIELE, T. 2014. Arsenic thiolation and the role of sulfate-reducing bacteria from the human intestinal tract. *Environmental Health Perspectives*, 122, 817-822.
- SAINTILNORD, W. N. & FONDUFE-MITTENDORF, Y. 2021. Arsenic-induced epigenetic changes in cancer development. *Seminars in Cancer Biology*, 76, 195-205.
- SAKSOUK, N., SIMBOECK, E. & DÉJARDIN, J. 2015. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics & Chromatin*, 8.
- 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 α (Gadd45 α) and its interactions with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Aurora A kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 22196-22201.
- SANYAL, T., DAS, A., BHATTACHARJEE, S., GUMP, B. B., BENDINSKAS, K. & BHATTACHARJEE, P. 2024. Targeting the 'DNA methylation mark': Analysis of early epigenetic-alterations in children chronically exposed to arsenic. *Science of the Total Environment*, 912.
- SAXONOV, S., BERG, P. & BRUTLAG, D. L. 2006. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 1412-1417.
- SCHAGGER, H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1, 16-22.
- SCHWERDTLE, T., WALTER, I. & HARTWIG, A. 2003a. Arsenite and its biomethylated metabolites interfere with the formation and repair of stable BPDE-induced DNA adducts in human cells and impair XPAzf and Fpg. *DNA Repair*, 2, 1449-1463.
- SCHWERDTLE, T., WALTER, I., MACKIW, I. & HARTWIG, A. 2003b. Induction of oxidative DNA damage by arsenite and its trivalent and pentavalent methylated metabolites in cultured human cells and isolated DNA. *Carcinogenesis*, 24, 967-974.
- SCIANDRELLO, G., BARBARO, R., CARADONNA, F. & BARBATA, G. 2002. Early induction of genetic instability and apoptosis by arsenic in cultured Chinese hamster cells. *Mutagenesis*, 17, 99-103.
- SERGEEVA, A., DAVYDOVA, K., PERENKOV, A. & VEDUNOVA, M. 2023. Mechanisms of human DNA methylation, alteration of methylation patterns in physiological processes and oncology. *Gene*, 875.
- SERRAZINA, D. C., DE ANDRADE, V. L., COTA, M., MATEUS, M. L., ASCHNER, M. & DOS SANTOS, A. P. M. 2018. Biomarkers of exposure and effect in a working population exposed to lead, manganese and arsenic. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues*, 81, 983-997.

-
- SHAJI, E., SANTOSH, M., SARATH, K. V., PRAKASH, P., DEEPCHAND, V. & DIVYA, B. V. 2021. Arsenic contamination of groundwater: A global synopsis with focus on the Indian Peninsula. *Geoscience Frontiers*, 12.
- SHEN, S. W., LI, X. F., CULLEN, W. R., WEINFELD, M. & LE, X. C. 2013. Arsenic binding to proteins. *Chemical Reviews*, 113, 7769-7792.
- SHVEDUNOVA, M. & AKHTAR, A. 2022. Modulation of cellular processes by histone and non-histone protein acetylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23, 329-349.
- SINGH, A. K. & MUELLER-PLANITZ, F. 2021. Nucleosome positioning and spacing: from mechanism to function. *Journal of Molecular Biology*, 433.
- SINGH, A. P., GOEL, R. K. & KAUR, T. 2011. Mechanisms pertaining to arsenic toxicity. *Toxicology International*, 18, 87-93.
- SMITH, B. C. & DENU, J. M. 2009. Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms*, 1789, 45-57.
- SMITH, E. R., PANNUTI, A., GU, W. G., STEURNAGEL, A., COOK, R. G., ALLIS, C. D. & LUCCHESI, J. C. 2000. The MSL complex acetylates histone h4 at lysine 16, a chromatin modification linked to dosage compensation. *Molecular and Cellular Biology*, 20, 312-318.
- SOLDI, M., CUOMO, A. & BONALDI, T. 2016. Quantitative assessment of chemical artefacts produced by propionylation of histones prior to mass spectrometry analysis. *Proteomics*, 16, 1952-1954.
- SOLOMON, E. R., CALDWELL, K. K. & ALLAN, A. M. 2021. A novel method for the normalization of ChIP-qPCR data. *MethodsX*, 8, 101504.
- SPEER, R. M., NANDI, S. P., COOPER, K. L., ZHOU, X. X., YU, H., GUO, Y., HUDSON, L. G., ALEXANDROV, L. B. & LIU, K. J. 2023. Arsenic is a potent co-mutagen of ultraviolet light. *Communications Biology*, 6.
- 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.
- SUN, M. J., CHENG, H. R., YU, T. L., TAN, J. W., LI, M., CHEN, Q., GU, Y., JIANG, C. L., LI, S. T., HE, Y. F. & WEN, W. H. 2023. Involvement of a AS3MT/c-Fos/p53 signaling axis in arsenic-induced tumor in human lung cells. *Environmental Toxicology*, 38, 615-627.
- SUN, X., ZHOU, X. X., DU, L. B., LIU, W. L., LIU, Y., HUDSON, L. G. & LIU, K. J. 2014. Arsenite binding-induced zinc loss from PARP-1 is equivalent to zinc deficiency in reducing PARP-1 activity, leading to inhibition of DNA repair. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 274, 313-318.
- SYKORA, P. & SNOW, E. T. 2008. Modulation of DNA polymerase beta-dependent base excision repair in cultured human cells after low dose exposure to arsenite. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 228, 385-394.
- TAKIMOTO, R., MACLACHLAN, T. K., DICKER, D. T., NIITSU, Y., MORI, T. & EL-DEIRY, W. S. 2002. BRCA1 transcriptionally regulates damaged DNA binding protein (DDB2) in the DNA repair response following UV-Irradiation. *Cancer Biology & Therapy*, 1, 177-186.

- TAM, L. M., JIANG, J., WANG, P. C., LI, L., MIAO, W. L., DONG, X. J. & WANG, Y. S. 2017. Arsenite binds to the zinc finger motif of TIP60 histone acetyltransferase and induces its degradation via the 26S proteasome. *Chemical Research in Toxicology*, 30, 1685-1693.
- TAM, L. M., PRICE, N. E. & WANG, Y. S. 2020. Molecular mechanisms of arsenic-induced disruption of DNA repair. *Chemical Research in Toxicology*, 33, 709-726.
- TANG, H. X., CHEN, Z. M., GAN, S. D., LIANG, Y., ZHANG, H. L., YANG, C. Y., LIN, L. Q., GUO, Y. B., LI, S. Y., LI, J. & YAO, L. H. 2023. GLUT1 contributes to impaired epithelial tight junction in the late phase of acute lung injury. *European Journal of Pharmacology*, 961.
- THOMPSON, J. A., WHITE, C. C., COX, D. P., CHAN, J. Y., KAVANAGH, T. J., FAUSTO, N. & FRANKLIN, C. C. 2009. Distinct Nrf1/2-independent mechanisms mediate As³⁺-induced glutamate-cysteine ligase subunit gene expression in murine hepatocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 46, 1614-25.
- TIAN, C., GUPTA, R., ZHAO, Y. C. & ZHANG, J. Y. 2016. Release behaviors of arsenic in fine particles generated from a typical high-arsenic coal at a high temperature. *Energy & Fuels*, 30, 6201-6209.
- TJEERTES, J. V., MILLER, K. M. & JACKSON, S. P. 2009. Screen for DNA-damage-responsive histone modifications identifies H3K9Ac and H3K56Ac in human cells. *EMBO Journal*, 28, 1878-1889.
- TONG, D., ORTEGA, J., KIM, C., HUANG, J., GU, L. Y. & LI, G. M. 2015. Arsenic inhibits DNA mismatch repair by promoting EGFR expression and PCNA phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 290, 14536-14541.
- UNIPROT, C. 2025. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Research*, 53, D609-D617.
- VAN GILS, J., MAGDINIER, F., FERGELOT, P. & LACOMBE, D. 2021. Rubinstein-taybi syndrome: a model of epigenetic disorder. *Genes*, 12.
- VERDIN, E. & OTT, M. 2015. 50 years of protein acetylation: From gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16, 258-264.
- VERMA, A., SUMI, S. & SEERVI, M. 2021. Heat shock proteins-driven stress granule dynamics: yet another avenue for cell survival. *Apoptosis*, 26, 371-384.
- VILLA-BELLOSTA, R. & SORRIBAS, V. 2010. Arsenate transport by sodium/phosphate cotransporter type IIb. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 247, 36-40.
- WADDINGTON, C. H. 1942. The epigenotype. *Wiederveröffentlicht 2012 in International Journal of Epidemiology*, 41, 10-3.
- WALTER, I., SCHWERDTLE, T., THUY, C., PARSONS, J. L., DIANOV, G. L. & HARTWIG, A. 2007. Impact of arsenite and its methylated metabolites on PARP-1 activity, PARP-1 gene expression and poly(ADP-ribosyl)ation in cultured human cells. *DNA Repair*, 6, 61-70.
- WANG, D. P., MA, Y., YANG, X., XU, X. G., ZHAO, Y. Y., ZHU, Z., WANG, X. J., DENG, H. Y., LI, C. C., GAO, F. F., TONG, J., YAMANAKA, K. & AN, Y. 2015. Hypermethylation of the Keap1 gene inactivates its function, promotes Nrf2 nuclear accumulation, and is involved in arsenite-induced human keratinocyte transformation. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 209-219.

-
- WANG, Q. L., WANG, W. J. & ZHANG, A. H. 2021. TET-mediated DNA demethylation plays an important role in arsenic-induced HBE cells oxidative stress via regulating promoter methylation of OGG1 and GSTP1. *Toxicology in Vitro*, 72.
- WANG, X. J., SUN, Z., VILLENEUVE, N. F., ZHANG, S., ZHAO, F., LI, Y. J., CHEN, W. M., YI, X. F., ZHENG, W. X., WONDRAK, G. T., WONG, P. K. & ZHANG, D. D. 2008a. Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis*, 29, 1235-1243.
- WANG, Z. B., ZANG, C. Z., ROSENFELD, J. A., SCHONES, D. E., BARSKI, A., CUDDAPAH, S., CUI, K. R., ROH, T. Y., PENG, W. Q., ZHANG, M. Q. & ZHAO, K. J. 2008b. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nature Genetics*, 40, 897-903.
- WATANABE, T. & HIRANO, S. 2013. Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, 87, 969-979.
- WEI, J. W., HUANG, K., YANG, C. & KANG, C. S. 2017. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics. *Oncology Reports*, 37, 3-9.
- WEI, S., ZHANG, H. & TAO, S. 2019. A review of arsenic exposure and lung cancer. *Toxicology Research (Cambridge)*, 8, 319-327.
- WILES, E. T. & SELKER, E. U. 2017. H3K27 methylation: a promiscuous repressive chromatin mark. *Current Opinion in Genetics & Development*, 43, 31-37.
- WISE, S. S., HOLMES, A. L. & WISE, J. P., SR. 2008. Hexavalent chromium-induced DNA damage and repair mechanisms. *Rev Environ Health*, 23, 39-57.
- WU, P. P., LIN, S. J., CHEN, D. Q. & JIN, C. Y. 2023. Characterization of histone chaperone MCM2 as a key regulator in arsenic-induced depletion of H3.3 at genomic loci. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 477.
- YE, F. P., WU, L., LI, H., PENG, X. S., XU, Y., LI, W. Q., WEI, Y. Y., CHEN, F., ZHANG, J. S. & LIU, Q. Z. 2023. SIRT1/PGC-1 α is involved in arsenic-induced male reproductive damage through mitochondrial dysfunction, which is blocked by the antioxidative effect of zinc. *Environmental Pollution*, 320.
- YIN, J. Y., ZHOU, Q., TAN, J. W., CHE, W. J. & HE, Y. F. 2022. Inorganic arsenic induces MDM2, p53, and their phosphorylation and affects the MDM2/p53 complex in vitro. *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 88078-88088.
- YUSUF, A. P., ABUBAKAR, M. B., MALAMI, I., IBRAHIM, K. G., ABUBAKAR, B., BELLO, M. B., QUSTY, N., ELAZAB, S. T., IMAM, M. U., ALEXIOU, A. & BATIHA, G. E. S. 2021. Zinc metalloproteins in epigenetics and their crosstalk. *Life (Basel)*, 11.
- ZENG, Q. B. & ZHANG, A. H. 2020. Assessing potential mechanisms of arsenic-induced skin lesions and cancers: Human and in vitro evidence. *Environmental Pollution*, 260.
- ZHANG, A. H., LI, H. Y., XIAO, Y., CHEN, L. P., ZHU, X. N., LI, J., MA, L., PAN, X. L., CHEN, W. & HE, Z. N. 2017. Aberrant methylation of nucleotide excision repair genes is associated with chronic arsenic poisoning. *Biomarkers*, 22, 429-438.

