

**Einfluss von Aluminium
auf die genomische Stabilität
und Proteine der Eisenhomöostase**

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

Dorothee Beatrix Ott

aus

Neuwied

KIT-Dekan: Prof. Dr. Reinhard Fischer

1. Referentin: Prof. Dr. Andrea Hartwig

2. Referent: Prof. Dr. Mirko Bunzel

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2019

Für meine Eltern

Erklärung

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 07.01.2019

Dorothee Beatrix Ott

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	5
2.1	Aluminium	5
2.1.1	Exposition des Menschen	5
2.1.2	Aufnahme, Metabolisierung und Ausscheidung durch den Menschen	9
2.1.3	Toxikologisches Wirkprofil	11
2.2	Eisenhaushalt	15
2.2.1	Schlüsselproteine zur Regulation der Eisenhomöostase	17
2.2.2	Einfluss von Aluminium auf den Eisenhaushalt	23
3	Fragestellung.....	27
4	Material und Methoden.....	29
4.1	Zellkultur.....	29
4.1.1	Verwendete Zelllinie	29
4.1.2	Zellkultivierung.....	29
4.1.3	Behandlung der A549-Zellen	30
4.1.3.1	Bestimmung der Löslichkeit von Aluminium in DMEM	30
4.1.3.2	Inkubation mit Al(acac) ₃ und Hacac	31
4.1.3.3	Bestrahlung mittels Röntgenröhre.....	32
4.1.4	Zytotoxizitätsuntersuchungen in A549-Zellen	32
4.1.4.1	Zellzahlbestimmung und Koloniebildungsfähigkeit	32
4.1.4.2	ATP-Assay	33
4.2	Untersuchung des Zellzyklus und der Zelltodmechanismen.....	34
4.3	Untersuchung der DNA-Schädigung und -Reparatur	36
4.3.1	Alkalische Entwindung (<i>Alkaline Unwinding</i>).....	36
4.3.2	Pulsfeld-Gelelektrophorese.....	38
4.3.3	Immunfluoreszenzfärbung.....	39
4.3.4	Elektrophorese und Western-Blot.....	40
4.4	Genexpressionsanalyse mittels <i>High-Throughput RT-qPCR</i>	42
4.5	Untersuchung der Metallbindung an Transferrin	45
4.5.1	Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie (ESI MS)	47
4.5.2	Strukturanalyse mittels Circular dichroismus (CD).....	47
4.6	Bestimmung des zellulären Ferritin-Gehaltes	48
4.7	Statistik	50

5	Ergebnisse und Diskussion	51
5.1	Löslichkeit von Aluminium im Zellkulturmedium	51
5.2	Einfluss von Aluminium auf zelluläre Prozesse in A549-Zellen.....	53
5.2.1	Zytotoxizitätsuntersuchungen.....	53
5.2.2	Untersuchung von Zelltodmechanismen	57
5.2.3	Untersuchung der Zellzyklusregulation und Proliferation.....	58
5.3	Einfluss von Aluminium auf die DNA und damit assoziierte Reparaturwege in A549-Zellen	61
5.3.1	Entstehung und Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen	62
5.3.2	Entstehung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	63
5.3.2.1	Einfluss von Aluminium auf γ H2AX	65
5.3.2.2	Einfluss von Aluminium auf Rad51	67
5.4	Einfluss von Aluminium auf die Genexpression in A549-Zellen	69
5.4.1	Einfluss auf Gene der DNA-Schadensantwort und der DNA-Reparatur.....	74
5.5	Interaktion von Aluminium mit Proteinen des Eisenhaushalts	78
5.5.1	Bedeutung von Serum-Transferrin für den Transport von $Fe^{(III)}$ und $Al^{(III)}$	78
5.5.1.1	Bindung von $Fe^{(III)}$ an apo-hTF.....	79
5.5.1.2	Bindung von $Fe^{(III)}$ an Al-hTF	85
5.5.1.3	Toxikologische Interpretation der Bindung von $Al^{(III)}$ an hTF	91
5.5.2	Einfluss von Aluminium auf das Eisenspeicherprotein Ferritin	93
6	Zusammenfassende Diskussion.....	98
7	Literaturverzeichnis	107
8	Anhang.....	125
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	125
8.2	Abbildungsverzeichnis	129
8.3	Verwendete Chemikalien und Kits.....	131
8.4	Antikörper, Primer, Puffer und Lösungen	134
8.4.1	Antikörper (Immunfluoreszenz (IF) und Western Blot (WB)).....	134
8.4.2	Primer (<i>High-throughput RTqPCR</i>)	134
8.4.3	Puffer und Lösungen	139
8.5	Verbrauchsmaterialien	142
8.6	Verwendete Geräte.....	144
8.7	Verwendete Software.....	146
8.8	Ergänzende Daten.....	147
8.8.1	Gutachten zur Authentifizierung der A549-Zellen	147

8.8.2	Einfluss von Aluminium auf die Koloniebildungsfähigkeit	
	- Ergänzende Daten	149
8.8.3	Einfluss von Aluminium auf Zelltodmechanismen	
	- Ergänzende Daten	149
8.8.4	Einfluss von Aluminium auf die Genexpression in A549-Zellen	
	- Ergänzende Daten	150
9	Publikationsliste	151
10	Danksagung.....	153

1 Zusammenfassung

Aluminium gehört zur Gruppe der Leichtmetalle und findet sich im Periodensystem der Elemente unter der Ordnungszahl 13 in der dritten Hauptgruppe. Mit einem Massenanteil von ca. 8 % ist es nach Sauerstoff und Silicium das dritthäufigste Element der Erdkruste und ubiquitär in der Umwelt vorhanden. Aufgrund seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften, hier sei insbesondere die geringe Dichte des Metalls ($2,7 \text{ g/cm}^3$) erwähnt, ist Aluminium als Reinstoff oder aber als Legierungsbestandteil hochattraktiv für industrielle Anwendungen. Das Leichtmetall findet sich unter anderem in Motoren, Bauteilen, Leiterkabeln und vielen weiteren Objekten vor allem im Fahrzeugbau und in der Elektrotechnik. So vielfältig der industrielle Einsatz von Aluminium ist, so vielfältig ist auch die Exposition des Menschen gegenüber diesem Metall. Die primären Aufnahmequellen sind dabei Lebensmittel, das Trinkwasser, Kosmetikprodukte oder Medikamente. Ebenfalls möglich ist eine gesteigerte, inhalative Exposition gegenüber feinen Aluminiumpartikeln am Arbeitsplatz. Nach derzeitigem Kenntnisstand übernimmt dieses Element keine essentielle Funktion im menschlichen Körper, obwohl es in einer Reihe von Körperflüssigkeiten und Organen bereits nachgewiesen wurde. Die Konfrontation des Menschen mit Aluminium erfolgt jedoch nicht nur auf der rein physischen, sondern auch auf der mentalen, teilweise emotionalen Ebene durch die Behandlung des Metalls in den Medien. Nicht selten sind Schlagzeilen wie „Aluminium und Brustkrebs: Risikofaktor Deodorant?“ oder „Demenz durch Aluminium“ zu lesen. Aluminium wirkt in sehr hohen Konzentrationen neurotoxisch. Eine mögliche Rolle bei der Krebsentstehung oder in der Entwicklung weiterer, neurodegenerativer Erkrankungen wird hingegen unter Wissenschaftlern kontrovers diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei wichtige Aspekte hinsichtlich der toxischen Wirkung von Aluminium aufgegriffen und näher untersucht. Dabei handelte es sich zum einen um den Einfluss des Metalls auf die genomische Stabilität, zum anderen um die Interaktion des Metalls mit Proteinen des Eisenhaushalts.

Die Untersuchungen zum Einfluss von Aluminium auf die genomische Stabilität erfolgten *in vitro* anhand der Adenokarzinom-Zelllinie A549 mit der Modellsubstanz Aluminiumacetylacetonat ($\text{Al}(\text{acac})_3$). Betrachtet wurden dabei zunächst die Parameter Zellviabilität, Zellzyklusverteilung und Zelltodmechanismen bei 24-stündiger Inkubation der Zellen mit der Verbindung in einem Konzentrationsbereich von 10-200 μM . Hierbei zeigte sich eine dosisabhängige Abnahme der Zellviabilität gemessen an der Zellzahl beziehungsweise der

Koloniebildungsfähigkeit mit deutlichen Effekten ab einer Konzentration von 150 μM . Grund dafür war ein Zellzyklusarrest, nicht aber ein vermehrtes Sterben der Zellen. Um zu überprüfen, ob es sich bei diesem Arrest um eine Reaktion der Zelle auf eine Schädigung ihrer DNA handelte, erfolgten vertiefende Untersuchungen zum Einfluss von $\text{Al}(\text{acac})_3$ auf die DNA sowie wichtige DNA-Reparaturprozesse. Mittels *Alkaline Unwinding* wurde weder eine Zunahme an DNA-Einzelstrangbrüchen noch eine Hemmung der DNA-Einzelstrangbruch-Reparatur bei Co-Inkubation der Zellen mit H_2O_2 festgestellt. Im Gegensatz dazu zeigten die Versuche der Pulsfeld-Gelelektrophorese ab einer Konzentration von 150 μM $\text{Al}(\text{acac})_3$ eine Zunahme an DNA-Doppelstrangbrüchen sowie eine Hemmung ihrer Reparatur bei zusätzlicher Bestrahlung der Zellen. Vertiefende Untersuchungen zu γH2AX und RAD51 durch Immunfluoreszenzmikroskopie und Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot bestätigten dieses Ergebnis auf Proteinebene. Des Weiteren zeigten die Genexpressions-Analysen mittels *High Throughput RT-qPCR*, dass die Abnahme des zellulären Rad51-Proteingehaltes auf einer verringerten Expression des betreffenden Gens in der Zelle beruht. Zahlreiche weitere Gene wichtiger DNA-Reparatursysteme, insbesondere der homologen Rekombination, wurden bei einer steigenden Konzentration an $\text{Al}(\text{acac})_3$ in den A549-Zellen ebenfalls weniger exprimiert.

Im Fokus der Interaktion von Aluminium mit dem Eisenhaushalt standen die Proteine humanes Serum-Transferrin (hTF) und Ferritin. Ersteres ist primär für den Transport, zweiteres für die Speicherung von Fe^{3+} -Ionen im Organismus verantwortlich.

Die Untersuchung der Bindung von Al^{3+} und Fe^{3+} an hTF erfolgte dabei mithilfe der hochauflösenden ESI Massenspektrometrie kombiniert mit der CD-Spektroskopie. Es zeigte sich, dass Fe_1 -hTF nur zusammen mit Fe_2 -hTF in der Proteinlösung auftrat. Als ausschlaggebender Faktor für die Tertiärstruktur des Proteins wurde das in der C-Schleife des Proteins gebundene Fe^{3+} -Ion identifiziert. Ebenfalls ergaben sich klare strukturelle Unterschiede zwischen Al_2 -hTF und Fe_2 -hTF. Zudem wurde die Bildung einer Hybridform, bestehend aus beiden Metallen und dem Protein, Al_1Fe_1 -hTF, nachgewiesen. In diesem Zusammenhang diskutiert wurde die Möglichkeit der Interaktion von Al_1Fe_1 -hTF mit dem Transferrin-Rezeptor aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Fe_2 -hTF.

Die Untersuchung zum Einfluss von Aluminium auf Ferritin erfolgte wieder im zellulären System mittels ELISA. Hierbei führte die Inkubation der A549-Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ ab einer Konzentration von 150 μM zu einem deutlichen Anstieg des Ferritin-Gehaltes. Ob Ferritin daher als potentieller Indikator für die Aufnahme von Aluminium in die Zelle herangezogen werden kann, gilt es durch weitere Versuche zu überprüfen.

Abstract

Aluminum belongs to the group of light metals and is found in the periodic table of the elements under the atomic number 13 in the third main group. With a mass fraction of approximately 8 %, it is the third most common element in the earth's crust after oxygen and silicon and is ubiquitously present in the environment. Due to its physical-chemical properties, in particular to the low density of the metal (2.7 g/cm³), aluminum is highly attractive as a pure material or as an alloying component for industrial applications. The light metal can be found in motors, building components, conductor cables and many other objects, especially in vehicle construction and electrical engineering. Equally diverse as the industrial use of aluminum is the human exposure to this metal. The primary absorption sources are food, drinking water, cosmetic products or medicines. An increased inhalation exposure to fine aluminum particles at the workplace is also possible. To date, this element has no known essential function in the human body, although it has already been determined in a number of body fluids and organs. The human confrontation with aluminum, however, does not only take place on the purely physical level but also on the mental, partly emotional level through the treatment of the metal in the media. Headlines such as "Aluminum and breast cancer: risk factor deodorant?" or "Dementia caused by aluminum" can often be read. Aluminum has a neurotoxic effect in very high concentrations. A possible role in the development of cancer or other neurodegenerative diseases is controversially discussed among scientists.

In the present study, two important aspects of the toxicological effect of aluminum were taken up and examined in more detail. These were on the one hand the influence of the metal on genomic stability and on the other hand the interaction of the metal with proteins of the iron balance.

The investigations on the influence of aluminum on genomic stability were carried out *in vitro* using the adenocarcinoma cell line A549 with the model substance aluminum acetylacetonate (Al(acac)₃). First, the parameters cell viability, cell cycle distribution and cell death mechanisms were considered during a 24-hour incubation of the cells with the compound in a concentration range of 10-200 µM. A dose-dependent decrease in cell viability measured by cell count or colony-forming ability with clear effects from a concentration of 150 µM was detected. The reason for this was a cell cycle arrest but not an increased death of the cells. In order to prove whether this arrest was a reaction of the cell to DNA damage, in-depth investigations were carried out into the influence of Al(acac)₃ on DNA and important DNA repair processes. Alkaline unwinding did not detect

an increased formation of DNA single strand breaks nor an inhibition of DNA single strand break repair during co-incubation of the cells with H_2O_2 . In contrast, the experiments with pulse field gel electrophoresis showed an increased formation of DNA double-strand breaks from a concentration of $150 \mu M$ $Al(acac)_3$ as well as a repair inhibition of radiation induced DNA double-strand breaks. Further investigations of $\gamma H2AX$ and $RAD51$ by immunofluorescence microscopy and gel electrophoresis with subsequent western blot confirmed this result at the protein level. Furthermore, gene expression analysis using high throughput RT-qPCR showed that the decrease in the cellular $Rad51$ protein content can be attributed to a reduced expression of the respective gene in the cell. In addition, numerous other genes of important DNA repair systems, in particular homologous recombination, were less expressed in the A549 cells with an increasing concentration of $Al(acac)_3$.

The interaction of aluminum with the iron balance focused on the proteins human serum transferrin (hTF) and ferritin. The former is primarily responsible for the transport, the latter for the storage of Fe^{3+} -ions in the organism.

The binding of Al^{3+} and Fe^{3+} to hTF was investigated using high-resolution ESI mass spectrometry combined with CD spectroscopy. It was found that Fe_1 -hTF only appeared together with Fe_2 -hTF in the protein solution. The Fe^{3+} -ion bound in the C-loop of the protein was identified as the decisive factor for the tertiary structure of the protein. There were also clear structural differences between Al_2 -hTF and Fe_2 -hTF observed. In addition, the formation of a hybrid form consisting of both metals and the protein Al_1Fe_1 -hTF was demonstrated. In this context, the possibility of an interaction of Al_1Fe_1 -hTF with the transferrin receptor was discussed due to its structural similarity to Fe_2 -hTF.

The investigation of the influence of aluminum on ferritin was again performed in the cellular system by ELISA. The incubation of the A549 cells with $Al(acac)_3$ from a concentration of $150 \mu M$ led to a significant increase of the ferritin content. Whether ferritin can therefore be used as a potential indicator for the uptake of aluminum into the cell needs to be investigated by further experiments.

2 Einleitung

Dieses Kapitel führt in die Thematik der vorliegenden Arbeit ein. Dafür werden zunächst die wichtigsten Fakten zu Aluminium allgemein und dann speziell in Bezug auf die menschliche Gesundheit vorgestellt. Ein Schwerpunkt liegt dabei auf dem toxischen Wirkprofil des Metalls. Im Anschluss daran werden der Eisenhaushalt und die darin involvierten Proteine, speziell Transferrin und Ferritin, in Grundzügen erläutert. Inwiefern Aluminium in der Lage ist, die Eisenhomöostase zu beeinflussen, wird abschließend anhand von ausgewählten Studien betrachtet.

2.1 Aluminium

Aluminium findet sich unter der Ordnungszahl 13 in der dritten Hauptgruppe des Periodensystems der Elemente. Es handelt sich um ein silberweißes, unedles Metall, das in Gegenwart von Sauerstoff und Wasser leicht zu Al^{3+} oxidiert. In der Umwelt tritt es primär in Verbindung mit Silikat in der Erdkruste auf. Dort ist es nach Sauerstoff und Silizium mit einem Gewichtsanteil von circa 8,1 % das dritthäufigste Element. Die erste Gewinnung des Metalls geht auf den dänischen Chemiker Hans Christian Ørsted im Jahr 1825 zurück (zusammengefasst in Priest, 2004). Erst gegen Ende des 19. Jahrhunderts bestand jedoch die Möglichkeit, größere Mengen des Metalls durch Methoden wie dem Bayer-Verfahren und dem Hall-Héroult-Prozess zu gewinnen. Diese Methoden werden heute noch angewendet (Norgate *et al.*, 2007).

Kennzeichnend für das Metall sind neben seinem ubiquitären Vorkommen in der Umwelt eine geringe Dichte von $2,7 \text{ g/cm}^3$ und eine gute elektrische sowie thermische Leitfähigkeit. Dies macht das Metall zu einem vielseitig einsetzbaren Werkstoff in der metallverarbeitenden Industrie, hier besonders im Fahrzeugbau und in der Elektrotechnik (zusammengefasst in Torralba *et al.*, 2003; Hirsch und Al-Samman, 2013).

Im Menschen lässt sich Aluminium in den unterschiedlichsten Körperkompartimenten nachweisen, übernimmt dort jedoch nach derzeitigem Stand des Wissens keine essentielle Funktion (zusammengefasst in Priest, 2004; Exley, 2013). Nachfolgend wird auf die menschliche Exposition, Aufnahme und Metabolisierung sowie die Wirkung des Leichtmetalls auf den Organismus im Detail eingegangen.

2.1.1 Exposition des Menschen

Die ständige Präsenz von Aluminium in der Umwelt, in der Industrie sowie im alltäglichen Leben führt zu einer vielfältigen Exposition des Menschen gegenüber dem Leichtmetall.

Wichtige Quellen im Hinblick auf die Allgemeinbevölkerung sind dabei unverarbeitete oder verarbeitete Lebensmittel, das Trinkwasser, Bedarfsgegenstände, kosmetische Mittel oder Medikamente. Beruflich bedingt kann es zu einer signifikanten Steigerung der Exposition durch den Kontakt mit dem Metall am Arbeitsplatz kommen. Besonders gefährdet sind dabei Aluminiumschweißer oder Personen, die aktiv in die Gewinnung oder Verarbeitung von Aluminium involviert sind (zusammengefasst in Krewski *et al.*, 2007; Willhite *et al.*, 2014; BfR, 2017).

Exposition über das Trinkwasser und die Nahrung

Täglich nimmt der Mensch Aluminium oral über das Trinkwasser und die Nahrung zu sich. Der Aluminiumgehalt des Trinkwassers schwankt dabei je nach Ursprung, pH-Wert und Anteil an organischem Kohlenstoff. Das Auftreten von Aluminium in unverarbeiteten sowie verarbeiteten Lebensmitteln ist zum Teil natürlich bedingt, da einige Pflanzen das Leichtmetall über ihre Wurzeln aus dem Boden aufnehmen und anreichern können. Wieviel Aluminium dabei letztendlich in der Pflanze gespeichert wird, hängt in erster Linie von der jeweiligen Pflanzenart ab. Besonders hohe Gehalte finden sich zum Beispiel in Kräutern wie Oregano und Basilikum, Tees, Gewürzen wie schwarzem Pfeffer, Kakao sowie sämtlichen Kakaoerzeugnissen. Im Hinblick auf die Akkumulation von Aluminium in Pflanzen stellen die Beschaffenheit und der pH-Wert des Bodens wichtige Parameter dar. So steigt die Bioverfügbarkeit des Metalls für die Pflanze bei einem sauren Boden pH-Wert aufgrund der zunehmenden Löslichkeit des Metalls an (Gerhardsson *et al.*, 1994). Über die Nahrungskette reichert sich das Aluminium auch in tierischen Produkten an (zusammengefasst in Flaten, 2002; EFSA, 2008; Stahl *et al.*, 2011).

Der Aluminium-Gehalt des Lebensmittels kann zudem durch die Zubereitung beziehungsweise Lagerung stark beeinflusst werden. Vor allem saure und basische Lebensmittel neigen dazu, das Leichtmetall aus Bedarfsgegenständen wie aluminiumhaltigem Kochgeschirr oder Aluminiumfolie vermehrt aufzunehmen. Das Ausmaß der Migration hängt dabei sowohl von der Dauer des Kontakts als auch von der Temperatur ab (Müller *et al.*, 1993; Fimreite *et al.*, 1997; López *et al.*, 2002; Al Zubaidy *et al.*, 2011; Al Juhaiman, 2012). Im Gegensatz zum natürlichen Auftreten von Aluminium im Lebensmittel kann dieser Eintrittspfad des Metalls in die Nahrung besser kontrolliert und durch geeignete Maßnahmen minimiert werden. Dies zeigt sich zum Beispiel anhand der Studie von Lopéz *et al.* (2002). Untersucht wurde dabei der Einfluss des Behältermaterials auf den Aluminiumgehalt von Trinkwasser, Fruchtsäften und Softdrinks. Insbesondere saure Getränke wie z.B. Apfel- oder Orangensaft wiesen bei einer Lagerung in

aluminiumhaltigen Dosen deutlich höhere Gehalte des Leichtmetalls verglichen mit einer Aufbewahrung in Glasgefäßen auf.

Metallisches Aluminium sowie eine Reihe von Aluminiumverbindungen werden zudem gezielt als Lebensmittelzusatzstoffe bei der industriellen Herstellung und Verarbeitung von Lebensmitteln eingesetzt. Dies kann ebenfalls zur oralen Exposition des Menschen gegenüber dem Leichtmetall beitragen. Der Einsatzbereich der jeweiligen Verbindung und die maximal zugelassene Höchstmenge sind in der Richtlinie 95/2/EG festgelegt (EFSA, 2008; BfR, 2017). Tabelle 1 informiert über die einzelnen Verbindungen und ihre Verwendung sowie Funktion im Lebensmittel.

Tabelle 1: Einsatz von Aluminium in Lebensmittelzusatzstoffen (modifiziert nach Richtlinie 95/2/EG).

E-Nr.	Bezeichnung	Verwendung	Funktion
E 173	Aluminium (metallisch)	Überzüge für Süßwaren Verzierung von Pralinen Liköre	Farbstoff
E 520	Aluminiumsulfat	Eiklar glasiertes, kandierte, kristallisiertes Obst und Gemüse	Stabilisator Festigungsmittel
E 521	Aluminiumnatriumsulfat		
E 522	Aluminiumkaliumsulfat		
E 523	Aluminiumammoniumsulfat		
E 541	Saures Natriumaluminiumphosphat	Biskuitgebäck Scones	Säureträger in Backpulver
E 554	Natriumaluminiumsilikat	u.a. Trockenlebensmittel Käse in Scheiben Kochsalz Kaugummi	Trennmittel
E 555	Kaliumaluminiumsulfat		
E 559	Aluminiumsilikat (Kaolin)		
E 1452	Stärkealuminiumoctenyl- succinat	in eingekapselten Vitaminzubereitungen in Nahrungsergänzungsmitteln	
-	Aluminiumoxid	Kaugummi	Füllstoff

Exposition über kosmetische Mittel

Der Einsatz von Aluminium in gebräuchlichen Kosmetikprodukten wird für die dermale Exposition der Allgemeinbevölkerung gegenüber Aluminium verantwortlich gemacht. An erster Stelle steht dabei die Verwendung des Metalls meist als Aluminiumhydroxychlorid in Antitranspirantien, wo es wegen seiner schweißhemmenden Wirkung gezielt eingesetzt wird. Die Wirkung beruht dabei auf der Verengung von Hautporen durch die Bildung von Aluminiumhydroxid im Porenangang sowie einer teilweisen Denaturierung der Proteine des Porenangangs. Je nach Applikationsform kann es durch die Verwendung eines Sprays oder Zerstäubers zu einer zusätzlichen Belastung des Verbrauchers mit dem Metall durch

Inhalation kommen (Teagarden und Hem, 1982; Pineau *et al.*, 2012; BfR, 2014). Des Weiteren findet sich Aluminium in Form von Aluminiumhydroxid in Sonnencremes oder als Aluminiumfluorid in Zahnpasta. Dort dient es nicht nur der Zahnreinigung, sondern auch als Poliermittel und kann beim Verschlucken zur oralen Exposition des Menschen beitragen (BfR, 2014).

Exposition über Medikamente

Der Einsatz von Aluminium in Medikamenten, z.B. Antacida, Impfstoffen und Stoffen zur Hyposensibilisierung, stellt eine weitere Expositionsmöglichkeit für den Menschen gegenüber dem Leichtmetall dar. Besonders kritisch wird dabei der Einsatz von Aluminiumhydroxid in Präparaten zur Hyposensibilisierung betrachtet. Hierbei wird dem Patienten therapiebedingt Aluminiumhydroxid (0,1-1,1 mg) in regelmäßigen Abständen über mehrere Jahre subkutan appliziert. Aluminiumhydroxid wird in diesen Präparaten als Adjuvans eingesetzt und führt durch eine stärkere Antigen-Adsorption zu einer verstärkten Immunantwort des Körpers (Weisser, 2015; Klotz *et al.*, 2017).

Exposition am Arbeitsplatz

Wie bereits erwähnt, sind bestimmte Personengruppen aufgrund der Situation am Arbeitsplatz gegenüber Aluminium verstärkt exponiert. Die Exposition erfolgt dabei in erster Linie inhalativ über die Lunge. Untersuchungen zeigen, dass die körperliche Belastung dieser Personen mit dem Leichtmetall die gegebenen Referenzwerte von Aluminium im Urin ($< 15 \mu\text{g/L}$) und im Serum ($< 5 \mu\text{g/L}$) um ein Vielfaches übersteigen kann (Umweltbundesamt, 1998; Rossbach *et al.*, 2006; Kiesswetter *et al.*, 2007; Kiesswetter *et al.*, 2009; Klotz *et al.*, 2017). Zur Abschätzung der inneren Belastung von Arbeitern wird zudem der Biologische Arbeitsstoff-Toleranzwert (BAT-Wert) von $50 \mu\text{g}$ Aluminium/g Kreatin im Urin herangezogen. Ein Überschreiten dieses Wertes bedeutet zwar nicht zwangsläufig eine körperliche Beeinträchtigung für die betroffene Person, jedoch wurde ab $100 \mu\text{g Al/g}$ Kreatinin eine Leistungsabnahme in neuropsychologischen Tests festgestellt (DFG, 2018).

Eine gewisse Grundbelastung des Menschen mit Aluminium ist aufgrund der Omnipräsenz des Leichtmetalls in der Umwelt nicht zu vermeiden. Das Ausmaß der Resorption hängt dabei jedoch ganz entscheidend vom jeweiligen Expositionspfad ab. Geeignete Maßnahmen, z.B. das Tragen einer Atemschutzmaske beim Arbeiten mit Aluminium, sollten deshalb zum Schutz des Menschen vor einer überdurchschnittlichen, vermeidbaren Exposition gegenüber dem Leichtmetall eingesetzt werden.

2.1.2 Aufnahme, Metabolisierung und Ausscheidung durch den Menschen

Aluminium wird über verschiedene Wege in den menschlichen Körper aufgenommen, verteilt und teilweise wieder abgegeben. Abbildung 1 fasst die wichtigsten Prozesse schematisch zusammen.

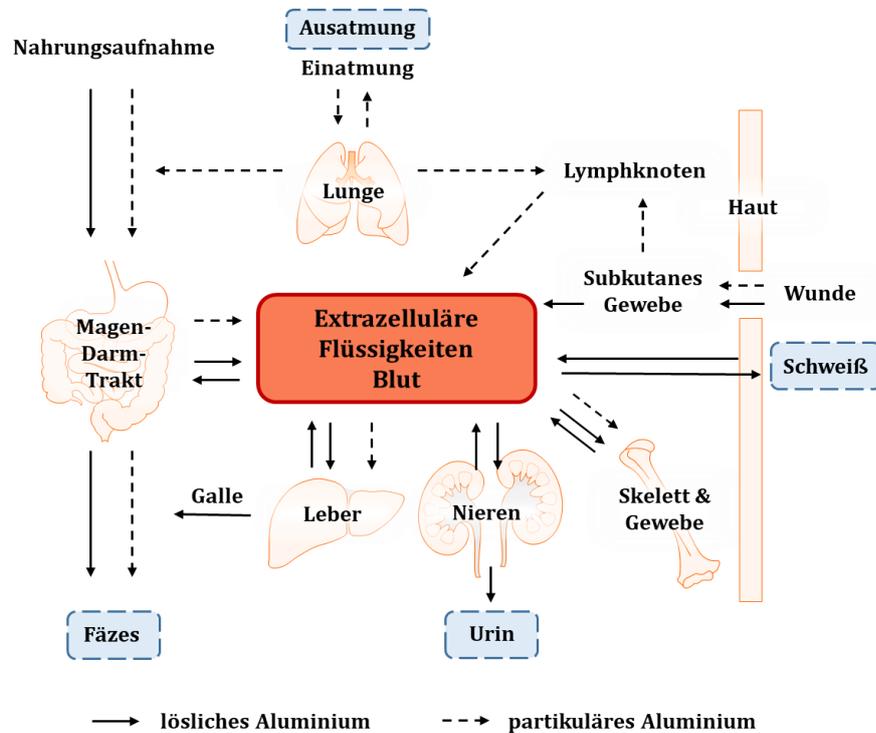


Abbildung 1: Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung von Aluminium im Organismus des Menschen (modifiziert nach Priest *et al.*, 2004). Lösliches Aluminium (durchgezogene Pfeile) gelangt primär oral über den Magen-Darm-Trakt oder dermal über geschädigte Hautpartien in den Körper. Partikuläres Aluminium (gestrichelte Pfeile) kann zudem inhalativ über die Lunge aufgenommen werden. Im Körper verteilt sich das Leichtmetall über die extrazellulären Flüssigkeiten und das Blut auf die unterschiedlichen Organe. Über die Ausatmung, die Fäzes, den Urin oder den Schweiß wird Aluminium zum Teil wieder ausgeschieden.

Die Aufnahme von Aluminium erfolgt überwiegend oral über den Magen-Darm-Trakt, inhalativ über die Lunge oder dermal über die Haut. Dabei wird mit der Nahrung zugeführtes Aluminium im Magen-Darm-Trakt nur zu circa 0,1 % resorbiert (zusammengefasst in Priest, 2004; Willhite *et al.*, 2014). Trotz dieser geringen Resorptionsrate wird davon ausgegangen, dass die tolerierbare wöchentliche Aufnahmemenge (TWI, *tolerable weekly intake*) von 1 mg Aluminium pro kg Körpergewicht, wie sie die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA, *European Food Safety Authority*) herausgegeben hat, allein durch die orale Aufnahme des Leichtmetalls über die Nahrungszufuhr bereits abgedeckt wird (EFSA, 2008; BfR, 2014). Eine Überschreitung des TWI allein durch die Nahrungsaufnahme gilt für bestimmte

Personengruppen, z.B. Säuglinge und Kleinkinder, als wahrscheinlich (Fernandez-Lorenzo *et al.*, 1999; Burrell und Exley, 2010; BfR, 2012).