- ZHANG, A. L., CHEN, L., MA, L., DING, X. J., TANG, S. F., ZHANG, A. H. & LI, J. 2020. Role of H3K18ac-regulated nucleotide excision repair-related genes in arsenic-induced DNA damage and repair of HaCaT cells. *Human & Experimental Toxicology*, 39, 1168-1177.
- ZHANG, H. X., CHEN, Y., XU, R. & HE, Q. Y. 2018a. Nrf2 mediates the resistance of human A549 and HepG2 cancer cells to boningmycin, a new antitumor antibiotic, through regulation of glutathione levels. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39, 1661-1669.
- ZHANG, Y., XUE, Y. M., SHI, J. J., AHN, J., MI, W. Y., ALI, M., WANG, X. L., KLEIN, B. J., WEN, H., LI, W., SHI, X. B. & KUTATELADZE, T. G. 2018b. The ZZ domain of p300 mediates specificity of the adjacent HAT domain for histone H3. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25, 841-849.
- ZHANG, Z., PI, R., LUO, J., LIU, J., ZHANG, A. & SUN, B. 2022. Association between arsenic exposure and inflammatory cytokines and C-reaction protein: a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 101, e32352.
- ZHANG, Z. H., HONG, Q., ZHANG, Z. C., XING, W. Y., XU, S., TIAN, Q. X., YE, Q. L., WANG, H., YU, D. X., XIE, D. D. & XU, D. X. 2021. ROS-mediated genotoxic stress is involved in NaAsO₂-induced cell cycle arrest, stemness enhancement and chemoresistance of prostate cancer cells in a p53-independent manner. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208.
- ZHAO, F., SEVERSON, P., PACHECO, S., FUTSCHER, B. W. & KLIMECKI, W. T. 2013. Arsenic exposure induces the Warburg effect in cultured human cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 271, 72-77.
- ZHAO, Y. M. & GARCIA, B. A. 2015. Comprehensive catalog of currently documented histone modifications. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7.
- ZHOU, T., CHUNG, Y. H., CHEN, J. J. & CHEN, Y. 2016. Site-specific identification of lysine acetylation stoichiometries in mammalian cells. *Journal of Proteome Research*, 15, 1103-1113.
- ZHOU, X., LI, Q., ARITA, A., SUN, H. & COSTA, M. 2009. Effects of nickel, chromate, and arsenite on histone 3 lysine methylation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 236, 78-84.
- ZHOU, X., SUN, H., ELLEN, T. P., CHEN, H. B. & COSTA, M. 2008. Arsenite alters global histone H3 methylation. *Carcinogenesis*, 29, 1831-1836.
- ZHOU, X. X., DING, X. F., SHEN, J. G., YANG, D., HUDSON, L. G. & LIU, K. J. 2019. Peroxynitrite contributes to arsenic-induced PARP-1 inhibition through ROS/RNS generation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 378.
- ZHOU, X. X., SPEER, R. M., VOLK, L., HUDSON, L. G. & LIU, K. J. 2021. Arsenic co-carcinogenesis: inhibition of DNA repair and interaction with zinc finger proteins. *Seminars in Cancer Biology*, 76, 86-98.
- ZHOU, X. X., SUN, X., COOPER, K. L., WANG, F., LIU, K. J. & HUDSON, L. G. 2011. Arsenite interacts selectively with zinc finger proteins containing C3H1 or C4 motifs. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 22855-22863.
- ZHU, Y., LI, Y. Q., LOU, D., GAO, Y., YU, J., KONG, D. H., ZHANG, Q., JIA, Y. K., ZHANG, H. M. & WANG, Z. B. 2018. Sodium arsenite exposure inhibits histone acetyltransferase p300 for attenuating H3K27ac at enhancers in mouse embryonic fibroblast cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 357, 70-79.

A ANHANG

A.1 CHEMIKALIEN SOWIE MESS- UND ANALYSEGERÄTE

A.1.1 Chemikalien

Tabelle A1 | Auflistung der verwendeten Chemikalien und deren Hersteller.

Bezeichnung	Hersteller
AAS-Arsenstandard (1 g/L)	PerkinElmer (Waltham, USA)
Accutase	Sigma-Aldrich (Burlington, MA, USA)
Aceton	Merck (Darmstadt, DE)
Acrylamid, (Rotiphorese® Gel 37,5:1)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Amersham ECL™ Prime Reagenz	Cytvia (Marlborough, MA, USA)
Ammoniumperoxodisulfat (APS), ≥ 98 %	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Atomic Absorption Modifier Solution Mg, 10000 mg/L, Matrix: Mg(NO ₃) ₂	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
Atomic Absorption Modifier Solution Pd, 10000 mg/L, Matrix: Pd(NO ₃) ₂ in 15 % HNO ₃	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
Bovine Serum Albumin (BSA), albumin fraction V low endotoxin	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Burlington, MA, USA)
Calciumchlorid-Dihydrat ≥ 95 %	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
CASYTon®	OMNI Life Science (Bremen, DE)
Collagen I (rat tail)	Corning (Corning, NY, USA)
Coomassie Brilliant Blau G250	Ral Diagnostics (Martillac, FR)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (CyStain® DNA/Protein)	Sysmex (Kobe, JP)
Dimethylsulfoxid (DMSO), ≥ 99,9 %	Sigma-Aldrich (Burlington, MA, USA)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄), ≥ 98 %	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
DL-Dithiothreitol (DTT), ≥ 98 %	Sigma-Aldrich (Burlington, MA, USA)
DNA Away®	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
DNA-Leiter 50 bp	Roth (Karlsruhe, DE)
DNA-Leiter Purple 100 bp	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
DNA-Suspensionspuffer	Teknova (Hollister, USA)
Essigsäure 100 % (Eisessig)	Merck (Darmstadt, DE)
Ethanol (pure)	Sigma-Aldrich (Burlington, MA, USA)

Ethanol (reinst), 99,9 %	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Ethanol (vergällt), 96 %	BrüggemannAlcohol (Heilbronn, DE)
Ethanol 96 %	VWR (Radnor, PA, USA)
Ethylendiamintetraacetat di-Natriumsalz Dihydrat (EDTA, ≥ 99 %)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
FACSFlow	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
FACSRinse	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Fetales Kälberserum (FKS) Gibco	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Fibronectin, bovine plasma	Sigma-Aldrich (Burlington, MA, USA)
Formaldehyd (FA), 37 % mit 10 % Methanol	Sigma-Aldrich (Burlington, MA, USA)
Gel Loading Dye, purple (6x)	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
GelPilot® 50 bp Ladder (50-500 bp)	Qiagen (Hilden, DE)
GelRed™ Nucleic Acid Stain (10000x)	Biotium (Fremont, CA, USA)
Glycin, ≥ 99 %	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
IFC Control Line Fluid	Standard BioTools (San Francisco, CA, USA)
Kaliumchlorid (KCl), ≥ 99,5 %	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄), ≥ 99 %	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄), ≥ 99 %	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Keratinocyte Growth Medium (KGM) Bullet Kit™	Lonza (Basel, CH)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂), ≥ 98,5 %	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Methanol	VWR (Radnor, PA, USA)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Natrium(meta)arsenit (NaAsO ₂), ≥ 90 %	Sigma-Aldrich (Burlington, MA, USA)
Natriumbutyrat	Stemcell Technologies (Vancouver, CA)
Natriumchlorid (NaCl), ≥ 99,5 %	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄), ≥ 99 %	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumdodecylsulfat (SDS), 10 %	AppliChem (Darmstadt, DE)
Natriumhydroxid (NaOH) (1 M und 4 M)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Nonidet® P 40 Ersatzprodukt (NP-40), Millipore®	Merck (Darmstadt, DE)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
PCR Reverse Transkriptase-Puffer (10x)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
PCR-zertifiziertes (nukleasefreies) Wasser	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Penicillin/Streptomycin-Lösung (Penicillin: 5000 U/mL; Streptomycin: 5 mg/L)	Sigma-Aldrich (Burlington, MA, USA)
Pierce™ 660 nm Protein-Assay-Reagenz	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Ponceau S	Merck (Darmstadt, DE)

Primer-Paare	Fluidigm (San Francisco, CA, USA) Eurofins Scientific (Luxemburg, LUX) Cell Signaling Technology (Leiden, NL)
Proteinase K (20 mg/mL)	Cell Signaling Technology (Leiden, NL)
<i>Protease Inhibitor Cocktail</i> (PIC)	Cell Signaling Technology (Leiden, NL)
Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder (0,1-10 kb)	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
RNAse A (10 mg/mL)	Cell Signaling Technology (Leiden, NL)
Roti® Load (4x)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
RPMI-1640	VWR (Radnor, PA, USA)
Saccharose	Sigma-Aldrich (Burlington, MA, USA)
Salpetersäure (HNO ₃), 69 %	Merck (Darmstadt, DE)
Salzsäure (HCl) (1 M und 4 M)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Sample Loading Reagent	Standard BioTools (San Francisco, CA, USA)
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄), ≥ 97 %	Merck (Darmstadt, DE)
SsoFast™ EvaGreen® Supermix with low ROX	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
TaqMan® PreAmp Master Mix (2x)	Applied Biosystems (Waltham, MA, USA)
TEMED, ≥ 99 %	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
TE-Puffer	TEKnova (Hollister, CA, USA)
Trichloressigsäure (TCA), ≥ 99 %	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Trifluoressigsäure (TFA), ≥ 99 %	Merck (Darmstadt, DE)
Tris ≥ 99,9 %	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Trypsin aus Rinderpankreas	Sigma-Aldrich (Burlington, MA, USA)
Tween® 20	Merck (Darmstadt, DE)
Wasser, Optima™ LC/MS-grade	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30%	Merck (Darmstadt, DE)

A.1.2 Puffer und Lösungen

Tabelle A2 | Verwendete Puffer bzw. Lösungen und deren Zusammensetzung.

Bezeichnung	Zusammensetzung
AAS-Aufschlusslösung	69 % HNO ₃ und 30 % H ₂ O ₂ (Verhältnis 1:1)
Agarosegel (1 %)	1 g Agarose 100 mL 1x TAE-Puffer 10 µL 10000x GelRed™
Agarosegel (2 %)	2 g Agarose 100 mL 1x TAE-Puffer 10 µL 10000x GelRed™
Blockierlösung	5 % Milchpulver in TBS-T (0,1 %)
Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS in ddH ₂ O
Mg/Pd Matrixmodifizierlösung	0,6 mL Mg AAS Modifier Solution (10 g/L) 1 mL Pd AAS Modifier Solution (10 g/L) mit 0,2 %iger HNO ₃ auf 10 mL auffüllen
Nuclear Isolation Buffer (NIB)	15 mM Tris-HCl (Tris mit HCl titrieren bis pH=7,5) 60 mM KCl 11 mM CaCl ₂ 5 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 250 mM Sucrose 1 mM Dithiothreitol (DTT) 10 mM Natriumbutyrat in ddH ₂ O
Phosphate Buffered Saline (PBS)	100 mM NaCl 4,5 mM KCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM KH ₂ PO ₄

	in ddH ₂ O; pH=7,4 und pH=7,2
PBS-EDTA	0,5 mM EDTA in PBS; pH=7,4
Ponceau S-Lösung	0,5 % Ponceau S 1 % Essigsäure in ddH ₂ O
Sammelgel (6 %)	4,375 mL ddH ₂ O 1,90 mL Tris-HCl-Puffer (1 M; pH = 6,8) 75 µL SDS (10 %) 1,125 mL Acrylamid (40 %) 75 µL APS (10 %) 8,5 µL TEMED Pipettenspitze Bromphenolblau
Strip-Puffer A	200 mM Glycin 500 mM NaCl in ddH ₂ O; pH 2,0
Strip-Puffer B	500 mM Tris in ddH ₂ O; pH 11,0
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	40 mM Tris 1 mM EDTA 20 mM Eisessig in ddH ₂ O
Tris-Buffered Saline (TBS)-Lösung (10x)	200 mM Tris 1500 mM NaCl in ddH ₂ O
TBS-Tween (TBS-T)-Lösung (0,1 %)	20 mM Tris 150 mM NaCl 0,1 % Tween®-20 in ddH ₂ O; pH 7,4
Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % Methanol

	in ddH ₂ O
Trenngel (15 %)	4,52 mL ddH ₂ O 3,10 mL Tris-HCl-Puffer (1 M; pH = 6,8) 137 µL SDS (10 %) 4,68 mL Acrylamid (40 %) 124 µL APS (10 %) 12,5 µL TEMED
Tris-HCl-Puffer (1 M; pH = 6,8)	1 M Tris in ddH ₂ O pH-Wert einstellen mit HCl
Tris-HCl-Puffer (1,5 M; pH = 8,8)	1,5 M Tris in ddH ₂ O pH-Wert einstellen mit HCl
Trypsin-Lösung	0,25 % Trypsin in PBS-EDTA

A.1.3 Kits

Tabelle A3 | **Verwendete Kits und deren Hersteller.**

Bezeichnung	Hersteller
CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay	Promega (Madison, WI, USA)
Core Histone Isolation Kit	Sigma-Aldrich (Burlington, MA, USA)
Epigenase™ HDAC Activity/Inhibition Direct Assay Kit Colorimetric	EpigenTek (Farmingdale, NY, USA)
EpiQuik™ HAT Activity/Inhibition Assay Kit	EpigenTek (Farmingdale, NY, USA)
EpiQuik™ Nuclear Extraction Kit I	EpigenTek (Farmingdale, NY, USA)
Exonuclease I	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
NucleoSpin® RNA Plus Kit	Machery-Nagel (Düren, DE)
qScript™ cDNA Synthesis Kit	QuantaBio (Beverly, MA, USA)
SimpleChIP® Plus Sonication Chromatin IP Kit	Cell Signaling Technology (Leiden, NL)

A.1.4 Antikörper

Tabelle A4 | Auflistung der verwendeten Antikörper und deren Hersteller.

Antikörper	Hersteller
H3K4me3 Tri-Methyl-Histone H3 (Lys4) (C42D8) Rabbit mAb #9751	Cell Signaling Technology (Leiden, NL)
H3K9ac Acetyl-Histone H3 (Lys9) (C5B11) Rabbit mAb #9649	Cell Signaling Technology (Leiden, NL)
H3K18ac Acetyl-Histone H3 (Lys18) (D8Z5H) Rabbit mAb #13998	Cell Signaling Technology (Leiden, NL)
H3K27me3 Tri-Methyl-Histone H3 (Lys27) (C36B11) Rabbit mAb #9733	Cell Signaling Technology (Leiden, NL)
Histone H3 (D2B12) XP Rabbit mAb (ChIP Formulated) #4620	Cell Signaling Technology (Leiden, NL)
Normal Rabbit IgG #2729	Cell Signaling Technology (Leiden, NL)
mouse anti-rabbit IgG-HRP #2357	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
m-IgG Fc BP-HRP #525409	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
β -Actin antibody (C4) #47778	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
Histone H3 antibody (1G1) #517576.	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)

A.1.5 Mess- und Analysengeräte

Tabelle A5 | Verwendete Instrumente und deren Hersteller.

Analysengerät	Hersteller
Analysenwaage Entris	Satorius (Göttingen, DE)
Atomabsorptionsspektrometer PinAAcle 900 T	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
Autoklav	HP Med (Oberschleißheim, DE)
Autoklav D-150	Systemec GmbH (Linden, DE)
Biofreezer Herafreeze Top	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Biomark	Fluidigm (San Francisco, CA, USA)
Blotting-Kammer	Peqlab (Erlangen, DE)
Brutschrank Heracell 150i	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
CASY® TT Cell Counter & Analyser System	OMNI Life Science (Bremen, DE)
Cryo 1 °C Cooler	VWR (Radnor, PA, USA)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen, DE)
Elektrodenlose Entladungslampe (As)	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
Evaporator	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Gelkammer Gelelektrophorese	Peqlab (Erlangen, DE)
Glaspipetten 5 mL, 10 mL, 20 mL	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, DE), Brand (Wertheim, DE)
Glasplatten Gelelektrophorese	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, DE)
Grobwaage	Sartorius (Göttingen, DE)
Heißluftsterilisator	Memmert (Büchenbach, DE)
IFC Controller HX	Fluidigm (San Francisco, CA, USA)
Inkubator (37 °C)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Inkubator (4 °C)	VWR (Radnor, PA, USA)
Kamm Gelelektrophorese 12 Well 1,5 mm	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, DE)
Kühlschrank	Bomann (Krefeld, DE)
Kühlschrank	VWR International (Darmstadt, DE)
Laborspülmaschine Professional G7883	Miele (Gütersloh, DE)
LAS-3000 Luminescent Image Analyzer	Fujifilm (Tokio, JPN)
Magnetische Racks für Mikrozentrifugengefäße	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Mikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss AG (Oberkochen, DE)
Mikrowelle	Bosch (Gerlingen, DE)
Multipipette Ranin Pipete Lite XLS® 0,5-10 µL	Mettler Toledo (Columbus, OH, USA)
NanoQuant Plate™	Tecan Group (Männedorf, CH)
Netzteil Elektrophorese PowerPac™ Basic	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Orbitrap Ascend Tribid.	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
pH-Meter	Mettler Toledo (Columbus, OH, USA)
PCR Workstation	VWR International (Darmstadt, DE)

PCR Workstation, Ultraviolet Sterilizing	Peqlab (Erlangen, DE)
Pipette 1000-5000 µL	Eppendorf (Hamburg, DE)
Pipette 100-1000µL	Eppendorf (Hamburg, DE)
Pipette 10-100 µL	Eppendorf (Hamburg, DE)
Pipette 2,5-10 µL	Eppendorf (Hamburg, DE)
Pipette 20-200 µL	Eppendorf (Hamburg, DE)
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, DE)
Reinstwasseranlage Milli-Q	Merck (Darmstadt, DE)
Rotator für Zentrifugengefäße/-röhrchen	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Rotator Roto-Shake Genie	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Schwenkplatte	neoLab (Heidelberg, DE)
Schwenkplatte 3012	GFL (Burgwedel, DE)
SemiDry-Blotting-Apparatur	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, DE)
Sonifizierungsapparatur Sonifier W-250 D	Branson Ultrasonics (Danbury, CT; USA)
Sterilwerkbank HERAsafe	Heraeus Instruments (Hanau, DE)
Tecan Infinite® M200 PRO	Tecan Group (Crailsheim, DE)
Thermocycler C100 Touch mit CFX96 Real-Time System	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Thermocycler T100	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Thermomixer	Peqlab (Erlangen, DE)
ThermoMixer C	Eppendorf (Hamburg, DE)
Tischzentrifuge Mikroreaktionsgefäße	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Transferpette S 1000-5000 µL	Brand (Wertheim, DE)
Tischzentrifuge Mini Star	VWR (Radnor, PA, USA)
Trockenschrank	Memmert (Büchenbach, DE)
Vanquish Neo LC	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Vortex RS-VA 10	Phoenix Instrument (Garbsen, DE)
Vortexmischer Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Wasserbad	Memmert (Büchenbach, DE)
Zentrifuge Mikro 220 R	Hettich (Tuttlingen, DE)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg, DE)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg, DE)

A.1.6 Software

Tabelle A6 | Verwendete Software und deren Anbieter.

Software	Anbieter
AA Winlab 322	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
AIDA Image Analyzer v.3.27	Elysia-Raytest (Straubenhardt, DE)
Beacon Designer 8.20	Premier Biosoft (Indore, IND)
ChemDraw 20.0	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
CXF Manager 3.1	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Fluidigm Real-Time PCR Analysis	Fluidigm (San Francisco, CA, USA)
GenEx 5	MultiD Analyses (Västra Frölunda, SE)
GraphPad Prism 10.4.1	GraphPad (San Diego, CA, USA)
MASCOT v2.8	Matrix Science (London, UK)
Proline	ProFi Proteomics (FR)
Tecan iControl 1.10	Tecan Group (Männedorf, CH)

A.1.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle A7 | Verwendete Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller.

Bezeichnung	Hersteller
96-Well Plate	Brand (Wertheim, DE)
96-Well Plate white bottom	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
AAS Sample Cups (1,2 mL)	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
AAS Sample Cups (2,5 mL)	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
CASY-Cups	OMNI Life Science (Bremen, DE)
Dynamic Array™ IFC	Fluidigm (San Francisco, CA, USA)
Einmalkanülen Sterican® zur Insulininjektion	B. Braun (Melsungen, DE)
Einmalspritzen Omnifix (1 mL)	B. Braun (Melsungen, DE)
Einmalspritzen Omnifix (10 mL)	B. Braun (Melsungen, DE)
Eppendorf-Reaktionsgefäß (2 mL)	Eppendorf (Hamburg)
Graphitrohr	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
Handschuhe TouchNTuff	Ansell (Brüssel, BE)
Kryoröhrchen mit Gewinde (1,8 mL)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Mikroreaktionsgefäß (1,5 mL)	Brand (Wertheim, DE)
Mikroreaktionsgefäß (1,5 mL) low protein bind	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Mikroreaktionsgefäß (2,0 mL)	Brand (Wertheim, DE)
Nunc™ MicroWell™ 96-well Platte	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Parafilm	Sigma-Aldrich (Burlington, MA, USA)
PCR-Gefäße 8er-Strips und Deckel	Brand (Wertheim, DE)
Pipettenspitzen 0,5-10 µL	Brand (Wertheim, DE)
Pipettenspitzen 100-1000 µL	Brand (Wertheim, DE)
Pipettenspitzen 20 µL	Mettler Toledo (Columbus, OH, USA)
Pipettenspitzen 2-200 µL	Brand (Wertheim, DE)
Pipettenspitzen 500-5000 µL	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen 500-5000 µL	Brand (Wertheim, DE)
PVDF-Membran	Cytvia (Marlborough, MA, USA)
Spritzenaufsatzfilter 28 mm, 0,2 µM	Corning (Corning, NY, USA)
Sterilfilter	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Sterilindikatorband Autoklav	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Sterilindikatorband Heißluftsterilisator	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Stoßhomogenisator	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Wägeschiffchen	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Whatman-Papier, 3 mm	Cytvia (Marlborough, MA, USA)
Zellkulturflasche 75 cm ²	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Zellkulturschalen (100 mm)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Zellkulturschalen (150 mm)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)

Zellkulturschalen (60 mm)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Zellschaber	Jet Bio-Filtration (Guangzhou, CHN)
Zentrifugenröhrchen (15 mL)	LLG Labware (Meckenheim, DE)
Zentrifugenröhrchen (50 mL)	LLG Labware (Meckenheim, DE)

A.2 ERGÄNZENDE DATEN

A.2.1 Übersicht der dokumentierten Histonmodifikationen

Tabelle A8 | Aktuelle Liste der bisher dokumentierten posttranslationalen Histonmodifikationen.
(Informationen entnommen aus Zhao und Garcia, 2015; Chan und Maze, 2020).

hPTM	Donor	Reaktion
Acetylierung	Acetyl-CoA	Acylierung
Acrolein-Addukt	Acrolein	Michael-Addition
Benzoylierung	Benzoyl-CoA	Acylierung
Biotinylierung	Biotin / Biotinyl-AMP	Biotinylierung
Butyrylierung	Butyryl-CoA	Acylierung
Citrullinierung	Arginin	Deiminierung
Crotonylierung	Crotonyl-CoA	Acylierung
Dimethylierung	S-Adenosylmethionin	Methylierung
Dopaminylierung	Dopamin	Transamidierung
Formylierung	Formyl-CoA	Acylierung
Glutarylierung	Glutaryl-CoA	Acylierung
Glutathionylierung	Glutathion	Disulfid-Bildung
Glykylierung	Methylglyoxal, Monosaccharide	Maillard-Reaktion
Homocysteininylierung	Homocystein-Thiolacton	N-Acylierung
Hydroxylierung	2-Oxoglutarat	Hydroxylierung
2-Hydroxyisobutyrylation	2-Hydroxyisobutyryl-CoA	Acylierung
Isomerisierung	-	Isomerisierung
Lactylierung	Lactyl-CoA	Acylierung
Malonylierung	Malonyl-CoA	Acylierung
Mono-ADP-Ribosylierung	NAD ⁺ (ADP-Ribose)	Mono-ADP-Ribosylierung
Monomethylierung	S-Adenosylmethionin	Methylierung
O-GlcNAcylierung	UDP-GlcNAc	O-Glykosylierung
4-Oxononanoyleylierung	4-Oxo-2-Nonenal	Ketoamid-Adduktion
Oxidation	Sauerstoff	Oxidation
O/S-Palmitoylierung	Palmitoyl-CoA	O/S-Acylierung
Phosphorylierung	ATP	Phosphorylierung
SUMOylierung	SUMO-Protein	SUMOylierung
Serontonylierung	Serotonin	Transamidierung
Trimethylierung	S-Adenosylmethionin	Methylierung
Ubiquitinierung	Ubiquitin-Protein	Ubiquitinierung

CoA: Coenzym A

A.2.2 Genliste der HT-RT-qPCR

Tabelle A9 | Auflistung aller analysierten Gene und ihrer entsprechend codierten Gene der HT-RT-qPCR. Referenzgene wurden mit einem Asterisk (*) gekennzeichnet.

Gen	Codiertes Protein
<i>ACTB*</i>	<i>β-actin (ACTB)</i>
<i>APAF1</i>	<i>apoptotic protease activating factor (APAF1)</i>
<i>ATM</i>	<i>ataxia telangiectasia mutated (ATM)</i>
<i>ATR</i>	<i>ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR)</i>
<i>B2M*</i>	<i>beta-2-Microglobulin (B2M)</i>
<i>BAX</i>	<i>bcl2-associated x protein (BAX)</i>
<i>BRCA1</i>	<i>breast cancer 1, early onset (BRCA1)</i>
<i>BRCA2</i>	<i>breast cancer 2, early onset (BRCA2)</i>
<i>BTRC</i>	<i>transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase, beta (β-TrCP)</i>
<i>CAT</i>	<i>catalase (CAT)</i>
<i>CCL22</i>	<i>C-C motif chemokine ligand 22 (CCL22)</i>
<i>CCND1</i>	<i>cyclin D1 (CCND1)</i>
<i>CDKN1A</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)</i>
<i>CDKN1B</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27)</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16)</i>
<i>CDKN2B</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15)</i>
<i>CDKN2D</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19)</i>
<i>COX2</i>	<i>cytochrome C oxidase assembly factor (COX2)</i>
<i>DDB2</i>	<i>damage-specific DNA binding protein 2 (DDB2)</i>
<i>DDIT3</i>	<i>DNA damage inducible transcript 3 (DDIT3)</i>
<i>DNMT1</i>	<i>DNA methyltransferase 1 (DNMT1)</i>
<i>DNMT3A</i>	<i>DNA methyltransferase 3A (DNMT3A)</i>
<i>DNMT3B</i>	<i>DNA methyltransferase 3B (DNMT3B)</i>
<i>E2F1</i>	<i>E2F transcription factor 1 (E2F1)</i>
<i>EGFR</i>	<i>epidermal growth factor receptor (EGFR)</i>
<i>EHMT2/G9a</i>	<i>euchromatic histone lysine methyltransferase 2 (EHMT2)</i>
<i>EP300</i>	<i>E1A binding protein P300 (EP300)</i>
<i>ERCC2</i>	<i>excision repair cross-complementation group 2 (XPB)</i>
<i>ERCC4</i>	<i>excision repair cross-complementation group 4 (XPF)</i>
<i>ERCC5</i>	<i>excision repair cross-complementation group 5 (XPG)</i>
<i>FOXO1</i>	<i>forkhead box O1 (FOXO1)</i>
<i>FOXO3</i>	<i>forkhead box O3 (FOXO3)</i>
<i>FTH1</i>	<i>ferritin heavy chain 1 (FTH1)</i>
<i>G6PD</i>	<i>glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)</i>
<i>GADD45A</i>	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (GADD45A)</i>

<i>GAPDH*</i>	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)</i>
<i>GCLC</i>	<i>glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit (GCL)</i>
<i>GPX1</i>	<i>glutathione peroxidase 1 (GPX1)</i>
<i>GPX2</i>	<i>glutathione peroxidase 2 (GPX2)</i>
<i>GSR</i>	<i>glutathione reductase (GSR)</i>
<i>GUSB*</i>	<i>glucuronidase, beta (GUSB)</i>
<i>HDAC1</i>	<i>histone deacetylase 1 (HDAC1)</i>
<i>HDAC10</i>	<i>histone deacetylase 10 (HDAC10)</i>
<i>HDAC2</i>	<i>histone deacetylase 2 (HDAC2)</i>
<i>HDAC3</i>	<i>histone deacetylase 3 (HDAC3)</i>
<i>HMOX1</i>	<i>heme oxygenase (decycling) 1 (hMO-1)</i>
<i>HPRT1*</i>	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)</i>
<i>HSPA1A</i>	<i>heat shock 70kDa protein 1A (HSP70)</i>
<i>IL1a</i>	<i>interleukin 1 alpha (IL1a)</i>
<i>IL1b</i>	<i>interleukin 1 beta (IL1b)</i>
<i>IL6</i>	<i>interleukin 6 (IL6)</i>
<i>IL8</i>	<i>interleukin 8 (IL8)</i>
<i>JUN</i>	<i>jun proto-oncogene (c-JUN)</i>
<i>KDM3A</i>	<i>lysine demethylase 3A (KDM3A)</i>
<i>KEAP1</i>	<i>kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1)</i>
<i>LIG1</i>	<i>ligase I, DNA, ATP-dependent (LIG1)</i>
<i>LIG3</i>	<i>ligase III, DNA, ATP-dependent (LIG3)</i>
<i>MAP3K5</i>	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 (MAP3K5/ASK1)</i>
<i>MBD4</i>	<i>methyl-CpG binding domain 4 (MBD4)</i>
<i>MDM2</i>	<i>MDM2 proto-oncogene (MDM2)</i>
<i>MeCP2</i>	<i>methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2)</i>
<i>MGMT</i>	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)</i>
<i>MLH1</i>	<i>mutL homolog 1 (MLH1)</i>
<i>MSH2</i>	<i>mutS homolog 2 (MSH2)</i>
<i>MT1X</i>	<i>metallothionein 1X (MT1X)</i>
<i>MT2A</i>	<i>metallothionein 2A (MT2A)</i>
<i>MYC</i>	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (c-MYC)</i>
<i>NFKB1</i>	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p50/p105)</i>
<i>NFKB2</i>	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)</i>
<i>NFKBIA</i>	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (IKBA)</i>
<i>OGG1</i>	<i>8-oxoguanine DNA glycosylase (hOGG1)</i>
<i>PARP1</i>	<i>poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1)</i>
<i>PLK3</i>	<i>polo-like kinase 3 (PLK3)</i>
<i>PMAIP1</i>	<i>phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (NOXA)</i>