Die Aufnahme von Aluminium über die Haut wird ebenfalls als gering eingestuft. Bei einer intakten Hautbarriere gelangt nur ein Bruchteil des aufgetragenen Aluminiums (0,01 %) bis in tiefere Hautschichten vor und ist letztendlich systemisch verfügbar. Bei einer leicht geschädigten Hautbarriere erhöht sich diese Resorptionsrate auf circa 0,06 %. Deshalb gilt die Verbraucherempfehlung, Antitranspirantien nicht direkt nach der Achselrasur aufzutragen (Flarend *et al.*, 2001; Pineau *et al.*, 2012; BfR, 2014). Kurz erläutert sei hier die 2-Probandenstudie von Flarend *et al.* (2001) zur Hautpenetration von Aluminium. Hierfür wurde den Probanden jeweils eine definierte Menge an radioaktiv markiertem ²⁶Al auf den Unterarm aufgetragen und anschließend Urin- sowie Blutproben der Probanden über einen Zeitraum von insgesamt 7 Wochen gesammelt und hinsichtlich ihres Aluminiumgehaltes analysiert. Es zeigte sich, dass nur circa 0,012 % des applizierten ²⁶Al tatsächlich vom Organismus aufgenommen wurden. Aufgrund der geringen Probandenzahl lassen sich jedoch keine endgültigen Aussagen treffen. Hierfür bedarf es großangelegter, epidemiologischer Studien (Klotz *et al.*, 2017).

Im Körper verteilt sich das Leichtmetall über die extrazellulären Flüssigkeiten und das Blut auf die einzelnen Organe des Körpers. Annahmen zufolge finden sich bei einem gesunden Mensch 30 – 50 mg Aluminium pro kg Körpergewicht. Die höchsten Anteile des Metalls finden sich dabei im Skelett (circa 50 %) und in der Lunge (circa 25 %) (zusammengefasst in Priest, 2004; Krewski *et al.*, 2007). Zur Abschätzung der Gesamtkörperbelastung mit Aluminium kann unter anderem die Konzentration des Leichtmetalls im Serum herangezogen werden. In der Regel liegt dieser Wert für die Allgemeinbevölkerung bei weniger als 5 µg/L (Umweltbundesamt, 1998).

Ein Teil des vom Körper resorbierten Aluminiums wird über die Fäzes, den Urin, den Schweiß oder die Ausatmung vom Organismus wieder abgegeben. Letzteres ist besonders für die Ausscheidung von partikulären Aluminiumverbindungen wichtig (zusammengefasst in Priest, 2004). Im Durchschnitt scheidet ein Mensch ohne berufliche Zusatzbelastung weniger als 15 µg Aluminium pro Liter Urin bzw. weniger als 60 µg des Leichtmetalls innerhalb von 24 Stunden mit dem Urin aus. Bei einer beruflichen Belastung kann dieser Wert auf mehr als 1000 µg Aluminium pro Liter Urin ansteigen (Umweltbundesamt, 1998; Klotz *et al.*, 2017).

2.1.3 Toxikologisches Wirkprofil

Die vielfältige Exposition des Menschen gegenüber Aluminium sowie der Nachweis des Metalls im gesamten Organismus führen zu der Frage, ob die menschliche Gesundheit durch das toxische Potential des Metalls tatsächlich gefährdet wird. Spekulative Behauptungen durch die Medien führen diesbezüglich zu einer großen Verunsicherung in der Bevölkerung. Doch auch in der Wissenschaft wird diese Frage kontrovers diskutiert, da teils widersprüchliche oder nur unzureichende Daten vorliegen. Zum Schutz der menschlichen Gesundheit gilt es jedoch, mögliche negative Einflüsse des Metalls auf den Menschen zu identifizieren, Dosis-Wirkungs-Beziehungen zu formulieren und, wenn nötig, Grenzwerte aufzustellen (Klotz *et al.*, 2017).

Die Toxizität von Aluminium ist zeitabhängig und eine akut toxische Wirkung des Metalls nach derzeitigem Kenntnisstand eher von untergeordneter Relevanz. Vielmehr zeigt die chronische Exposition gegenüber dem Leichtmetall negative Auswirkungen auf den Organismus. Im Menschen äußert sich dies z.B. in der neurodegenerativen Erkrankung der Dialyse-Enzephalopathie und der Atemwegserkrankung einer Aluminose. In Tierversuchen zeigte sich zudem eine schädigende Wirkung auf den Embryo (Llobet *et al.*, 1995; zusammengefasst in Krewski *et al.*, 2007; Willhite *et al.*, 2014).

Neben den wissenschaftlich belegten, schädlichen Auswirkungen des Metalls auf die menschliche Gesundheit werden eine Reihe weiterer Krankheiten verstärkt diskutiert. Unter anderem stellt sich die Frage, inwieweit Aluminium die genomische Stabilität herabsetzt und dadurch potentiell zu einer Erhöhung des Krebsrisikos führt. Im Fokus steht dabei die zunehmende Anzahl an Brustkrebs-Erkrankungen in den westlichen Industrienationen und die Verwendung aluminiumhaltiger Antitranspirantien (Darbre, 2005; Lankoff *et al.*, 2006; Sappino *et al.*, 2012).

Im Folgenden werden die wichtigsten Erkenntnisse bezüglich der neurotoxischen Wirkung des Metalls und der beruflich bedingten Atemwegserkrankung einer Aluminose dargestellt. Anschließend erfolgt eine detaillierte Betrachtung aktueller Studien zur potentiell genotoxischen und kanzerogenen Wirkung des Metalls.

Neurotoxizität und neurodegenerative Erkrankungen

Die neurotoxische Wirkung von Aluminium äußert sich im Krankheitsbild der sogenannten Dialyse-Enzephalopathie. Sie beruht auf der Quervernetzung von Proteinen, dem Auslösen von oxidativem Stress, der Beeinflussung kalziumabhängiger Signalwege und einer Reihe weiterer Effekte auf das Zentralnervensystem (zusammengefasst in

Kawahara und Kato-Negishi, 2011; Klotz *et al.*, 2017). Charakteristisch für diese Erkrankung sind zum Beispiel Sprach- und Koordinationsstörungen, myoklonische Rucke sowie eine schnelle Ermüdung. All diese Symptome sind bei einer frühen Diagnose der Krankheit durch das Ergreifen geeigneter Maßnahmen vollständig reversibel (Parkinson *et al.*, 1981). Es waren Arbeiten von Alfrey *et al.*, die Anfang der 1970er Jahre zum ersten Mal einen direkten Zusammenhang zwischen der Dialyse-Enzephalopathie und einer Vergiftung mit Aluminium herstellten. Die Wissenschaftler sahen im Nachweis deutlich höherer Aluminiumgehalte im Muskel, in den Knochen und im Gehirn betroffener Patienten verglichen mit einer Kontrollgruppe einen direkten Anhaltspunkt für ihre Hypothese (Alfrey *et al.*, 1976). Die Aluminium-Intoxikation der Patienten wurde in diesem Zusammenhang primär auf eine Kontamination der Dialyseflüssigkeit mit dem Leichtmetall zurückgeführt (Parkinson *et al.*, 1981). An dieser Stelle sei erwähnt, dass Dialysepatienten aufgrund ihrer Nierenersatztherapie deutlich höheren Wassermengen verglichen mit einer gesunden Person ausgesetzt sind. Zudem gelangen mögliche Kontaminanten aus dem Wasser direkt in die Blutbahn, ohne vorher eine natürliche Barriere wie dem Magen-Darm-Trakt überwinden zu müssen. Gründe für die damals stark erhöhten Aluminium-Gehalte der verwendeten Dialyseflüssigkeiten waren Rückstände von Aluminiumsulfat, welches als Flockungsmittel zur Wasseraufarbeitung eingesetzt wurde und der Zusatz aluminiumhaltiger Phosphatbinder (Parkinson *et al.*, 1981; Hoenich und Levin, 2003).

Parkinson *et al.* (1981) bestätigten die Hypothese von Alfrey *et al.* (1976) durch ihre Untersuchung von 21 Dialyse-Enzephalopathie Patienten aus Newcastle. Die Bestimmung der Aluminiumgehalte im Plasma und im Gehirn der Patienten ergab auch hier deutlich höhere Werte verglichen mit denjenigen der Allgemeinbevölkerung. Als Schwelle einer Intoxikation mit Aluminium wurde ein Wert von 50 µg/L des Leichtmetalls im Plasma angegeben.

Inwieweit Aluminium in die Entstehung weiterer neurodegenerativer Erkrankungen involviert ist, wird hingegen kontrovers diskutiert. Eine Vielzahl an Studien beschäftigt sich mit der Frage, ob Aluminium Ursache oder Folgeerscheinung der Alzheimer-Krankheit ist (Rondeau *et al.*, 2000; zusammengefasst in Flaten, 2001; De Sole *et al.*, 2013). Grund dafür ist der Nachweis deutlich höherer Mengen des Metalls im Gehirn von Alzheimer-Patienten (Bhattacharjee *et al.*, 2013; Exley und Vickers, 2014; Mirza *et al.*, 2017). Untersuchungen zeigten jedoch, dass sich das Erscheinungsbild der Alzheimer-Krankheit deutlich von demjenigen der Dialyse-Enzephalopathie unterscheidet. Es

erscheint demnach unwahrscheinlich, dass Aluminium die Ursache für die Alzheimer-Krankheit ist (Wisniewski und Wen, 1992; Klotz *et al.*, 2017).

Atemwegserkrankung - Aluminose

Die Aluminose, auch bekannt unter dem Begriff einer ‚Aluminiumstaublunge‘, wurde erstmals in den 1930iger Jahren beschrieben. Sie entsteht durch die wiederholte Inhalation von hohen Dosen an metallischem Aluminiumpulver beziehungsweise Stäuben aus Aluminiumoxid. Je nach Krankheitsverlauf entwickelt sich aus der Aluminose eine Lungenfibrose, die zu Ventilationsstörungen oder, im gravierendsten Fall, Lungenkrebs führen kann (zusammengefasst in Smolkova und Nakladalova, 2014).

Kraus *et al.* (2006) verdeutlichten anhand ihrer Studie mit 62 Arbeitern aus der Aluminiumpulver-Herstellung, dass die Aluminose auch heute noch zu den relevanten Berufskrankheiten gehört. Die Probanden wurden dafür zunächst befragt und anschließend unterschiedlichen Tests zur körperlichen Belastbarkeit, dem Immunstatus und der Lungenfunktion unterzogen. Des Weiteren wurde im Rahmen des Monitorings zur Aluminiumbelastung des Körpers die Konzentration des Leichtmetalls im Plasma und dem Urin bestimmt. Eine gezielte Untersuchung auf Frühstadien einer Aluminose erfolgte mithilfe der hochauflösenden Computertomographie (HRCT). Hierbei korrelierte ein positives Testergebnis auf Aluminose gut mit dem Zeitraum der Exposition sowie der gemessenen Aluminium-Konzentrationen im Urin und im Plasma (Kraus *et al.*, 2006).

Weitere Studien bestätigen die Brisanz der Thematik anhand ausgewählter Fallstudien (Smolkova *et al.*, 2014; Rodrigo *et al.*, 2015; Tomioka *et al.*, 2016). Dies zeigt, wie wichtig ein umfassendes Monitoring der berufsbedingten Exposition des Menschen gegenüber Aluminium-Stäuben ist. In diesem Zusammenhang sei auf die aktuell geltenden maximalen Arbeitsplatz-Konzentrationen (MAK-Werte) für Aluminium-, Aluminiumoxid- und Aluminiumhydroxid-haltige Stäube am Arbeitsplatz hingewiesen. Sie liegen bei 4 mg/m³ bezogen auf die einatembare Fraktion und bei 1,5 mg/m³ bezogen auf die alveolengängige Fraktion (DFG, 2018).

Genotoxizität und Kanzerogenität

Untersuchungen zum genotoxischen Potential von Aluminium sind aufgrund der Omnipräsenz des Metalls in der Umwelt, aber auch im Alltag des Menschen sehr wichtig. Dabei wurde gezeigt, dass Aluminium in Form seines dreiwertigen Kations sowohl mit dem negativen Phosphat-Rückgrat der DNA als auch den DNA-Basen wechselwirkt. Hier besonders zu nennen ist die N7-Position von Guanin (Ahmad *et al.*, 1996; Zhang *et al.*,

2002). Eine durch Aluminium hervorgerufene Quervernetzung der chromosomalen Proteine wurde ebenfalls festgestellt (Wedrychowski *et al.*, 1986; zusammengefasst in Krewski *et al.*, 2007). Das Leichtmetall zeigte jedoch weder eine mutagene Wirkung in bakteriellen Testsystemen, noch führte es zu Genmutationen in Säugetierzellen. Allerdings zeigte sich anhand von *in vitro* und *in vivo* Studien die klastogene Wirkung des Metalls und das Auftreten von Mikronuklei (EFSA, 2008). Inwieweit Aluminium in der Lage ist, die DNA direkt zu schädigen, wird anhand von zwei ausgewählten Studien genauer betrachtet.

Lankoff *et al.* (2006) untersuchten die DNA-schädigende Wirkung von Aluminium mit dem sogenannten Comet Assay. Hierfür inkubierten die Wissenschaftler humane Lymphozyten zunächst für 72 Stunden mit AlCl_3 im Konzentrationsbereich 1-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, um anschließend Aliquote der Zellsuspensionen für den Assay einzusetzen. Festgestellt wurde dabei eine dosisabhängige Zunahme an DNA-Strangbrüchen bis zu einer behandelnden Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Bei höheren Konzentrationen wurden zwar weniger DNA-Schäden detektiert, jedoch stieg auch die Anzahl an apoptotischen Zellen. Bei einer zusätzlichen Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray zeigte sich zudem eine verminderte Kapazität zur DNA-Reparatur, die auf die Gegenwart des Metalls zurückgeführt wurde.

Auch Celik *et al.* (2012) beobachteten im Rahmen ihrer *in vivo* Untersuchungen einen positiven Zusammenhang zwischen der Aluminiumkonzentration im Blutserum und dem Anteil an geschädigter Lymphozyten-DNA. Probanden mit einer verstärkten Exposition gegenüber dem Leichtmetall wiesen dabei höhere Aluminiumkonzentrationen im Serum auf verglichen mit weniger stark exponierten Probanden und zeigten eine vermehrte Schädigung der Lymphozyten-DNA. In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls eine Zunahme des oxidativen Stresslevels im Organismus der stark exponierten Probanden festgestellt.

Eine potentiell kanzerogene Wirkung von Aluminium wird vor allem im Hinblick auf die Brustkrebs-Erkrankungen diskutiert (McGrath, 2003; Darbre *et al.*, 2013a). Brustkrebs gilt in den westlichen Industrienationen als die häufigste Krebserkrankung bei Frauen. Die Vermutung, dass Aluminium durch die Applikation von Antitranspirantien der Auslöser dieser Krankheit ist, begründet sich darin, dass innerhalb der letzten Jahrzehnte Tumore vermehrt im oberen äußeren Quadranten der Brust festgestellt wurden. Dies korreliert mit einem erhöhten Gehalt an Aluminium in diesem Bereich der Brust (zusammengefasst in Darbre *et al.*, 2013b). Allerdings mehren sich die Hinweise, dass es sich hierbei nicht um eine Ursache der Krankheit, sondern vielmehr um eine Folgeerscheinung handelt (Mirick *et al.*, 2002; zusammengefasst in Namer *et al.*, 2008; Klotz *et al.*, 2017).

2.2 Eisenhaushalt

Eisen gehört zur Gruppe der Übergangsmetalle und findet sich im Periodensystem der Elemente unter der Ordnungszahl 26. Nach Aluminium ist es das zweithäufigste Metall in der Erdkruste, wo es hauptsächlich als Bestandteil von Erzen und Mineralien auftritt (zusammengefasst in Pantopoulos *et al.*, 2012; Davis und Clarke, 2013). Menschen, Tiere aber auch Pflanzen sind auf eine ausreichende Versorgung mit diesem essentiellen Spurenelement zur Aufrechterhaltung ihrer physiologischen Prozesse angewiesen. In Bezug auf den Menschen gehören dazu die Aufnahme und der Transport von Sauerstoff im Blut, die Energiegewinnung über die Atmungskette in den Mitochondrien und die Bewahrung der katalytischen Aktivität von Enzymen durch das redoxaktive Metall (zusammengefasst in Terwilliger, 1998; Solomon *et al.*, 2000; Lill, 2009). Als Beispiel sei hier Cytochrom P450, ein Schlüsselprotein zur Biotransformation von Substanzen im menschlichen Organismus, aufgeführt. Dieses beinhaltet Eisen als sogenannten Co-Faktor im aktiven Zentrum (zusammengefasst in Guengerich, 2001).

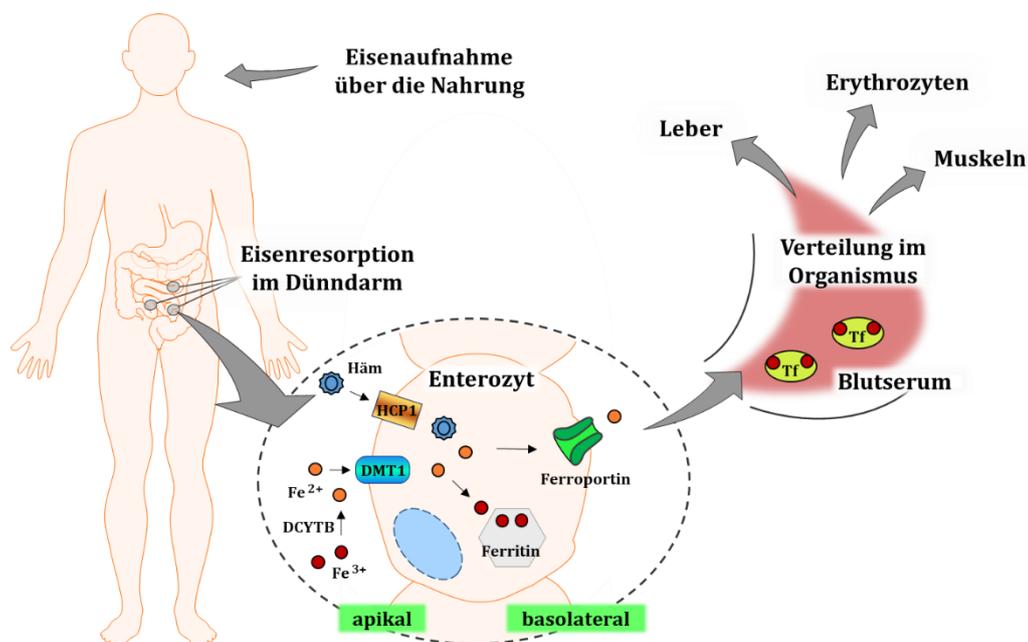


Abbildung 2: Orale Eisenaufnahme sowie Resorption des Metalls im Dünndarm (modifiziert nach Pantopoulos *et al.*, 2012). Die Aufnahme von Eisen in den Organismus erfolgt primär über die tägliche Nahrungszufuhr. Im Dünndarm kommt es anschließend zur Resorption des essentiellen Spurenelements in die Enterozyten. Dies geschieht entweder über die Aufnahme von Häm über HCP1 (*heme carrier protein 1*) oder aber nach Reduktion des Metalls zu Fe²⁺ durch die Ferri-reduktase DCYTB (*duodenal cytochrome B*) und dem Transport über DMT1 (*divalent metal transporter 1*). In den Enterozyten wird das Eisen entweder oxidiert und in Ferritin gespeichert oder es wird über Ferroportin auf der basolateralen Seite der Zelle ins Blut abgegeben. Von dort aus erfolgt der Transport von Fe³⁺-Ionen gebunden an Transferrin zu den Organen des Körpers.

Abbildung 2 fasst den Hauptaufnahmeweg für Eisen in den menschlichen Organismus sowie die anschließende Resorption des Metalls durch die Enterozyten des Dünndarms zusammen. Der Eisenbedarf des Menschen wird dabei in erster Linie durch die Aufnahme von tierischen, aber auch pflanzlichen Lebensmitteln gedeckt. Durchschnittlich nimmt ein Mann 16-18 mg und eine Frau 12 mg Eisen pro Tag mit der Nahrung zu sich (Trumbo *et al.*, 2001). Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) empfiehlt eine tägliche Eisenzufuhr von 10-15 mg. Dieser Wert gilt jedoch nicht für Personen aus Risikogruppen wie z.B. Schwangere oder Kleinkinder (Deutsche Gesellschaft für Ernährung, 2017). An dieser Stelle sei auf die Studie von Volkert *et al.* (2004) zur Energie- und Nährstoffversorgung der älteren Generation (> 65 Jahre) in Deutschland hingewiesen. Die Studie mit insgesamt 4020 Probanden zeigte, dass sowohl Frauen als auch Männer dieser Altersklasse täglich zwischen 12-14 mg Eisen über die Nahrung aufnahmen. Damit lagen sie über dem von der DGE empfohlenen Wert von 10 mg Eisen pro Tag, so dass von einer ausreichenden Eisenversorgung der getesteten Probanden ausgegangen werden kann (Volkert *et al.*, 2004).

Nur ein Bruchteil (1-2 mg) des mit der Nahrung aufgenommenen Eisens wird im Dünndarm tatsächlich resorbiert. Der weitaus größere Teil wird über die Fäzes wieder ausgeschieden. Die Resorptionsrate hängt dabei maßgeblich vom Ursprung des Lebensmittels (tierisch/pflanzlich) sowie den weiteren Nahrungsmittelkomponenten ab. In tierischen Lebensmitteln tritt das Metall primär als Hämeisen in der Oxidationsstufe +2 auf. Dieses wird vom Menschen zu 15-25 % resorbiert. Die Aufnahme in die Enterozyten erfolgt dabei über das Carrier-Protein HCP1 (*heme carrier protein 1*) (zusammengefasst in Przybyszewska und Zekanowska, 2014). Pflanzliche Lebensmittel enthalten Eisen hingegen primär als Nicht-Hämeisen in der Oxidationsstufe +3, was nur zu 5-12 % resorbiert wird. Grund für die stark unterschiedlichen Resorptionsraten ist die jeweilige Oxidationsstufe des Metalls. Nur zweiwertiges Eisen kann von DMT1 (*divalent metal transporter 1*) in die Zelle transportiert werden. Dreiwertiges Eisen aus pflanzlichen Lebensmitteln muss daher zunächst durch die Ferrireduktase DCYTB (*duodenal cytochrome B*) reduziert werden, ehe der Transport ins Zellinnere erfolgen kann. Dies erklärt auch, warum Eisen aus pflanzlichen Lebensmitteln bei gleichzeitiger Aufnahme von z.B. Vitamin C-haltigen Nahrungsmitteln oder Präparaten deutlich besser aufgenommen wird. Im Gegensatz dazu verringert sich die Resorption durch einen hohen Anteil von Ballaststoffen in der Nahrung, da diese Eisen vermehrt binden und es so über die Fäzes mit ausgeschieden wird (zusammengefasst in Beard und Tobin, 2000; Hurrell und Egli, 2010; Reeves *et al.*, 2017). Dies zeigt auch das Ergebnis der *German Vegan Study* (GVS) von Waldmann *et al.* (2004), die den Zusammenhang von Eisenaufnahme und

Eisenstatus von 75 sich vegan ernährenden Frauen unterschiedlichen Alters aus Deutschland analysierte. Obwohl die Probandinnen durchschnittlich 20 mg Eisen pro Tag mit der Nahrung aufnahmen, dies liegt über dem empfohlenen Wert der Deutschen Gesellschaft für Ernährung, wurde bei 40 % der Frauen < 50 Jahre ein Eisenmangel diagnostiziert. Die Wissenschaftler führten dies auf die deutlich geringere Verfügbarkeit des Spurenelements aus den primären Eisenquellen Gemüse, Früchte und Cerealien sowie den darin enthaltenen Ballaststoffen zurück (Waldmann *et al.*, 2004).

Die Resorption im Dünndarm stellt einen der wichtigsten Kontrollpunkte im Eisenhaushalt des Menschen dar. So wird die Aufnahme bei einem Mangel an diesem Spurenelement gesteigert und bei einer ausreichenden Versorgung des Körpers herunterreguliert. Eine Schlüsselfunktion übernimmt hierbei das Protein Heparin. Dieses bindet an den Eisentransporter Ferroportin und initiiert dadurch letztlich dessen lysosomalen Abbau. Kommt es aufgrund einer Mutation im *HFE*-Gen zu einer verringerten Synthese von Heparin, wird Eisen ungehindert im Dünndarm resorbiert und über Ferroportin ins Blut abgegeben. In Folge dessen steigt der Eisengehalt des Körpers signifikant an, was auf lange Sicht zu Organschäden führt und unter dem Begriff der ‚Hämochromatose‘ zusammengefasst wird (zusammengefasst in Bassett, 2001; Pantopoulos *et al.*, 2012). Mittlerweile sind weitere, genetische Faktoren bekannt, die eine Hämochromatose hervorrufen können. Dazu gehören unter anderem Mutationen im *HAMP*- oder *TFR2*-Gen (Camaschella *et al.*, 2000; Merryweather-Clarke *et al.*, 2003).

Auch ein Eisenmangel, bekannt unter dem Krankheitsbild der ‚Anämie‘, hat negative Folgen für den Organismus. Hierbei kommt es zu einem starken Abfall der Hämoglobinkonzentration im Blut. Hämoglobin enthält Eisen als Zentralatom der Hämgruppe, wodurch Sauerstoff effektiv gebunden und im Blut transportiert wird. Der verminderte Sauerstofftransport im Körper äußert sich durch Symptome wie z.B. Schwäche und Abgeschlagenheit (zusammengefasst in Beard und Tobin, 2000; Camaschella, 2017).

2.2.1 Schlüsselproteine zur Regulation der Eisenhomöostase

Die Eisenhomöostase im menschlichen Körper wird durch das komplexe Zusammenspiel einer Reihe von Proteinen aufrechterhalten. Dabei lassen sich die Proteine anhand ihrer jeweiligen Funktion der Aufnahme, dem Transport, der Speicherung oder dem Export von Eisen zuordnen. Eine Reihe weiterer, übergeordneter Proteine koordinieren diese Prozesse (zusammengefasst in Eisenstein, 2000; Hentze *et al.*, 2010).

Abbildung 3 fasst die wichtigsten Vorgänge zur Regulation der Eisenhomöostase und der darin involvierten Proteine auf zellulärer Ebene zusammen. Hierbei handelt es sich um eine stark vereinfachte Darstellung der komplexen Vorgänge.

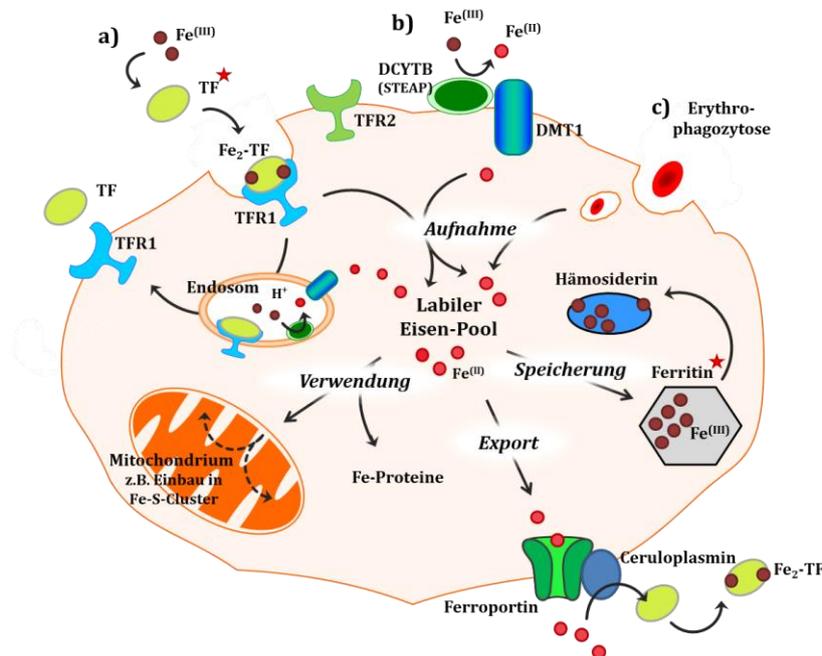


Abbildung 3: Regulation der Eisenhomöostase auf zellulärer Ebene – ein schematischer Überblick (modifiziert nach Hentze *et al.*, 2010). Die Aufnahme von Eisen in die Zelle erfolgt entweder a) als Fe(III) gebunden an Transferrin (TF) durch rezeptorvermittelte Endozytose über den Transferrin-Rezeptor (TFR); b) als Fe(II) nach Reduktion durch DCYTB (*duodenal cytochrome B*) über DMT1 (*divalent metal transporter 1*) oder c) durch Erythrophagozytose. Ein Teil des intrazellulären, labilen Eisen-Pools wird zur Synthese von Fe-Proteinen primär im Mitochondrium verwendet. Überschüssiges Eisen wird entweder als Fe(III) in Ferritin bzw. dessen Abbauprodukt, Hämosiderin, gespeichert oder aber als Fe(II) über Ferroportin wieder aus der Zelle ausgeschleust. Extrazellulär erfolgt die Oxidation von Fe(II) zu Fe(III) durch Ceruloplasmin mit anschließender Übertragung auf TF.

Die Zelle als Grundbaustein eines jeden Organismus verfügt über unterschiedliche Mechanismen der Eisenaufnahme. Dazu gehören unter anderem die Endozytose von Eisen-Transferrin über den Transferrin-Rezeptor, oder die Aufnahme von Eisenionen in der Oxidationsstufe +2 über den zweiwertigen Metall-Transporter DMT1. Nicht zu vergessen ist die Wiederverwendung des Metalls aus zuvor phagozytierten Erythrozyten. Die so in die Zelle aufgenommenen Eisenionen werden unter dem Begriff des ‚labilen Eisen-Pools‘ zusammengefasst und teilweise in Proteine eingebaut (zusammengefasst in Hentze *et al.*, 2010; Silva und Faustino, 2015). Von besonderer Bedeutung sind hierbei die Synthese von Häm und Eisen-Schwefel-Cluster von Proteinen in den Mitochondrien (zusammengefasst in Terwilliger, 1998; Lill, 2009). Überschüssige Ionen werden entweder in der Oxidationsstufe +3 in den Proteinen Ferritin und Hämosiderin gespeichert, oder aber in der Oxidationsstufe +2 wieder aus der Zelle ausgeschleust. Der Export erfolgt

dabei über das in die Membran integrierte Protein Ferroportin (Miyazaki *et al.*, 2002; Donovan *et al.*, 2005; zusammengefasst in Arosio *et al.*, 2009). Der Einbau, die Speicherung und der Export des Metalls verhindern das Auftreten ungebundener Eisenionen in der Zelle. Dies ist aufgrund des hohen Oxidationspotentials dieses Metalls und zum Schutz des Organismus vor oxidativem Stress von besonderer Wichtigkeit. Ein Anstieg des prooxidativen Stresslevels im Körper bewirkt eine Oxidation von Lipiden und eine Schädigung redoxsensitiver Domänen von Proteinen, was meist zum Verlust ihrer spezifischen Funktion führt (zusammengefasst in Hartwig, 2013).

Im Folgenden wird auf die Proteine Transferrin und Ferritin im Detail eingegangen, da sie im Fokus der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Interaktion von Aluminium mit dem Eisenhaushalt standen. Die Proteine sind in Abbildung 3 durch einen Stern markiert.