<i>PRDX1</i>	<i>peroxiredoxin 1 (PRX1)</i>
<i>RAD50</i>	<i>RAD50 homolog (S. cerevisiae) (RAD50)</i>
<i>RAD51</i>	<i>RAD51 recombinase (RAD51)</i>
<i>RRM2B</i>	<i>ribonucleotide reductase M2B (TP53 inducible) (p53R2)</i>
<i>SETD2</i>	<i>SET domain containing 2 (SETD2)</i>
<i>SIRT2</i>	<i>sirtuin 2 (SIRT2)</i>
<i>SLC30A1</i>	<i>solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1 (ZnT1)</i>
<i>SOD1</i>	<i>superoxide dismutase 1, soluble (SOD1)</i>
<i>SOD2</i>	<i>superoxide dismutase 2, mitochondrial (SOD2/MnSOD)</i>
<i>TET1</i>	<i>tet methylcytosine dioxygenase 1 (TET1)</i>
<i>TET2</i>	<i>tet methylcytosine dioxygenase 2 (TET2)</i>
<i>TET3</i>	<i>tet methylcytosine dioxygenase 3 (TET3)</i>
<i>TGFb</i>	<i>transforming growth factor beta (TGFb)</i>
<i>TNFa</i>	<i>tumor necrosis factor a (TNFa)</i>
<i>TNFRSF10B</i>	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b (DR5)</i>
<i>TXN</i>	<i>thioredoxin (TXN)</i>
<i>TXNRD1</i>	<i>thioredoxin reductase 1 (TXNRD)</i>
<i>VEGFA</i>	<i>vascular endothelial growth factor A (VEGFA)</i>
<i>XPA</i>	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group A (XPA)</i>
<i>XPC</i>	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group C (XPC)</i>
<i>XRCC5</i>	<i>x-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (XRCC5)</i>

A.2.3 Detaillierte Ergebnisse der HT-RT-qPCR

Tabelle A10 | Ergebnisse der HT-RT-qPCR in A549-Zellen nach akuter Arsenitbehandlung. Die Zellen wurden für 24 h mit Natriumarsenit (NaAsO₂) exponiert. Aufgelistet sind die ermittelten log₂-fachen Änderungen der relativen Genexpression (RGE).

Gen	NaAsO ₂ -Konzentration				
	1 µM	10 µM	15 µM	20 µM	25 µM
<i>APAF1</i>	0,01	0,10	-0,03	-0,44	-0,02
<i>BAX</i>	-0,09	0,05	0,00	-0,15	0,03
<i>BTRC</i>	-0,06	-0,01	-0,08	-0,36	-0,12
<i>CCND1</i>	-0,04	-0,03	-0,10	-0,26	-0,24
<i>CDKN1A</i>	-0,07	0,01	0,04	0,00	0,27
<i>CDKN1B</i>	-0,16	-0,11	-0,23	-0,44	-0,34
<i>CDKN2D</i>	0,01	-0,38	-0,36	-0,67	-0,53
<i>EF2F1</i>	-0,10	-0,11	-0,20	-0,62	-0,53
<i>EGFR</i>	0,03	0,27	0,21	0,11	0,23
<i>FOXO1</i>	-0,02	0,02	0,10	0,08	0,19
<i>FOXO3</i>	0,07	0,15	0,20	0,27	0,39
<i>JUN</i>	0,01	0,25	0,18	0,11	0,13
<i>MDM2</i>	-0,04	0,18	0,11	0,03	0,19
<i>MYC</i>	0,07	0,14	0,04	-0,31	-0,16
<i>PLK3</i>	0,01	-0,20	0,20	0,01	0,32
<i>PMAIP1</i>	0,06	0,26	0,40	0,40	0,71
<i>SIRT2</i>	-0,17	-0,21	0,01	-0,24	0,18
<i>TNFRSF10B</i>	-0,10	0,06	0,19	0,11	0,45
<i>VEGFA</i>	0,15	0,12	0,52	-0,11	0,73
<i>CCL22</i>	-0,45	-0,19	-0,18	0,13	-1,43
<i>COX2</i>	-0,28	-0,56	-0,02	-0,64	-0,10
<i>IL1a</i>	0,33	1,48	2,13	2,92	2,88
<i>IL1b</i>	-0,10	-0,06	0,35	0,87	1,15
<i>IL6</i>	0,14	1,58	2,43	2,70	3,17
<i>IL8</i>	0,10	0,19	0,55	0,59	1,39
<i>TGFb</i>	-0,07	-0,17	0,02	-0,48	-0,08
<i>DNMT1</i>	-0,04	-0,09	-0,26	-0,48	-0,54
<i>DNMT3a</i>	-0,18	-0,24	-0,37	-0,40	-0,40
<i>DNMT3b</i>	-0,01	-0,53	-0,28	-1,01	-0,40
<i>EHMT2/G9a</i>	-0,07	0,02	-0,15	-0,49	-0,32
<i>EP300</i>	-0,14	-0,23	-0,20	-0,44	-0,12
<i>HDAC1</i>	-0,03	-0,23	-0,25	-0,34	-0,32
<i>HDAC10</i>	-0,09	-0,15	-0,11	-0,34	-0,10
<i>HDAC2</i>	0,06	-0,09	-0,19	-0,60	-0,37
<i>HDAC3</i>	-0,05	0,01	-0,07	-0,13	-0,14
<i>KDM3A</i>	-0,04	0,14	0,00	0,13	0,11
<i>MBD4</i>	0,00	-0,17	-0,29	-0,36	-0,37
<i>MeCP2</i>	-0,07	-0,22	-0,29	-0,59	-0,18
<i>SETD2</i>	0,02	-0,01	-0,12	-0,38	-0,24
<i>TET1</i>	-0,18	-0,06	-0,40	-0,46	-0,45
<i>TET2</i>	0,02	-0,02	-0,11	-0,39	-0,06
<i>TET3</i>	-0,10	0,18	0,03	-0,17	-0,11
<i>ATM</i>	-0,09	-0,05	-0,22	-0,36	-0,29
<i>ATR</i>	0,07	-0,02	-0,10	-0,25	-0,26

<i>BRCA1</i>	0,01	-0,08	-0,21	-0,49	-0,43
<i>BRCA2</i>	0,03	0,04	-0,15	-0,44	-0,38
<i>DDB2</i>	-0,06	-0,46	-0,34	-0,86	-0,41
<i>DDIT3</i>	0,40	0,78	1,34	1,34	2,11
<i>ERCC2</i>	-0,15	-0,06	0,01	-0,19	-0,02
<i>ERCC4/XPF</i>	0,02	0,07	-0,10	-0,21	-0,19
<i>ERCC5/XPG</i>	-0,08	-0,01	-0,48	-0,34	-0,33
<i>GADD45A</i>	0,11	0,20	0,29	0,28	0,51
<i>LIG1</i>	-0,05	-0,17	-0,38	-0,52	-0,55
<i>LIG3</i>	0,03	-0,08	-0,35	-0,66	-0,52
<i>MGMT</i>	0,02	-0,10	-0,10	-0,56	-0,04
<i>MLH1</i>	-0,04	-0,02	-0,12	-0,36	-0,26
<i>MSH2</i>	0,02	-0,14	-0,27	-0,49	-0,49
<i>OGG1</i>	0,01	-0,04	-0,14	-0,52	-0,30
<i>PARP1</i>	0,04	0,03	-0,03	-0,15	-0,18
<i>RAD50</i>	-0,03	-0,02	-0,18	-0,28	-0,32
<i>RAD51</i>	-0,01	0,00	-0,11	-0,25	-0,33
<i>RRM2B</i>	-0,02	-0,07	-0,22	-0,44	-0,25
<i>XPA</i>	0,02	-0,05	-0,16	-0,40	-0,15
<i>XPC</i>	-0,07	-0,09	-0,28	-0,30	-0,26
<i>XRCC5</i>	-0,01	0,04	-0,13	-0,39	-0,28
<i>FTH1</i>	0,29	0,33	0,71	0,17	0,71
<i>MT1X</i>	0,01	-0,10	0,39	0,98	1,68
<i>MT2A</i>	0,25	0,41	1,02	0,98	2,02
<i>SLC30A1</i>	0,02	0,03	0,10	-0,05	0,45
<i>CAT</i>	-0,01	-0,04	-0,03	-0,21	-0,10
<i>G6PD</i>	-0,05	-0,13	-0,24	-0,62	-0,44
<i>GCLC</i>	-0,07	-0,36	-0,61	-0,93	-0,91
<i>GPX1</i>	-0,13	-1,34	-1,39	-1,62	-1,45
<i>GPX2</i>	-0,19	-0,71	-0,96	-1,48	-1,35
<i>GSR</i>	-0,09	-0,12	-0,40	-0,64	-0,53
<i>HMOX1</i>	0,23	3,00	3,58	3,85	4,18
<i>HSPA1A</i>	0,06	-0,06	-0,02	-0,65	-0,11
<i>KEAP1</i>	-0,04	-0,13	-0,18	-0,72	-0,29
<i>MAP3K5</i>	0,03	-0,09	-0,19	-0,44	-0,26
<i>NFKB1</i>	-0,04	0,04	0,12	-0,21	0,09
<i>NFKB2</i>	0,18	0,88	1,12	1,12	1,36
<i>NFKBIA</i>	0,22	0,26	0,70	0,11	0,72
<i>PRDX1</i>	0,02	-0,24	-0,22	-0,56	-0,19
<i>SOD1</i>	0,05	0,08	0,04	-0,04	0,01
<i>SOD2</i>	0,02	0,21	0,37	0,53	0,68
<i>TXN</i>	-0,01	-0,21	-0,09	-0,64	-0,02
<i>TXNRD1</i>	-0,08	0,17	0,04	-0,08	0,07

Tabelle A11 | Ergebnisse der HT-RT-qPCR in A549-Zellen nach akuter Arsenitbehandlung und Nachinkubation (24 h). Die Zellen wurden für 24 h mit Natriumarsenit (NaAsO₂) exponiert und anschließend für 24 h Arsenit-frei weiterkultiviert. Aufgelistet sind die ermittelten log₂-fachen Änderungen der relativen Genexpression (RGE).

Gen	NaAsO ₂ -Konzentration				
	1 µM	10 µM	15 µM	20 µM	25 µM
<i>APAF1</i>	0,04	-0,17	-0,10	-0,03	-0,26
<i>BAX</i>	0,12	-0,02	0,17	0,20	-0,01
<i>BTRC</i>	0,02	-0,10	-0,02	-0,06	-0,16
<i>CCND1</i>	0,02	-0,13	0,04	-0,05	-0,05
<i>CDKN1A</i>	-0,02	0,13	0,46	0,72	0,91
<i>CDKN1B</i>	0,07	-0,16	-0,16	-0,19	-0,35
<i>CDKN2D</i>	-0,09	-0,63	-0,52	-0,68	-0,69
<i>EF2F1</i>	-0,01	-0,40	-0,48	-0,61	-1,26
<i>EGFR</i>	0,08	0,09	0,20	0,12	-0,06
<i>FOXO1</i>	-0,09	0,01	-0,03	0,05	0,36
<i>FOXO3</i>	-0,02	-0,02	0,01	0,04	0,16
<i>JUN</i>	0,10	0,22	0,39	0,40	0,31
<i>MDM2</i>	0,02	0,28	0,35	0,45	0,56
<i>MYC</i>	0,03	0,07	0,11	-0,07	-0,20
<i>PLK3</i>	-0,10	-0,55	-0,27	-0,23	-0,05
<i>PMAIP1</i>	0,02	0,19	0,45	0,56	0,95
<i>SIRT2</i>	-0,21	-0,32	-0,17	-0,32	-0,24
<i>TNFRSF10B</i>	-0,06	-0,24	0,12	0,11	0,25
<i>VEGFA</i>	-0,16	0,02	0,04	0,22	0,25
<i>CCL22</i>	-	-	-	-	-
<i>COX2</i>	0,49	0,05	-0,04	-0,30	-0,34
<i>IL1a</i>	-0,22	0,96	1,90	1,96	3,00
<i>IL1b</i>	0,06	0,47	1,10	1,16	1,76
<i>IL6</i>	-0,12	1,80	3,01	2,62	3,62
<i>IL8</i>	-0,12	0,43	0,62	0,49	1,11
<i>TGFb</i>	-0,07	-0,12	-0,30	-0,37	-0,41
<i>DNMT1</i>	0,07	-0,13	-0,21	-0,39	-0,74
<i>DNMT3a</i>	-0,12	-0,30	-0,30	-0,43	-0,54
<i>DNMT3b</i>	-0,12	-0,88	-0,56	-1,00	-0,92
<i>EHMT2/G9a</i>	0,03	-0,09	-0,19	-0,23	-0,63
<i>EP300</i>	-0,06	-0,31	-0,22	-0,49	-0,47
<i>HDAC1</i>	0,04	-0,38	-0,32	-0,42	-0,53
<i>HDAC10</i>	0,04	-0,35	0,05	-0,02	0,05
<i>HDAC2</i>	0,01	-0,21	-0,27	-0,47	-0,86
<i>HDAC3</i>	0,05	-0,14	-0,07	-0,15	-0,42
<i>KDM3A</i>	0,11	0,09	0,32	0,24	0,25
<i>MBD4</i>	0,03	-0,23	-0,28	-0,32	-0,45
<i>MeCP2</i>	-0,16	-0,46	-0,38	-0,52	-0,56
<i>SETD2</i>	0,05	-0,11	-0,12	-0,22	-0,34
<i>TET1</i>	0,02	-0,27	-0,24	-0,47	-0,59
<i>TET2</i>	0,03	-0,09	-0,16	-0,24	-0,24
<i>TET3</i>	0,10	-0,27	-0,08	-0,33	-0,63
<i>ATM</i>	0,13	-0,20	-0,06	-0,19	-0,29
<i>ATR</i>	0,04	-0,40	-0,24	-0,43	-0,65
<i>BRCA1</i>	0,00	-0,16	-0,21	-0,40	-0,77
<i>BRCA2</i>	0,05	-0,12	-0,18	-0,50	-0,95