Serum-Transferrin

Serum-Transferrin (TF) gehört wie Ovotransferrin oder Lactoferrin zu einer Gruppe von Proteinen, die unter dem Begriff der ‚Transferrin-Familie‘ zusammengefasst werden. Es handelt sich um ein einkettiges Protein, bestehend aus 679 Aminosäureresten mit einem Molekulargewicht von etwa 80 kDa. Die übergeordnete Funktion dieses Proteins ist der Transport von Nonhäm-Eisen in der Oxidationsstufe +3 im Blutserum zu den einzelnen Organen des Körpers. Mit einer Serumkonzentration von ca. 35 μM verhindert TF dabei nicht nur das Ausfallen des bei neutralem pH-Wert nahezu unlöslichen Metalls, sondern auch das Auftreten freier Fe^{3+} -Ionen (zusammengefasst in Sun *et al.*, 1999). Die stark redoxaktiven Ionen werden wirksam von der Umgebung abgeschirmt, so dass es nicht zu einer vermehrten Bildung von Hydroxylradikalen im Zuge der Fenton-Reaktion kommen kann (Winterbourn, 1995). Die metallfreie Form des Proteins (apo-TF) bindet entweder ein (Fe_1 -TF) oder maximal zwei Fe^{3+} -Ionen (Fe_2 -TF). Die Aufnahme der Ionen erfolgt dabei über zwei spezifische Metallbindungsstellen, wobei sich eine in der N- und eine in der C-Schleife des Proteins befindet. Strukturell gesehen sind beide Bindungsstellen nahezu identisch, zeigen jedoch feine Unterschiede hinsichtlich ihrer Fähigkeit Fe^{3+} -Ionen aufzunehmen beziehungsweise wieder abzugeben. Die komplexe Bindung der Eisenionen an das Protein erfolgt dabei durch je vier Aminosäurereste (2x Tyr, 1x Asp, 1x His) und einem ‚synergistischen Anion‘. Hierbei handelt es sich in der Regel um Carbonat (zusammengefasst in Legrand *et al.*, 1988; Boffi *et al.*, 2003; Halbrooks *et al.*, 2004). Es wird davon ausgegangen, dass bei einem gesunden Menschen ca. 1/3 der Bindungsstellen von TF im Blut mit Eisen besetzt sind. Dies unterstreicht nochmals die hohe

Pufferkapazität des Systems (zusammengefasst in Gkouvatsos *et al.*, 2012). Im Zuge der Metallbindung geht das Protein von einer offenen (apo-TF) in eine geschlossene Konformation (Fe₂-TF) über (Zhang *et al.*, 2004). Dies ist wichtig, da nur der Eisen-sättigte TF-Komplex an der Zelloberfläche vom Transferrin-Rezeptor (TFR) erkannt und durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden kann (zusammengefasst in Sun *et al.*, 1999; Vincent und Love, 2012). Die rezeptorvermittelte Endozytose gilt hierbei als der Hauptaufnahmeweg von Eisen in Hepatozyten, Retikulozyten sowie weitere Zelltypen. Studien weisen darauf hin, dass Säugetiere über zwei Arten des TFR verfügen, TFR1 und TFR2. Allerdings hat TFR1 eine weitaus größere Bedeutung für den Organismus (Kawabata *et al.*, 1999; zusammengefasst in Aisen, 2004). Nach der Aufnahme des Metall-TF-TFR-Komplexes in die Zelle und dem Absenken des pH-Wertes in den Endosomen wird Eisen aus dem Komplex freigesetzt und nach Reduktion zu Fe²⁺ über DMT1 ins Zellinnere abgegeben. Der Komplex aus apo-TF und TFR wird hingegen wieder zur Zellmembran transportiert und aus der Zelle ausgeschleust. Bei extrazellulärem pH-Wert löst sich apo-TF vom Rezeptor und steht für eine neue Eisenaufnahme zur Verfügung. Dieser Vorgang lässt sich als eine Art „Recyclingprozess“ sowohl von TF als auch TFR beschreiben (Dautry-Varsat *et al.*, 1983; zusammengefasst in Sun *et al.*, 1999).

Der Transport von Eisen durch TF und die anschließende rezeptorvermittelte Endozytose des Metall-TF-TFR-Komplexes werden durch unterschiedliche Faktoren kontrolliert. Dazu gehören zum Beispiel der Sättigungsgrad des Proteins mit Fe³⁺-Ionen bzw. die Regulation der Serumkonzentration von TF sowohl auf Genexpressions- als auch auf Proteinebene. All diese Prozesse tragen zur Aufrechterhaltung der Eisenhomöostase in der Zelle bei (zusammengefasst in Eisenstein, 2000). An dieser Stelle soll auf die Regulation der Expression des für TF codierenden Gens sowie die Translation der mRNA von TF genauer eingegangen werden.

Die Serumkonzentration von TF ist invers mit dem Eisen-Status verknüpft. Liegt ein Eisenmangel im Körper vor, so wird die Transkription des TF-Gens um das 2 bis 3-fache gesteigert. Dies erfolgt primär in der Leber als dem Hauptsyntheseort für TF. Zudem nimmt die Anzahl der TFR an der Zelloberfläche stark zu. Dadurch wird sowohl der Transport als auch die zelluläre Aufnahme der vermehrt aus dem Dünndarm resorbierten Eisenionen sichergestellt (McKnight *et al.*, 1980; zusammengefasst in Eisenstein, 2000). Die Bedeutung dieser regulatorischen Maßnahmen des Organismus zur Vermeidung eines Eisenmangels zeigt sich besonders deutlich, wenn sie nicht funktionieren. So kann es z.B. in Folge einer Inaktivierung des für den TFR codierenden Gens zu einer starken Entwicklungsstörung des Nervensystems beziehungsweise der Erythroide kommen

(zusammengefasst in Ponka und Lok, 1999). An dieser Stelle sei jedoch erwähnt, dass die Aufnahme von TF-gebundenem Eisen auch unabhängig vom TFR erfolgen kann. Dies ist wichtig, da nicht alle Zellen diesen Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren (Gatter *et al.*, 1983). Des Weiteren gibt es Mechanismen, die bei einem Überangebot von Eisen aktiviert werden. So wird z.B. die Translation der mRNA von Tf herunterreguliert, wenn die Eisenversorgung den Bedarf des Organismus übersteigt. Infolgedessen sinkt die Serumkonzentration von TF von 35 auf 10 μM ab (Cox und Adrian, 1993; zusammengefasst in Eisenstein, 2000).

Eisen in der Oxidationsstufe +III weist unter allen bisher untersuchten Metallen die höchste Bindungsaffinität zu TF auf. Trotzdem binden eine Vielzahl weiterer Metalle an das Protein, wie z.B. essentielle Elemente sowie potenziell pharmazeutische oder radio-pharmazeutische Wirkstoffe. Auch toxische Metalle werden durch TF im Blutserum transportiert und auf diese Weise im Körper verteilt. Zahlreiche Studien beschäftigen sich nun mit den Bindungsaffinitäten der Metalle zum Protein sowie den Strukturen der gebildeten TF-Spezies (zusammengefasst in Sun *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2004; Vincent und Love, 2012). Hierbei wurde deutlich, dass die Bindung an TF zwar den Transport des jeweiligen Metalls ermöglicht, aber nicht zwangsläufig zur rezeptorvermittelten Aufnahme des Metall-Protein-Komplexes in die Zelle führt. Ausschlaggebend dafür scheint die spezifische Bindung des mit Metall gesättigten Proteins an den Rezeptor gemäß dem ‚Schlüssel-Schloss-Prinzip‘ zu sein (Sakajiri *et al.*, 2010).

Ferritin

Ferritin gehört zur übergeordneten Gruppe der Ferritine und übernimmt als zelluläres Eisenspeicherprotein eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Eisenhomöostase. Die größten Anteile des Proteins finden sich rein mengenmäßig im Cytosol von Leber-, Milz- und Knochenmarkszellen. Auch in den Mitochondrien wurde mittlerweile eine Form von Ferritin nachgewiesen (zusammengefasst in Harrison und Arosio, 1996; Arosio *et al.*, 2009). Ein weitaus geringerer Anteil des Proteins zirkuliert im Blut und wird als ‚Serum-Ferritin‘ bezeichnet. Hierbei handelt es sich um einen bis heute in der klinischen Diagnostik fest etablierten und vielfach eingesetzten Indikator zur Bestimmung der Eisenversorgung des Organismus. Sowohl ein Mangel als auch eine Überladung des Körpers mit dem Spurenelement kann dadurch festgestellt werden. Da die Serumkonzentration von Ferritin jedoch durch eine Reihe weiterer Faktoren wie z.B. Entzündungsprozessen oder Lebererkrankungen beeinflusst wird, stellt sich die Frage,

inwieweit die gemessenen Werte den tatsächlichen Eisenstatus des Organismus wiedergeben (zusammengefasst in Wang *et al.*, 2010).

Das kugelförmige Protein besteht aus insgesamt 24 Untereinheiten, die sich entweder dem H- oder L-Typ zuordnen lassen. Die Bezeichnungen ‚H‘ und ‚L‘ leiten sich dabei von den Organen Herz (*heart*) und Leber (*liver*) ab, deren Ferritine im Menschen besonders reich an H- beziehungsweise L-Untereinheiten sind. Obwohl die Aminosäuresequenzen beider Untereinheit-Typen in Säugetieren zu circa 50 % übereinstimmen, ergeben sich klare, strukturelle Unterschiede. Dies zeigt sich auch auf funktioneller Ebene. Tragen die L-Untereinheiten primär zur Eisenspeicherkapazität des Proteins bei, ermöglichen die H-Untereinheiten durch ihre katalytische Funktion als Ferroxidase die Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} . Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die anschließende Speicherung des Metalls im Protein. Gleichzeitig trägt es zum antioxidativen Schutzsystem der Zelle bei, da die äußerst reaktiven Fe^{2+} -Ionen in die etwas weniger reaktiven Fe^{3+} -Ionen überführt werden. Das Verhältnis von H- und L-Untereinheiten im Protein ist nicht konstant, sondern abhängig vom Typ und Entwicklungszustand des jeweiligen Gewebes (zusammengefasst in Andrews *et al.*, 1992; Levi *et al.*, 1992; Levi *et al.*, 1994).

Kennzeichnend für Ferritin ist seine hohe Eisenbindungskapazität. Ein Molekül des Proteins kann bis zu 4000 Fe^{3+} -Ionen aufnehmen und in seinem inneren Hohlraum speichern. Tatsächlich liegt die Sättigung des Proteins in den meisten Zellen bei weniger als 40 %, dies entspricht circa 1500 Fe^{3+} -Ionen. Dadurch wird das Auftreten freier, ungebundener Eisenionen in der Zelle effektiv verhindert und trotzdem eine ausreichende Versorgung der Zelle mit diesem essentiellen Spurenelement sichergestellt (zusammengefasst in Harrison und Arosio, 1996; Arosio *et al.*, 2009).

Der zelluläre Ferritin-Gehalt unterliegt analog zu den anderen Schlüsselproteinen des Eisenhaushalts ebenfalls einer starken Kontrolle. Maßgeblichen Einfluss hat dabei das Zusammenspiel aus *iron regulatory proteins* (IRPs) und *iron responsive elements* (IREs) auf der post-transkriptionalen Ebene. Im Fall eines Eisenmangels erfolgt die Bindung von IRPs an ein einzelnes IRE im nicht-translatierten 5' UTR Bereich der Ferritin mRNA. Dies hemmt die Translation infolgedessen die Ferritin-Konzentration in der Zelle sinkt (Dix *et al.*, 1992; Dix *et al.*, 1993; Muckenthaler *et al.*, 1998; zusammengefasst in Eisenstein, 2000).

Analog zu Transferrin ist auch Ferritin in der Lage, weitere Metalle, z.B. Cadmium, Zink oder Aluminium, zu binden (Joshi *et al.*, 1989; Sakamoto *et al.*, 2004; Spada *et al.*, 2009).

2.2.2 Einfluss von Aluminium auf den Eisenhaushalt

Eine Vielzahl von Studien beschäftigt sich mit der Frage nach dem grundlegenden Mechanismus der toxischen Wirkung von Aluminium. In diesem Zusammenhang vermehrt diskutiert wird der Einfluss des Metalls auf eine Reihe von Proteinen des Eisenhaushalts und eine dadurch bedingte Störung der Eisenhomöostase (Ward *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2007; Mannello *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Richtungsweisend hierfür war die Entdeckung, dass Aluminium im Blutserum primär an Transferrin bindet und auf diese Weise im Körper transportiert wird (Tomimatsu und Donovan, 1976a; Trapp, 1983).

Die *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur Interaktion von Aluminium mit Transferrin, dem Transferrin-Rezeptor, Ferritin oder aber dem übergeordneten Netzwerk aus Regulatorproteinen (IRPs) kommen jedoch nicht zu einem einheitlichen Ergebnis. Die Wissenschaftler sind sich bislang uneins darüber, an welcher Stelle Aluminium in die Eisenhomöostase eingreift. Ebenfalls kontrovers diskutiert wird die Frage, inwieweit Aluminium die Ursache oder Begleiterscheinung für eine veränderte Eisenhomöostase in einer Reihe von Krankheiten ist (Dedman *et al.*, 1992; Han *et al.*, 1999; Ward *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2012; De Sole *et al.*, 2013).

Um die Diskrepanz des derzeitigen Stands der Wissenschaft zu verdeutlichen, werden im Folgenden ausgewählte Studien zur Bindung von Aluminium an Transferrin und die anschließende Wechselwirkung des Metall-Transferrin-Komplexes mit dem Rezeptor vorgestellt.

Ein Molekül Transferrin kann bis zu zwei Al^{3+} -Ionen in den für Eisen spezifischen Bindungsstellen der C- und N-Schleife des Proteins aufnehmen. Die Bindungsaffinität von Aluminium zum Protein ist dabei deutlich geringer als diejenige von Eisen zum Protein. Dies zeigt sich anhand der jeweiligen Bindungskonstanten mit $\log K_1$ 13,5 und $\log K_2$ 12,5 für Al^{3+} beziehungsweise $\log K_1$ 21,4 und $\log K_2$ 20,3 für Fe^{3+} (Aisen *et al.*, 1978; Harris und Sheldon, 1990). Durch die Bindung der Metallionen kommt es zu einer strukturellen Veränderung des Proteins ausgehend von einer offenen in eine geschlossene Konformation. Wie entscheidend dabei der Radius des jeweiligen Metalls ist, zeigt die Studie von Zhang *et al.* (2004). Anhand ihrer Untersuchungen zur Bindung von Indium und Bismut an Transferrin entwickelten die Wissenschaftler ein Modell, das den Einfluss des Metallradius auf die Konformation der jeweiligen Bindungsstelle schematisch darstellt. Ihrer Meinung nach erlaubt ein kleiner Radius den Übergang des Proteins von einer offenen in eine geschlossene Konformation, wohingegen die Bindungstasche des Proteins durch Metallionen mit einem großen Radius in der offenen Konformation

verbleibt (Zhang *et al.*, 2004). Dies ist ein wichtiger Aspekt im Hinblick auf die rezeptorvermittelte Aufnahme des Metall-Transferrin-Komplexes in die Zelle, die eine bestimmte Proteinkonformation von Transferrin für die Interaktion mit dem Transferrin-Rezeptor auf der Zelloberfläche voraussetzt. Für Eisen ist bekannt, dass es in Form von $\text{Fe}_2\text{-TF}$ durch eine rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen wird. Eisen weist dabei einen Radius von $0,65 \text{ \AA}$ für Fe^{3+} auf. Der Radius von Aluminium liegt im Vergleich dazu bei $0,54 \text{ \AA}$ für Al^{3+} (zusammengefasst in Sun *et al.*, 1999). Nach dem Modell von Zhang *et al.* müsste Transferrin bei der Bindung von Al^{3+} -Ionen demnach in eine geschlossene Konformation übergehen. Dies wäre die notwendige Voraussetzung für eine Interaktion von $\text{Al}_2\text{-TF}$ mit dem Transferrin-Rezeptor.

Die Bindung von $\text{Al}_2\text{-TF}$ an den Rezeptor ist jedoch einer der am stärksten diskutierten Aspekte, wenn es um die Wechselwirkung von Aluminium mit Schlüsselproteinen des Eisenhaushalts geht. Galt es lange Zeit als gesichert, dass $\text{Al}_2\text{-TF}$ an den Rezeptor bindet und anschließend durch Endozytose in die Zelle aufgenommen wird (McGregor *et al.*, 1990; Cochran *et al.*, 1991; Kasai *et al.*, 1991), bezweifeln neuere Studien diesen Mechanismus (Hémadi *et al.*, 2003; Sakajiri *et al.*, 2010; zusammengefasst in Chahine *et al.*, 2012).

Für ihre Untersuchungen zur Interaktion von $\text{Al}_2\text{-TF}$ mit TFR1 inkubierten Hémadi *et al.* (2003) zunächst beide Proteinspezies miteinander, um anschließend eine Größenausschlusschromatographie mit Messung der Absorption der einzelnen Probeneluate bei 280 nm durchzuführen. $\text{Al}_2\text{-TF}$ und TFR1 wurden dabei in zwei unterschiedlichen Eluaten detektiert, was die Wissenschaftler auf eine fehlende Wechselwirkung der beiden Spezies untereinander zurückführten.

Die Studie von Sakajiri *et al.* (2010) zur Untersuchung der Bindung von $\text{Al}_2\text{-TF}$ an TFR1 beruht auf der Analyse der physikochemischen Eigenschaften von $\text{Al}_2\text{-TF}$ im direkten Vergleich zu den Eigenschaften von apo-TF und $\text{Fe}_2\text{-TF}$. Untersucht wurden dabei der hydrodynamische Radius sowie das Zeta-Potential der einzelnen TF-Spezies. Die Wissenschaftler stellten fest, dass der hydrodynamische Radius von $\text{Al}_2\text{-TF}$ mit $38,8 \text{ \AA}$ zwischen den Radien von apo-TF ($42,6 \text{ \AA}$) und $\text{Fe}_2\text{-TF}$ ($37,2 \text{ \AA}$) liegt. Die Konformation des Proteins liegt demnach zwischen der offenen Form der metallfreien apo-Form und der geschlossenen Konformation von $\text{Fe}_2\text{-TF}$. Des Weiteren zeigte die Messung des Zeta-Potentials, dass $\text{Al}_2\text{-TF}$ mit $-11,3 \text{ mV}$ eher dem Potential von apo-TF mit $-11,2 \text{ mV}$ anstatt dem von $\text{Fe}_2\text{-TF}$ mit $-11,9 \text{ mV}$ entspricht. Dies bedeutet, dass die Oberfläche von $\text{Al}_2\text{-TF}$ weniger geladen ist als die Oberfläche von $\text{Fe}_2\text{-TF}$. Aufgrund der festgestellten Unterschiede der physikochemischen Eigenschaften von $\text{Al}_2\text{-TF}$ zu $\text{Fe}_2\text{-TF}$ folgerten die

Wissenschaftler, dass eine Interaktion von $\text{Al}_2\text{-TF}$ mit dem Rezeptor sowie eine rezeptorvermittelte Aufnahme von $\text{Al}_2\text{-TF}$ nicht möglich sei.

Unter Berücksichtigung der Studienergebnisse von Hémadi *et al.* beziehungsweise Sakajiri *et al.* sei an dieser Stelle auf die Zellkultur-Studien von Pérez *et al.* (1999) und McGregor *et al.* (1990) hingewiesen, anhand derer die stark kontroverse Datenlage sichtbar wird.

Pérez *et al.* (1999) untersuchten den Einfluss von Aluminium auf die Eisenhomöostase in humanen Erythroleukämie K562 Zellen. Die Zellen wurden dafür zunächst differenziert, so dass sie zur Hämoglobin-Synthese befähigt waren, und anschließend mit ^{125}I -markiertem $\text{Al}_2\text{-TF}$ inkubiert. Infolgedessen detektierten die Wissenschaftler eine Zunahme an TF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche bei einem gleichbleibenden Eisengehalt der Zellen. Dieses Phänomen erklärten Pérez *et al.* anhand der ebenfalls bestimmten Dissoziationskonstanten für $\text{Fe}_2\text{-TF}$ bzw. $\text{Al}_2\text{-TF}$ an TFR, die vergleichbare Werte zeigten. Folglich schienen die Bindungsaffinitäten beider TF-Spezies zum Rezeptor miteinander vergleichbar. Die Zunahme an TF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche deuteten die Wissenschaftler als Reaktion der Zelle zur Aufrechterhaltung der intrazellulären Eisenkonzentration, sprich Eisenhomöostase. Weniger die Eisenaufnahme in die Zelle, sondern vielmehr der Eisenmetabolismus in der Zelle schien durch die Gegenwart von Aluminium gestört zu werden.

Im Rahmen der Untersuchungen von McGregor *et al.* (1990) wurden ebenfalls humane Erythroleukämie K562 Zellen mit $\text{Al}_2\text{-TF}$ behandelt und der Einfluss des Metalls auf die Eisenhomöostase untersucht. Detektiert wurde in diesem Zusammenhang sowohl eine Hemmung der Eisenaufnahme in die Zelle um 80 % sowie eine Abnahme der Anzahl an TFR an der Zelloberfläche um 40 %. Eine Konkurrenz von $\text{Al}_2\text{-TF}$ mit $\text{Fe}_2\text{-TF}$ um die Bindung an TFR wurde nicht festgestellt. Die Wissenschaftler interpretierten das Ergebnis dahingehend, dass die Gegenwart von Aluminium zu einer Störung der intrazellulären Freisetzung von Eisen aus Transferrin bewirkte.

Möglicherweise lassen sich die gegensätzlichen Ergebnisse von Pérez *et al.* und McGregor *et al.* auf die unterschiedlichen Vorgehensweisen der Wissenschaftler zum Beispiel im Hinblick auf die Differenzierung oder Behandlung der Zellen zurückführen.

Abschließend sei die *in vivo* Studie von Ward *et al.* (2001) an männlichen Wistar-Ratten erwähnt. Die Tiere wurden für acht Wochen mit Aluminiumgluconat behandelt, was zu einer deutlichen Verschiebung der Eisenhomöostase führte. Dies wurde anhand der simultanen Zunahme des Aluminium- und Eisengehaltes unterschiedlicher Gewebe wie Leber, Herz, Milz, Niere und des Gehirns diagnostiziert. Obwohl der Eisengehalt stieg,

nahm die Aktivität einer Reihe zellprotektiver Enzyme mit Ausnahme der Superoxiddismutase im frontalen Cortex nicht zu. Dieses Ergebnis veranlasste die Wissenschaftler zu der Hypothese, dass Aluminium zu einer Stabilisierung des übergeordneten Regulatorproteins IRP-2 führt, was wiederum die verstärkte Synthese von TFR initiiert, jedoch die Synthese von Ferritin hemmt (Ward *et al.*, 2001).

Die aktuelle Datenlage macht deutlich, wie notwendig grundlegende Studien zur Bindung von Aluminium an Transferrin inklusive der strukturellen Aspekte der gebildeten Metall-Transferrin-Komplexe sind. Dies bezieht sich vor allem auf die potentielle Bindung des Komplexes an den Transferrin-Rezeptor. Des Weiteren gilt es zu klären, inwieweit die Konzentration anderer Schlüsselproteine des Eisenhaushalts, zum Beispiel Ferritin, durch die Gegenwart des Leichtmetalls beeinflusst werden.

3 Fragestellung

Aluminium ist das dritthäufigste Element in der Erdkruste und daher auf natürliche Weise in der Umwelt allgegenwärtig. Daneben gehört es aufgrund seiner vielseitigen industriellen Anwendungen zu einem festen Bestandteil des alltäglichen Lebens. Die menschliche Exposition gegenüber diesem Leichtmetall erfolgt primär über das Trinkwasser und die Nahrung. Auch Kosmetika und Medizinprodukte sowie im Besonderen die Situation am Arbeitsplatz können zu einer erhöhten inneren Belastung des Organismus mit dem Metall beitragen. Aluminium wirkt dabei in sehr hohen Konzentrationen neurotoxisch. Weitere negative Auswirkungen auf die Gesundheit des Menschen werden zum Teil kontrovers diskutiert. Darunter fällt auch die Frage nach dem genotoxischen, kanzerogenen Potential des Metalls, welches möglicherweise in Zusammenhang mit einer gestörten Eisenhomöostase steht. Obwohl eine Reihe von Studien die Interaktion von Aluminium mit Schlüsselproteinen des Eisenhaushalts bestätigen (Kim *et al.*, 2007; Mannello *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011), sind das Ausmaß und die Bedeutung dieser Wechselwirkungen zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausreichend erforscht.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage, inwieweit Aluminium die genomische Stabilität gefährdet und ob dies möglicherweise auf eine Interaktion des Metalls mit Proteinen des Eisenhaushalts zurückgeführt werden kann.

Um diese Frage zu beantworten, sind zunächst *in vitro* Versuche mit der humanen Alveolarkarzinomzelllinie A549 in Anlehnung an eine mögliche inhalative Exposition des Menschen am Arbeitsplatz geplant. Dabei soll die konzentrationsabhängige Wirkung von Aluminium in Form der lipophilen Modellsubstanz Aluminiumacetylacetonat auf die Zellviabilität, die Zellzyklusverteilung und die Zelltodmechanismen untersucht werden. Mehrere Studien geben Grund zur Annahme, dass Aluminium die DNA sowie die DNA-Reparatur negativ beeinflusst (Lankoff *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2007; Celik *et al.*, 2012). Aufgrund dessen sind im Anschluss gezielte Untersuchungen zur Induktion sowie zur Hemmung der Reparatur von DNA-Einzelstrang- sowie Doppelstrangbrüchen durch das Metall geplant. Als Methoden bieten sich hierfür die Alkalische Entwindung, die Pulsfeldgelelektrophorese oder die gezielte Untersuchung von DNA-Reparaturproteinen wie z.B. γ H2AX mithilfe der Immunfluoreszenzspektroskopie an. Für die Schädigung der zellulären DNA sollen Wasserstoffperoxid oder Röntgenstrahlung eingesetzt werden. Des Weiteren gilt es, den Einfluss der Verbindung auf die Expression ausgewählter Gene, die in Zusammenhang mit der genomischen Stabilität der Zelle stehen, näher zu analysieren.

Kommt es im Zuge der Behandlung zu einer Veränderung der Genexpression, kann dies ein Hinweis auf den toxischen Wirkmechanismus der Substanz sein.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sind vertiefende Untersuchungen zur Wechselwirkung von Aluminium mit Schlüsselproteinen des Eisenhaushalts angedacht. Im Fokus sollen dabei das Eisentransportprotein Transferrin sowie das Eisenspeicherprotein Ferritin stehen.

Aluminium bindet im Blutserum des menschlichen Organismus zu 80 % an Transferrin und wird auf diese Weise im Körper transportiert. Lange Zeit kontrovers diskutiert wurde dabei die Frage, ob Aluminium gebunden an Transferrin mittels rezeptorvermittelter Endozytose in die Zellen aufgenommen wird. Aktuelle Studien verneinen diesen Weg der zellulären Aufnahme von Aluminium, da sie keine Wechselwirkung zwischen Aluminium-Transferrin und dem Transferrin-Rezeptor feststellten (Hémadi *et al.*, 2003; Sakajiri *et al.*, 2010). Als Grund wird die Struktur des Metall-Protein-Komplexes angegeben, wobei hier experimentelle Daten meist fehlen. Im Rahmen dieser Arbeit sind deshalb vertiefende Untersuchungen zum grundlegenden Bindungsmechanismus zwischen dem Leichtmetall und dem Transportprotein während meines Forschungsaufenthaltes in Kanada bei Prof. Dr. Martin Stillman an der *University of Western Ontario* geplant. Die Kombination aus hochauflösender ESI Massenspektrometrie und der spektroskopischen Methode des Circular dichroismus erscheint dabei besonders vielversprechend, um Informationen zu den jeweiligen Bindungsverhältnissen im Protein und der jeweiligen strukturellen Eigenschaften des Metall-Protein-Komplexes zu erhalten. In diesem Zusammenhang soll ebenfalls die Bindung von Eisen an Transferrin untersucht werden, da hierdurch mögliche Unterschiede beider Metalle festgehalten werden können. Des Weiteren kann dadurch die Bildung einer möglichen Hybridform aus beiden Metallen näher analysiert werden.

Abschließend sind Untersuchungen zum Einfluss von Aluminium auf das Eisenspeicherprotein Ferritin in A549-Zellen geplant. Dies soll klären, ob der intrazelluläre Ferritin-Gehalt als Indikator für die zelluläre Aufnahme von Aluminium herangezogen werden kann.

4 Material und Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Kits sind dem Anhang zu entnehmen. Ebenfalls tabellarisch aufgelistet sind die verwendeten Antikörper sowie Primer.

4.1 Zellkultur

4.1.1 Verwendete Zelllinie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen an der humanen Adenokarzinomzelllinie A549 aus dem Alveolarepithel durchgeführt. Es handelt sich dabei um adhärenz wachsende Zellen, die Monolayer ausbilden. Informationen zum Ursprung der verwendeten Zelllinie sind dem molekulargenetischen Gutachten zur Zell-Linien-Authentifizierung zu entnehmen (siehe 8.8.1).

4.1.2 Zellkultivierung

Die Kultivierung, Behandlung sowie Untersuchung der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank der Stufe 2 mit vertikaler Luftströmung (*Laminar Air Flow Box*). Dabei wurden die Vorgaben zum sterilen Arbeiten mit Zellkulturen konsequent eingehalten. Die Zellen wurden bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 100 % und einem CO₂-Gehalt von 5 % im Brutschrank gezüchtet. Verwendet wurde das Kulturmedium *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FKS) und 100 U/mL Penicillin sowie 100 µg/mL Streptomycin. Zur Aufrechterhaltung einer gleichbleibend hohen Qualität wurden die A549-Zellen alle 2-3 Tage subkultiviert und nur die Passagen 14-30 für die Versuche eingesetzt. Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte in 1 mL Einfriermedium bestehend aus 90 % FKS und 10 % DMSO bei -196 °C in flüssigem Stickstoff. Im Zuge der Subkultivierung wurde das Medium von den Zellen abgenommen, Reste des Mediums durch das Waschen mit PBS entfernt und die Zellen für 30 s mit Trypsinlösung (0,25 % in PBS) bei RT versetzt. Das Trypsin wurde anschließend abgenommen, die Zellen zunächst für 2-3 min im Brutschrank inkubiert und schließlich die abgelösten Zellen in frischem Medium aufgenommen. Das im Medium enthaltene FKS inaktivierte dabei das Trypsin, wodurch ein weiterer Verdau der Zellen unterbunden wurde. Alle verwendeten Lösungen wurden vor ihrer Verwendung auf 37 °C temperiert. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mittels *Casy® Cell Counter* jeweils in einer Dreifachbestimmung im Bereich 12,6 - 40,0 µm. Anschließend wurde eine definierte Anzahl der A549-Zellen in ein neues Kulturgefäß mit frischem Medium überführt und kultiviert.

4.1.3 Behandlung der A549-Zellen

4.1.3.1 Bestimmung der Löslichkeit von Aluminium in DMEM

Die geringe Löslichkeit von Aluminium bei neutralem pH-Wert ist ein wichtiges Kriterium bei der Untersuchung der Wirkung des Metalls auf zellulärer Ebene. Daher wurde vor einer Behandlung der A549-Zellen die Löslichkeit von Aluminium in den Verbindungen Aluminiumchlorid (AlCl_3), Aluminiumsulfat ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$), Aluminiumcitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{AlO}_7$) und Aluminiumacetylacetonat ($\text{Al}(\text{acac})_3$) in neutralem Zellkulturmedium untersucht.

Versuchsansatz und Probenaufarbeitung

Es wurden Stammlösungen von AlCl_3 (0,1 M), $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (100 mg/mL) und $\text{C}_6\text{H}_5\text{AlO}_7$ (0,1 M) in bidest. Wasser sowie von $\text{Al}(\text{acac})_3$ (0,1 M) in Dimethylsulfoxid (DMSO) angesetzt. Ausgehend davon wurden Verdünnungen jeder einzelnen Verbindung in DMEM hergestellt. Die Konzentrationen waren dabei wie folgt: AlCl_3 , 0,1-1,0 mM; $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, 50-150 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; $\text{C}_6\text{H}_5\text{AlO}_7$, 0,1-1,0 mM; $\text{Al}(\text{acac})_3$, 50-150 μM . Anschließend wurden von jeder Verdünnung je 5 mL in eine Zellkulturschale (\varnothing 60 mm) überführt und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Dies erfolgte für jede Probe in einer Doppelbestimmung. Nach Ablauf der Inkubation wurde das jeweilige Medium in der Platte resuspendiert, je 1,5 mL in ein Eppendorfgefäß überführt und zentrifugiert (16.000 rcf, 60 min, RT). Von jeder Probe wurden 1 mL des Überstands entnommen und für die ICP-MS Messung mit 1 %-iger HNO_3 (suprapur, s.p.) 1:10 beziehungsweise 1:50 verdünnt. Kontrollen mit reinem Medium bzw. eine DMSO-Kontrolle (0,2 % in DMSO) wurden ebenfalls mitgeführt.

Für die anschließende Probenmessung wurden zunächst je 25 μL eines internen Standards (Indium und Beryllium je 1 ppm in 1 %-iger HNO_3 s.p.) pro Messröhrchen vorgelegt. Der interne Standard diene als Bezugspunkt zur Interpolation der einzelnen Probensignale. Anschließend wurden je 500 μL Probe und 2000 μL 1 %-ige HNO_3 s.p. hinzugefügt, das Messröhrchen mit Parafilm verschlossen und alles gut gemischt. Ebenfalls vorbereitet wurden mehrere Waschlösungen (je 25 μL interner Standard in 2500 μL 1 %-ige HNO_3 s.p.) sowie externe Aluminium-Standards (je 25 μL interner Standard, 2500 μL Al-Standard 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ in 1 %-iger HNO_3 s.p.). Sowohl die Probenvorbereitung als auch die anschließende Messung erfolgten in einem Reinraum.

Probendetektion und Auswertung

Die Detektion der Proben erfolgte mittels ICP MS XSeriesII mit CCT (*inductively coupled plasma mass spectrometry* mit Kollisionszellentechnologie) unter folgenden Bedingungen: Plasmaleistung, 1400 W; Gasflüsse, 13/0,69/0,89 L/min; Kollisionsgas, Helium (92 %)/

Wasserstoff (8 %) der Reinheit 5.0. Die Trennung der Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) erfolgte durch einen Quadrupol-Massenanalysator. Ausgehend von einem klassifizierten Aluminiumstandard (10 mg/L) wurden zunächst Kalibriestandards mit den Konzentrationen 0 $\mu\text{g/L}$, 10 $\mu\text{g/L}$, 25 $\mu\text{g/L}$, 50 $\mu\text{g/L}$, 100 $\mu\text{g/L}$, 250 $\mu\text{g/L}$, 500 $\mu\text{g/L}$ und 1000 $\mu\text{g/L}$ Aluminium in 1 %-iger HNO_3 s.p. angesetzt und gemessen. Vor der Probenmessung wurde ein Kontrollzyklus bestehend aus Waschlösung, externem Aluminium-Standard und erneuter Waschlösung aufgenommen. Dieser Zyklus wurde nach 10-12 Probenmessungen zur Kontrolle der Messergebnisse wiederholt. Die Proben wurden per Autosampler in das Gerät appliziert und dreimal gemessen. Zur Probendetektion wurde die Software Plasma Lab 2.5.3 verwendet und die anschließende Auswertung erfolgte in Excel.

4.1.3.2 Inkubation mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ und Hacac

Inkubation mit $\text{Al}(\text{acac})_3$

Für die Inkubation der A549-Zellen wurden ausgehend von einer $\text{Al}(\text{acac})_3$ -Stammlösung der Konzentration 100 mM Verdünnungen im Konzentrationsbereich 5-75 mM angesetzt. Dies erfolgte jeweils am Tag der Inkubation in Volumina $\leq 100 \mu\text{L}$. Aufgrund des lipophilen Charakters der Verbindung wurde sowohl für die Stammlösung als auch für die Verdünnungen das organische Lösemittel DMSO verwendet. Die Herstellung der Inkubationsmedien mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ in Konzentrationen 10-200 μM in DMEM erfolgte anschließend in 15 mL-Röhrchen unter Verwendung der Verdünnungen beziehungsweise der Stammlösung. Dabei lag der Volumenanteil von DMSO im Medium bei jeweils 0,2 %. Um einen möglichen Einfluss des Lösemittels in dieser Konzentration auf die Zellen ausschließen zu können, wurde bei jeder Analyse eine DMSO-Kontrolle (0,2 % v/v in DMEM) als Referenz mitgeführt. Die Inkubationsmedien wurden vor der Behandlung der Zellen durchmischt und im Brutschrank auf 37 °C temperiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte jeweils in der logarithmischen Wachstumsphase für insgesamt 24 h im Brutschrank unter optimalen Wachstumsbedingungen. Im Anschluss wurde das Inkubationsmedium von den Zellen abgenommen, evtl. eine zusätzliche Bestrahlung der Zellen mit anschließender Nachinkubation in frischem DMEM vorgenommen, und die Zellproben entsprechend der jeweiligen Methode aufgearbeitet.

Inkubation mit Hacac

Im Rahmen der Analysen zu $\text{Al}(\text{acac})_3$ wurde auch die Wirkung des Liganden Acetylaceton (Hacac) separat untersucht, um falsch positive Aussagen bezüglich der Wirkung des Metalls zu vermeiden. Hierfür wurden ausgehend von einer wässrigen Hacac-

Stammlösung der Konzentration 100 mM Inkubationsmedien der Konzentrationen 30-600 μM direkt in DMEM angesetzt. Die Festlegung dieses Konzentrationsbereichs erfolgte anhand der für die Inkubation der Zellen eingesetzten Konzentrationen an $\text{Al}(\text{acac})_3$ unter Berücksichtigung der Dreifachkomplexierung des Metalls mit dem Liganden. Die Inkubation der Zellen mit Hacac erfolgte gemäß den Vorgaben zu $\text{Al}(\text{acac})_3$. Als Referenz diente dabei eine unbehandelte Kontrolle.

4.1.3.3 Bestrahlung mittels Röntgenröhre

Die Bestrahlung der A549-Zellen erfolgte mit dem Röntgengerät Cell-Rad von Faxitron bei einer Spannung von 140 kV und einer Stromstärke von 4,5 mA. Je nach Methode wurden die Zellen zur Erzeugung von DNA-Doppelstrangbrüchen mit 1 Gy (z.B. IF) bzw. 80 Gy (PFGE) bestrahlt und für 2 oder 8 h in frischem Medium nachinkubiert.

4.1.4 Zytotoxizitätsuntersuchungen in A549-Zellen

Die zytotoxische Wirkung von Aluminium im Komplex mit Acetylacetonat wurde anhand der Parameter Zellviabilität (Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit) und metabolischer Aktivität (zellulärer ATP-Level) bestimmt. Diese Untersuchungen dienten der Bestimmung eines geeigneten Konzentrationsbereichs für die Behandlung der A549-Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ während der weiteren Analysen.

4.1.4.1 Zellzahlbestimmung und Koloniebildungsfähigkeit

Es wurden je $0,35 \times 10^6$ A549-Zellen in 5 mL DMEM pro Zellkulturschale (\varnothing 60 mm) ausgestreut, für 24 h kultiviert und anschließend mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ (10-150 μM) oder Hacac (450 μM) 24 h inkubiert (siehe 4.1.3.2). Der Ansatz erfolgte dabei jeweils in einer Doppelbestimmung. Anschließend wurden die Zellen abtrypsiniert und die Zellzahl der jeweiligen Probe mittels Casy® *Cell Counter* bestimmt (siehe 4.1.2). Alternativ wurden die Zellen vor der Zellzahlbestimmung zunächst mit 1 Gy bestrahlt und für 8 h in frischem DMEM nachinkubiert. Für die Untersuchung der Koloniebildungsfähigkeit (CFA) wurden je Probe 300 Zellen in eine Zellkulturschale (\varnothing 60 mm) mit 5 mL frischem DMEM überführt und für 10 Tage kultiviert. Dies erfolgte jeweils in einer Dreifachbestimmung. Im Anschluss wurden die Zellkolonien mit kaltem PBS gewaschen, durch 96 %-ige, kalte Ethanol-Lösung (5 min) auf der Oberfläche der Kulturschale fixiert und durch Giemsa-Färbelösung (1:20) innerhalb von 2 h angefärbt. Die Auszählung der Kolonien erfolgte mittels *Colony Counter BZG-300*.

4.1.4.2 ATP-Assay

Der ATP-Gehalt der A549-Zellen wurde mittels *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* der Firma Promega nach den Herstellervorgaben bestimmt. Der Assay beruht auf der katalytischen Umsetzung von Luziferin zu Oxyluziferin durch das Enzym Luziferase in Gegenwart von ATP, O₂ und Mg²⁺. Dabei kommt es zu einer Freisetzung von Photonen, die proportional zum ATP-Gehalt der Probe ist. Die Messung des Lumineszenz-Signals informiert je nach Versuchsansatz über die Viabilität beziehungsweise die metabolische Aktivität der Zellen.

Bestimmung der Zellviabilität

Je 10⁴ Zellen in 200 µL DMEM wurden pro Kavität einer 96-Loch-Platte ausgestreut und für 24 h kultiviert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit je 200 µL Al(acac)₃ (50-200 µM) beziehungsweise Hacac (450-600 µM) in einer Dreifachbestimmung. Je nach Versuchsansatz wurden die Zellen nach der Inkubation zusätzlich mit 1 Gy bestrahlt und für 8 h nachinkubiert. Anschließend wurde das Medium aus den Kavitäten entfernt, jeweils 100 µL frisches DMEM pro Kavität pipettiert und die Zellen innerhalb von 30 min im Dunkeln auf RT temperiert. Zu jeder Probe wurden 100 µL *CellTiterGlo*-Reagenz (RT) hinzugefügt und die 96-Well-Platte für 2 min leicht geschwenkt (100 U/min). Nach 20 min erfolgte die Detektion der Lumineszenz am TECAN Infinite® M200 Pro bei einer Wellenlänge von 562 nm.

Bestimmung der metabolischen Aktivität

Für die Bestimmung der metabolischen Aktivität wurden je 0,35 x 10⁶ A549-Zellen in 5 mL DMEM pro Zellkulturschale (Ø 60 mm) ausgestreut, 24 h im Brutschrank kultiviert und anschließend mit Al(acac)₃ (10-150 µM) oder Hacac (450 µM) für 24 h inkubiert (siehe 4.1.3.2). Der Ansatz der Proben erfolgte dabei jeweils in einer Doppelbestimmung. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS gewaschen, durch Trypsin (0,25 %) von der Kulturschale abgelöst und die Zellzahl jeder Probe mittels Casy® *Cell Counter* bestimmt (siehe 4.1.2). Teilweise wurden die Proben zuvor noch mit 1 Gy bestrahlt und für 8 h in frischem Medium nachinkubiert. Von jeder Probe wurden 2,5 x 10⁵ Zellen in ein Eppendorfgefäß überführt, zentrifugiert (250 g, 5 min, RT) und das erhaltene Zellpellet in 500 µL DMEM aufgenommen. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 100 µL mit insgesamt 50.000 Zellen pro Kavität einer 96-Loch-Platte überführt und mit je 100 µL *CellTiterGlo*-Reagenz (RT) versetzt. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Proben wurden unter Schwenken der 96-Loch-Platte (100 U/min, 2 min) durchmischt und

nach 20 min die Lumineszenz der Proben am TECAN Infinite® M200 Pro bei einer Wellenlänge von 562 nm detektiert.

Die Viabilitätsuntersuchungen mittels ATP-Assay erfolgten teilweise in Zusammenarbeit mit Frau Ellen Ahlswede im Rahmen ihrer Masterarbeit „Untersuchung auf Induktion von Mikrokernen durch Metallverbindungen“. Die Untersuchungen zur metabolischen Aktivität sowie ergänzende Untersuchungen zur Viabilität wurden zum Teil in Zusammenarbeit mit Frau Stefanie Beck im Rahmen ihrer Masterarbeit „Einfluss von Aluminiumacetylacetonat auf den Zellzyklus und die Apoptose in A549-Zellen“ durchgeführt.

4.2 Untersuchung des Zellzyklus und der Zelltodmechanismen

Die Untersuchungen zum Einfluss von $\text{Al}(\text{acac})_3$ auf den Zellzyklus beziehungsweise die Zelltodmechanismen in A549-Zellen erfolgten am Durchflusszytometer. Dafür wurden die Zellen zunächst mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen markiert und anschließend durch das FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) einzelnen Populationen zugeordnet.

Zellzykluskinetik

Die kinetischen Untersuchungen zum Zellzyklus erfolgten unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Dieser interkaliert bevorzugt in die AT-reichen Regionen der DNA und informiert anhand dessen über den DNA-Gehalt, sprich die Zellzyklusphase der jeweiligen Zelle.

Versuchsansatz

Es wurden je $0,35 \times 10^6$ A549-Zellen in 5 mL DMEM pro Zellkulturschale (\emptyset 60 mm) ausgestreut, für 24 h im Brutschrank kultiviert und im Anschluss daran für 24 h mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ (50-150 μM) beziehungsweise Hacac (450 μM) inkubiert (beschrieben unter 4.1.3.2). Der Probenansatz erfolgte jeweils in einer Doppelbestimmung. Anschließend wurde das Medium aus den Schalen entfernt, die Zellen für die Zellzyklusuntersuchung aufgearbeitet oder teilweise mit 1 Gy bestrahlt und anschließend in frischem Medium für 4-24 h nachinkubiert. Im Zuge der Aufarbeitung wurde das Medium von den Zellen abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsinlösung (0,25 %) abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in je 3 mL PBS/FKS (10 %) aufgenommen, die Zellsuspension in ein 15 mL Röhrchen überführt und zentrifugiert (1300 rpm, 4 min, 4 °C). Der Probenüberstand wurde verworfen und das Zellpellet mit je 1 mL PBS in ein Messröhrchen überführt. Nach der tropfenweisen Zugabe von insgesamt 3 mL eiskaltem

Ethanol (96 %) pro Probe auf dem Vortex wurden die Proben bei -20 °C für maximal 1 Woche gelagert.

Probenaufarbeitung und Detektion

Für die Zellzyklusuntersuchung wurden die mit Ethanol versetzten Proben zunächst zentrifugiert (1300 rpm, 4 min, 4 °C), die Überstände verworfen und je Probe 400 µL DAPI-Färbelösung hinzugefügt. Um ein Ausbleichen des Farbstoffs zu verhindern, wurde künstliches Licht vermieden. Im Anschluss wurden die Proben für ca. 30 min auf Eis inkubiert. Die Probenmessung erfolgte am Durchflusszytometer LRSII Fortessa. Dabei wurden jeweils 30.000 Events (Zellen) mit einer maximalen Messgeschwindigkeit von 800 Events/s aufgenommen. Die Extraktionswellenlänge für DAPI lag bei 405 nm und die Detektion der Emission erfolgte bei 450/50 nm. Aufgetragen wurden die Counts (Zellanzahl) gegen die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI.

Zelltodmechanismen: Apoptose versus Nekrose

Der Farbstoff Annexin V-FITC bindet an das Phospholipid Phosphatidylserin (PS), das sich auf der Membranninnenseite von lebenden Zellen befindet. Der Farbstoff Propidiumiodid (PI) interkaliert in die zelluläre DNA. Lebende Zellen haben eine intakte Zellmembran, die das Zellinnere mit der DNA von der äußeren Umgebung abgrenzt. Bei apoptotischen Zellen kommt es zu einem Verlust der Membranasymmetrie, so dass PS auch auf der Membranaußenseite auftritt. Für nekrotische Zellen charakteristisch ist der Verlust der Membranintegrität, wodurch Farbstoffe ins Zellinnere gelangen können. Diese Merkmale ermöglichen die Zuordnung der untersuchten Zellen anhand ihrer Signalintensitäten für beide Fluoreszenzfarbstoffe. Dabei ergeben sich 4 Populationen: lebende Zellen (kein Signal), apoptotische Zellen (Annexin V-FITC positiv), nekrotische Zellen (PI positiv) und apoptotisch/nekrotische Zellen (Annexin V FITC und PI positiv).

Versuchsansatz

Es wurden je $0,5 \times 10^6$ A549-Zellen in 5 mL DMEM pro Zellkulturschale (\emptyset 60 mm) ausgestreut, für 24 h im Brutschrank kultiviert und im Anschluss daran für 24 h mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ (50-200 µM) beziehungsweise Hacac (450-600 µM) inkubiert (beschrieben unter 4.1.3.2). Der Ansatz der Proben erfolgte jeweils in einer Doppelbestimmung. Als Referenz wurde ebenfalls eine DMSO-Kontrolle mitgeführt und als Positivkontrolle für die Induktion der Apoptose Staurosporin (STS, 400 nM, 4 h Inkubation). Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen teilweise mit 1 Gy bestrahlt und für 8 h in frischem DMEM nachinkubiert. Zum Abbruch der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen, durch

Trypsin (0,25 %) von der Kulturschale abgelöst und in je 2 mL kaltem PBS/FKS (10 %) aufgenommen. Es wurde zentrifugiert (1300 rpm, 4 min, 4 °C) und das jeweilige Zellpellet mit 2 mL kaltem PBS versetzt.

Probenaufarbeitung und Detektion

Je 1 mL jeder Zellsuspension wurde in ein Messröhrchen überführt, zentrifugiert (1300 rpm, 4 min, 4 °C) und das erhaltene Zellpellet in 200 µL Mastermix (1 µL Annexin V-FITC, 50 µg/µL PI in Ringerlösung) aufgenommen. Die Inkubation der Zellen mit den Farbstoffen erfolgte für 30 min auf Eis. Bei der anschließenden Messung wurden für jede Probe je 10.000 Events (Zellen) mit einer maximalen Messgeschwindigkeit von 800 Events/s aufgenommen. Es wurde eine Extraktionswellenlänge von 488 nm für Annexin V-FITC und PI gewählt und die Emission bei 530/30 nm (Annexin V-FITC) beziehungsweise 695/40 nm (PI) gemessen. Aufgetragen wurde das FITC-Signal gegen das PI-Signal.

Die Untersuchung des Zellzyklus und der Zelltodmechanismen erfolgten teilweise in Zusammenarbeit mit Frau Stefanie Beck im Rahmen ihrer Masterarbeit „Einfluss von Aluminiumacetylacetonat auf den Zellzyklus und die Apoptose in A549-Zellen“.

4.3 Untersuchung der DNA-Schädigung und -Reparatur

4.3.1 Alkalische Entwindung (*Alkaline Unwinding*)

Die Methode der Alkalischen Entwindung (Hartwig *et al.*, 1993) wurde in dieser Arbeit zum Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen im Zuge der Behandlung der Zellen mit Al(acac)₃ einzeln oder in Co-Inkubation mit H₂O₂ eingesetzt.

Versuchsansatz

Zunächst wurden je 0,1 x 10⁶ A549-Zellen in 2 mL DMEM pro Zellkulturschale (Ø 35 mm) ausgestreut und für 24 h im Brutschrank kultiviert. Anschließend erfolgte die 24-stündige Inkubation der Zellen mit Al(acac)₃ (100-200 µM) beziehungsweise Hacac (600 µM) wie unter 4.1.3.2 beschrieben. Eine DMSO-Kontrolle wurde ebenfalls mitgeführt sowie eine Positivkontrolle, bei der die Zellen für 5 min mit 80 µM H₂O₂ behandelt wurden. Der Ansatz jeder einzelnen Probe erfolgte in einer Dreifachbestimmung. Im Rahmen der Untersuchung zum Einfluss von Al(acac)₃ auf die DNA-Einzelstrangbruchreparatur wurden die Zellen gegen Ende der 24-stündigen Inkubation zusätzlich für 5 min mit H₂O₂ (80 µM) co-inkubiert und anschließend für 30 min nachinkubiert. Eine reine 0,2 %ige DMSO-Kontrolle diente hierbei als Negativkontrolle. Zum Abbruch der Inkubation wurde

das Inkubationsmedium abgenommen, je 2 mL kaltes PBS auf die Zellen gegeben und die Zellkulturschalen auf Eis gestellt. Künstliches Licht wurde bei allen Schritten vermieden.

Alkalische Entwindung

Bei der Durchführung der alkalischen Entwindung wurden die Proben nacheinander aufgearbeitet. Dafür wurde das PBS von den Zellen entfernt, je 1,5 mL einer alkalischen Lösung (pH-Wert 12,2-12,4) pro Schale pipettiert und die Zellen für 30 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde das zur Neutralisation (pH-Wert $6,80 \pm 0,02$) notwendige Volumen einer HCL-Lösung (0,1 N) zur Probe hinzugefügt und die Reaktion dadurch beendet. Nach der Überführung der Probe in ein AU-Röhrchen wurde für 15 s sonifiziert, die Probe mit 10 μ L einer 10 %-igen Natriumdodecylsulfatlösung (SDS) versetzt und durchmischt. Die Probenlagerung erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Chromatographie und Probendetektion

Die Trennung der doppel- und einzelsträngigen Proben-DNA erfolgte chromatographisch unter Verwendung von Hydroxylapatit-Säulen. Dafür wurden die mit Glasfilterfritten abgedichteten Säulen mit je 1 mL Apatitsuspension in Natriumpuffer (NaP, 0,01 M) befüllt und mit je 1,5 mL Kaliumpuffer (KP, 0,5 M) sowie NaP (0,01 M) konditioniert. Sowohl die Apparatur als auch alle benötigten Reagenzien wurden dafür zunächst im Wasserbad auf $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperiert. Die Proben wurden ebenfalls auf $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperiert, durchmischt und auf die vorbereiteten Säulen überführt. Anschließend wurden je Säule 2,5 mL NaP (0,01 M) aufgetragen und das Eluat verworfen. Dieser Schritt diente der Entfernung störender Begleitsubstanzen. Zur Elution der einzelsträngigen DNA wurden je 1,5 mL KP (0,15 M) und zur Elution der doppelsträngigen DNA je 1,5 mL KP (0,35 M) auf die Säule gegeben. Die Eluate wurden in einer 24-Well-Platte aufgefangen. Pro Platte wurde ein Puffer als Kontrolle mitgeführt.

Zur Färbung der Proben wurden je $4,25\text{ }\mu\text{L}$ des in die DNA interkalierenden Farbstoffs Hoechst 33258 eingesetzt. Anschließend wurden die Proben durchmischt, für 30 min im Dunkeln inkubiert und die Fluoreszenz am Tecan bestimmt ($E_m = 360\text{ nm}$; $E_x = 455\text{ nm}$).

Der Anteil an doppelsträngiger DNA (ds DNA) wurde nach Hartwig *et al.* (1993) wie folgt berechnet (1):

$$ds\text{ DNA} = f_{ds\text{ DNA}} / (2,1 \times f_{ss\text{ DNA}}) + f_{ds\text{ DNA}} \quad (1)$$

$f_{ds\text{ DNA}}$ = Fluoreszenzwert der doppelsträngigen DNA

$f_{ss\text{ DNA}}$ = Fluoreszenzwert der einzelsträngigen DNA

Der im Nenner auftretende Faktor von 2,1 berücksichtigt, dass der Farbstoff Hoechst 33258 stärker an doppelsträngige als an einzelsträngige DNA bindet.

Die Untersuchung der DNA-Einzelstrangbrüche mittels *Alkaline Unwinding* erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Caroline Soballa im Rahmen ihrer Masterarbeit „Einfluss von Aluminium auf die DNA-Reparatur“.

4.3.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese wurde der Einfluss von Aluminium in Form der Verbindung $\text{Al}(\text{acac})_3$ auf die Entstehung sowie die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in A549-Zellen untersucht.

Versuchsansatz

Jeweils $2,0 \times 10^6$ A549-Zellen wurden in 10 mL DMEM pro Zellkulturschale (\varnothing 100 mm) ausgestreut, für 24 h kultiviert und anschließend mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ (100-200 μM) oder Hacac (450 - 600 μM) für weitere 24 h inkubiert (siehe 4.1.3.2). Nach Ablauf der Inkubation wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit frischem DMEM versetzt und die Proben teilweise mit 80 Gy bestrahlt. Das Ablösen der Zellen mit Trypsin (0,25 % in PBS) und die Aufnahme in 6 mL kaltem PBS/FKS (10 %) erfolgte entweder direkt nach der Bestrahlung oder aber nach einer 8-stündigen Nachinkubation. Im weiteren Verlauf der Analyse wurde zunächst für jede einzelne Probe die Zellzahl bestimmt und genau $5,0 \times 10^6$ Zellen in ein neues 15 mL Röhren überführt. Nach Zentrifugation (1300 rpm, 3 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 1 mL kaltem PBS in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Die durch Zentrifugation (1300 rpm, 3 min, 4 °C) erhaltenen Proben-Zellpellets wurden bei -80 °C für maximal 4 Wochen gelagert.

Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung erfolgte mittels *CHEF Mammalian Genomic DNA Plug Kit* von BioRad gemäß den Vorgaben des Herstellers. Dazu wurden die Probenpellets zunächst mit je 75 μL Zellsuspensionspuffer vermischt, auf 50 °C erwärmt und 75 μL *CleanCut* Agarose (2 %, 50 °C) hinzugefügt. Zum Gießen der Blöckchen wurden jeweils 100 μL jeder Probe eingesetzt. Die anschließende Zellyse erfolgte durch Inkubation der Blöckchen mit je 300 μL Extraktionspuffer (Proteinase K Reaktionspuffer/Proteinase K Stock (4 %)) bei 50 °C über Nacht. Anschließend wurden die Blöckchen dreimal mit jeweils 1 mL Waschpuffer versetzt.

Pulsfeld-Gelelektrophorese und Auswertung

Die Elektrophorese erfolgte in der PFGE CHEF-DR III Apparatur von BioRad für 92 h bei 14 °C unter einem Feldwinkel von 120°, einer elektrischen Feldstärke von 1,5 V/cm und einer Pulszeit von 5-5000 s. Dafür wurden die Proben-Blöckchen zunächst in einem Gel (0,8 % *Pulsed-field*-Agarose in 0,5xTBE-Puffer mit Fluoreszenzfarbstoff *GelRed* (1:10.000)) fixiert, das Gel in der Apparatur ausgerichtet und vor dem Lauf für 30 min in Laufpuffer (0,5xTBE-Puffer, 14 °C) vorkonditioniert. Für die Probendetektion wurde der Luminescent Image Analyzer LAS-3000 eingesetzt und folgende Einstellungen gewählt: Fluoreszenz; Qualität, Standard; Einsatz-Position, 2; Exposition, manuell. Die Probenauswertung erfolgte durch die Software *AIDA Image Analyzer*.

4.3.3 Immunfluoreszenzfärbung

Die Methode der Immunfluoreszenzfärbung wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um den Einfluss von Aluminium als $\text{Al}(\text{acac})_3$ auf die Proteine γH2AX und Rad51 zu untersuchen. Diese stehen in Zusammenhang mit der DNA-Doppelstrangbruchreparatur.

Versuchsansatz

Es wurden je $0,16 \times 10^6$ A549-Zellen in 2 mL DMEM pro Zellkulturschale (\varnothing 35 mm) ausgestreut, in die zuvor jeweils 2 Deckgläschen (\varnothing 12 mm) gelegt wurden. Die 24-stündige Inkubation der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ (50-150 μM) oder Hacac (450 μM) erfolgte nach 24 h wie unter 4.1.3.2 beschrieben. Anschließend wurden die Proben zum Teil mit 1 Gy bestrahlt und für 2 beziehungsweise 8 h in frischem Medium nachinkubiert.

Probenaufarbeitung und Antikörperfärbung

Die Fixierung der Zellen auf den Deckgläschen erfolgte mit 3,7 %-iger Formaldehydlösung in PBS für 10 min. Danach wurden die Zellen dreimal mit reinem PBS gewaschen und die Zellmembranen durch die Zugabe von je 1 mL Triton X-100 (0,2 % in PBS) pro Probe für 5 min bei 4 °C permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschschrift (3x mit PBS/FKS (1%)) wurden die Zellen mit PBS/BSA (2 %) versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Freie Bindungsstellen wurden dadurch blockiert. Die Markierung der Zielproteine erfolgte zunächst durch die Inkubation der Zellen mit den Primärantikörpern. Dafür wurde entweder eine Mischung der Antikörper anti- γH2AX (Maus, 1:1000) und anti-CENP-F (Kaninchen, 1:500) beziehungsweise anti-Rad51 (Kaninchen, 1:5000) und anti-CENP-F (Maus, 1:500) in PBS/BSA (2 %) verwendet. Bei CENP-F handelt es sich um ein Zentromerprotein. Es wurde zur Bestimmung der Zellzyklusphase eingesetzt. Die ungebundenen Primärantikörper wurden durch das dreimalige Waschen der Zellen mit

PBS/BSA (2 %) für jeweils 10 min entfernt. Anschließend erfolgte die 3-stündige Inkubation der Zellen mit den Sekundärantikörpern Alexa Fluor® 488-conjugated anti-mouse (Ziege, 1:500) und Cy3-conjugated anti-rabbit (Ziege, 1:500) in PBS/BSA (2 %) bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurde je Deckgläschen ein Tropfen *Vectashield Mounting Medium with DAPI* auf einem Objektträger (76 x 26 mm) vorgelegt, die Deckgläschen mit den fixierten Zellen Richtung *Mounting Medium* aufgelegt und mit Nagellack luftdicht abgeschlossen.

Probendetektion und Auswertung

Die Auszählung der Foci von insgesamt 40 Zellen (G₂-Phase) je Proben-Deckgläschen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Objektiv 63x). Anschließend wurden die Foci-Mittelwerte jeder einzelnen Probe berechnet und je nach Fragestellung die Differenz der Mittelwerte von bestrahlter und unbestrahlter Probe gebildet.

4.3.4 Elektrophorese und Western-Blot

Versuchsansatz

Es wurden $1,0 \times 10^6$ A549-Zellen in 10 mL DMEM pro Zellkulturschale (Ø 100 mm) ausgestreut und die Zellen zunächst für 24 h kultiviert, so dass sie sich zum Zeitpunkt der Inkubation in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Die 24-stündige Inkubation der Proben erfolgte entweder mit Al(acac)₃ (50-150 µM) oder dem Liganden Hacac (450 µM) (siehe 4.1.3.2). Anschließend wurde das Medium aus den Schalen entfernt, die Zellen durch Trypsinlösung (0,25 %) von der Schalenoberfläche abgelöst und in 3 mL kaltem PBS/FKS (10 %) aufgenommen. Die jeweilige Zellsuspension wurde anschließend in ein 15 mL Röhren überführt, zentrifugiert (1300 rpm, 3 min, 4 °C) und das erhaltene Zellpellet in 1 mL kaltem PBS resuspendiert. Nach dem Überführen der Proben in 1,5 mL Eppendorfgefäße und erneutem Zentrifugieren (1300 rpm, 3 min, 4 °C) wurden die Zellpellets bei -80 °C gelagert.

Probenaufarbeitung und Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Proteinbestimmung der Proben erfolgte zunächst ein Zellaufschluss. Dafür wurden die Zellpellets mit je 50 µL Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA und 0,1 % Triton X-100) unter Zusatz von Protease-Inhibitor (1x) versetzt, durchmischt und für 30 min unter leichtem Schwenken auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (14.000 rpm, 20 min, 4 °C), die Überstände in neue 1,5 mL Eppendorfgefäße überführt und auf Eis gelagert. Die Rückstände wurden verworfen.

Die Proteinbestimmung der einzelnen Proben erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Dafür wurden Probenaliquote mit bidest. Wasser (1:200) verdünnt und ausgehend von einer BSA-Stammlösung (10 mg/mL) Kalibrierstandards der Konzentrationen 0,01 mg/mL, 0,025 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,075 mg/mL in bidest. Wasser angesetzt. Für die Bestimmung wurden je 20 µL Probe beziehungsweise Standard pro Kavität einer 96-Loch-Platte in Doppelbestimmung vorgelegt. Ein Blindwert aus reinem bidest. Wasser wurde ebenfalls mitgeführt. Nach der Zugabe von je 180 µL verdünntem Bradford-Reagenz (140 µL H₂O, 40 µL Bio-Rad Reagenz) pro Kavität wurden die Reaktionsansätze durch das Schwenken der 96-Loch-Platte für 5 min (100 U/min) durchmischt. Die Messung der Absorption erfolgte am TECAN Infinite® M200 Pro bei einer Wellenlänge von 595 nm. Für die anschließende Elektrophorese wurden je Probe 30 µg Protein im entsprechenden Volumen in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt, mit bidest. Wasser auf ein Gesamtvolumen von 15 µL ergänzt und mit 5 µL 4xLadepuffer versetzt. Die vollständige Denaturierung der Probenproteine erfolgte innerhalb von 10 min bei 95 °C.