<i>DDB2</i>	-0,17	-0,44	-0,45	-0,51	-0,74
<i>DDIT3</i>	0,07	0,25	0,82	0,63	1,29
<i>ERCC2</i>	-0,03	-0,20	-0,13	-0,28	-0,34
<i>ERCC4/XPF</i>	0,02	-0,01	-0,09	-0,17	-0,28
<i>ERCC5/XPG</i>	0,02	0,01	0,00	-0,04	-0,08
<i>GADD45A</i>	0,09	-0,04	0,52	0,46	0,70
<i>LIG1</i>	0,04	-0,28	-0,24	-0,46	-0,95
<i>LIG3</i>	-0,02	-0,22	-0,28	-0,34	-0,77
<i>MGMT</i>	-0,08	-0,12	-0,17	-0,11	0,00
<i>MLH1</i>	0,04	-0,18	-0,21	-0,27	-0,59
<i>MSH2</i>	0,04	-0,38	-0,37	-0,47	-0,77
<i>OGG1</i>	0,00	-0,19	-0,30	-0,33	-0,63
<i>PARP1</i>	0,08	-0,13	-0,04	-0,19	-0,47
<i>RAD50</i>	0,03	-0,06	-0,08	-0,17	-0,31
<i>RAD51</i>	0,01	-0,17	-0,22	-0,43	-0,85
<i>RRM2B</i>	0,04	-0,19	-0,12	-0,05	-0,17
<i>XPA</i>	0,03	-0,19	-0,16	-0,24	-0,38
<i>XPC</i>	0,10	-0,12	-0,01	0,06	-0,06
<i>XRCC5</i>	0,05	-0,04	-0,19	-0,21	-0,50
<i>FTH1</i>	-0,03	0,39	0,53	0,26	0,75
<i>MT1X</i>	-0,04	-0,11	0,35	0,69	1,66
<i>MT2A</i>	-0,13	0,26	0,64	0,94	1,74
<i>SLC30A1</i>	0,02	0,04	0,20	0,28	0,43
<i>CAT</i>	0,03	-0,14	0,02	-0,01	-0,09
<i>G6PD</i>	-0,05	-0,07	-0,23	-0,23	-0,45
<i>GCLC</i>	0,03	-0,43	-0,57	-0,67	-1,07
<i>GPX1</i>	-0,23	-1,20	-1,40	-1,19	-1,26
<i>GPX2</i>	-0,08	-0,82	-1,50	-1,63	-1,80
<i>GSR</i>	0,06	-0,22	-0,17	-0,29	-0,61
<i>HMOX1</i>	0,35	2,08	3,15	2,78	3,50
<i>HSPA1A</i>	-0,07	0,02	-0,05	0,08	0,09
<i>KEAP1</i>	0,01	-0,20	-0,19	-0,27	-0,52
<i>MAP3K5</i>	0,03	-0,31	-0,29	-0,44	-0,42
<i>NFKB1</i>	-0,03	-0,16	-0,17	-0,23	-0,45
<i>NFKB2</i>	0,04	0,55	0,92	0,83	1,03
<i>NFKBIA</i>	-0,20	0,18	0,03	0,09	-0,03
<i>PRDX1</i>	-0,13	-0,37	-0,39	-0,54	-0,43
<i>SOD1</i>	0,00	-0,11	-0,08	-0,12	-0,05
<i>SOD2</i>	0,04	0,07	0,59	0,52	0,87
<i>TXN</i>	-0,17	-0,28	-0,29	-0,38	-0,23
<i>TXNRD1</i>	0,08	0,05	0,30	0,23	0,16

Tabelle A12 | Ergebnisse der HT-RT-qPCR in A549-Zellen nach akuter Arsenitbehandlung und Nachinkubation (48 h). Die Zellen wurden für 24 h mit Natriumarsenit (NaAsO₂) exponiert und anschließend für 48 h Arsenit-frei weiterkultiviert. Aufgelistet sind die ermittelten log₂-fachen Änderungen der relativen Genexpression (RGE).

Gen	NaAsO ₂ -Konzentration				
	1 µM	10 µM	15 µM	20 µM	25 µM
<i>APAF1</i>	-0,22	-0,02	0,06	0,03	-0,44
<i>BAX</i>	-0,22	0,21	0,23	0,11	-0,58
<i>BTRC</i>	-0,05	0,04	0,01	-0,09	-0,54
<i>CCND1</i>	-0,09	-0,15	-0,08	-0,15	-0,37
<i>CDKN1A</i>	-0,10	0,37	0,80	0,67	0,40
<i>CDKN1B</i>	-0,25	-0,43	-0,74	-0,86	-1,70
<i>CDKN2D</i>	-0,19	-0,67	-0,52	-0,85	-1,11
<i>EF2F1</i>	-0,12	-0,54	-1,22	-1,31	-2,23
<i>EGFR</i>	-0,24	0,00	-0,54	-0,47	-1,04
<i>FOXO1</i>	-0,02	-0,03	0,15	0,31	0,41
<i>FOXO3</i>	-0,07	0,19	0,18	0,14	-0,08
<i>JUN</i>	-0,06	0,12	-0,21	-0,45	-1,43
<i>MDM2</i>	-0,03	0,21	0,38	0,26	-0,11
<i>MYC</i>	-0,01	0,01	-0,40	-0,76	-1,42
<i>PLK3</i>	-0,14	-0,33	0,16	-0,23	-0,01
<i>PMAIP1</i>	-0,11	0,14	0,49	0,49	0,15
<i>SIRT2</i>	-0,19	-0,09	-0,15	-0,43	-0,65
<i>TNFRSF10B</i>	-0,31	0,04	0,32	0,15	-0,25
<i>VEGFA</i>	0,13	-0,11	0,04	-0,33	-0,25
<i>CCL22</i>	-	-	-	-	-
<i>COX2</i>	-0,03	-0,23	-0,60	-0,85	-1,64
<i>IL1a</i>	0,35	1,29	1,46	1,47	1,34
<i>IL1b</i>	-0,15	0,36	0,71	0,78	1,26
<i>IL6</i>	-0,33	2,33	2,83	2,01	1,58
<i>IL8</i>	-0,17	0,44	-0,09	-0,37	-1,02
<i>TGFb</i>	-0,14	-0,21	-0,16	-0,36	-0,18
<i>DNMT1</i>	-0,05	-0,33	-0,50	-0,78	-1,31
<i>DNMT3a</i>	-0,11	-0,26	-0,36	-0,55	-0,89
<i>DNMT3b</i>	-0,29	-0,59	0,30	-0,10	0,17
<i>EHMT2/G9a</i>	-0,09	-0,20	-0,29	-0,34	-0,69
<i>EP300</i>	-0,17	-0,26	-0,36	-0,45	-0,80
<i>HDAC1</i>	-0,20	-0,35	-0,38	-0,44	-0,67
<i>HDAC10</i>	-0,24	-0,21	0,67	-0,03	-0,28
<i>HDAC2</i>	-0,08	-0,36	-0,57	-0,70	-1,12
<i>HDAC3</i>	-0,20	-0,12	-0,37	-0,48	-0,85
<i>KDM3A</i>	-0,15	0,10	0,24	0,06	-0,19
<i>MBD4</i>	-0,07	-0,21	-0,07	-0,19	-0,56
<i>MeCP2</i>	-0,15	-0,37	-0,50	-0,66	-1,14
<i>SETD2</i>	-0,21	-0,26	-0,37	-0,56	-1,15
<i>TET1</i>	-0,17	-0,45	-0,20	-0,46	-0,66
<i>TET2</i>	-0,13	-0,35	-0,52	-0,58	-0,97
<i>TET3</i>	-0,33	-0,14	-0,33	-0,74	-1,50
<i>ATM</i>	-0,22	-0,26	-0,16	-0,38	-0,87
<i>ATR</i>	-0,14	-0,27	-0,14	-0,43	-0,75
<i>BRCA1</i>	0,03	-0,25	-0,55	-0,62	-1,43
<i>BRCA2</i>	-0,02	-0,14	-0,65	-0,90	-1,70

<i>DDB2</i>	-0,12	-0,52	-1,01	-0,99	-1,62
<i>DDIT3</i>	0,10	-0,12	-0,06	-0,56	-0,50
<i>ERCC2</i>	-0,19	-0,03	-0,11	-0,30	-0,51
<i>ERCC4/XPF</i>	-0,10	-0,16	-0,40	-0,66	-1,28
<i>ERCC5/XPG</i>	0,02	-0,05	0,01	-0,29	-0,70
<i>GADD45A</i>	-0,01	0,25	0,14	-0,25	-1,27
<i>LIG1</i>	0,04	-0,14	-0,54	-0,68	-1,42
<i>LIG3</i>	-0,09	-0,30	-0,64	-0,88	-1,71
<i>MGMT</i>	-0,03	-0,12	-0,13	-0,13	-0,13
<i>MLH1</i>	-0,13	-0,13	-0,53	-0,61	-1,07
<i>MSH2</i>	-0,13	-0,28	-0,34	-0,40	-0,65
<i>OGG1</i>	-0,05	-0,21	-0,43	-0,48	-0,84
<i>PARP1</i>	-0,06	-0,01	-0,12	-0,37	-0,79
<i>RAD50</i>	-0,08	-0,06	-0,35	-0,39	-0,95
<i>RAD51</i>	0,02	-0,03	-0,47	-0,50	-0,97
<i>RRM2B</i>	-0,18	-0,16	-0,41	-0,28	-0,90
<i>XPA</i>	-0,20	-0,45	-0,64	-0,79	-1,11
<i>XPC</i>	-0,25	-0,13	-0,17	-0,25	-0,83
<i>XRCC5</i>	-0,06	-0,12	-0,57	-0,45	-0,79
<i>FTH1</i>	0,47	0,54	1,12	0,59	1,64
<i>MT1X</i>	-0,10	1,06	2,69	2,23	3,29
<i>MT2A</i>	0,12	1,07	2,46	2,05	3,12
<i>SLC30A1</i>	-0,11	0,11	0,30	0,42	0,24
<i>CAT</i>	-0,10	-0,21	-0,14	-0,16	-0,36
<i>G6PD</i>	-0,07	-0,07	-0,12	-0,27	-0,55
<i>GCLC</i>	-0,24	-0,56	-0,86	-0,85	-1,54
<i>GPX1</i>	-0,43	-0,93	-1,08	-1,15	-1,21
<i>GPX2</i>	-0,05	-0,99	-1,31	-1,14	-1,48
<i>GSR</i>	-0,12	-0,28	-0,35	-0,41	-0,87
<i>HMOX1</i>	0,30	2,60	4,05	3,37	3,85
<i>HSPA1A</i>	0,01	0,09	1,10	1,56	3,13
<i>KEAP1</i>	-0,08	-0,18	-0,50	-0,36	-0,66
<i>MAP3K5</i>	-0,11	-0,21	-0,23	-0,16	-0,39
<i>NFKB1</i>	-0,09	-0,06	-0,59	-0,67	-1,30
<i>NFKB2</i>	0,04	0,95	1,07	0,62	0,46
<i>NFKBIA</i>	0,21	0,12	0,17	-0,20	-0,11
<i>PRDX1</i>	-0,05	-0,19	-0,03	0,02	0,21
<i>SOD1</i>	-0,04	-0,20	-0,04	0,00	0,08
<i>SOD2</i>	-0,19	0,98	1,72	1,19	1,23
<i>TXN</i>	-0,02	-0,12	0,04	-0,01	0,12
<i>TXNRD1</i>	-0,26	-0,31	-0,23	-0,06	-0,37

A.2.4 Informationen zu den ChIP-qPCR-Primern

Tabelle A13

Detaillierte Informationen zu den etablierten und erworbenen ChIP-qPCR-Primern.