Gelelektrophorese

Als Gelelektrophorese wurde die Variante der SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) mit einem 10%-igen Trenngel und einem 4%-igen Sammelgel eingesetzt. Dafür wurden die zuvor denaturierten Proben mit je 30 µg Protein sowie ein Molekulargewichtsstandard (5 µL) in die Taschen des Gels aufgetragen. Der Gel-Lauf erfolgte zunächst für 5 min bei 50 V und anschließend für 60 min bei 180 V in Laufpuffer.

Western-Blot und Antikörperfärbung

Für den Western-Blot wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel, die Nitrozellulosemembran, Pads und Whatman-Papiere in Transferpuffer vorkonditioniert. Danach wurde die Membran auf das Trenngel gelegt und beidseitig mit Whatman-Papieren und Pads in die Blotting-Apparatur eingespannt. Die Membran wurde dabei in Richtung der positiv geladenen Anode orientiert, da dies der Transferrichtung der negativ geladenen Proteine entsprach. Anschließend wurde die Apparatur mit Transferpuffer gefüllt und der Blot über Nacht bei 30 V und 4 °C unter ständigem Rühren des Transferpuffers durchgeführt. Vor der Antikörperfärbung wurde die Membran zunächst für 1 h in Blockierlösung (5 % Milchpulver in PBST) unter leichtem Schwenken inkubiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden dadurch blockiert. Die Inkubation der Membran mit den Primärantikörpern Rad51 (1:3000, rabbit polyclonal) und Actin (1:2000, goat polyclonal IgG) in 4 mL Blockierlösung erfolgte für 2 h bei RT unter Rotation in einem

50 mL Röhrchen. Danach wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min mit PBST gewaschen, so dass überschüssiger Primärantikörper entfernt wurde. Die Inkubation der Membran mit den IgG-HRP konjugierten Sekundärantikörpern donkey anti-rabbit (1:1000) und donkey anti-goat (1:1000) in 4 mL Blockierlösung erfolgte ebenfalls für 2 h bei RT auf dem Rotator in einem 50 mL Röhrchen. Im Anschluss wurde die Membran erneut dreimal mit PBST für je 10 min und einmal mit reinem PBS für 2 min gewaschen und bis zur Probendetektion in PBS aufbewahrt.

Messung der Chemilumineszenz und Auswertung

Die Messung der Chemilumineszenz der Proben erfolgte am Luminescent Image Analyzer LAS-3000 anhand der Einstellungen: Chemilumineszenz; Inkrement, 30 s; Qualität, hoch; Einsatz-Position, Stufe 2. Dafür wurde die Membran auf dem Einsatz mittig ausgerichtet, fokussiert und mit 700 μ L ECL-Reagenz (350 μ L Reagenz 1, 350 μ L Reagenz 2) versetzt. Nach 1 min wurde das Reagenz wieder abgenommen und das Signal detektiert. Die Aufnahme der Markerbanden erfolgte anhand der Einstellungen ‚Digitize, Epi‘ mit einer Belichtungszeit von 1/100 s. Die Probenauswertung erfolgte mit der Software *AIDA Image Analyzer*.

4.4 Genexpressionsanalyse mittels *High-Throughput RT-qPCR*

Die Methode der *High-Throughput RT-qPCR* wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um den Einfluss von Al(acac)₃ auf die Expression ausgewählter Gene zu untersuchen. Diese Gene stehen im Zusammenhang mit der genomischen Stabilität und können verschiedenen zellulären Signalwegen und Prozessen zugeordnet werden. Dazu gehören unter anderem die Zellproliferation und Zellzyklusregulation, der Zelltodmechanismus der Apoptose, die oxidative Stressantwort sowie DNA-Reparatur. Die hohe Effizienz der Methode zeigt sich in der simultanen Betrachtung von 95 Genen in 96 Proben (Fischer *et al.*, 2016).

Versuchsansatz

Zunächst wurden jeweils $0,35 \times 10^6$ A549-Zellen in 5 mL DMEM pro Zellkulturschale (\emptyset 60 mm) ausgestreut und die Zellen für 24 h unter optimalen Bedingungen kultiviert. Anschließend erfolgte die 24-stündige Inkubation der Proben entweder mit Al(acac)₃ (50-150 μ M) oder dem Liganden Hacac (450 μ M) wie unter 4.1.3.2 beschrieben. Je Probe wurde eine Doppelbestimmung angesetzt. Nach Ablauf der Inkubation wurde das Medium aus den Schalen entfernt, die Zellen mittels Trypsinlösung (0,25 %) abgelöst und in 3 mL kaltem PBS/FKS (10 %) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein 15 mL Röhrchen überführt und zentrifugiert (1300 rpm, 3 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und

der Rückstand in frischem PBS aufgenommen, resuspendiert und in ein 1,5 mL Eppendorfgesäß überführt. Nach Zentrifugation der Proben (2000 rpm, 5 min, 4 °C) wurden die Überstände entfernt und die erhaltenen Zellpellets bei -80 °C für max. 2 Wochen gelagert.

RNA-Isolation

Die Isolation der RNA erfolgte mittels *NucleoSpin® RNA Plus Kit* von Macherey-Nagel gemäß den Vorgaben des Herstellers. Zur Vermeidung einer Probenkontamination mit Fremd-RNA wurden die Arbeiten in einem mit Ethanol (80 %) gereinigten Abzug durchgeführt und sterile Pipettenspitzen verwendet. Die Proben wurden während der Isolation auf Eis gelagert, wodurch ein Abbau der RNA unterbunden wurde. Zunächst wurden die tiefgefrorenen Zellproben mit je 350 µL Lysepuffer (LBP) versetzt und auf dem Vortex vermischt. Nach Überführung der Proben auf eine DNA-bindende Säule wurde zentrifugiert (11.000 rpm, 30 s, 4 °C) und das jeweilige Eluat mit 100 µL Binding Solution (BS) vermischt. Durch die Überführung der Probe auf eine RNA-bindende Säule und anschließender Zentrifugation wurde die Proben-RNA auf der Säule fixiert. Störende Proteine und Salze wurden in den darauffolgenden Waschschrinen mit Waschpuffer 1 (WB1, 200 µL/Probe) und Waschpuffer 2 (WB2, 600 und 250 µL/Probe) entfernt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (11.000 rpm, 2 min, 4 °C) und die Säulen mit der gebundenen Proben-RNA auf ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß gesetzt. Zur Elution der RNA wurden 30 µL RNase-freies Wasser auf die Säulen pipettiert und erneut zentrifugiert (11.000 rpm, 1 min, 4 °C). Dieser Schritt wurde mit dem Eluat wiederholt. Die Lagerung der Eluate mit der darin enthaltenen RNA erfolgte bei -80 °C für maximal zwei Wochen. Für die nachfolgende cDNA-Synthese wurde die RNA-Konzentration der Probeneluate durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm am TECAN Infinite® M200 Pro bestimmt. Zur Überprüfung einer möglichen Verunreinigung mit DNA wurde der Quotient aus den Absorptionen bei 260 und 280 nm gebildet. Bei einem Wert > 2,0, konnte von einer ausreichenden Reinheit der Probe ausgegangen werden.

cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA erfolgte mittels *qScript cDNA Synthese Kit* von Bio Rad gemäß den Vorgaben des Herstellers. Pro Reaktionsansatz wurden zu je 1 µg Proben-RNA genau 5 µL Mastermix, dieser bestand aus 1 µL *iScript Reverse Transcriptase* und 4 µL *5xReaction Mix*, pipettiert. Dieses Gemisch wurde mit PCR-geeignetem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µL ergänzt, die Proben auf dem Vortex durchmischt und runterzentrifugiert. Für die

cDNA-Synthese wurde folgendes Temperaturprogramm am Thermocycler gewählt: 5 min bei 25 °C, 30 min bei 42 °C, 5 min bei 85 °C, ∞ bei 4 °C. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C für maximal 2 Wochen.

Preamplifikation und Exonukleaseverdau

Die Preamplifikation der Zielgene und der anschließende Exonukleaseverdau wurden gemäß den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Für die Preamplifikation der Zielgene (*specific target amplification*, STA) wurden zunächst 3,75 µL Pre-Mix (2,5 µL 2xTaqMan PreAmp Master Mix, 0,5 µL *Pooled* Primer Mix, 0,75 µL PCR-zertifiziertes Wasser) pro Kavität eines Nano Eppendorf Gefäßes vorgelegt und je 1,25 µL der zuvor synthetisierten Proben-cDNA hinzugefügt. Der verwendete *Pooled* Primer Mix wurde dabei im Vorfeld angesetzt und enthielt alle Primerpaare (500 nM) in DNA-Suspensionspuffer. Seine Lagerung erfolgte bei -20 °C. Als Kontrolle dienten eine nicht umgeschriebene RNA-Probe (-RT) sowie Wasser (NTC-STA). Nach einer guten Durchmischung und Zentrifugation der Proben wurde folgendes Temperaturprogramm am Thermocycler gestartet: 10 min bei 95 °C, 15 s bei 95 °C und 4 min bei 60 °C für 12 Zyklen, ∞ bei 4 °C. Im Zuge des Verdaus der ungebundenen Primer wurden die Proben gemischt, zentrifugiert und mit jeweils 2 µL verdünnter Exonuklease (0,4 µL Exonuklease I (20 Units/µL), 0,2 µL 10xExonuklease I Reaktionspuffer, 1,4 µL PCR-zertifiziertes Wasser) versetzt. Das Temperaturprogramm am Thermocycler war wie folgt: 40 min bei 37 °C, 15 min bei 80 °C, ∞ bei 4 °C. Anschließend wurden die Proben mit jeweils 18 µL TE-Puffer verdünnt, durchmischt inklusive Zentrifugation und bei -20 °C über Nacht gelagert.

Primer- und Probenvorbereitung

Für die Primervorbereitung wurden 2,5 µL einer Mischung aus *forward* und *reverse* Primer (100 µM) in 47,5 µL Mastermix (25 µL 2xAssay Loading Reagent, 22,5 µL DNA-Suspensionspuffer) auf eine Konzentration von 5 µM verdünnt. Eine Wasserprobe diente als *no reaction control* (NRC). Die Aufbewahrung des Primer-Mix erfolgte bei -20 °C.

Im Zuge der Probenvorbereitung wurden 2,75 µL Sample Pre-Mix (2,5 µL 2xSsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low ROX, 0,25 µL 20xDNA Binding Dye Sample Loading Reagent) pro Reaktionskavität vorgelegt, je 2,25 µL Probe hinzugefügt und gut durchmischt. Ab diesem Schritt wurde eine weitere Wasserprobe als *no template control* (NTC) mitgeführt.

96x96 Dynamic Array IFC qPCR Analyse

Die Durchführung der 96x96 Dynamic Array IFC qPCR Analyse erfolgte anhand der Vorgaben des Herstellers. Zunächst wurden die Akkumulatoren des *dynamic array IFC* mit

150 μL Kontrollfluid befüllt und der Chip ohne Schutzfolie in den *IFC Controller HX* gestellt. Die Mikrokanäle des Chips wurden durch das Programm *Prime* (136x) mit dem Fluid gefüllt und der Chip im direkten Anschluss mit je 5 μL der vorbereiteten Proben und Primer in die Kavitäten des Chips pipettiert. Auftretende Luftblasen wurden entfernt. Mittels *IFC Controller HX* Programm *Load Mix* (136x) wurden die Proben und Primer miteinander vermischt und die Oberfläche des Chips vor der eigentlichen Analyse von Staubpartikeln befreit. Die qPCR und Schmelzkurvenanalyse der Proben erfolgte anschließend im BioMark™ HD System anhand dem Temperaturprogramm: 2.400 s bei 70 °C und 30 s bei 60 °C (thermale Durchmischung), 60 s bei 95 °C, 5 s bei 96 °C und 20 s bei 60 °C für 30 Zyklen, 3 s bei 60 °C mit einem anschließenden Anstieg der Temperatur (1 °C/3 s) auf 95 °C (Schmelzkurvenanalyse).

Datenanalyse und Auswertung

Im Zuge der Datenanalyse und Auswertung der *High-Throughput RT-qPCR* wurde zunächst anhand des Referenzfarbstoffs ROX und der Software *Fluidigm Real-Time PCR Analysis* die gleichmäßige Beladung des Chips sichergestellt. Die Präzisierung erfolgte anhand der Schwellenwertmethode ‚*Auto detectors*‘. Anhand der mitgeführten Kontrollen (-RT, NTC-STA, NTC, NRC) wurde das Analysenergebnis überprüft. Die mittels Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen® festgestellten C_q -Werte wurden in Form einer *Heat Map* abgebildet und für die weitere Analyse als solche exportiert. In der Software *GenEx* wurden zunächst alle C_q -Werte > 30 aus dem Datensatz entfernt. Anschließend wurden die Referenzgene (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT1*) mittels *geNorm* und *Normfinder* hinsichtlich ihrer Güte überprüft und die Anzahl an Referenzgenen für den jeweiligen Versuch festgelegt. Für die Normalisierung der Gene wurde die $\Delta\Delta C_q$ -Methode angewandt (Gleichungen 1-2):

$$\Delta C_q = C_q (\text{Zielgen}) - C_q (\text{Referenzgen}) \quad (1)$$

$$\Delta\Delta C_q = \Delta C_q (\text{behandelte Probe}) - \Delta C_q (\text{Kontroll-Probe}) \quad (2)$$

Das Ergebnis wurde jeweils als $2^{-\Delta\Delta C_q}$ angegeben (Livak und Schmittgen, 2001). Für die logarithmische Darstellung des Ergebnisses wurde die relative Genexpression der Kontrolle auf den Wert 0 gesetzt. Nahm die relative Genexpression im Zuge der Behandlung um den Faktor 2 zu beziehungsweise ab, wurde die Modulation der Expression als relevant angesehen.

4.5 Untersuchung der Metallbindung an Transferrin

Die Analysen zur schrittweisen Bindung von Fe^{3+} - und Al^{3+} -Ionen an das Protein Serum-Transferrin (hTF) erfolgten mithilfe der ultrahochauflösenden ESI Massenspektrometrie

sowie der spektroskopischen Methode Circular dichroismus. Dadurch wurden neue Erkenntnisse bezüglich der Metallsättigung des Proteins in Zusammenhang mit den damit einhergehenden strukturellen Veränderungen gewonnen. Dies ist vor allem hinsichtlich der Bindung des Metall-Protein-Komplexes an den Transferrin-Rezeptor und einer möglichen rezeptorvermittelten Aufnahme des Komplexes in die Zelle von Bedeutung.

Ansatz der Stammlösungen

Für die Untersuchung der Metallbindung an hTF wurden zunächst Stammlösungen der Acetylacetonate von Eisen und Aluminium hergestellt. Dazu wurden 0,02 g der Verbindung Eisen(III)acetylacetonat ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) mit 10 mL bidestilliertem Wasser versetzt und über Nacht bei RT inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden anschließend durch Sterilfiltration entfernt und die Konzentration der Stammlösung mittels GF-AAS bestimmt. Hierbei ergab sich eine Konzentration von 2,8 mM $\text{Fe}(\text{acac})_3$. Des Weiteren wurde eine 2,5 mM Stammlösung der Verbindung Aluminium(III)acetylacetonat ($\text{Al}(\text{acac})_3$) in bidestilliertem Wasser angesetzt. Die Konzentration von $\text{Al}(\text{acac})_3$ wurde hierbei nicht weiter überprüft, da dies für die Verwendung der Lösung in den nachfolgenden Untersuchungen nicht notwendig war.

Proteinaufarbeitung

Ausgehend vom humanen, eisengesättigten holo-Transferrin (holo-hTF) wurde zunächst das metallfreie Apoprotein (apo-hTF) gewonnen, welches je nach Versuchsansatz zu Aluminium-Transferrin (Al -hTF) weiterprozessiert wurde. Dazu wurden pro Reaktionsansatz 1-2 mg holo-hTF in 1 mL eines 10 mM EDTA-Puffers aufgenommen und die Proteinlösung für 3 h bei RT inkubiert. EDTA wirkte in diesem Zusammenhang als Chelatbildner und löste die beiden Fe^{3+} -Ionen durch Komplexbildung aus den Metallbindungsstellen des Proteins. Anschließend wurde das Apoprotein durch einen mehrmaligen Pufferwechsel mit frischem 10 mM EDTA-Puffer mittels Ultrafiltration aufgereinigt. Die Lagerung von apo-hTF erfolgte bei 4 °C über Nacht. Für die weiteren Analysen wurde die metallfreie und gereinigte Proteinlösung zunächst in deionisiertem Wasser und dann in 50 mM HEPES, 100 mM NH_4HCO_3 (Massenspektrometrie) oder 50 mM HEPES, 100 mM NaHCO_3 (Circular dichroismus) umgepuffert. Der pH-Wert der Proteinlösung betrug 7,4. Entweder wurde diese Proteinlösung zur Untersuchung der Eisenbindung an apo-hTF eingesetzt, oder aber das Protein zu Al_2 -hTF weiterprozessiert. Dazu wurde ein Überschuss an Al^{3+} -Ionen in Form der $\text{Al}(\text{acac})_3$ -Stammlösung zum Protein apo-hTF hinzugegeben. Dies erfolgte entweder in 50 mM HEPES, 100 mM NH_4HCO_3 (Massenspektrometrie) oder in 50 mM HEPES, 100 mM NaHCO_3

(Circulardichroismus) bei einem pH-Wert von 7,4. Zur Aufnahme von Aluminium in die Metallbindungsstellen von apo-hTF wurde das Protein anschließend für 3 h bei RT und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach erfolgte ein Pufferwechsel mittels Ultrafiltration, wodurch ungebundene Al³⁺-Ionen aus der Proteinlösung entfernt wurden. Die Lösungen von apo-hTF und Al-hTF wurden vor ihrer weiteren Verwendung für maximal 2 Tage bei 4 °C gelagert. Vor der stöchiometrischen Zugabe von Fe³⁺-Ionen wurde jeweils die Proteinkonzentration der verwendeten Lösung bestimmt. Dies erfolgte durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten von hTF ($\epsilon_{280} = 84.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

4.5.1 Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie (ESI MS)

Metalltitration am Q-Exactive™ Orbitrap Massenspektrometer

Im Zuge der Metalltitration wurden Probenaliquote von apo-hTF bzw. Al-hTF mit unterschiedlichen Mengen an Fe³⁺-Ionen durch Zugabe von Fe(acac)₃-Stammlösung versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Aufnahme der MS-Daten erfolgte an einem Q-Exactive Quadrupol Orbitrap Massenspektrometer. Dafür wurden die Proben mittels Spritzenpumpe mit einer Injektionsrate von 5 µL/min direkt in das Gerät injiziert. Die Elektrospray-Ionisation (ESI) erfolgte im positiven Modus und wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Kapillarspannung, 3,9 kV; Kapillartemperatur, 320 °C; Hüllgas, 4 Einheiten; Hilfsgas, 0 Einheiten; Sondenheiztemperatur, 30 °C; S-Linse RF-Level, 90 und In-Source CID, 80 eV. Insgesamt wurden 10 Mikroskans mit einer Auflösung von 70.000 für 3 min im Massenbereich von m/z 2500 bis 6000 aufgenommen. Die automatische Verstärkungsregelung und die maximale Einspritzzeit lagen bei 3x10⁶ bzw. 500 ms.

Datenanalyse

Die gesammelten Spektren wurden jeweils einzeln mit der Thermo Xcalibur®-Software über den aufgenommenen Zeitraum gemittelt, mit einem internen Python-Skript von *Agriculture and Agri-Food Canada* dekonvolviert und in Microsoft Excel aufbereitet. Für die Simulation der relativen Speziesverteilung wurde das Programm HySS2009 (*Hyperquad Simulation and Specification*) verwendet (Alderighi *et al.*, 1999).

4.5.2 Strukturanalyse mittels Circulardichroismus (CD)

Metalltitration am CD Spektropolarimeter

Die Strukturuntersuchungen von hTF erfolgten an einem JASCO J-815 CD Spektrometer. Dafür wurden 3 mL Proteinlösung, apo-hTF beziehungsweise Al-hTF der Konzentration 1,5 mg/mL, in eine 1 cm Küvette vorgelegt. Anschließend erfolgte die schrittweise Zugabe

von Fe³⁺-Ionen in Form von Fe(acac)₃ in molaren Äquivalenten von 0,5 bis zu einem molaren Verhältnis von Metall zu Protein von 3:1 bei RT. Nach jeder Zugabe wurde das entsprechende CD-Spektrum im Wellenlängenbereich 250-600 nm unter folgenden Einstellungen aufgenommen: Bandbreite, 1 nm; Scan-Geschwindigkeit, 50 nm/min; Response, 2 sec; Empfindlichkeit, 100 mdeg (Standard). Die Proben wurden im genannten Wellenlängenbereich jeweils zweimal gemessen und die CD-Spektren gemittelt.

Datenanalyse

Die Spektren wurden in Origin mittels schneller Fourier-Transformation (*Fast Fourier Transform, FFT*) verarbeitet und die Daten in Microsoft Excel übertragen.

Die Untersuchung der Metallbindung durch Transferrin erfolgten im Rahmen meines viermonatigen Auslandsaufenthalts an der *University of Western Ontario* (London, Kanada) in Kooperation mit Prof. Dr. Martin Stillman (*Department of Chemistry, Stillman Bioinorganic Group*). Die ESI MS Messungen wurden an einem Q-Exactive™ Orbitrap Massenspektrometer am Ministerium für Landwirtschaft und Ernährung Kanada (*Department of Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC)*, London, Kanada) in Zusammenarbeit mit Dr. Justin Renaud und Dr. Mark Sumarah durchgeführt. Eine Wiederholung und Bestätigung der CD Messungen erfolgte am Institut für Biologische Grenzflächen (IBG-2), Optische Spektroskopie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) nach Absprache mit Dr. Jochen Bürck und Prof. Dr. Anne S. Ulrich.

4.6 Bestimmung des zellulären Ferritin-Gehaltes

Die Bestimmung des intrazellulären Ferritin-Gehaltes von A549-Zellen erfolgte quantitativ unter Verwendung des *Ferritin (FTL) in vitro SimpleStep ELISA*® KITs der Firma Abcam. Das Testsystem beruht dabei auf der Bildung eines Komplexes bestehend aus Fänger-Antikörper, Rezeptor-konjugiertem Detektions-Antikörper sowie dem zu bestimmenden Analyten Ferritin. Dieser Komplex wird in den Kavitäten einer mit anti-Tag Antikörper vorbeschichteten 96-Loch-Mikroplatte immobilisiert und anschließend durch die Zugabe einer Entwicklungslösung detektiert. Gemessen wird dabei die durch HRP katalysierte Umsetzung von TMB.

Versuchsansatz

Zu Beginn der Untersuchungen wurden jeweils 2,0 x 10⁶ A549-Zellen in 10 mL DMEM pro Zellkulturschale (Ø 100 mm) ausgestreut und für 24 h unter optimalen Bedingungen kultiviert. Anschließend erfolgte die 24-stündige Inkubation der Proben entweder mit

Al(acac)₃, dem Liganden Hacac oder Al-Citrat in unterschiedlichen Konzentrationen (beschrieben unter 4.1.3.2). Pro Versuchsansatz wurden zwei Kontrollen und für jede Behandlungskonzentration eine Probe mitgeführt. Der Abbruch der Inkubation erfolgte unter Absaugen des Inkubationsmediums und zweimaligem Waschen des Zellrasens mit warmem PBS. Nach Zugabe von je 5 mL kaltem PBS pro Schale wurden die Zellen durch vorsichtiges Abschaben von der Oberfläche der Zellkulturschale abgelöst und in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (500 rcf, 5 min, 4 °C), der Überstand abgesaugt und die Zellpellets in je 750 µL kaltem Zellextraktionspuffer mit frisch zugesetztem Protease-Inhibitor (10 %) resuspendiert. Die Proben wurden für 20 min auf Eis inkubiert, erneut zentrifugiert (18.000 rcf, 20 min, 4 °C) und die Überstände mit den darin enthaltenen Zellproteinen in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Bis zur weiteren Untersuchung wurden die Zelllysate bei -80 °C für maximal eine Woche gelagert. Die Rückstände wurden verworfen.

Probenaufarbeitung und Proteinbestimmung nach Bradford

Im Zuge der Probenaufarbeitung wurde zunächst der Proteingehalt jeder einzelnen Probe mit der Methode nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Dafür wurden die Zelllysate der Proben mit bidestilliertem Wasser 1:50 verdünnt und jeweils 20 µL der Verdünnung in die Kavität einer 96-Well-Platte vorgelegt. Die Auftragung der Proben erfolgte dabei in einer Doppelbestimmung. Anschließend wurden genau 180 µL verdünntes Bradford-Reagenz (140 µL H₂O, 40 µL Bio-Rad Reagenz) in jede Kavität hinzupipettiert und die Mischung aus Probe und Reagenz für 5 min unter leichtem Schwenken (100 U/min) durchmischt. Die Messung der Absorption erfolgte am TECAN Infinite® M200 Pro bei einer Wellenlänge von 595 nm. Anhand einer ebenfalls mitgeführten externen Kalibrierung mit BSA (analog 4.3.4) wurden die Proteingehalte der einzelnen Proben bestimmt. Für das weitere Vorgehen wurden Aliquote der unverdünnten Zelllysate entnommen und mit Zellextraktionspuffer auf eine Konzentration von 30 µg Protein/mL verdünnt.

Ferritin (FTL) *in vitro* SimpleStep ELISA®

Die quantitative Bestimmung des Ferritin-Gehaltes der Zellproben erfolgte mittels *Ferritin (FTL) in vitro SimpleStep ELISA®* Kit der Firma Abcam. Dafür wurden zunächst alle für die Analyse benötigten Reagenzien sowie eine ausreichende Anzahl an Kavitäten der vorbeschichteten 96-Loch-Mikroplatte bei RT äquilibriert. Zudem wurde ein Antikörper-Cocktail, eine Mischung aus Fänger- und Detektions-Antikörper in Verdünnungslösung, gemäß den Herstellervorgaben für jeden Versuch frisch angesetzt.

Pro Reaktionsansatz wurden 1,5 µg Protein in 50 µL Zellextraktionspuffer (≈ 30 µg/mL) je Kavität der 96-Loch-Mikroplatte vorgelegt. Die Auftragung der Proben erfolgte dabei in einer Doppelbestimmung. Anschließend wurden jeweils 50 µL des Antikörper-Cocktails in die bereits mit Probe befüllten Kavitäten pipettiert und die Proben für 1 h im Dunkeln unter leichtem Schwenken (185 rpm) bei RT inkubiert. Vor der Detektion wurden die Kavitäten vorsichtig entleert und dreimal mit je 350 µL Waschpuffer gewaschen. Die Detektion von Ferritin erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden in jede Kavität 100 µL der TMB-Entwicklungslösung hinzugegeben und die Reaktion für 8-10 min bei vorsichtigem Durchmischen (185 rpm) inkubiert. Zum Abbruch der Reaktion wurden zu jeder Kavität genau 100 µL Stopplösung pipettiert, wodurch es zu einem Farbumschlag von blau nach gelb kam. Nach 1 min war diese Farbumschlags-Reaktion abgeschlossen und es erfolgte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Bandbreite von 9 nm am TECAN Infinite® M200 Pro.

Die Bestimmung des Ferritin-Gehaltes der Proben erfolgte anhand einer extern mitgeführten 6-Punkt-Kalibrierung mit dem im Kit enthaltenen Standard für humanes Ferritin (200 ng/mL). Ausgehend von der Ferritin-Stammlösung wurden Verdünnungen mit den Konzentrationen 0,313 ng/mL, 0,625 ng/mL, 1,25 ng/mL, 2,5 ng/mL, 5,0 ng/mL in Zellextraktionspuffer angesetzt. Eine Leerwertprobe mit reinem Zellextraktionspuffer wurde ebenfalls mitgeführt. Jeweils 50 µL des entsprechenden Kalibrierstandards beziehungsweise des Puffers wurde analog der Proben für die Durchführung des ELISA eingesetzt.

4.7 Statistik

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sind als Mittelwerte unter Angabe der jeweiligen Standardabweichung angegeben. Die statistische Prüfung der Mittelwerte auf Varianzhomogenität erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA). Bei einer Homogenität der Varianzen wurde anschließend der Dunnett's T Post-Hoc-Test angewendet, bei einer Inhomogenität der Varianzen der Dunnett's T3 Test.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Löslichkeit von Aluminium im Zellkulturmedium

Die geringe Löslichkeit von Aluminium bei neutralem pH-Wert ist ein stark limitierender Faktor bei den *in vivo* beziehungsweise *in vitro* Untersuchungen zum Einfluss des Metalls auf zelluläre Prozesse. Nicht nur der pH-Wert, sondern auch unerwünschte Reaktionen mit Bestandteilen des Zellkulturmediums verringern dabei die Löslichkeit des Metalls im Testsystem (Martin, 1986; Corain *et al.*, 1992; Helmig *et al.*, 2018). Um jedoch verlässliche Aussagen bezüglich der Wirkung von Aluminium auf zellulärer Ebene treffen zu können, bedarf es einer gezielten Untersuchung aller auftretenden Metall-Spezies sowie einer quantitativen Bestimmung des tatsächlich gelösten Anteils des Leichtmetalls im Medium (Corain *et al.*, 1996). Aus diesem Grund wurden zunächst Versuche zur Löslichkeit von Aluminium in Verbindung mit Chlorid, Sulfat, Citrat oder Acetylacetonat in DMEM unter Zusatz von 10 % FKS durchgeführt. Die Festlegung des jeweiligen Konzentrationsbereichs erfolgte dabei anhand von Literaturwerten beziehungsweise eigenen Vorversuchen mit A549-Zellen.

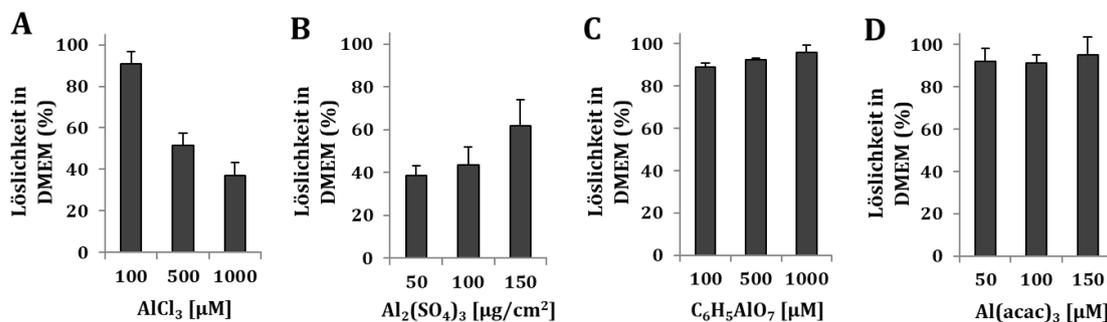


Abbildung 4: Löslichkeit von AlCl_3 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{AlO}_7$ und $\text{Al}(\text{acac})_3$ in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM). Die Aluminiumverbindungen wurden jeweils in drei unterschiedlichen Konzentrationen dem Zellkulturmedium zugesetzt und für 24 h bei 37 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt. Die Bestimmung des Aluminiumgehalts im Überstand erfolgte mittels ICP-MS und bezieht sich auf den ursprünglich eingesetzten Gehalt. Gezeigt sind die Mittelwerte + SD von 4 Werten aus zwei unabhängigen Versuchen.

Abbildung 4 fasst das Ergebnis der Untersuchungen zusammen. Von den vier getesteten Verbindungen zeigten nur Aluminiumcitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{AlO}_7$, C) und Aluminiumacetylacetonat ($\text{Al}(\text{acac})_3$, D) über den gesamten Konzentrationsbereich eine gute Löslichkeit für das Leichtmetall im Medium. Diese lag bei ≥ 90 %. Im Hinblick auf Aluminiumchlorid (AlCl_3 , A) sank der Anteil an gelöstem Aluminium im Medium konzentrationsabhängig von 90 % (100 μM) auf circa 40 % bei der 10fach höheren Konzentration (1000 μM). Für

Aluminiumsulfat ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, B) nahm der Anteil an gelöstem Aluminium im Medium hingegen mit steigender Konzentration leicht zu und lag schließlich bei 60 %.

Die begrenzte Löslichkeit von Aluminium in Verbindung mit Chlorid oder Sulfat wird auf ein Ausfallen des Metalls im Zellkulturmedium zurückgeführt. Diese Annahme stützt sich auf Untersuchungen von Helmig *et al.* (2018) zum Einsatz von Aluminiumverbindungen in zellkulturbasierten Toxizitätsstudien. Hierbei zeigte sich, dass sowohl AlCl_3 als auch $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ im Testsystem, verwendet wurde RPMI-Medium, zum Teil als Aluminiumphosphat auskristallisierten. Die Wissenschaftler analysierten die Präzipitate jeweils mittels Elektronenmikroskopie, Thermogravimetrie sowie Differentialthermoanalyse. Dabei stellten sie fest, dass die Zusammensetzung des Präzipitats ganz entscheidend von der ursprünglich eingesetzten Konzentration der Verbindung abhing. Bei den Untersuchungen zu $\text{C}_6\text{H}_5\text{AlO}_7$ wurde auch in dieser Studie kein Ausfallen des Metalls im Zellkulturmedium festgestellt. Dies wurde auf die höhere Bindungsaffinität von Al^{3+} -Ionen zu Citrat im Vergleich zu Phosphat zurückgeführt (zusammengefasst in Martin, 1986). Nur so versteht sich auch die Rolle von Citrat als wichtigster, niedermolekularer Bindungspartner für Al^{3+} -Ionen im Blutserum (Ohman und Martin, 1994; Matzapetakis *et al.*, 1999; Matzapetakis *et al.*, 2001).

Nach Corain *et al.* (1996) beruht das stark schwankende Lösungsverhalten des Leichtmetalls auf dem Prinzip der starken und schwachen Säuren. Verbindungen, in denen das Al^{3+} -Ion mit einer starken Säure wie z.B. Chlorid oder Sulfat auftritt, reagieren demnach in wässriger Lösung unter vollständiger Hydrolyse stark sauer. Im Zuge der Neutralisation des Gemischs präzipitieren die Al^{3+} -Ionen als schwerlösliches $\text{Al}(\text{OH})_3$. Ist Aluminium hingegen mit einer schwachen alpha-Hydroxycarbonsäure wie z.B. Laktat oder Citrat verbunden, kommt es erst im Millimolaren Konzentrationsbereich zu einem Ausfallen des Metalls bei neutralem pH-Wert. Eine über die Zeit andauernde, gute Löslichkeit des Metalls stellten die Wissenschaftler in Verbindung mit dem zweizähligen, organischen Liganden Acetylacetonat fest. Diese lag für den getesteten Zeitraum von 72 Stunden in neutralem Tris-HCl Puffer für eine 1 mM $\text{Al}(\text{acac})_3$ -Lösung bei konstant 100 %.

Anhand der Löslichkeitsuntersuchungen sowie der betrachteten Studien wurde $\text{Al}(\text{acac})_3$ als Modellsubstanz für alle nachfolgenden *in vitro* Versuche zum Einfluss von Aluminium auf zelluläre Prozesse in A549-Zellen ausgewählt. Diese Verbindung zeichnet sich nicht nur durch eine sehr gute Löslichkeit im Zellkulturmedium aus, sondern besitzt zudem einen lipophilen Charakter. Eine zelluläre Aufnahme durch einfache Membrandiffusion erscheint demnach als wahrscheinlich.

5.2 Einfluss von Aluminium auf zelluläre Prozesse in A549-Zellen

Die Wirkung von Aluminium auf zellulärer Ebene ist Gegenstand der aktuellen Forschung und gibt häufig Anlass für kontrovers geführte Diskussionen. Im folgenden Abschnitt werden die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Untersuchungen zum Einfluss von Aluminium in Form der Verbindung $\text{Al}(\text{acac})_3$ vorgestellt. Betrachtet wurde unter anderem der Einfluss der Verbindung auf die Viabilität sowie die Proliferation von A549-Zellen. Die Wahl der humanen Lungenkarzinomzelllinie aus dem Alveolartrakt erfolgte dabei in Anlehnung an die beruflich bedingte, inhalative Exposition des Menschen gegenüber dem Leichtmetall am Arbeitsplatz.

5.2.1 Zytotoxizitätsuntersuchungen

Die zu Beginn durchgeführten Untersuchungen zur zytotoxischen Wirkung von $\text{Al}(\text{acac})_3$ in A549-Zellen dienten der Festlegung eines geeigneten Konzentrationsbereichs für alle nachfolgenden Behandlungen der Zellen mit dieser Verbindung. Anhand der klassischen Parameter Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit wurde der akute beziehungsweise länger anhaltende Einfluss der Verbindung auf die Zellviabilität untersucht (Abbildung 5, A). Des Weiteren erfolgte die Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ im Konzentrationsbereich 50 bis 200 μM (Abbildung 5, B). Je nach experimenteller Vorgehensweise wurden dadurch Informationen zur Viabilität beziehungsweise zur metabolischen Aktivität der Zellen erhalten. Als Kontrolle dienten Zellen, die ausschließlich mit dem für die Aluminium-Stammlösung verwendeten Lösemittel DMSO (0,2 % v/v) inkubiert worden waren. Ebenfalls in Abbildung 5 dargestellt ist der Einfluss des Liganden Acetylaceton (Hacac). Er wurde separat untersucht, da diese Verbindung nicht natürlicherweise in der Zelle vorkommt.

Die 24-stündige Inkubation der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ zeigte bis zu einer Konzentration von 100 μM keinen nennenswerten Effekt auf die Anzahl sowie die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen (Abbildung 5, A). Erst ab einer Konzentration von 125 μM sank die Zellzahl im Zuge der Behandlung auf 86 % bezogen auf die Kontrolle und lag bei einer Inkubation der Zellen mit 150 μM noch bei circa 65 %. Stärkere Effekte wurden hinsichtlich der Koloniebildungsfähigkeit der Zellen festgestellt. Hier bewirkte die Inkubation der Zellen mit 125 μM $\text{Al}(\text{acac})_3$ eine Abnahme der Koloniebildungsfähigkeit auf circa 60 %. Bei Behandlung der Zellen mit der Verbindung in der höchsten getesteten Konzentration von 150 μM wurden nahezu keine Kolonien mehr gebildet. An dieser Stelle sei erwähnt, dass der Ligand weder die Anzahl noch die Koloniebildungsfähigkeit der A549-Zellen negativ beeinflusste (Daten nicht gezeigt).

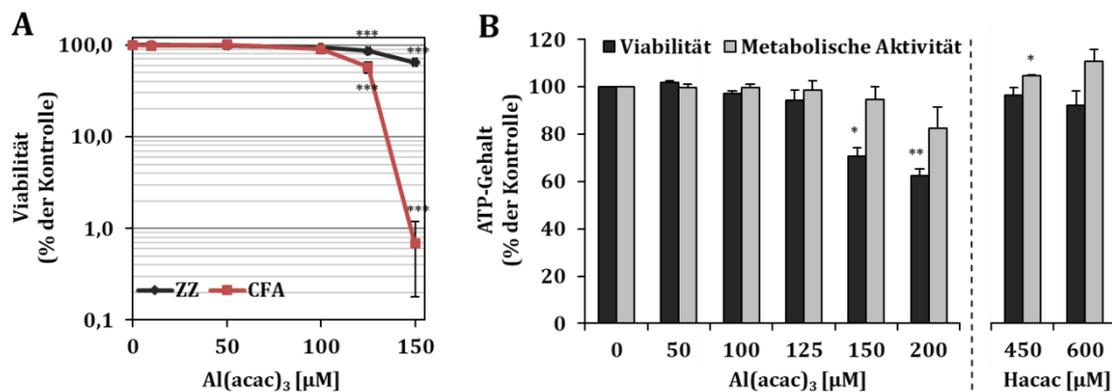


Abbildung 5: Einfluss von Aluminium auf die Zellviabilität sowie die metabolische Aktivität von A549-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit Al(acac)₃ oder dem Liganden (Hacac) inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellviabilität anhand der Parameter Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit (A) sowie die Untersuchung der Zellviabilität und metabolischen Aktivität gemessen am intrazellulären ATP-Gehalt (B). Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD aus sechs Werten aus drei unabhängigen Versuchen (A) beziehungsweise die Mittelwerte + SD aus drei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen (B). Statistische Signifikanz nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test: * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001.

Gemessen am ATP-Gehalt sank die Viabilität der Zellen konzentrationsabhängig ab einer Behandlung mit 125 µM Al(acac)₃ (Abbildung 5, B). Signifikante Effekte zeigten sich jedoch erst bei Inkubation der Zellen mit 150 µM (70 %) beziehungsweise 200 µM (61 %). Die Abnahme der Viabilität wurde dabei in erster Linie auf eine verringerte Zellzahl in den untersuchten Proben zurückgeführt. Der Ligand hatte auch hier keinen Einfluss auf die Zellviabilität. Bei der Wahl der Konzentrationen wurde die Dreifachkomplexierung von Aluminium in der Verbindung Al(acac)₃ durch den Liganden berücksichtigt (siehe Kapitel 4.3.1.2).

Die Bestimmung der metabolischen Aktivität erfolgte anhand des ATP-Gehalts von Proben mit einer definierten, gleichen Zellzahl. Dabei zeigten sich nur schwache Effekte bei Behandlung der Zellen mit Al(acac)₃ in den zwei höchsten, getesteten Konzentrationen. Die metabolische Aktivität sank dabei auf 82 % bei Behandlung mit 200 µM bezogen auf die Kontrolle. Dies deutet darauf hin, dass die metabolische Aktivität der Zellen durch Al(acac)₃ im getesteten Konzentrationsbereich nicht beziehungsweise nur sehr wenig beeinflusst wurde. Interessant war diesbezüglich das Ergebnis der Untersuchungen zum Einfluss des Liganden. Dieser hatte eine geringfügig aktivierende Wirkung auf die metabolische Aktivität der Zellen in den Konzentrationen 450 und 600 µM. Der intrazelluläre ATP-Gehalt stieg dabei auf 110 % an. Al(acac)₃ und Hacac zeigten demnach in den zueinander korrespondierenden Konzentrationen gegensätzliche Effekte auf die metabolische Aktivität der Zellen. Möglicherweise wurde der Einfluss von Al(acac)₃ durch die Anwesenheit des Liganden abgeschwächt.

An dieser Stelle sei auf die Untersuchungen von Campbell *et al.* (2001) zur Toxizität von Aluminiumacetylacetonat in humanen Neuroblastom- (SK-N-SH) und Glioblastomzellen (T98G) hingewiesen. Die Behandlung der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ führte dabei zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität. Dieser Effekt war sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig und äußerte sich verstärkt in den T98G-Zellen. Der Ligand selbst hatte auch in dieser Studie keinen Einfluss auf die Zellviabilität. Ebenfalls untersucht wurde in diesem Zusammenhang die Verbindung Aluminiumsulfat, die jedoch keine zytotoxische Wirkung auf die Zellen hatte.

Wie verbindungsspezifisch die zytotoxische Wirkung von Aluminium ist, wird anhand der Untersuchungen von Kawahara *et al.* (2001) mit neuronalen Zellen aus der Ratte deutlich. Hier führte nur die Behandlung der Zellen mit Aluminiummaltolat beziehungsweise Aluminiumacetylacetonat zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Aluminiumchlorid sowie Aluminiumlactat zeigten hingegen selbst bei einer Behandlungsdauer von 7 Tagen keine zytotoxischen Effekte.

Im Hinblick auf die geplanten Versuche zum Einfluss von Aluminium auf die DNA-Reparatur (siehe Kapitel 5.3) erfolgten weitere Untersuchungen zur zytotoxischen Wirkung von $\text{Al}(\text{acac})_3$ in Kombination mit Bestrahlung. Dafür wurden die Zellen zunächst für 24 Stunden mit der Substanz inkubiert, mit 1 Gray bestrahlt und anschließend für 8 Stunden in frischem Medium nachinkubiert. Die unbestrahlten Proben dienten als Referenz. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 zusammengefasst.

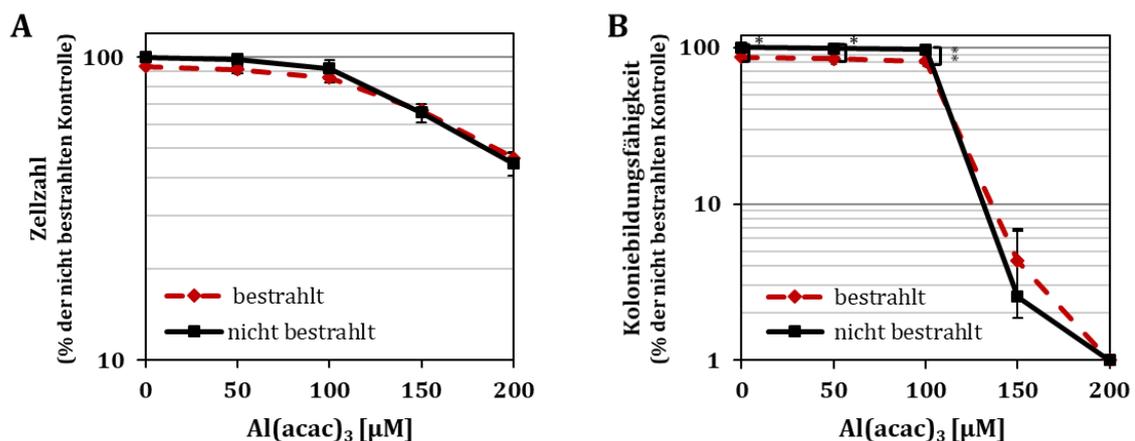


Abbildung 6: Einfluss von Aluminium auf die Zellzahl (A) und Koloniebildungsfähigkeit (B) von A549-Zellen bei zusätzlicher Bestrahlung. Die Zellen wurden für 24 h mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ inkubiert, bestrahlt (1 Gy) oder nicht bestrahlt und für 8 h in frischem Medium nachinkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellviabilität anhand der Parameter Zellzahl (A) und Koloniebildungsfähigkeit (B). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen. Statistische Signifikanz nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

Die Behandlung der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ im Konzentrationsbereich 50 bis 200 μM führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Zellzahl (Abbildung 6, A). Bei der höchsten getesteten Konzentration von 200 μM lag diese noch bei 45 %. Es zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der bestrahlten und nicht bestrahlten Proben, d.h. die durch Aluminium hervorgerufenen Effekte wurden durch die zusätzliche Bestrahlung der Zellen nicht verstärkt. Hinsichtlich der Koloniebildungsfähigkeit wurden deutliche Effekte erst ab einer Behandlung mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ in der Konzentration 150 μM festgestellt (Abbildung 6, B). Ab dieser Konzentration verloren die Zellen ihre Fähigkeit zur Koloniebildung nahezu vollständig. Die zusätzliche Bestrahlung der Zellen führte zu einer signifikant stärkeren Abnahme der Koloniebildungsfähigkeit im Vergleich zu den nicht bestrahlten Proben im unteren Konzentrationsbereich. Bis einschließlich 100 μM betrug dieser Unterschied 10-20 %. Die genauen Werte sind im Anhang tabellarisch zusammengefasst (siehe 8.8.2). Der Ligand mit und ohne Bestrahlung hatte weder einen Einfluss auf die Zellzahl noch die Koloniebildungsfähigkeit (Daten nicht dargestellt).

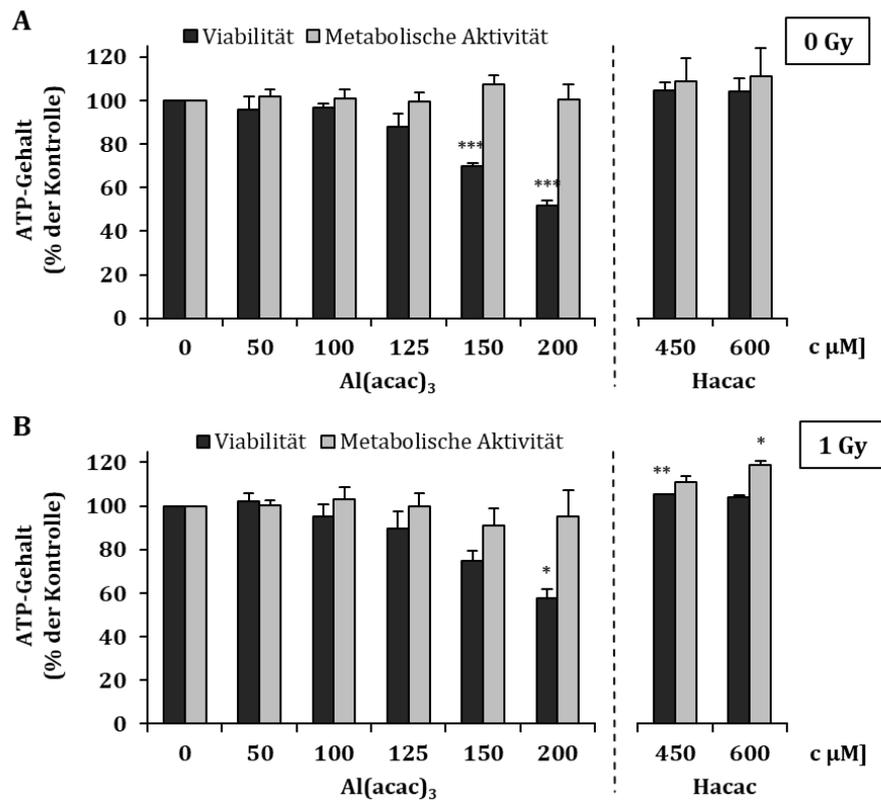


Abbildung 7: Einfluss von Aluminium auf die Viabilität und metabolische Aktivität von A549-Zellen gemessen am ATP-Gehalt bei zusätzlicher Bestrahlung. Die Zellen wurden für 24 h mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ beziehungsweise dem Liganden (Hacac) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nicht bestrahlt (A) oder bestrahlt mit 1 Gy (B) und für 8 h in frischem Medium nachinkubiert. Die Bestimmung der Zellviabilität und der metabolischen Aktivität erfolgte anhand des intrazellulären ATP-Gehalts. Gezeigt sind die Mittelwerte + SD aus drei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen. Statistische Signifikanz nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Abbildung 7 fasst das Ergebnis der Untersuchungen zur Viabilität und metabolischen Aktivität gemessen am ATP-Gehalt der Zellen bei zusätzlicher Bestrahlung zusammen. Die mit 1 Gray bestrahlten Proben (B) werden hierbei den nicht bestrahlten Proben (A) gegenübergestellt. Im Zuge der Behandlung sank die Zellviabilität mit steigender Konzentration an $\text{Al}(\text{acac})_3$ bis auf 50-60 % bei 200 μM . Dieser Effekt wurde durch die zusätzliche Bestrahlung der Zellproben um 5-10 % minimal abgeschwächt. Auch hier wird die Abnahme der Viabilität der bestrahlten und nicht bestrahlten Zellen gemessen am ATP-Gehalt auf die verminderte Zellzahl der untersuchten Proben zurückgeführt. Der Ligand bewirkte nur bei einer Konzentration von 450 μM in Kombination mit Bestrahlung eine minimale Zunahme der Viabilität. Die metabolische Aktivität der Zellen wurde weder durch die Behandlung mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ alleine noch in Kombination mit Bestrahlung beeinflusst. Ein leichter Anstieg auf ca. 120 % wurde lediglich für den Liganden bei einer Konzentration von 600 μM und einer zusätzlichen Bestrahlung festgestellt.

Anhand der Zytotoxizitätsuntersuchungen wurden für alle weiteren *in vitro* Versuche mit den Zellen $\text{Al}(\text{acac})_3$ im Konzentrationsbereich von 50 bis maximal 200 μM eingesetzt. Hierbei gilt es jedoch zu beachten, dass die zwei höchsten Konzentrationen 150 und 200 μM bereits stark zytotoxische Effekte in den A549-Zellen zeigten.

5.2.2 Untersuchung von Zelltodmechanismen

Im Rahmen der Zytotoxizitätsuntersuchungen wurde sowohl eine Abnahme der Zellzahl als auch eine verringerte Koloniebildungsfähigkeit der A549-Zellen festgestellt. Als möglicher Grund dafür wird ein vermehrtes Zellsterben diskutiert. Daher wurden die Zellproben nach der Behandlung mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ 50-200 μM mit und ohne zusätzlicher Bestrahlung auf die Induktion von Zelltodmechanismen mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Die 24-stündige Inkubation der A549-Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ im Konzentrationsbereich 50 bis 200 μM induzierte hierbei weder den Zelltodmechanismus der Apoptose noch den der Nekrose (siehe 8.8.3). Erst bei 24-stündiger Inkubation der Zellen mit 150 beziehungsweise 200 μM $\text{Al}(\text{acac})_3$ und einer anschließenden Nachinkubationszeit von 8 Stunden wurde eine geringfügige Zunahme an apoptotischen Zellen im Vergleich zur Kontrolle detektiert (Abbildung 8, A). Dieser Effekt verstärkte sich durch eine zusätzliche Bestrahlung der Proben. Der Anteil an nekrotischen Zellen blieb hingegen unverändert und lag bei allen getesteten Proben mit und ohne Bestrahlung < 1 % (Abbildung 8, B). Der Ligand selbst hatte keinen Einfluss auf den Anteil apoptotischer oder nekrotischer Zellen.

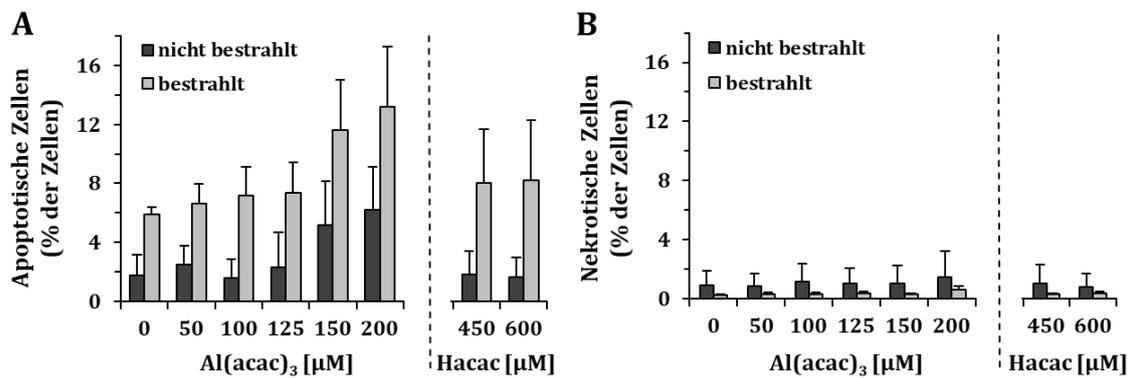


Abbildung 8: Einfluss von Aluminium auf die Apoptose (A) und die Nekrose (B) in A549-Zellen mit und ohne Bestrahlung. Die Zellen wurden für 24 h mit Al(acac)₃ bzw. Hacac inkubiert, nicht bestrahlt oder bestrahlt (1 Gy) und für acht Stunden in frischem Medium nachinkubiert. Der Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen wurde anhand der Annexin V-FITC und PI-Färbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte + SD von drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

Auch Lankoff *et al.* (2006) stellten im Rahmen ihrer Untersuchungen zum Einfluss von Aluminium auf die DNA und DNA-Reparaturprozesse in humanen Blutlymphozyten eine Zunahme an früh- und spät-apoptotischen Zellen fest. Dafür wurden die Zellen zunächst mit AlCl₃ der Konzentration 1-25 μg/mL für 72 Stunden behandelt und anschließend der Anteil an apoptotischen Zellen mittels Comet Assay und Durchflusszytometrie bestimmt. Verglichen mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit führte die Behandlung der Blutlymphozyten mit AlCl₃ zu einer wesentlich stärkeren Zunahme an apoptotischen Zellen um bis zu 30 %. Dies wird neben den Unterschieden in der Zelllinie und der Aluminiumverbindung auf die deutlich längere Nachinkubationszeit von 72 Stunden im Vergleich zu 8 Stunden zurückgeführt. Eine Zunahme an nekrotischen Zellen stellten jedoch auch Lankoff *et al.* nicht fest.

Die Untersuchung der Zelltodmechanismen zeigt, dass die Abnahme der Zellzahl bei Behandlung der A549-Zellen mit Al(acac)₃ nicht auf ein vermehrtes Zellsterben zurückgeführt werden kann. Ob dies auch für den Verlust der Koloniebildungsfähigkeit zutrifft, gilt es durch Versuche mit einer längeren Nachinkubationszeit zu überprüfen. Alternativ kommt ein Zellzyklusarrest in Frage, was im Folgenden näher untersucht wurde.

5.2.3 Untersuchung der Zellzyklusregulation und Proliferation

Die Untersuchungen zur Zellzyklusregulation und Proliferation erfolgten am Durchflusszytometer unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), der in die zelluläre DNA interkaliert und sie dadurch anfärbt.

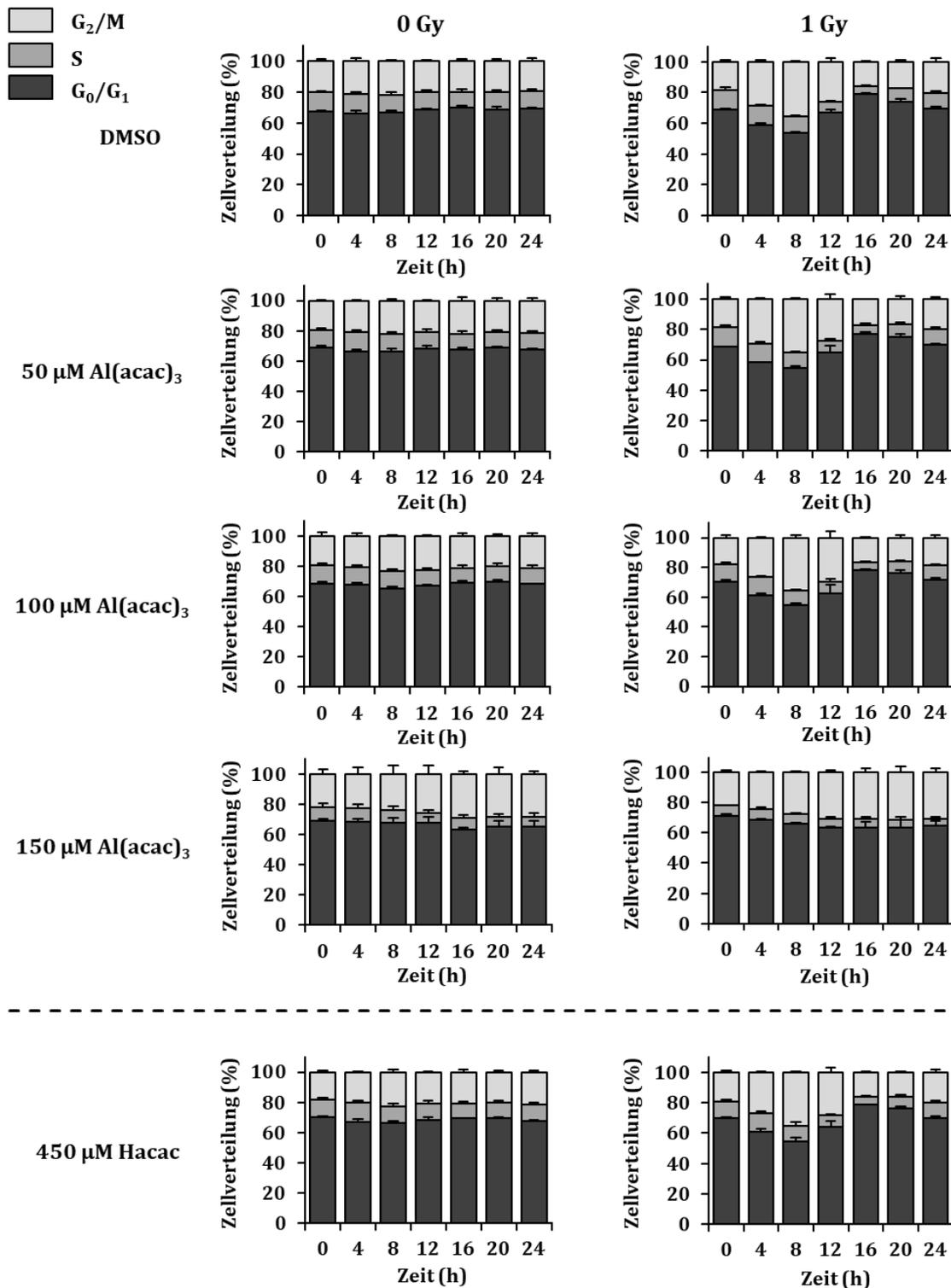


Abbildung 9: Einfluss von Aluminium auf die Zellzyklusphasenverteilung mit und ohne Bestrahlung. A549-Zellen wurden für 24 h mit Al(acac)₃ inkubiert, mit 1 Gy bestrahlt oder nicht bestrahlt und in frischem Medium nachinkubiert. Der Einfluss des Liganden (Hacac) wurde in der höchsten korrespondierenden Konzentration ebenfalls getestet. Die Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen wurde mittels DAPI-Färbung am Durchflusszytometer erfasst. Gezeigt sind die Mittelwerte + SD von drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

Abbildung 9 fasst das Ergebnis der Zellzyklusuntersuchungen zusammen. Die Zellen wurden dafür 24 Stunden mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ im Konzentrationsbereich 50-150 μM behandelt, bestrahlt mit 1 Gray oder nicht bestrahlt und für 0-24 Stunden in frischem Medium nachinkubiert. Der Einfluss des Liganden wurde in der höchsten, zu $\text{Al}(\text{acac})_3$ 150 μM korrespondierenden Konzentration ebenfalls untersucht.

Die Behandlung der Zellen mit 50 beziehungsweise 100 μM $\text{Al}(\text{acac})_3$ hatte keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung. Wie auch bei der Kontrolle befanden sich hier circa 70 % der unbestrahlten Zellen in der G_0/G_1 -, 10 % in der S- und die verbleibenden 20 % in der G_2/M -Phase. Dieses Verteilungsverhältnis der Zellzyklusphasen in unbehandelten A549-Zellen findet sich auch in Studien anderer Wissenschaftler (Chairuangkitti *et al.*, 2013). Erst die Behandlung der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ in der höchsten getesteten Konzentration von 150 μM äußerte sich ab einer Nachinkubationszeit von 12 Stunden in einer leichten Zunahme der G_2/M -Phase auf Kosten der S-Phase. Dieser Effekt verstärkte sich mit zunehmender Nachinkubationszeit. Der Ligand in der Konzentration 450 μM hatte keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung der Zellen.

Durch die zusätzliche Bestrahlung mit 1 Gray wurde in den Kontrollzellen, den mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ 50 bzw. 100 μM behandelten Zellen sowie den mit Hacac 450 μM behandelten Zellen ein G_2 -Zellzyklusphasenarrest ausgelöst. Diese Annahme stützt sich auf Untersuchungen anderer Wissenschaftler zum strahlungsinduzierten G_2/M -Arrest in A549-Zellen (Parshad *et al.*, 1984; Stuschke *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2013). Die Folgen des Arrests waren dabei 8 Stunden nach der Bestrahlung am deutlichsten ausgeprägt. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich circa 55 % der Zellen in der G_0/G_1 -, 10 % der Zellen in der S- und 35 % der Zellen in der G_2/M -Phase. Anschließend nahm der Anteil an Zellen in der G_0/G_1 -Phase wieder deutlich zu und der Anteil an Zellen in der S- beziehungsweise G_2/M -Phase ab. Der G_2 -Zellzyklusphasenarrest bestand demnach nur vorübergehend und wurde wieder aufgehoben. 24 Stunden nach der Bestrahlung hatte sich die Zellpopulation vollständig erholt und es lag die ursprüngliche Verteilung der Zellen mit 70 % in der G_0/G_1 -, 10 % in der S- und 20 % in der G_2/M -Phase vor.