Gen	RefSeq	Sequenz 5'→3'	Produkt (bp)	Annealing T _m (°C)
<i>GAPDH</i>	NG_007073.2	fwd: ATGCTGCATTGCGCCTCTTAATGG rev: AGGCGCCCAATACGACCAAATCTA	120	65,2
<i>MB</i>	NG_007075	fwd: CAACCTCTCGGAGCCTCAAT rev: GACTCAGTATATGCCAGGAACCA	136	67,8
<i>MLH1</i>	NG_007109	fwd: CCTTCTCCTTTTCCGCAGAC rev: CCTCCACTTACACTCCAAACAAC	83	67,5
<i>MPG</i>	NC_000016	fwd: TGGCAGTCTCCGTTCTACATT rev: GCAGCACCTAAGTCCTCCT	83	67,8
<i>MSH2</i>	NG_007110	fwd: AAAGGGAGGCAGTCGGAGA rev: GCATGGGAGTAACATCAGAAGGAA	108	68,7
<i>MYOD1</i>		SimpleChIP® Human MyoD1 Exon 1 Primers #4490 (Cell Signaling Technology)		
<i>RPL30</i>		SimpleChIP® Human RPL30 Exon 3 Primers #7014 (Cell Signaling Technology)		
<i>XPA</i>	NG_011642	fwd: AGCCTATACTCTGAATCACCAAGC rev: CCGCCTAACTACCTGCTCTC	113	68,3
<i>XPC</i>	NG_011763	fwd: GTTGTGCTCTTTCCTGCTTCC rev: GCCTAGTCACGCCCTAAA	80	68,2
<i>XRCC1</i>	NG_033799	fwd: TGGAAGTCTAAGGAGAGTCATGG rev: CCGTGGAAGTTCACCTATGG	158	66,7

A.2.5 Kontrollen der ChIP-qPCR-Analysen

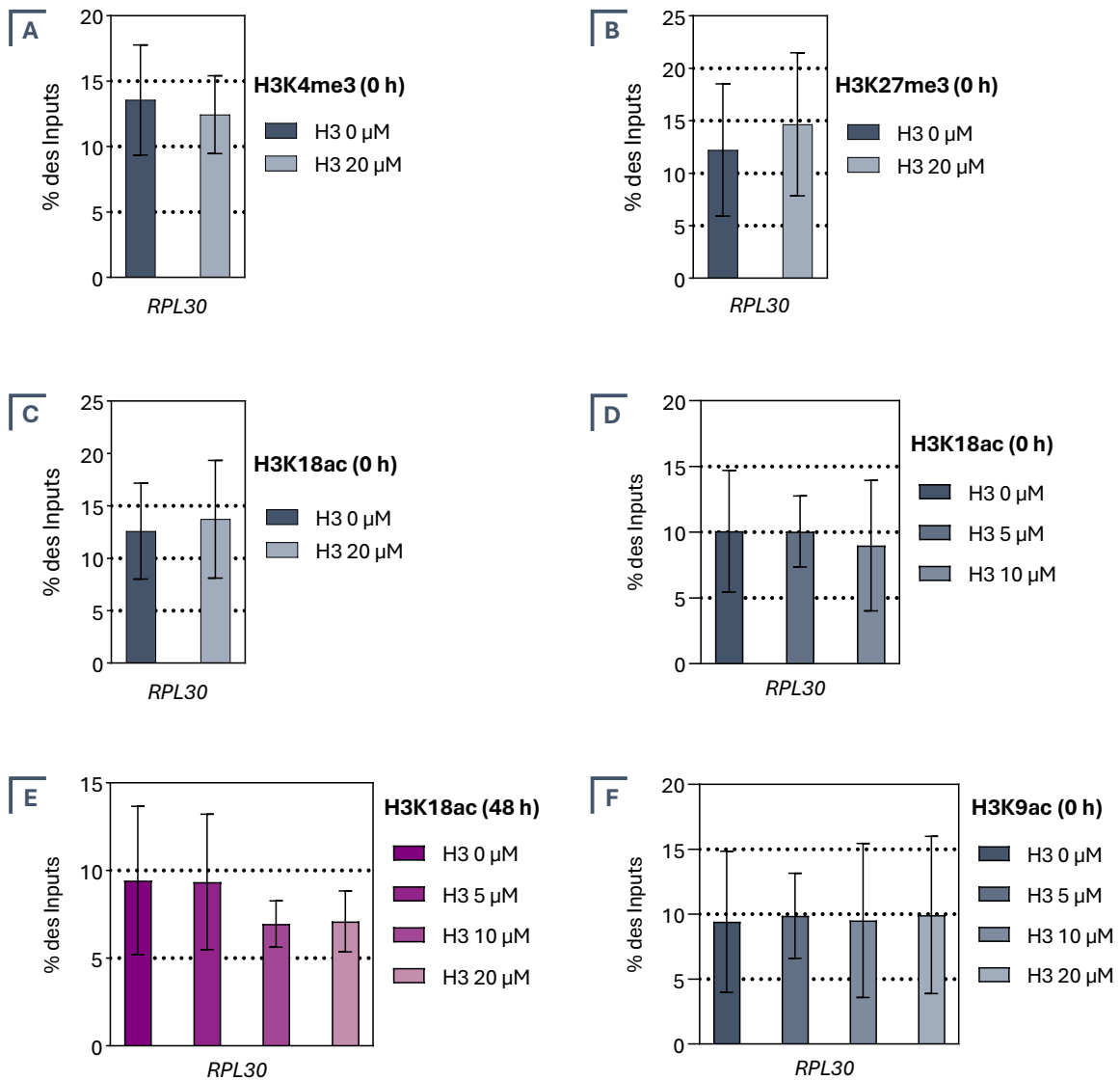


Abbildung A1 | Ergebnisse der ChIP-Kontrollen zur Anreicherung von Histon H3. Die A549-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Natriumarsenit für 24 h exponiert. Dargestellt sind die ChIP-qPCR-Ergebnisse für die Positivkontrolle Histon H3 am Positivkontrolllocus *RPL30*. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten in Einfachbestimmung.

A.2.6 Repräsentative Blots der analysierten Histonmodifikationen

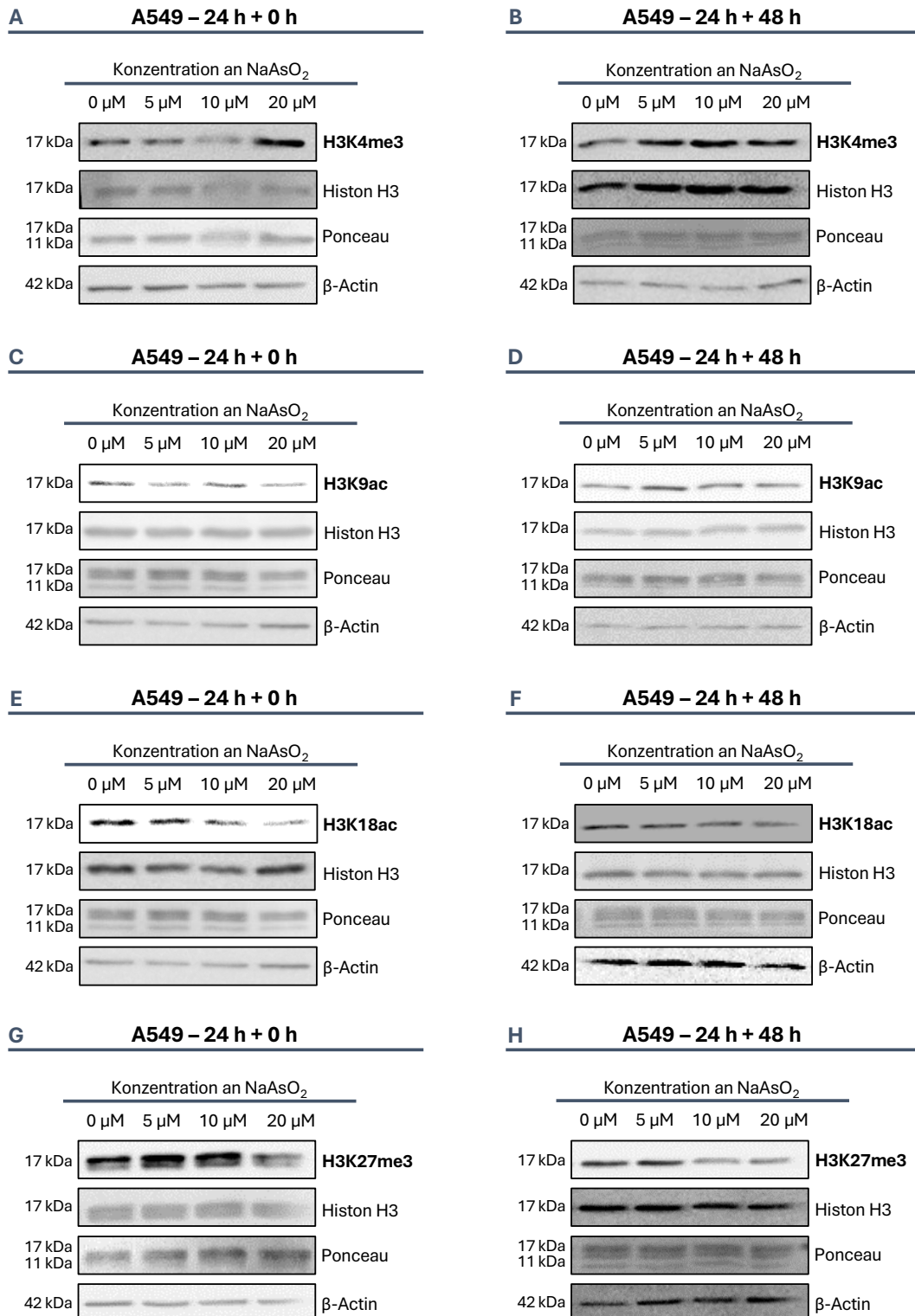


Abbildung A2 | Exemplarische Blots der analysierten Histonmodifikationen der A549-Zelllinie. Die Zellen wurden für 24 h mit Natriumarsenit (NaAsO₂) exponiert. Anschließend wurde das globale Vorkommen posttranslatiöner Histonmodifikationen entweder direkt (**A, C, E, G**) oder nach einer Arsenit-freien Erholungsphase von 48 h (**B, D, F, H**) mittels Western Blot analysiert. Gezeigt wird jeweils ein exemplarisches Beispielergebnis der Dreifachbestimmung.

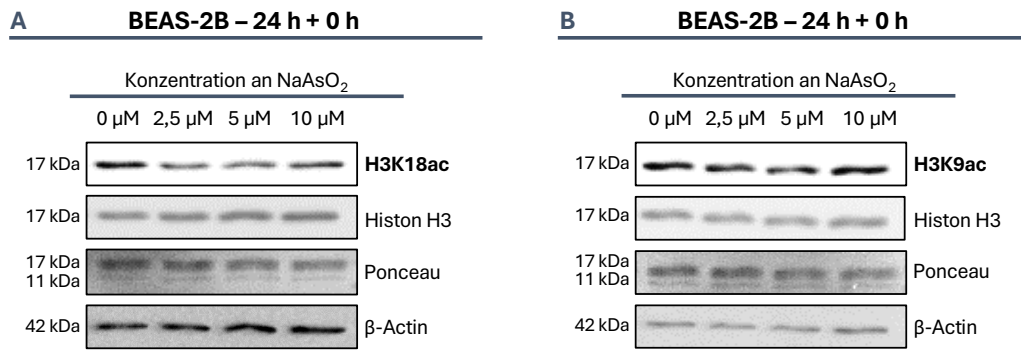


Abbildung A3 | **Beispielhafte Blots der analysierten globalen Histonmodifikationen der BEAS-2B-Zelllinie.** Die Zellen wurden für 24 h mit Natriumarsenit (NaAsO₂) exponiert. Anschließend wurde das globale Vorkommen der beiden posttranslationalen Histonmodifikationen H3K18ac (**A**) und H3K9ac (**B**) mittels *Western Blot* analysiert. Gezeigt wird jeweils ein exemplarisches Beispielergebnis der Dreifachbestimmung.

A.2.7 Weitere Ergebnisse der LC-MS/MS-Analyse

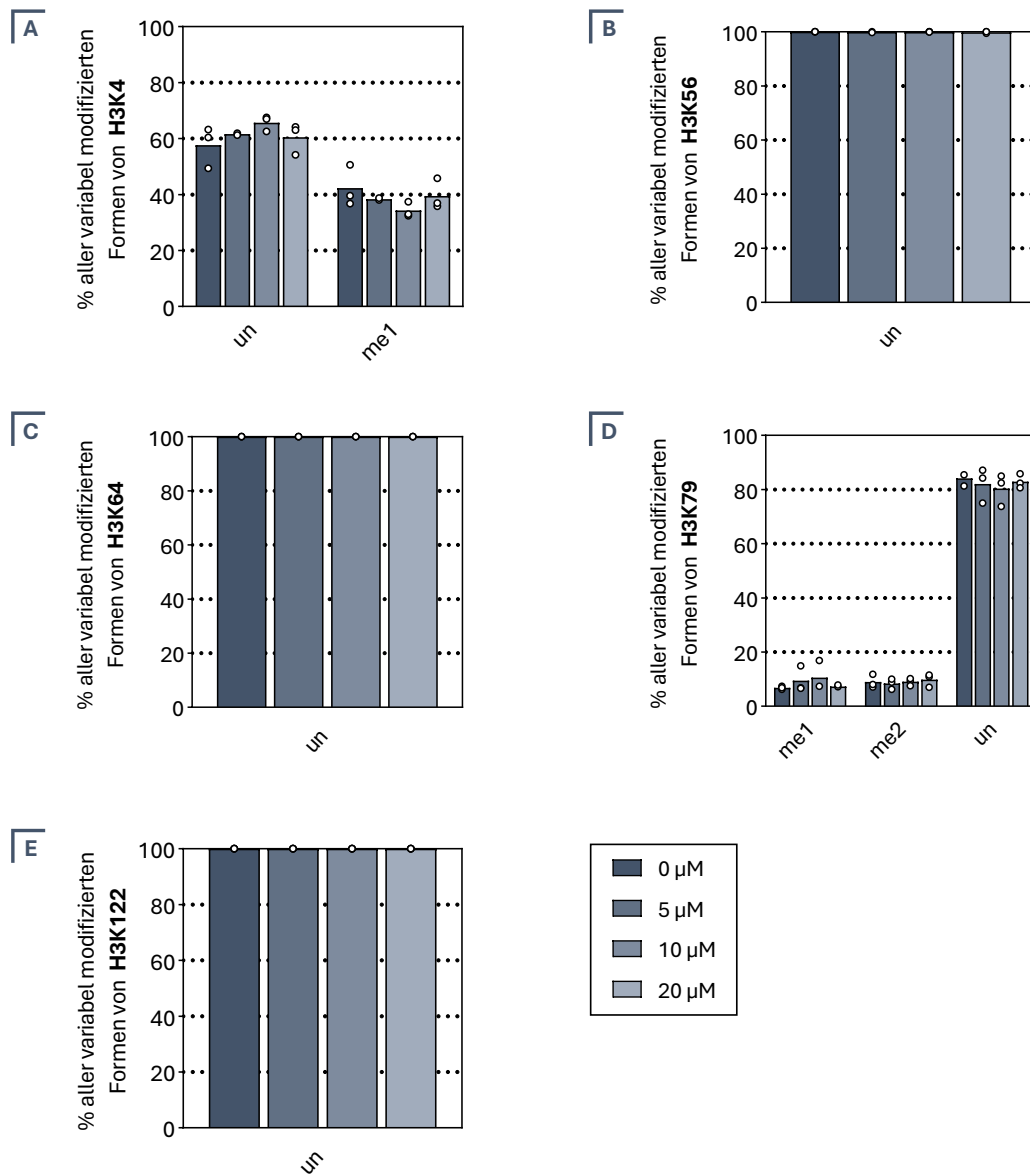


Abbildung A4 | **Relatives Vorkommen weiterer H3-Peptide nach Trypsinverdau.** Die A549-Zellen wurden für 24 h mit 5 μM bis 20 μM Natriumarsenit (NaAsO₂) behandelt, anschließend wurden die Histonfraktionen isoliert und die posttranslationalen Modifikationen mittels LC-MS/MS analysiert. Dargestellt sind die Ergebnisse für die identifizierten Peptidformen H3K4-R8 (**A**), H3K56-R63 (**B**), H3K64-R69 (**C**), H3K79-R83 (**D**) und H3K122-R128 (**E**). Die Daten wurden aus biologischen Triplikaten erhalten, die als individuelle Punkte in den Graphen visualisiert werden, wobei die Balkenhöhe jeweils den korrespondierenden Mittelwert repräsentiert.