Eine andere Zellzyklusverteilung zeigte sich bei Inkubation der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ in der Konzentration 150 μM . Hier bewirkte die zusätzliche Bestrahlung der A549-Zellen eine Verstärkung des bereits durch die Verbindung selbst ausgelösten Effekts. Das heißt, der Anteil an Zellen in der G_0/G_1 - und der S-Phase nahm leicht ab, derjenige in der G_2/M -Phase zu. Diese Verschiebung der Zellzyklusverteilung war 12 Stunden nach der Bestrahlung am stärksten ausgeprägt und über den weiteren betrachteten Zeitraum persistent. Nach 24 Stunden befanden sich circa 65 % der Zellen in der G_0/G_1 -, 5 % in der S- und 30 % in

der G₂/M-Phase. Die Abnahme der G₀/G₁- und vor allem der S-Phase wird dabei sowohl auf einen G₁- als auch einen G₂-Zellzyklusphasenarrest zurückgeführt.

Es gibt wenige Studien, die sich gezielt mit dem Einfluss von Aluminium auf den Zellzyklus humaner Zellen befassen. In der bereits erwähnten Studie von Lankoff *et al.* (2006) mit humanen Lymphozyten nahm der Anteil an Zellen in der G₀/G₁-Phase im Zuge der Behandlung mit AlCl₃ wie auch im oben beschriebenen Experiment ab. Gleichzeitig stieg der Anteil von Zellen in der S-, nicht jedoch der G₂-Phase stark an. In diesem Zusammenhang diskutiert wurde sowohl eine durch AlCl₃-induzierte Verlangsamung des Zellzyklus als auch ein S-Phasenarrest zur Reparatur von oxidativen DNA-Schäden. Vertiefende Untersuchungen veranlassten die Wissenschaftler schließlich zu der Aussage, dass die Zunahme von Zellen in der S-Phase auf einer Entfernung von geschädigten DNA-Basen während der DNA-Replikation beruht. Das Auftreten eines Zellzyklusarrests als Folge einer DNA-Schädigung wird durch eine Vielzahl an Studien belegt (zusammengefasst in Roos *et al.*, 2016; Hustedt und Durocher, 2017).

Grund für die Zellzyklusuntersuchungen war die Frage, ob ein Arrest für die Abnahme der Zellviabilität ab einer Behandlung der Zellen mit Al(acac)₃ > 100 µM mit und ohne Bestrahlung verantwortlich gemacht werden kann. Diese Vermutung wurde durch die Feststellung eines G₂- und einem etwas verzögert einsetzenden G₁-Phasenarrest im Zuge der Behandlung mit der höchsten Konzentration in den Zellen bestätigt. Inwieweit dies auf einer Schädigung der DNA beziehungsweise einer Hemmung von DNA-Reparaturprozessen durch Aluminium beruht, wird im folgenden Kapitel näher betrachtet.

5.3 Einfluss von Aluminium auf die DNA und damit assoziierte Reparaturwege in A549-Zellen

Aluminium in Form seines dreifach positiv geladenen Ions hat eine große Affinität zu negativ geladenen Gruppen, Partialladungen inbegriffen. Im Hinblick auf die DNA bedeutet dies, dass die Aluminiumionen bevorzugt mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der DNA sowie den Sauerstoffatomen der DNA-Basen wechselwirken. Infolgedessen kann es zu strukturellen Veränderungen der DNA kommen (Rao und Stein, 2003; zusammengefasst in Bharathi *et al.*, 2008). Es mehren sich die Hinweise, dass die Interaktion des Leichtmetalls mit der DNA ein wichtiger Parameter für dessen toxische Wirkung ist (Achary *et al.*, 2008; Sappino *et al.*, 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb der Einfluss von Aluminium in Form der Verbindung Al(acac)₃ auf die DNA und damit assoziierte Reparaturwege mithilfe der Alkalischen Entwindung, der Pulsfeld-Gelelektrophorese sowie der Immunfluoreszenz-Spektroskopie untersucht.

5.3.1 Entstehung und Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen

Die Untersuchung der Induktion und Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen erfolgte anhand der Methode der Alkalischen Entwindung. Hierbei kommt es durch die Zugabe einer alkalischen Lösung zur Entwindung der zellulären DNA an Einzelstrangbrüchen. Die anschließende Trennung der einzel- und doppelsträngigen DNA erfolgt durch eine Hydroxylapatitchromatographie und der quantitative Nachweis ihrer jeweiligen Anteile durch die Interkalation des DNA-Farbstoffs Hoechst mittels Fluoreszenzspektroskopie (Hartwig *et al.*, 1993). Abbildung 10 informiert über den Anteil doppelsträngiger (ds) DNA bei Behandlung der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ oder Hacac mit und ohne H_2O_2 . Ebenfalls aufgeführt ist das Ergebnis einer Positiv- (PK) und einer Negativkontrolle (NK).

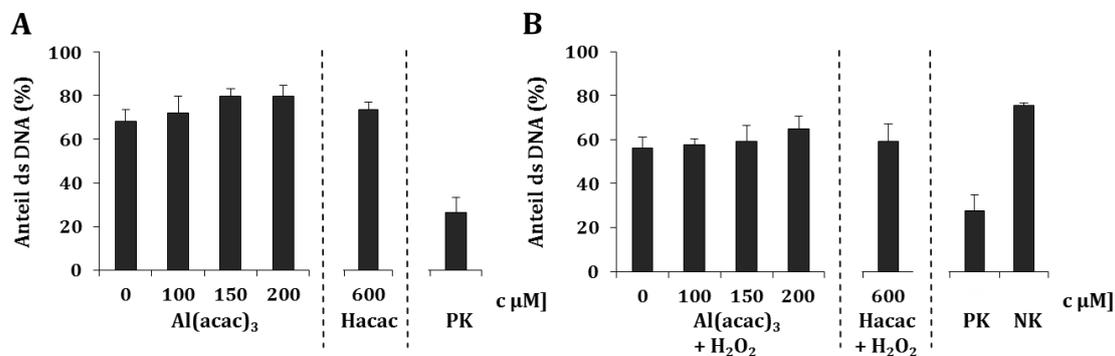


Abbildung 10: Einfluss von Aluminium auf den Anteil an doppelsträngiger (ds) DNA in A549-Zellen als Indikator für die Entstehung von DNA-Einzelstrangbrüchen. Für die Untersuchung der Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen wurden die Zellen für 24 h mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ bzw. Hacac inkubiert und entweder direkt mittels Alkalischer Entwindung analysiert (A) oder zusätzlich für 5 min mit H_2O_2 coinkubiert mit einer anschließenden Nachinkubation von 30 min (B). Bei der Negativkontrolle (NK) handelt es sich um Zellen, die ausschließlich mit DMSO (0,2 % v/v) behandelt wurden. Zellen der Positivkontrolle (PK) wurden für 5 min mit H_2O_2 inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD aus mind. zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen.

Die Behandlung der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ im Konzentrationsbereich 100-200 μM führte weder zu einem Anstieg an DNA-Einzelstrangbrüchen (Abb. 10, A), noch zu einer Hemmung der DNA-Einzelstrangbruchreparatur bei Co-Inkubation mit H_2O_2 (Abb. 10, B). Gleiches gilt für den Liganden Hacac. Dass die Methode an sich funktionierte, zeigt sich anhand dem geringen Anteil an doppelsträngiger DNA (circa 30 %) in der Positivkontrolle. Hierfür wurden die Zellen für 5 min mit H_2O_2 inkubiert und die Reaktion sofort gestoppt. Die Negativkontrolle (NK) wurde ausschließlich mit DMSO (0,2 % v/v) behandelt.

Zwar wurde für Aluminium eine genotoxische Wirkung im zellulären System festgestellt (Lankoff *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2007), jedoch lassen die von den Autoren gewählten Detektionsmethoden keine Unterscheidung bezüglich der Art der DNA-Schädigung zu. Eine Differenzierung zwischen DNA-Doppelstrang- und DNA-Einzelstrangbrüchen ist

demnach nicht möglich. Gezielte Studien mit humanen Zellen zur Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen durch das Leichtmetall sind der Autorin zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt.

5.3.2 Entstehung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Dieses Kapitel befasst sich mit dem Einfluss von Aluminium in Form der Verbindung $\text{Al}(\text{acac})_3$ auf die Entstehung sowie die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen. Hierbei handelt es sich, gemessen an den möglichen Folgen, um die schwerwiegendste Art der DNA-Schädigung (zusammengefasst in Hoeijmakers, 2001).

Für einen ersten Überblick und zur Detektion der Gesamtheit aller auftretenden DNA-Doppelstrangbrüche wurde die Methode der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) eingesetzt. Die besondere Stärke der Methode beruht dabei auf der Trennung vergleichsweise großer DNA-Fragmente von bis zu 10 Mbp im Vergleich zur maximalen Trenngröße von 50 kbp bei der klassischen Agarose-Gelelektrophorese. Dafür verantwortlich ist ein sich ständig in der Richtung wechselndes elektrisches Feld, wodurch kürzere DNA-Fragmente schneller durch das Gel wandern und längere Fragmente verstärkt zurückbleiben (Herschleb *et al.*, 2007).

In Abbildung 11 sind zwei repräsentative Gele der PFGE dargestellt. Sie zeigen den Einfluss der Verbindung $\text{Al}(\text{acac})_3$ auf die DNA von A549-Zellen. Für die Untersuchung einer möglichen Inhibierung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur durch das Metall wurden die Zellproben zum Teil zusätzlich bestrahlt. Eine Strahlungs-dosis von 1 Gray erzeugt dabei circa 40 DNA-Doppelstrangbrüche pro Zelle. Dies variiert je nach Zelllinie und Zeitpunkt der Bestrahlung (zusammengefasst in Ward, 1990; Goodhead, 1994). Die Auswertung des Gels erfolgte optisch anhand der Länge und der Intensität des Schweißes der einzelnen Proben im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Dabei galt: Je länger und intensiver gefärbt der Schweiß, desto mehr DNA-Doppelstrangbrüche lagen in der Proben-DNA vor.

Die 24-stündige Inkubation der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ im Konzentrationsbereich 100-200 μM bewirkte keine Zunahme an DNA-Doppelstrangbrüchen. Ebenfalls vergleichbar war das Ausmaß der DNA-Schädigung der bestrahlten Proben und der bestrahlten Kontrolle gemessen anhand der Schweißintensitäten im Gel. Gleiches gilt für den Liganden (Abbildung 11, A). Erst bei einer 8-stündigen Nachinkubation zeigten sich für die mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ 150 und 200 μM behandelten Zellproben ein Schweiß als Indikator für das Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen. Dabei nahm die Schweißintensität, sprich die Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen, mit steigender Konzentration zu (Abbildung 11, B).

Die ausbleibende Detektion einer DNA-schädigenden Wirkung bei sofortigem Abbruch der Reaktion wird deshalb primär auf die geringe Sensitivität der Methode zurückgeführt. Da die Schweifintensitäten der mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ 150 bzw. 200 μM behandelten Proben 8 Stunden nach der Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle weniger abnahmen, wird ebenfalls von einer Hemmung der Reparatur strahlungsinduzierter DNA-Doppelstrangbrüche durch die Substanz ausgegangen (Abbildung 11, B). Der Ligand hatte keinen Einfluss auf die DNA-Doppelstrangbruchreparatur.

Aluminium in Form der Verbindung $\text{Al}(\text{acac})_3$ zeigte im gewählten Testsystem sowohl eine DNA-schädigende als auch eine Reparatur-hemmende Wirkung ab einer Konzentration von 150 μM . An dieser Stelle sei nochmals darauf hingewiesen, dass bei dieser Konzentration bereits stark zytotoxische Effekte in den Zellen auftraten.

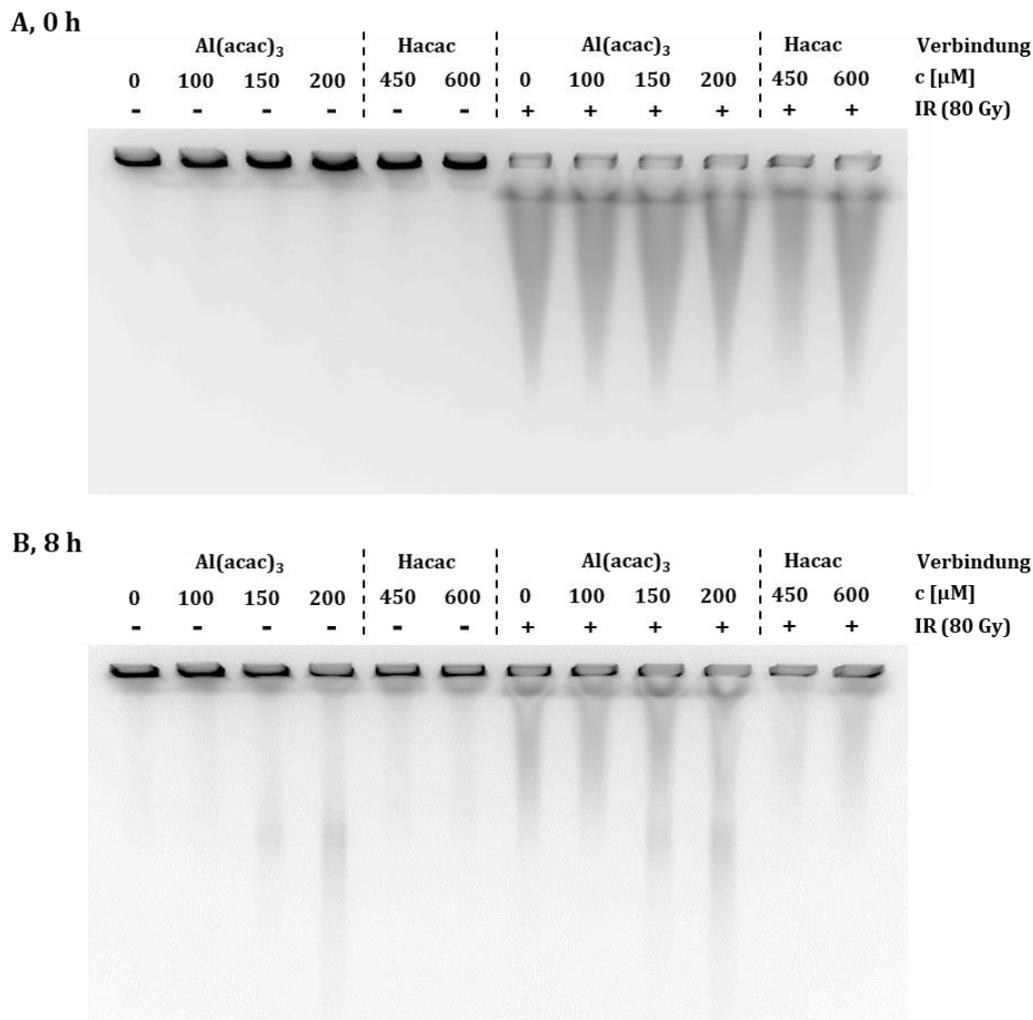


Abbildung 11: Aufnahmen einer Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) zur Untersuchung des Einflusses von Aluminium auf die Entstehung und Reparatur von DSB. A549-Zellen wurden mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ für 24 h inkubiert, je nach Probe mit 80 Gy bestrahlt (IR) und entweder nicht (A) oder für 8 h in frischem Medium nachinkubiert (B). Die Auftrennung der zellulären DNA erfolgte mittels PFGE innerhalb von 92 h. Der Einfluss des Liganden (Hacac) wurde ebenfalls untersucht.

Das Ergebnis der PFGE bestätigt die *in vitro* Untersuchungen von Lankoff *et al.* (2006) an humanen Lymphozyten unter Verwendung des alkalischen Comet Assays. Die Behandlung der Zellen mit AlCl_3 führte dabei sowohl zu einer Schädigung der DNA als auch zu einer Hemmung der Reparatur zuvor strahlungsinduzierter DNA-Brüche. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig. Eine Differenzierung zwischen DNA-Einzel- und DNA-Doppelstrangbrüchen war in dieser Studie aufgrund des gewählten pH-Werts jedoch nicht möglich.

Im Anschluss an die allgemeinen Untersuchungen mittels PFGE zum Einfluss von Aluminium auf die Entstehung sowie die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen wurden einzelne Parameter genauer betrachtet. Der Fokus lag dabei auf wichtigen DNA-Reparaturproteinen wie z.B. γH2AX .

5.3.2.1 Einfluss von Aluminium auf γH2AX

Das Protein H2AX gehört zur Gruppe der Histone, die aufgrund ihrer komplexbildenden Eigenschaften ganz entscheidend zur Stabilisierung der Erbinformation beitragen. Im Falle einer Schädigung der DNA wird das Protein an der Aminosäure Serin 139 phosphoryliert, so dass γH2AX entsteht. Diese Form des Proteins gilt als besonders empfindlicher und selektiver Indikator für das Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen und kann mithilfe der spezifischen Antikörperfärbung durch Immunfluoreszenzspektroskopie in der Zelle nachgewiesen werden. Ein Focus markiert dabei einen Doppelstrangbruch in der zellulären DNA (Burma *et al.*, 2001; zusammengefasst in Mah *et al.*, 2010).

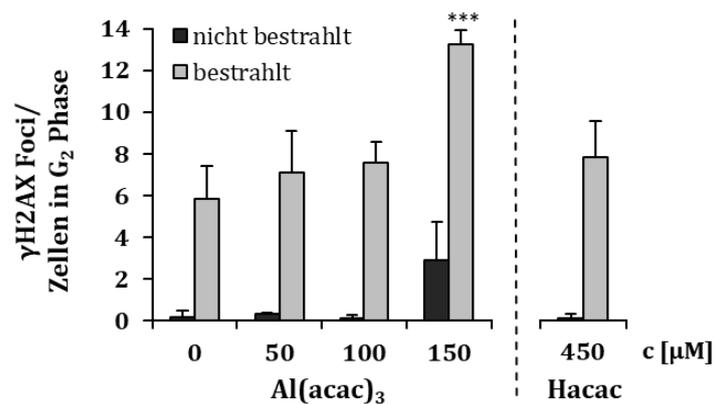


Abbildung 12: Einfluss von Aluminium auf die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen gemessen an der Anzahl von γH2AX -Foci in Zellen der G_2 -Phase. A549-Zellen wurden mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ für 24 h inkubiert, zur Schadenssetzung teilweise mit 1 Gy bestrahlt (IR) und für 8 h in frischem Medium nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T beziehungsweise Dunnett T3-Test: *** $p \leq 0,001$.

Abbildung 12 zeigt den Einfluss der Verbindung $\text{Al}(\text{acac})_3$ auf die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen gemessen an der Anzahl immunfluoreszenzmarkierter γH2AX -Foci in bestrahlten und nicht bestrahlten A549-Zellen. Anhand des Ergebnisses wird deutlich, dass nur die Behandlung der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ in der höchsten Konzentration von $150\ \mu\text{M}$ zu einer Zunahme an γH2AX -Foci führte und demnach einen Einfluss auf die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen hatte. Dieser Effekt äußerte sich verstärkt in der bestrahlten Probe und war signifikant bezogen auf die bestrahlte Kontrolle. Im Hinblick auf die toxische Wirkung des Leichtmetalls wird deshalb vermutet, dass primär eine Hemmung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur und weniger eine Schädigung selbst von Bedeutung ist. Gemessen an der Anzahl detektierter γH2AX -Foci hatte der Ligand keinen Einfluss auf die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen. Die auftretenden Effekte bei Behandlung mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ $150\ \mu\text{M}$ können folglich allein dem Metall zugeschrieben werden.

Auch die Studie von Sappino *et al.* (2012) befasst sich mit dem Einfluss von Aluminium auf die genomische Stabilität, speziell der Entstehung sowie der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen. In Anlehnung an den Einsatz des Metalls in Antitranspirantien wurden hierfür humane MCF-10A Brustepithelzellen mit AlCl_3 im Konzentrationsbereich $10\text{-}300\ \mu\text{M}$ inkubiert, teilweise bestrahlt und anschließend die Anzahl an γH2AX -Foci pro Zellkern ebenfalls mithilfe der Immunfluoreszenzspektroskopie bestimmt. Festgestellt wurde dabei eine Zunahme an γH2AX -Foci in proliferierenden, nicht jedoch konfluent wachsenden MCF-10A Zellen bei einer steigenden Konzentration an AlCl_3 . Diese war bei einer 16-stündigen Inkubation der Zellen im Vergleich zur 1-stündigen Inkubation wesentlich stärker ausgeprägt. Die zeitverzögerte Wirkung veranlasste die Forscher zu der Annahme, dass die Wirkung des Metalls indirekten Mechanismen zugeschrieben werden kann und möglicherweise auf einer Hemmung der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beruht. Diese Hypothese wurde durch die anschließende Untersuchung der mit 1 Gray bestrahlten und für 8 beziehungsweise 24 Stunden nachinkubierten Zellproben jedoch nicht bestätigt. Insgesamt wurde in dieser Studie folglich keine Hemmung der Reparatur durch das Metall festgestellt. Möglicherweise lässt sich dies jedoch auf die Auswahl an Zellen zur Bestimmung der Foci-Anzahl zurückführen. Hierbei differenzierten die Forscher nicht zwischen den einzelnen Zellzyklusphasen, so dass die ermittelten Werte aller Voraussicht nach auf einer Mischung aus Zellen der G_1 -, S- und G_2 -Phase basieren. Die Anzahl an detektierten γH2AX -Foci hängt jedoch stark von der jeweiligen Zellzyklusphase ab. Dabei treten in der G_2 -Phase circa doppelt so viele Foci wie in der G_1 -Phase auf. Dies beruht auf dem doppelten Chromosomensatz der Zelle kurz vor

der Zellteilung (Beucher *et al.*, 2009). Hinsichtlich der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen muss zudem zwischen zwei Reparaturwegen, dem nicht-homologen *end joining* (NHEJ) und der homologen Rekombination (HR) unterschieden werden. Das NHEJ stellt dabei den primären Reparaturweg für strahlungsinduzierter DNA-Doppelstrangbrüche dar. Es findet sowohl in der G₁- als auch in der frühen G₂-Phase statt. Die HR erfolgt hingegen ausschließlich in der späten S- und G₂-Phase, da für die Reparatur des Schadens das Schwesterchromatid benötigt wird (Beucher *et al.*, 2009; zusammengefasst in Iyama und Wilson, 2013). Je nachdem, welcher Reparaturweg durch Aluminium nun möglicherweise gehemmt wird, ist die Wahl der zur Auswertung herangezogenen Zellen folglich ein ganz entscheidender Parameter.

Dieser Aspekt wurde in den nachfolgenden Untersuchungen zum Einfluss von Al(acac)₃ auf die DNA-Doppelstrangbruchreparatur aufgegriffen und näher betrachtet. Als Indikator diente dabei das Protein Rad51, da es eine wichtige Funktion bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels HR einnimmt.

5.3.2.2 Einfluss von Aluminium auf Rad51

Humanes Rad51 besteht aus insgesamt 339 Aminosäuren mit einem Gesamtgewicht von 36,9 kDa. Dieses Protein bindet sowohl an einzelsträngige als auch an doppelsträngige DNA und übernimmt eine entscheidende Rolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen im Zuge der HR. Hierbei lagert sich Rad51 zunächst an die prozessierten Enden des geschädigten DNA-Strangs an, um im weiteren Verlauf die homologen DNA-Bereiche im Schwesterchromatid zu identifizieren und einen Strangaustausch zu vermitteln (zusammengefasst in Baumann und West, 1998; Heyer *et al.*, 2010). Der spektroskopische Nachweis des immunfluoreszenzmarkierten Proteins wird dabei in der Wissenschaft zur Untersuchung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur mittels HR und der dabei involvierten Proteine vielfältig eingesetzt (Yuan *et al.*, 2003; van Veelen *et al.*, 2005; Orre *et al.*, 2006).

Abbildung 13 fasst das Ergebnis der Untersuchungen zum Einfluss von Aluminium in Verbindung mit Acetylacetonat auf die Bildung von Rad51-Foci in Zellen der G₂-Phase als Indikator für die Reparatur strahlungsinduzierter DNA-Doppelstrangbrüche mittels HR zusammen. Der Einfluss des Liganden in der zu Al(acac)₃ 150 µM korrespondierenden Konzentration wurde ebenfalls untersucht und ist dargestellt.

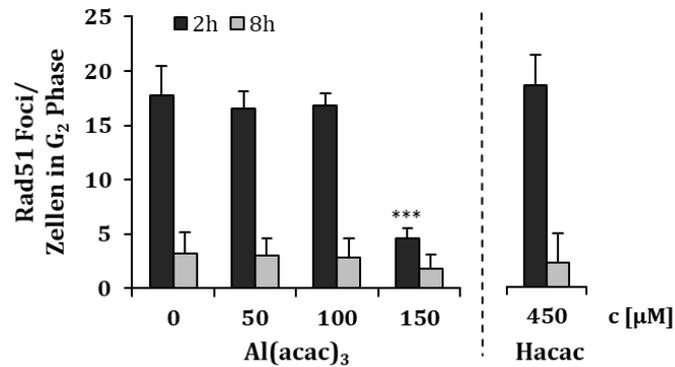


Abbildung 13: Einfluss von Aluminium auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen gemessen an der Anzahl von Rad51-Foci in Zellen der G₂-Phase. A549-Zellen wurden mit Al(acac)₃ für 24 h inkubiert, zur Schadenssetzung mit 1 Gy bestrahlt (IR) und für 2 bzw. 8 h in frischem Medium nachinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T beziehungsweise Dunnett T3-Test: *** p ≤ 0,001.

Durch die Bestrahlung der Zellproben mit 1 Gray wurden DNA-Doppelstrangbrüche induziert. Dies zeigte sich 2 Stunden nach der Bestrahlung anhand der Detektion von Rad51-Foci in Zellen der G₂-Phase. Gezählt wurden dabei circa 18 Foci pro Zellkern für die Kontrolle, den mit Al(acac)₃ 50 und 100 µM behandelten Proben sowie für den Liganden. Acht Stunden nach der Bestrahlung lag die Anzahl detektierter Rad51-Foci noch bei circa 3 pro Zelle, so dass von einer erfolgreichen Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche durch die HR ausgegangen werden kann. Eine Ausnahme bildete hierbei die mit Al(acac)₃ 150 µM behandelte Zellprobe. Zwei Stunden nach der Bestrahlung wurden in diesen Zellen signifikant weniger Rad51-Foci (< 5) im Vergleich zu den anderen Proben festgestellt. Die Abnahme der Foci-Anzahl 8 Stunden nach der Bestrahlung fiel dementsprechend gering aus. Dieses Ergebnis kann verschiedene Ursachen haben. Denkbar ist, dass die zelluläre Konzentration des Proteins zu gering war, als dass die Gesamtheit aller Schäden hätte detektiert werden können. Ebenfalls möglich ist, dass zwar genug Rad51-Protein in der Zelle vorhanden war, aber die Anlagerung des Proteins an den DNA-Doppelstrangbruch effektiv verhindert wurde. Für die Untersuchung der ersten Möglichkeit wurden A549-Zellen 24 Stunden mit Al(acac)₃ inkubiert, die Zellen lysiert und die Zellproteine elektrophoretisch aufgetrennt. Der spezifische Nachweis von Rad51 erfolgte anschließend mittels Western Blot und das Ergebnis ist in Abbildung 14 dargestellt. Schon rein optisch (A) zeigt der Western Blot, dass der Gehalt an Rad51 konzentrationsabhängig abnahm. Das Protein Actin wurde als Ladekontrolle eingesetzt und bestätigt, dass für alle Proben vergleichbare Mengen an Protein aufgetragen wurden. Die quantitative Auswertung (B) bestätigt dieses Ergebnis. Die Abnahme des zellulären Rad51 Gehalts war

konzentrationsabhängig und ab einer Behandlungskonzentration von 125 μM $\text{Al}(\text{acac})_3$ signifikant. Bei einer Behandlung der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ 150 μM sank der intrazelluläre Gehalt von Rad51 auf 20 % bezogen auf die Kontrolle. Der Ligand zeigte keinen Einfluss auf den intrazellulären Gehalt an Rad51, so dass die für $\text{Al}(\text{acac})_3$ detektierten Effekte eindeutig auf das Metall zurückgeführt werden konnten. Die fehlende Detektion von Rad51-Foci in der Immunfluoreszenzspektroskopie beruht folglich primär auf einer verminderten zellulären Konzentration des Proteins.

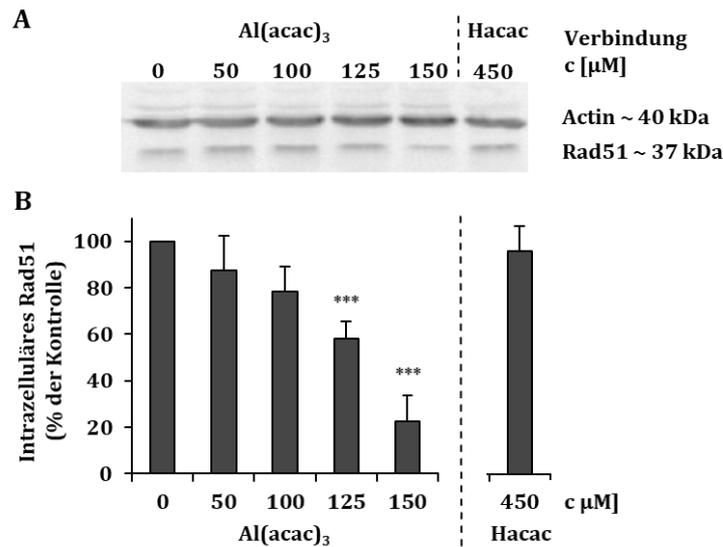


Abbildung 14: Einfluss von Aluminium auf den intrazellulären Gehalt von Rad51. A549-Zellen wurden für 24 h mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ bzw. dem Liganden inkubiert. Die Bestimmung des zellulären Rad51-Gehaltes erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung der Zellproteine mittels Western Blot und spezifischer Antikörperfärbung von Rad51. Gezeigt sind die Mittelwerte + SD aus drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-Test: *** $p \leq 0,005$.

Als denkbare Ursache für die Abnahme des zellulären Gehaltes von Rad51 kommt eine Hemmung der Transkription des für Rad51 codierenden Gens in Frage. Im Rahmen der nachfolgenden Genexpressionsanalysen wurde dieser Aspekt aufgegriffen.

5.4 Einfluss von Aluminium auf die Genexpression in A549-Zellen

Die Genexpressionsanalysen erfolgten anhand der im Arbeitskreis etablierten Methode der *High-throughput RT qPCR* (Fischer *et al.*, 2016). Die untersuchten Gene lassen sich dabei unterschiedlichen Signalwegen zuordnen wie z.B. der Proliferation und des Zellzyklus, der Apoptose, der oxidativen Stressantwort, der DNA-Schadensantwort und -Reparatur sowie dem Fremdstoffmetabolismus. Ebenfalls untersucht wurde die Expression wichtiger Transkriptionsfaktoren.