A.3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.3.1 Allgemeine Abkürzungen

Abkürzung	Bezeichnung
5-hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5-mC	5-Methylcytosin
ABC	<i>ATP-binding cassette transporter</i>
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
AK	Antikörper
ACN	Acetonitril
AQP	Aquaglyceroporinkanal
ARE	<i>Antioxidant Response Element</i>
AS	Aminosäuren
As ³⁺ (GS) ₃	Arsentriglutathion
ATO	Arsentrioxid
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basenexzisionsreparatur
BMDL	<i>Benchmark Dose Lower Confidence Limit</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	Cytosin
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
CoR	Corepressor
C _q	<i>cycle of quantification</i>
DDA	<i>Data Dependent Aquisition</i>
DMA ³⁺	dreiwertige Dimethylarsinsäure
DMA ⁵⁺	fünfwertige Dimethylarsinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
EFSA	<i>European Food and Safety Authority</i>
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
EXO	Exonukleaseverdau
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FKS	Fetales Kälberserum
gDNA	genomische DNA
GF-AAS	Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie
GG-NER	<i>global genome NER</i>

GNAT	Gcn5-N-Acetyltransferase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HMT	Histonmethyltransferase
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
hPTM	posttranslationale Histonmodifikation
HR	homologe Rekombination
HSP	<i>heat shock protein</i>
HT-RT-qPCR	<i>High-Throughput Reverse Transcription Quantitative PCR</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IFC	<i>Dynamic Array Integrated Fluidic Circuit</i>
IL	Interleukin
JmjC	JumonjiC-Domäne
JNK	<i>c-Jun NH2-terminal kinase</i>
KDM	Lysin-spezifische Demethylase
KG	Körpergewicht
KGM	<i>Keratinocyte Growth Medium</i>
KMT	Lysin-spezifische Methyltransferase
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry</i>
lncRNA	<i>long non-coding RNA</i>
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
MAPK	<i>mitogen activated kinase</i>
miRNA	<i>micro RNA</i>
MMA ³⁺	dreiwertige Monomethylarsonsäure
MMA ³⁺ (GS) ₂	Monomethylarsonsäure-Diglutathion
MMA ⁵⁺	fünfwertige Monomethylarsonsäure
MMR	Mismatch-Reparatur
MOE	<i>Margin of Exposure</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MT	Metallothionein
MYST	Morf, Ybf2, Sas2, Tip60
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
ncRNA	<i>non-coding RNA</i>
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	<i>Non-Homologous End Joining</i>
NRC	<i>No Reaction Control</i>
NTC	<i>No Template Control</i>

O ₂ ^{•-}	Superoxidanion-Radikale
OH [•]	Hydroxyl-Radikal
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff
OA-NAM	O-Acetyl-ADP-Ribose und Nicotinamid
ROO [•]	Peroxyl-Radikal
PHD	<i>Plant Homeodomain</i>
PIC	<i>Protease Inhibitor Cocktail</i>
PPM	<i>Pooled Primer Mix</i>
PRMT	Protein-Arginin-N-Methyltransferase
PTM	posttranslationale Modifikation
RCC	<i>Relative Cell Count</i>
RGE	Relative Genexpressionsänderung
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
RP-HPLC	<i>Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SET	<i>enhancer of zeste, trithorax</i>
SIRT	Sirtuine
SOD	Superoxiddismutase
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
STA	<i>Specific Target Amplification</i>
TC-NER	<i>transcription-coupled NER</i>
TF	Transkriptionsfaktor
TSA	Trichostatin A
TSS	Transkriptionsstartstelle
WHO	<i>World Health Organization</i>

A.3.2 Abkürzungen von Proteinen und Genen

Protein	Bezeichnung	Gen
AP-1	<i>activator protein 1</i>	<i>FOS, JUN, (...)</i>
APAF1	<i>apoptotic protease activating factor</i>	<i>APAF1</i>
APE1	<i>apurinic-apyrimidinic endonuclease 1</i>	<i>APEX1</i>
APTX	<i>aprataxin</i>	<i>APTX</i>
AQP7	<i>aquaporin 7</i>	<i>AQP7</i>
AQP9	<i>aquaporin 9</i>	<i>AQP9</i>
AS3MT	<i>arsenite methyltransferase</i>	<i>AS3MT</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>	<i>ATM</i>
ATR	<i>ataxia telangiectasia and rad3-related protein</i>	<i>ATR</i>
B2M	<i>beta-2-microglobulin</i>	<i>B2M</i>
BAX	<i>bcl2-associated x protein</i>	<i>BAX</i>
BRCA1/2	<i>breast cancer 1, early onset</i>	<i>BRCA1</i>
BRCA2	<i>breast cancer 2, early onset</i>	<i>BRCA2</i>
ACTB	<i>β-actin</i>	<i>ACTB</i>
β-TrCP	<i>transducin repeat containing e3 ubiquitin protein ligase, beta</i>	<i>BTRC</i>
CAT	<i>catalase</i>	<i>CAT</i>
CBP	<i>CREB-binding protein</i>	<i>CREBBP</i>
CCL22	<i>c-c motif chemokine ligand 22</i>	<i>CCL22</i>
CCND1	<i>cyclin d1</i>	<i>CCND1</i>
CETN2	<i>centrin 2</i>	<i>CETN2</i>
c-JUN	<i>jun proto-oncogene</i>	<i>JUN</i>
CLOCK	<i>circadian locomoter output cycles protein kaput</i>	<i>CLOCK</i>
c-MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>	<i>MYC</i>
COX2	<i>cytochrome c oxidase assembly factor</i>	<i>COX2</i>
CREB	<i>cyclic AMP-responsive element-binding protein</i>	<i>CREB1</i>
CSA	<i>cockayne syndrome group A</i>	<i>ERCC8</i>
CSB	<i>cockayne syndrome group B</i>	<i>ERCC6</i>
DDB2	<i>damage-specific DNA binding protein 2</i>	<i>DDB2</i>
DDB2	<i>damage-specific DNA binding protein 2</i>	<i>DDB2</i>
DDIT3	<i>DNA damage inducible transcript 3</i>	<i>DDIT3</i>
DNMT1	<i>DNA methyltransferase 1</i>	<i>DNMT1</i>
DNMT3A	<i>DNA methyltransferase 3A</i>	<i>DNMT3A</i>
DNMT3B	<i>DNA methyltransferase 3B</i>	<i>DNMT3B</i>
DOT1	<i>disruptor of telomeric silencing 1</i>	<i>DOT1L</i>
DR5	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b</i>	<i>TNFRSF10B</i>
E2F1	<i>E2F transcription factor 1</i>	<i>E2F1</i>
E2F1	<i>e2f transcription factor 1</i>	<i>E2F1</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>	<i>EGFR</i>
EHMT2	<i>euchromatic histone-lysine N methyltransferase 2</i>	<i>EHMT2</i>
EHMT2/G9a	<i>euchromatic histone lysine methyltransferase 2</i>	<i>EHMT2</i>
EP300	<i>e1a binding protein p300</i>	<i>EP300</i>
ERCC1	<i>excision repair cross complementing 1</i>	<i>ERCC1</i>

ERCC2	<i>excision repair cross complementing 2</i>	ERCC2
EXO1	<i>exonuclease 1</i>	EXO1
FEN1	<i>flap endonuclease 1</i>	FEN1
FOS	<i>proto-oncogene c-Fos</i>	FOS
FOXO1	<i>forkhead box o1</i>	FOXO1
FOXO3	<i>forkhead box o3</i>	FOXO3
FTH1	<i>ferritin heavy chain 1</i>	FTH1
G6PD	<i>glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>	G6PD
GADD45A	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha</i>	GADD45A
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	GAPDH
GCL	<i>glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit</i>	GCLC
Gcn5	<i>general control non-repressed protein</i>	GCN5
GLUT1	<i>glucose transporter 1</i>	SLC2A1
GNAT1	<i>G protein subunit alpha transducin 1</i>	GNAT1
GPX1	<i>glutathione peroxidase 1</i>	GPX1
GPX2	<i>glutathione peroxidase 2</i>	GPX2
GSR	<i>glutathione reductase</i>	GSR
GSTO1	<i>glutathione S-transferase omega-1</i>	GSTO1
GUSB	<i>glucuronidase, beta</i>	GUSB
HDAC1	<i>histone deacetylase 1</i>	HDAC1
HDAC2	<i>histone deacetylase 2</i>	HDAC2
HDAC3	<i>histone deacetylase 3</i>	HDAC3
HDAC6	<i>histone deacetylase 6</i>	HDAC6
HDAC10	<i>histone deacetylase 10</i>	HDAC10
HIF1A	<i>hypoxia-inducible factor 1A</i>	HIF1A
HO-1	<i>heme oxygenase (decycling) 1</i>	HMOX1
hMOF/KAT8	<i>human males absent on the first / histone acetyltransferase KAT8</i>	KAT8
OGG1/hOGG1	<i>8-oxoguanine DNA glycosylase</i>	OGG1
HPRT1	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>	HPRT1
HSF1	<i>heat shock factor 1</i>	HSF1
HSP70	<i>heat shock 70kda protein 1a</i>	HSPA1A
IKBA	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>	NFKBIA
IL1a	<i>interleukin 1 alpha</i>	IL1a
IL1b	<i>interleukin 1 beta</i>	IL1b
IL6	<i>interleukin 6</i>	IL6
IL8	<i>interleukin 8</i>	IL8
JUN	<i>proto-oncogene c-Jun</i>	JUN
KDM1A	<i>lysine-specific histone demethylase 1A</i>	KDM1A
KDM1B	<i>lysine-specific histone demethylase 1B</i>	KDM1B
KDM2A	<i>lysine-specific histone demethylase 2A</i>	KDM2A
KDM3A	<i>lysine-specific histone demethylase 3A</i>	KDM3A
KDM5	<i>lysine-specific histone demethylase 5</i>	KDM5
Keap1	<i>kelch-like ECH-associated protein 1</i>	KEAP1
LIG1	<i>ligase 1, DNA, ATP-dependent</i>	LIG1

LIG3	<i>ligase 3, DNA, ATP-dependent</i>	LIG3
MAP3K5/ASK1	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5</i>	MAP3K5
MB	<i>myoglobin</i>	MB
MBD4	<i>methyl-cpg binding domain 4</i>	MBD4
MDM2	<i>mdm2 proto-oncogene</i>	MDM2
MeCP2	<i>methyl-cpg binding protein 2</i>	MECP2
MGMT	<i>o-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>	MGMT
MLH1	<i>MutL homolog 1</i>	MLH1
Morf	<i>monocytic leukemia zinc finger protein-related factor</i>	MLZF1
MPG	<i>N-methylpurine DNA glycosylase</i>	MPG
MRP1	<i>multidrug resistance-associated protein 1</i>	ABCC1
MRP2	<i>multidrug resistance-associated protein 2</i>	ABCC2
MRP4	<i>multidrug resistance-associated protein 4</i>	ABCC4
MSH2	<i>MutS homolog 2</i>	MSH2
MSH3	<i>MutS homolog 3</i>	MSH3
MSH6	<i>MutS homolog 6</i>	MSH6
MT1X	<i>metallothionein 1x</i>	MT1X
MT2A	<i>metallothionein 2a</i>	MT2A
MTF-1	<i>metal regulatory transcription factor 1</i>	MTF1
MYC	<i>proto-oncogene c-Myc</i>	MYC
MYOD1	<i>myogenic differentiation 1</i>	MYOD1
NaPi-IIIb	<i>sodium-dependent phosphate transport protein 2B</i>	SLC34A2
NBS1	<i>nijmegen breakage syndrome 1 (nibrin)</i>	NBN
NCOA3/ACTR	<i>nuclear receptor coactivator 3</i>	NCOA3
NF-κB	<i>nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>	NFKB1
Nox2	<i>NADPH oxidase 2</i>	CYBB
NOXA	<i>phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>	PMAIP1
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>	NFE2L2
p15	<i>cyclin-dependent kinase (CDK) 4 inhibitor 2b</i>	CDKN2B
p16	<i>cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor 2a</i>	CDKN2A
p19	<i>cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor 2d</i>	CDKN2D
p21	<i>cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor 1a</i>	CDKN1A
p27	<i>cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor 1b</i>	CDKN1B
p300	<i>histone acetyltransferase p300</i>	EP300
p49/p100	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in b-cells 2</i>	NFKB2
p50/p105	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in b-cells 1</i>	NFKB1
p53	<i>tumor protein p53</i>	TP53
PARP-1	<i>poly (ADP-ribose) polymerase 1</i>	PARP1
PCAF	<i>p300-CBP-associated factor</i>	PCAF
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>	PCNA
RAD23B	<i>UV excision repair protein RAD23 homolog B</i>	RAD23B
RAD50	<i>rad50 homolog (s. cerevisiae)</i>	RAD50
RAD51	<i>rad51 recombinase</i>	RAD51
RFC	<i>replication factor C</i>	RFC1-5

RIZ	<i>retinoblastoma-interacting zinc-finger protein</i>	PRDM2
RPA	<i>replication protein A</i>	RPA1-3
RPL30	<i>60S ribosomal protein L30</i>	RPL30
Sas2	<i>something about silencing 2</i>	SAS2
SETD1	<i>SUV39 enhancer of zeste, trithorax-domain containing 1</i>	SETD1A/B
SETD2	<i>SUV39 enhancer of zeste, trithorax-domain containing 2</i>	SETD2
Sir2	<i>silent information regulator 2 like protein 2 (saccharomyces cerevisiae)</i>	SIR2
SIRT1	<i>NAD-dependent protein deacetylase sirtuin 1</i>	SIRT1
SIRT2	<i>NAD-dependent protein deacetylase sirtuin 2</i>	SIRT2
SIRT3	<i>NAD-dependent protein deacetylase sirtuin 3</i>	SIRT3
SIRT4	<i>NAD-dependent protein deacetylase sirtuin 4</i>	SIRT4
SIRT5	<i>NAD-dependent protein deacetylase sirtuin 5</i>	SIRT5
SIRT6	<i>NAD-dependent protein deacetylase sirtuin 6</i>	SIRT6
SIRT7	<i>NAD-dependent protein deacetylase sirtuin 7</i>	SIRT7
SOD1	<i>superoxide dismutase 1, soluble</i>	SOD1
SOD2/ MnSOD	<i>superoxide dismutase 2, mitochondrial</i>	SOD2
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>	STAT3
SUV39	<i>suppressor of variegation 3-9</i>	SUV39H1
TET1	<i>methylcytosine dioxygenase ten-eleven translocation 1</i>	TET1
TET2	<i>methylcytosine dioxygenase ten-eleven translocation 2</i>	TET2
TET3	<i>methylcytosine dioxygenase ten-eleven translocation 3</i>	TET3
TFIIH	<i>transcription factor II H</i>	GTF2H1-5
TGFb	<i>transforming growth factor beta</i>	TGFb
Tip60	<i>tat-interacting protein 60 kDa</i>	HTATIP
TNFa	<i>tumor necrosis factor a</i>	TNFa
TRIM33	<i>tripartite motif containing 33</i>	TRIM33
TXN	<i>thioredoxin</i>	TXN
TXNRD	<i>thioredoxin reductase 1</i>	TXNRD1
USP7	<i>ubiquitin-specific protease 7</i>	USP7
UV-DDB	<i>UV-damaged DNA binding protein</i>	DDB1/DDB2
UVSSA	<i>UV sensitivity associated protein</i>	UVSSA
VEGFA	<i>vascular endothelial growth factor a</i>	VEGFA
XPA	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group a</i>	XPA
XPC	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group c</i>	XPC
XPD	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group d/ excision repair cross-complementation group 2</i>	ERCC2
XPF	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group f/ excision repair cross-complementation group 4</i>	ERCC4
XPG	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group g/ excision repair cross-complementation group 5</i>	ERCC5
XRCC1	<i>x-ray repair cross-complementing protein 1</i>	XRCC1
XRCC5	<i>x-ray repair cross-complementing protein 5</i>	XRCC5
XRCC6/Ku70	<i>x-ray repair cross-complementing protein 6</i>	XRCC6
Yb2	<i>yeast bromodomain factor 2</i>	BRD2
ZnT1	<i>solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1</i>	SLC30A1

A.4 ABILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Aufbau des Chromatins und Mechanismen der epigenetischen Regulation.	8
Abbildung 2	Schematische Darstellung der Histon(de)acetylierung und Histon(de)methylierung.	12
Abbildung 3	Metabolismus von Arsen in Hepatozyten.	18
Abbildung 4	Intrazelluläre molekulare Wirkmechanismen von Arsenit.	21
Abbildung 5	Ausgewählte DNA-Reparaturmechanismen und deren Beeinflussung durch Arsenit.	27
Abbildung 6	Arsenit-vermittelte epigenetische Dysregulation.....	29
Abbildung 7	Exemplarisches Histogramm des <i>Gatings</i> zur Bestimmung der Zellzyklusphasenverteilung.	40
Abbildung 8	Exemplarische Fragmentierungsüberprüfung der A549-Zelllinie.	48
Abbildung 9	Exemplarische Ponceau-S-Färbung der Histonfraktionen der A549-Zelllinie.....	51
Abbildung 10	Einfluss von Natriumarsenit auf den ATP-Gehalt in A549-Zellen.....	60
Abbildung 11	Einfluss von Natriumarsenit auf die relative Lebendzellzahl von A549-Zellen.....	61
Abbildung 12	Zellzyklusphasenverteilung von A549-Zellen nach Inkubation mit Natriumarsenit..	62
Abbildung 13	Aufnahmestudien von Natriumarsenit in A549-Zellen.....	64
Abbildung 14	Einfluss von 25 μ M Natriumarsenit mit Nachinkubation auf das Genexpressionsprofil in A549-Zellen.	66
Abbildung 15	Genexpressionsprofile von A549-Zellen nach akuter Arsenitexposition und Nachinkubation.	67
Abbildung 16	Einfluss von Natriumarsenit auf die Expression von Genen der Metallhomöostase und Inflammation in A549-Zellen.	68
Abbildung 17	Einfluss von Natriumarsenit auf die Expression von Genen der oxidativen Stressantwort in A549-Zellen.	70
Abbildung 18	Einfluss von Natriumarsenit auf die Expression von Genen der Zellzyklusregulation und apoptotischer Vorgänge in A549-Zellen.	73
Abbildung 19	Einfluss von Natriumarsenit auf die Expression von Genen der DNA-Reparatur und DNA-Schadensantwort in A549-Zellen.....	74

Abbildung 20	Einfluss von Natriumarsenit auf die Expression von Genen der epigenetischen Regulation in A549-Zellen.....	76
Abbildung 21	Vorkommen von H3K4me3 in ausgewählten DNA-Reparaturgenen von A549-Zellen.	79
Abbildung 22	Vorkommen von H3K27me3 in ausgewählten DNA-Reparaturgenen von A549-Zellen.	80
Abbildung 23	Vorkommen von H3K18ac in ausgewählten DNA-Reparaturgenen von A549-Zellen.	81
Abbildung 24	Vorkommen von H3K9ac in ausgewählten DNA-Reparaturgenen von A549-Zellen.	83
Abbildung 25	Hypothetische Mechanismen der Arsenit-vermittelten genspezifischen Deacetylierung.....	85
Abbildung 26	Effekt einer Arsenitbehandlung und Nachinkubation auf das globale Vorkommen von H3K4me3.	87
Abbildung 27	Effekt einer Arsenitbehandlung und Nachinkubation auf das globale Vorkommen von H3K27me3.	87
Abbildung 28	Effekt einer Arsenitbehandlung und Nachinkubation auf das globale Vorkommen von H3K9ac.	88
Abbildung 29	Effekt einer Arsenitbehandlung und Nachinkubation auf das globale Vorkommen von H3K18ac.	89
Abbildung 30	Effekt einer Arsenitbehandlung und Nachinkubation auf das globale Vorkommen von H3K9ac und H3K18ac in BEAS-2B-Zellen.	89
Abbildung 31	Schematische Darstellung der Proteinsequenz des humanen Histon H3.1 Proteins.	92
Abbildung 32	Relatives Vorkommen der modifizierten Peptidformen von Histon H3 (K9/K14) nach Trypsinverdau.....	93
Abbildung 33	Relatives Vorkommen der modifizierten Peptidformen von Histon H3 (K18/K23) nach Trypsinverdau.....	94
Abbildung 34	Relatives Vorkommen der modifizierten Peptidformen von Histon H3 (K27/K36/K37) nach Trypsinverdau. Die	95
Abbildung 35	Relatives Vorkommen der modifizierten Peptidformen von Histon H3.3 (K27/K36/K37) nach Trypsinverdau.	96
Abbildung 36	Einfluss von Arsenit auf die relative Häufigkeit von Histon H3 vs. H3.3.	97
Abbildung 37	Effekt von Natriumarsenit und einer Nachinkubation auf die HDAC-Aktivität von A549-Zellen.	99

Abbildung 38	Effekt von Natriumarsenit und einer Nachinkubation auf die HAT-Aktivität von A549-Zellen.	101
Abbildung 39	Zeitliche Veränderungen Arsenit-vermittelter transkriptioneller Zellreaktionen.	106
Abbildung 40	Domänenarchitektur ausgewählter Proteine mit Zink-bindenden Elementen.	114
Abbildung 41	Epigenetische Modulation posttranslationaler Modifikationen von Histon H3 durch Arsenit.....	116

Anhang

Abbildung A1	Ergebnisse der ChIP-Kontrollen zur Anreicherung von Histon H3.	160
Abbildung A2	Exemplarische Blots der analysierten Histonmodifikationen der A549-Zelllinie. ...	161
Abbildung A3	Beispielhafte Blots der analysierten globalen Histonmodifikationen der BEAS-2B-Zelllinie.	162
Abbildung A4	Relatives Vorkommen weiterer H3-Peptide nach Trypsinverdau.	163

A.5 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Temperaturprogramm zur Arsenanalyse mittels Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie.	38
Tabelle 2	Temperaturprogramm zur Durchführung der cDNA-Synthese.	41
Tabelle 3	Temperaturprogramm der Präamplifikation.	42
Tabelle 4	Temperaturprogramm zur Durchführung des Exonukleaseverdaus.	42
Tabelle 5	Temperaturprogramm zur Durchführung der cDNA-Synthese.	43
Tabelle 6	Verdünnungsschema der verwendeten Antikörper für die Chromatinimmunopräzipitation.	46
Tabelle 7	Temperaturprogramm der qPCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse.	47
Tabelle 8	Übersicht der im <i>Western Blot</i> zur globalen Histonbestimmung eingesetzten Antikörper.	52
Tabelle 9	Verwendeter Gradient zur flüssigchromatographischen Auftrennung der Peptide auf einer C18-Säule mit einer Flussrate von 300 nL/min.	54
Tabelle 10	Parameter der massenspektrometrischen Analyse mittels DDA.	54
Tabelle 11	Pipettierschema des Histondeacetylase (HDAC)-Aktivitätsassays.	56
Tabelle 12	Pipettierschema des Histonacetyltransferase (HAT)-Aktivitätsassays.	56

Anhang

Tabelle A1	Auflistung der verwendeten Chemikalien und deren Hersteller.	136
Tabelle A2	Verwendete Puffer bzw. Lösungen und deren Zusammensetzung.	139
Tabelle A3	Verwendete Kits und deren Hersteller.	142
Tabelle A4	Auflistung der verwendeten Antikörper und deren Hersteller.	143
Tabelle A5	Verwendete Instrumente und deren Hersteller.	144
Tabelle A6	Verwendete Software und deren Anbieter.	146
Tabelle A7	Verwendete Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller.	147

Tabelle A8	Aktuelle Liste der bisher dokumentierten posttranslationalen Histonmodifikationen.	149
Tabelle A9	Auflistung aller analysierten Gene und ihrer entsprechend codierten Gene der HT-RT-qPCR.	150
Tabelle A10	Ergebnisse der HT-RT-qPCR in A549-Zellen nach akuter Arsenitbehandlung.....	153
Tabelle A11	Ergebnisse der HT-RT-qPCR in A549-Zellen nach akuter Arsenitbehandlung und Nachinkubation (24 h).	155
Tabelle A12	Ergebnisse der HT-RT-qPCR in A549-Zellen nach akuter Arsenitbehandlung und Nachinkubation (48 h).	157
Tabelle A13	Detaillierte Informationen zu den etablierten und erworbenen ChIP-qPCR-Primern.	159

A.6 PUBLIKATIONSLISTE

Publikationen in Fachzeitschriften

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.

Fischer F., Stöber S., Wegmann L., Veh E., **Lumpp T.**, Parsdorfer M., Schumacher P., Hartwig A.: Chromate Affects Gene Expression and DNA Methylation in Long-Term In Vitro Experiments in A549 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(18):10129.

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.

Publikationen in Vorbereitung

Lumpp T., Hijazi, H., Stöber, S., Tekin, E., Fischer, F., Brugière, S., Pflieger, D., Hartwig, A.: Impact of Arsenite on Transient and Persistent Histone H3 Modifications and Transcriptional Response.

Vorträge auf Fachtagungen

Lumpp, T., Tekin, E., Stöber, S., Fischer, F., Hartwig, A.: Arsenite-mediated epigenetic dysregulation: Global and DNA repair gene-specific changes of histone H3 acetylation in human lung cells. 34th Meeting of the German Society for Environmental Mutation Research, 20.-22.03.2024, Kaiserslautern, Deutschland.

Lumpp, T., Tekin, E., Stöber, S., Schumacher, P., Hartwig, A.: Arsenite-mediated epigenetic disruption of histone acetylation in DNA repair genes within lung epithelial cells. Symposium Signaling through Chromatin: from molecules to ecosystems, 02.-04.10.2023, Grenoble, Frankreich.

Lumpp, T., Gleiss, K., Stöber, S., Schumacher, P., Hartwig, A.: Arsenite-induced epigenetic dysregulation of post-translational histone modifications in DNA repair genes in lung epithelial cells. 8th German Pharm-Tox Summit, 06.-09.03.2023, Ulm, Deutschland.

Posterbeiträge auf Fachtagungen

Lumpp, T., Stöber, S., Tekin, E., Brunner, L., Fischer, F., Hartwig, A.: Transient epigenetic responses to arsenite on DNA repair genes and histone modifications in human lung cells. Annual Meeting of the German Society for Research on DNA Repair, 25.-27.09.2024, Köln, Deutschland.

Preise und Auszeichnungen

GT-Vortragspreis, 8th German Pharm-Tox Summit, 06.-09.03.2023, Ulm, Deutschland