Ergebnisse und Diskussion

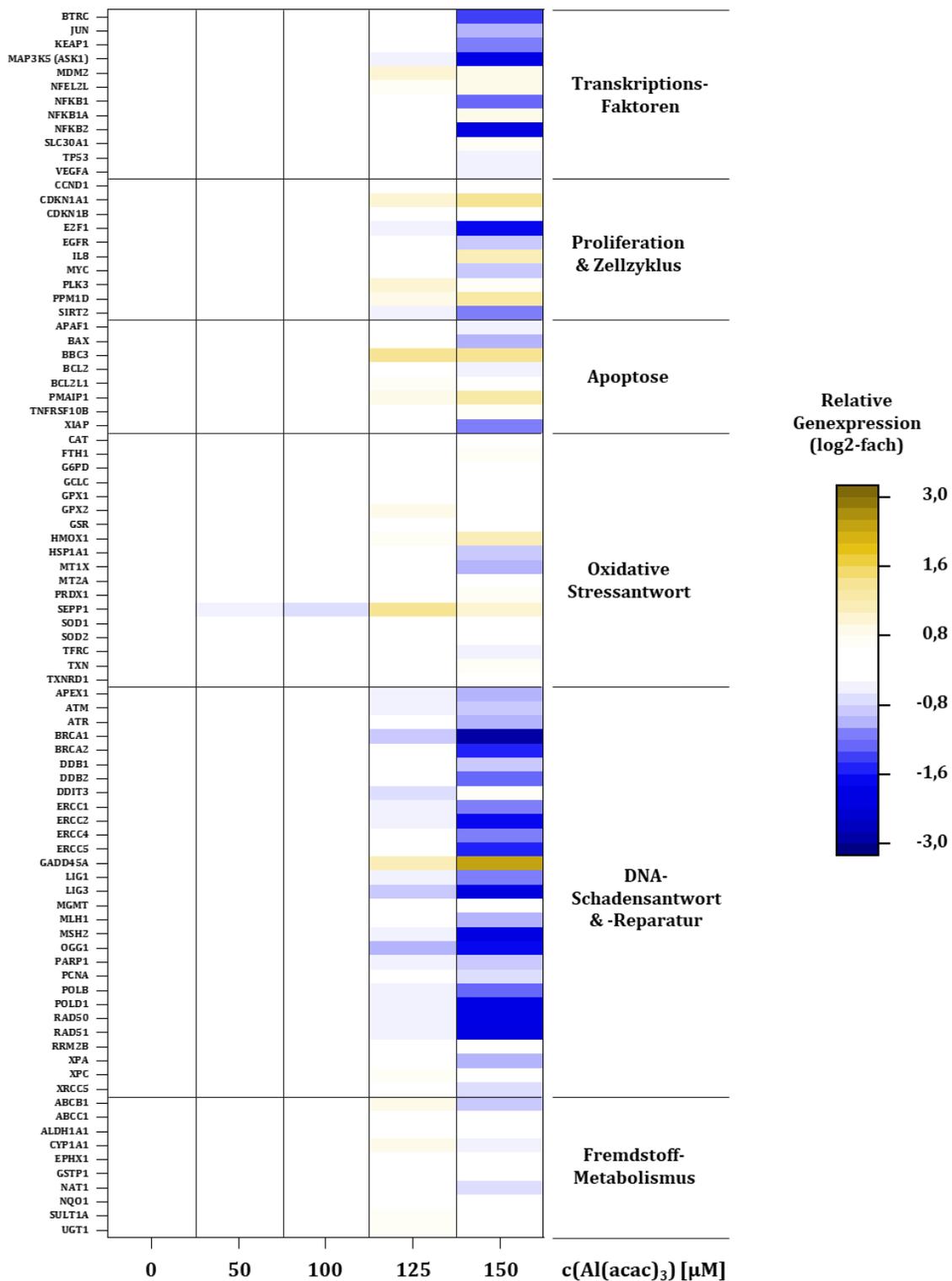


Abbildung 15: Einfluss von Aluminium auf die Expression ausgewählter Gene in A549-Zellen, dargestellt in Form einer Heatmap. Die Zellen wurden für 24 h mit Al(acac)₃ behandelt und anschließend die relative Genexpression mittels *High-throughput RT qPCR* bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (log₂-fach) aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen. Ein Wert ≥ 1 (Braunfärbung) steht für die Induktion des entsprechenden Gens, ein Wert ≤ -1 (Blaufärbung) hingegen für eine Repression.

Abbildung 15 fasst das Ergebnis der Genexpressionsuntersuchungen in Form einer Heatmap zusammen. Dargestellt ist die relative Expression ausgewählter Gene der für 24 Stunden behandelten Proben im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle in der logarithmischen Zahlenskala. Ein Wert ≥ 1 signalisiert dabei eine Induktion, ein Wert ≤ -1 eine Hemmung der Expression des entsprechenden Gens.

Allgemein zeigte die Behandlung der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ erst ab einer Konzentration von $125 \mu\text{M}$ Auswirkungen auf die Genexpression. Für die Mehrheit der betroffenen Gene verstärkte sich dieser Effekt mit steigender Konzentration. Die einzige Ausnahme bildete hierbei *SEPP1*, ein Gen der oxidativen Stressantwort, wo auch bei Konzentrationen $< 125 \mu\text{M}$ $\text{Al}(\text{acac})_3$ Effekte auftraten. Da diese jedoch den kritischen Wert von ≤ -1 nicht unterschritten, wird nicht näher darauf eingegangen.

Die deutlichsten Effekte zeigten sich im Bereich der DNA-Schadensantwort und der DNA-Reparatur. Für die Mehrheit der untersuchten Gene wurde dabei eine deutlich verminderte Expression festgestellt. Dies wird im nachfolgenden Kapitel (Kapitel 5.4.1) unter Berücksichtigung der bereits gewonnenen Erkenntnisse zum Einfluss von $\text{Al}(\text{acac})_3$ auf Proteine der DNA-Schadensantwort ausführlich diskutiert.

Auch Gene wichtiger Transkriptionsfaktoren, darunter *BTRC*, *KEAP1*, *MAP3K5* sowie *NFKB1* & *2* wurden im Zuge der Behandlung mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ vermindert exprimiert. Abbildung 16 zeigt jedoch, dass diese Effekte erst ab einer behandelnden Konzentration von $150 \mu\text{M}$ auftraten.

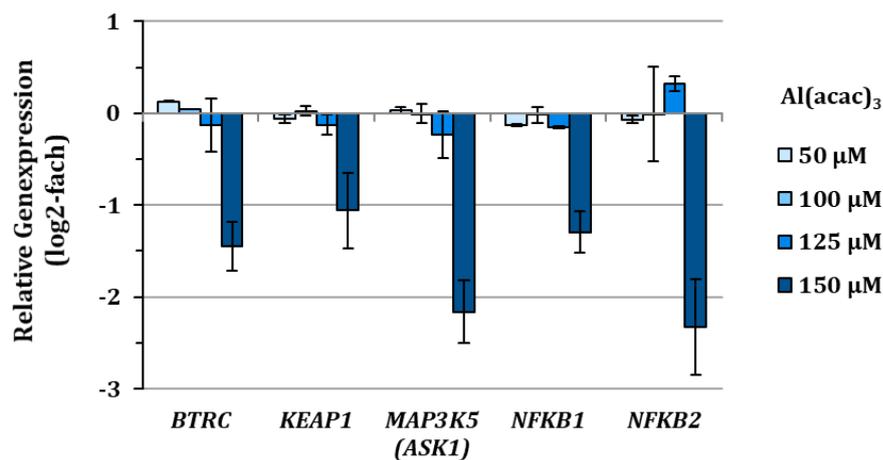


Abbildung 16: Einfluss von Aluminium auf die relative Expression ausgewählter Gene, die für wichtige Transkriptionsfaktoren codieren. A549-Zellen wurden für 24 h mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ behandelt und anschließend die relative Genexpression mittels *High-throughput RT qPCR* bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (\log_2 -fach) \pm SD aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen. Ein Wert ≥ 1 steht dabei für die Induktion des entsprechenden Gens, ein Wert ≤ -1 für eine Repression.

Das von *MAP3K5* codierte Protein gehört zur übergeordneten Gruppe der ‚mitogen-activated protein kinases‘, die z.B. in Folge von oxidativem Stress eine Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und dadurch bestimmte Signalkaskaden in der Zelle auslösen (zusammengefasst in Chang und Karin, 2001). Die Expression des Gens wird dabei maßgeblich durch E2Fs (*E2 promoter-binding factors*) reguliert (Kherrouche *et al.*, 2006). Dies erklärt auch die im Rahmen der Untersuchungen festgestellte verminderte Expression von *MAP3K5*, da auch *E2F1* aus dem Bereich der Proliferation und des Zellzyklus durch die Behandlung stark vermindert exprimiert wurde. Die zelluläre Funktion des von *E2F1* codierten Proteins wird im nachfolgenden Abschnitt näher erläutert.

Im Bereich der Proliferation und des Zellzyklus kam es in Folge der Behandlung nicht nur zu einer verminderten Expression von *E2F1*, sondern auch von *SIRT2*. Eine tendenzielle Steigerung der Expression zeigte sich hingegen für die Gene *CDKN1A1*, *IL8* und *PPM1D*. Abbildung 17 zeigt, dass diese Effekte konzentrationsabhängig waren.

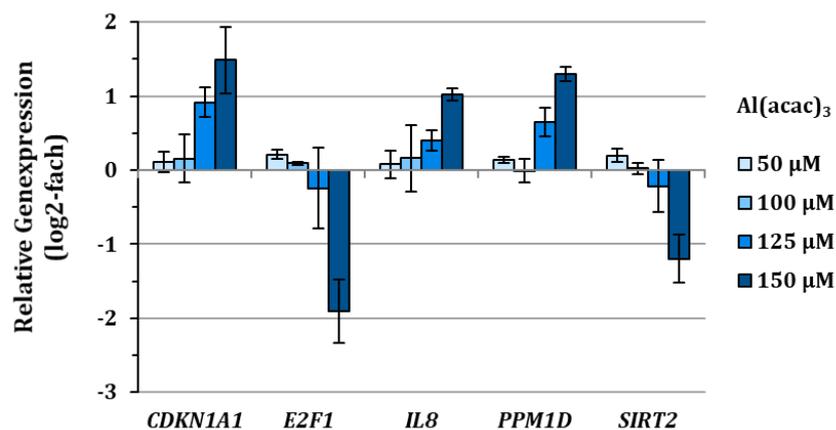


Abbildung 17: Einfluss von Aluminium auf die relative Expression ausgewählter Gene, die in Zusammenhang mit der Proliferation und des Zellzyklus stehen. A549-Zellen wurden für 24 h mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ behandelt und anschließend die relative Genexpression mittels *High-throughput RT-qPCR* bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (\log_2 -fach) \pm SD aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen. Ein Wert ≥ 1 steht dabei für die Induktion des entsprechenden Gens, ein Wert ≤ -1 für eine Repression.

Das von *E2F1* codierte, gleichnamige Protein tritt in der Zelle als Transkriptionsfaktor auf und kann über vielfältige Signalkaskaden den Zelltodmechanismus der Apoptose auslösen. Des Weiteren kontrolliert dieses Protein die Expression zahlreicher Gene, die für Schlüsselproteine der S-Phase codieren. Hierzu zählt unter anderem die DNA Polymerase α (zusammengefasst in Ginsberg, 2002; Bertoli *et al.*, 2013). Die verminderte Expression von *E2F1* wird z.B. durch das Retinoblastom-Protein (Rb) ausgelöst und führt zu einem Zellzyklus-Arrest in der G_1 -Phase (Kowalik *et al.*, 1995; Hahm und Singh, 2007). Die

detektierte Abnahme der Expression von *E2F1* bestätigt damit das Ergebnis der durchflusszytometrischen Untersuchung des Zellzyklus (Kapitel 5.2.3), in der neben einem G_2 - auch ein G_1 -Zellzyklusphasen-Arrest festgestellt wurde.

Im Hinblick auf die Apoptose nahm die Expression des pro-apoptotischen Gens *BAX* und des anti-apoptotischen Gens *XIAP* leicht ab, die der pro-apoptotischen Gene *BBC3* und *PMAIP* hingegen leicht zu (Abbildung 18). Tendenziell spricht dies für eine geringfügige Induktion der Apoptose in den Zellen bei Behandlung mit $150 \mu\text{M}$ $\text{Al}(\text{acac})_3$ und bestätigt somit das Ergebnis der durchflusszytometrischen Untersuchungen. Hierbei wurde eine minimale Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen festgestellt (siehe 5.2.2), die bei einer längeren Nachinkubationszeit aller Voraussicht nach stärker ausgefallen wäre.

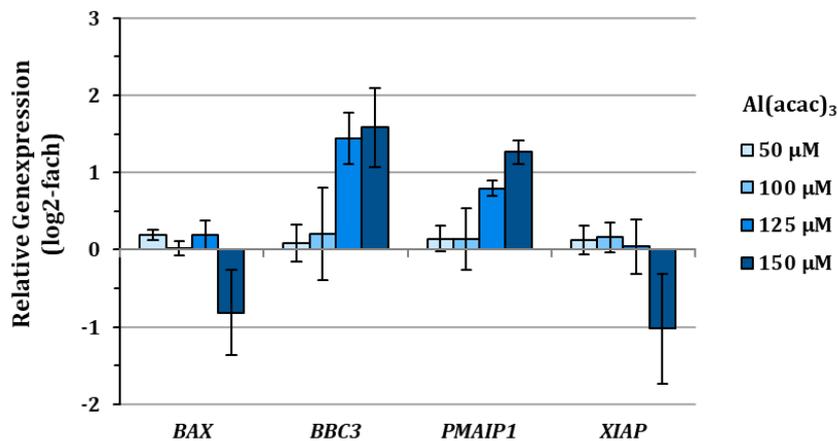


Abbildung 18: Einfluss von Aluminium auf die relative Expression ausgewählter Gene, die in Zusammenhang mit der Apoptose stehen. A549-Zellen wurden für 24 h mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ behandelt und anschließend die relative Genexpression mittels *High-throughput RTqPCR* bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (\log_2 -fach) \pm SD aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen. Ein Wert ≥ 1 steht dabei für die Induktion des entsprechenden Gens, ein Wert ≤ -1 für eine Repression.

Die Behandlung der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ hatte keinen nennenswerten Einfluss auf die untersuchten Gene der oxidativen Stressantwort sowie des Fremdstoffmetabolismus. Dies ist besonders hinsichtlich der oxidativen Stressantwort ein unerwartetes Ergebnis, da einige Studien die toxische Wirkung des Leichtmetalls auf das Auslösen von oxidativem Stress zurückführen (zusammengefasst in Exley, 2004; Kaneko *et al.*, 2007). Auch im Hinblick auf die potentielle Interaktion des Leichtmetalls mit dem Eisenhaushalt ist dies ein wichtiges Ergebnis (Bondy *et al.*, 1998; Yoshino *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2012).

Der Ligand selbst hatte keinen Einfluss auf die Expressionsmuster der untersuchten Gene (Daten nicht dargestellt), so dass die detektierten Effekte eindeutig auf das Leichtmetall zurückgeführt werden konnten.

Ein vergleichbares Ergebnis bezüglich der Genexpression wurde erhalten, wenn die Zellen im Anschluss an die 24-stündige Inkubation mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ zusätzlich mit 1 Gray bestrahlt wurden, gefolgt von einer 8-stündigen Nachinkubationszeit in frischem Medium (siehe 8.8.4). Unbestrahlte Proben wurden als Referenz ebenfalls mitgeführt. Die zusätzliche Bestrahlung der Zellen führte hierbei nicht zu einer Verstärkung der auftretenden Effekte. Im Vergleich zur entsprechenden unbestrahlten Probe waren sie eher leicht abgeschwächt.

5.4.1 Einfluss auf Gene der DNA-Schadensantwort und der DNA-Reparatur

In Abbildung 19 ist der Einfluss von Aluminium in Form der Verbindung $\text{Al}(\text{acac})_3$ auf die relative Expression wichtiger Gene der DNA-Reparatur anhand eines Balkendiagramms dargestellt. Die untersuchten Gene lassen sich dabei einzelnen Reparaturwegen zuordnen. Unterschieden wird zwischen der Mismatch-Reparatur (MMR), der Basenexzisionsreparatur (BER), der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) sowie der DNA-Doppelstrangbruchreparatur. Letztere umfasst sowohl das nicht homologe *end-joining* (NHEJ) als auch die homologe Rekombination (HR).

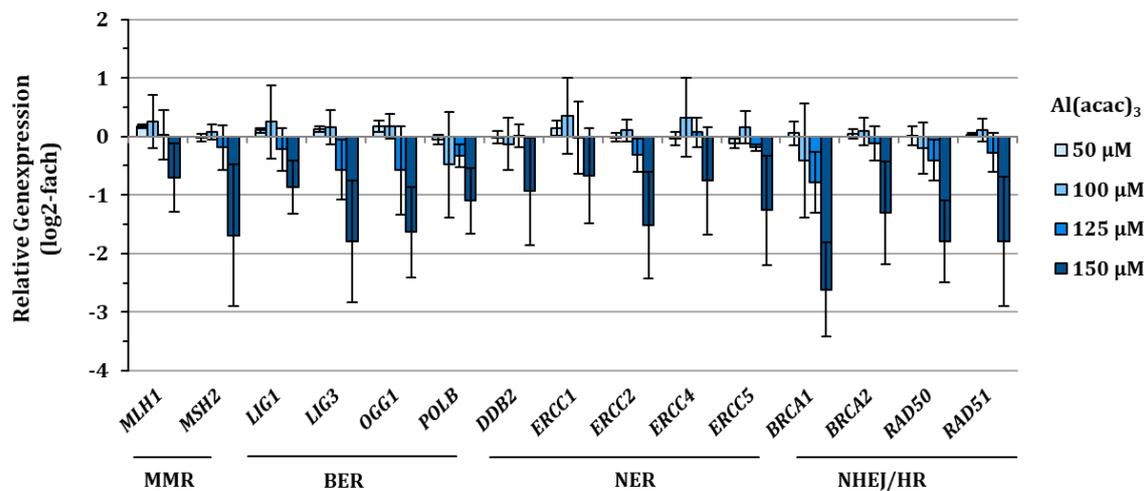


Abbildung 19: Einfluss von Aluminium auf die relative Expression ausgewählter Gene, die in Zusammenhang mit der DNA-Reparatur stehen. A549-Zellen wurden für 24 h mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ behandelt und anschließend die relative Genexpression mittels *High-throughput RT qPCR* bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (\log_2 -fach) \pm SD aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen. Ein Wert ≥ 1 steht dabei für die Induktion des entsprechenden Gens, ein Wert ≤ -1 für eine Repression.

Die 24-stündige Inkubation der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ führte auf Genexpressionsebene zu einer Hemmung der Transkription eines Großteils der untersuchten Gene, die für wichtige DNA-Reparaturproteine codieren. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig und der kritische Wert von ≤ -1 wurde erst bei der höchsten Behandlungskonzentration von

150 μM unterschritten. Der Ligand hatte, wie bereits erwähnt, keinen Einfluss auf die Expression der betrachteten Gene. Die auftretenden Effekte konnten demnach eindeutig auf die Wirkung des Metalls zurückgeführt werden. Eine deutliche Inhibierung der Transkription wurde dabei für *MSH2* aus der MMR, *LIG3* und *OGG1* aus der BER, *ERCC2* und *ERCC5* aus der NER und sämtliche untersuchten Gene (*BRCA1*, *BRCA2*, *Rad50*, *Rad51*) der DNA-Doppelstrangbruchreparatur festgestellt. Aufgrund der breiten Verteilung der betroffenen Gene wird davon ausgegangen, dass Aluminium die DNA-Reparatur auf vielfältige Art und Weise negativ beeinflusst. Besonders stark betroffen scheint dabei allerdings die DNA-Doppelstrangbruchreparatur zu sein. Insgesamt stellt sich die Frage, welcher übergeordnete Faktor beziehungsweise Mechanismus für die verminderte Transkription der genannten Gene verantwortlich ist. Da im Rahmen dieser Arbeit keine vertiefenden Untersuchungen in dieser Richtung erfolgten, befasst sich der kommende Abschnitt mit zwei in der Literatur beschriebenen, potentiellen Ursachen. Dabei handelt es sich zum einen um die Wirkung von Aluminium auf wichtige Transkriptionsfaktoren wie z.B. p53, zum anderen um den Einfluss des Leichtmetalls auf die Struktur doppelsträngiger DNA.

Das Protein p53 wirkt im menschlichen Körper als Tumorsuppressor und wird aufgrund seiner bedeutenden Funktion bei der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität auch als sogenannter „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Lane, 1992). Kommt es zu einer Schädigung der DNA, so kontrolliert p53 als Transkriptionsfaktor die Expression einer Vielzahl an Proteinen, die entweder mit dem Zellzyklus, dem programmierten Zelltod (Apoptose) oder aber der Reparatur von DNA-Schäden zusammenhängen. Eine Störung der Transkription von p53 beziehungsweise ein Verlust seiner Funktionalität auf Proteinebene werden mit einem deutlich erhöhten Risiko der Krebsentstehung in Verbindung gebracht (Jacks *et al.*, 1994; zusammengefasst in Efeyan und Serrano, 2007; Ventura *et al.*, 2007).

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Studien belegen den Einfluss von Aluminium auf die Transkription dieses bedeutenden Tumorsuppressors (Johnson *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2009). So führte die Behandlung von Neuro-2A Zellen mit Aluminiummaltolat in der Studie von Johnson *et al.* (2004) zu einer gesteigerten Expression des Tumorsuppressorgens p53, woraufhin es zu einer Verschiebung des Proteinverhältnisses von Bcl und Bax kam. Der Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen nahm infolgedessen signifikant zu. Ebenso zeigten Kumar *et al.* (2009), dass die chronische, intragastrale Gabe von 10 mg Aluminium/kg Körpergewicht über einen Zeitraum von 12 Wochen zu einer gesteigerten

Expression von p53 in männlichen Wistar-Ratten führte. Dies galt auch für weitere, den Zellzyklus regulierende Proteine wie z.B. Cyclin D1.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand der Genexpressionsanalysen kein Einfluss von Aluminium in Form der Verbindung $\text{Al}(\text{acac})_3$ auf die Expression von p53 in A549-Zellen festgestellt. Dies bedeutet allerdings nicht, dass dies auch auf Proteinebene zutrifft. An dieser Stelle sei auf die Studie von Hanas und Gunn (1996) hingewiesen, die sich mit dem Einfluss von Aluminium auf den Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA) beschäftigt. TFIIIA ist ein Cystein-reiches Protein, das wie p53 über sogenannte Zinkfinger-Domänen verfügt. Die wichtigste Funktion dieses Proteins besteht in der Transkription der 5S ribosomalen RNA, einem wichtigen Bestandteil der Ribosomen als Ort der Proteinbiosynthese in der Zelle (zusammengefasst in Layat *et al.*, 2013). Hanas und Gunn (1996) detektierten nun eine Hemmung der Aktivität von TFIIIA durch Al^{3+} -Ionen ab einer Konzentration $\geq 5 \mu\text{M}$. Weitere Untersuchungen mit zusätzlichen Reaktionspartnern veranlassten die Wissenschaftler schließlich zu der Aussage, dass dies auf einer direkten Interaktion des Metalls mit den Zinkfingerdomänen des Proteins beruht. Über den genauen Mechanismus wurden jedoch keine Aussagen getroffen. Ein Einfluss auf andere Proteine wie z.B. der DNaseI konnte im Rahmen dieser Studie nicht festgestellt werden. Allerdings zeigten die Untersuchungen mittels Agarose-Gelelektrophorese, dass das Leichtmetall zu einer strukturellen Veränderung sowohl der einzel- als auch der doppelsträngigen DNA führte. Dies wurde bereits in den 1970iger und 80iger Jahren durch die Studien von Morimura und Matsumoto sowie Karlik *et al.* postuliert (Morimura und Matsumoto, 1978; Karlik *et al.*, 1980). Hiernach führt die Anlagerung eines Aluminium-Polymers bestehend aus hydratisierten Al^{3+} - und OH-Ionen an die negativ geladenen Phosphatreste beider DNA-Stränge zu einer Stabilisierung der schraubenförmigen DNA-Doppelhelix. Infolgedessen unterbleibt die Entwindung der DNA, wodurch sowohl die Replikation als auch die Transkription effektiv unterbunden werden. Diese Aussagen basieren auf spektroskopischen Untersuchungen, Schmelzkurvenanalysen sowie auf der Bestimmung der Hyperchromizität der DNA. Auch die Studie von Ahmad *et al.* (1996), die sich mit der Komplexierung von Kalbsthymus-DNA durch dreiwertige Metallkationen beschäftigt, belegt die Bindung von Al^{3+} -Ionen an das negative Phosphatrückgrat der DNA sowie an die N-7 Position von Guanin. Dies wurde jedoch nur für niedrige Konzentration des Leichtmetalls festgestellt. Bei höheren Konzentrationen des Leichtmetalls detektierten die Wissenschaftler mittels FTIR-Spektroskopie hingegen eine zunehmende Instabilität der DNA. Nicht nur die Stabilität der DNA-Doppelhelix, sondern auch ihre Topologie scheint ein wichtiger Aspekt im Hinblick auf eine veränderte Genexpression zu sein. Dies zeigen weitere CD-spektroskopische Untersuchungen, bei denen die Gegenwart von Al^{3+} -Ionen

eine Veränderung der DNA-Konformation ausgehend von einer rechtsgängigen B- zu einer linksgängigen Z-DNA initiierte (Latha *et al.*, 2002; Rao und Stein, 2003).

Welcher Mechanismus letztendlich für die verminderte Transkription der Vielzahl an untersuchten Genen der DNA-Schadensantwort verantwortlich ist, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig sagen. Das Ergebnis der Genexpressionsanalysen bestätigt jedoch die bereits gewonnenen Erkenntnisse zum Einfluss des Leichtmetalls auf die DNA-Reparatur aus der PFGE (Kapitel 5.3.2) sowie der Immunfluoreszenzspektroskopie von γ H2AX (Kapitel 5.3.2.1) und Rad51 (Kapitel 5.3.2.2). Im Rahmen dieser Experimente führte die Behandlung der Zellen mit 150 μ M Al(acac)₃ zu einer Hemmung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur. Vertiefende Untersuchungen mittels Western Blot zeigten zudem eine starke Abnahme der zellulären Proteinkonzentration von Rad51 (Kapitel 5.3.2.2). Dies lässt sich nun anhand der Genexpressionsuntersuchungen auf eine verminderte Transkription des für Rad51 codierenden Gens zurückführen. Gemessen an den erhaltenen Expressionsprofilen scheint dieses Protein jedoch nur ein Beispiel für viele weitere DNA-Reparaturproteine zu sein. Dies gilt es durch weitere Untersuchungen auf Proteinebene zu überprüfen.

Die im Rahmen der Genexpressionsanalysen für A(acac)₃ detektierten Effekte waren überwiegend konzentrationsabhängig. Es wird davon ausgegangen, dass dies auf einer ebenfalls konzentrationsabhängigen Aufnahme von Aluminium in die Zelle beruht. Dieser Aspekt wird bei den nachfolgenden Untersuchungen zum Einfluss des Metalls auf Schlüsselproteine des Eisenhaushalts erneut aufgegriffen. Eine zentrale Frage ist dabei, über welchen Mechanismus Aluminium in die Zelle gelangt und, welche Bedeutung der jeweilige Bindungspartner dabei einnimmt.

5.5 Interaktion von Aluminium mit Proteinen des Eisenhaushalts

Die Wechselwirkung von Aluminium mit Schlüsselproteinen des Eisenhaushalts ist aufgrund der Bedeutung dieser zwei Metalle für den menschlichen Organismus und ihrer toxikologischen Wirkprofile ein wichtiger Forschungsgegenstand (Nasiadek und Chmielnicka, 2000; Ward *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb vertiefende Untersuchungen zur Bindung von Aluminium im Vergleich zu Eisen an das Transportprotein Serum-Transferrin durchgeführt. Des Weiteren erfolgten *in vitro* Versuche mit A549-Zellen zum Einfluss des Leichtmetalls auf die intrazelluläre Konzentration des Eisenspeicherproteins Ferritin. Der Fokus lag dabei auf der Frage, inwieweit Aluminium in Form seines dreiwertigen Kations diese beiden Proteine für den eigenen Transport, die eigene zelluläre Aufnahme beziehungsweise Speicherung nutzen kann.

5.5.1 Bedeutung von Serum-Transferrin für den Transport von Fe^(III) und Al^(III)

Humanes Serum-Transferrin (hTF), dessen primäre Funktion im sicheren Transport von Fe³⁺-Ionen besteht, wurde anhand von Untersuchungen ebenfalls als der wichtigste Bindungspartner für Al³⁺-Ionen im Blutserum identifiziert. Circa 80 % des bei neutralem pH-Wert nahezu unlöslichen Leichtmetalls werden auf diese Weise in Lösung gehalten und über den Blutkreislauf im Organismus verteilt (Willhite *et al.*, 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurden nun zwei leistungsstarke Analysemethoden zur detaillierten Untersuchung der Bindung von Eisen und Aluminium an hTF, einzeln oder zusammen, miteinander kombiniert. Die ultrahochauflösende ESI-Massenspektrometrie (ESI MS) informiert dabei über das Vorkommen sowie die Verteilung aller auftretenden hTF-Spezies bei unterschiedlichen Sättigungsgraden des Proteins mit Fe³⁺-Ionen. Die spektroskopischen Untersuchungen mittels Circular dichroismus (CD) geben des Weiteren Auskunft über die strukturellen Eigenschaften der detektierten Proteinspezies. Durch die anschließende Verknüpfung der Ergebnisse aus den CD-Experimenten mit den ESI MS-Daten wird ein direkter Zusammenhang zwischen der Tertiärstruktur und dem jeweiligen Bindungszustand des Proteins hergestellt.

Zunächst werden die Ergebnisse aus den ESI MS- und CD-Experimenten zur schrittweisen Aufnahme von Fe³⁺-Ionen in die metallfreie apo-Form des Proteins (apo-hTF) vorgestellt. Sie dienen als Grundlage für die anschließende Betrachtung der Reaktion in Gegenwart von Aluminium.

5.5.1.1 Bindung von Fe^(III) an apo-hTF

Die Bindung von Fe³⁺-Ionen an apo-hTF erfolgte schrittweise unter Aufzeichnung der jeweiligen Massenspektren (Abbildung 20, A-I). Die Verwendung der vergleichsweise schonenden Ionisationsmethode der Elektrosprayionisation (ESI) ermöglichte dabei die Untersuchung des Proteins in seiner intakten, nativen Konformation (Kaltashov *et al.*, 2012). Die aufgenommenen Massenspektren zeigten das Protein in den Ladungszuständen +16, +17, +18, +19 und +20. Da die stärksten Signale bei einem Ladungszustand von +18 auftraten, wird dieser Ausschnitt der jeweiligen Massenspektren in der linken Spalte von Abbildung 20 mit den entsprechenden dekonvolvierten Spektren auf der rechten Seite dargestellt.

Ausgehend vom metallfreien Protein apo-hTF (Abbildung 20, A) wurden zunächst Fe³⁺-Ionen in molaren Äquivalenten von 0,25 bezogen auf den Proteingehalt der Lösung hinzugegeben und das jeweilige Spektrum aufgenommen. Dies erfolgte bis zu einem molaren Metall zu Protein Verhältnis von 1:1 (Abbildung 20, B-E), bei dem durchschnittlich 0,89 Fe³⁺-Ionen pro Molekül hTF gebunden waren. Anschließend wurden weitere Fe³⁺-Ionen der Lösung in molaren Äquivalenten von 0,5 bis zur vollständigen Sättigung beider Metallbindungsstellen des Proteins hinzugefügt (Abbildung 20, F-I). Diese Sättigung wurde bei einem Metall/Protein-Verhältnis von 3:1 erreicht. Unter Berücksichtigung der im Versuch eingesetzten Eisenverbindung Fe(acac)₃ steht dieses Ergebnis nicht im Widerspruch zur allgemein anerkannten und wissenschaftlich belegten Annahme einer vollständigen Sättigung von hTF bei einem Metall/Protein-Verhältnis von 2:1 (zusammengefasst in Sun *et al.*, 1999; Hirose, 2000; Abdizadeh *et al.*, 2017). Der Anstieg des Verhältnisses wird vielmehr auf die Gegenwart des ebenfalls in der Lösung vorliegenden, mehrzähligen Liganden Acetylacetonat (Acac⁻) zurückgeführt. Dieser konkurriert mit hTF um die Bindung von Fe³⁺-Ionen, wodurch eine wesentlich detailliertere Analyse der Aufnahme von Fe³⁺-Ionen in das Transportprotein möglich ist.

Apo-hTF erscheint bei einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) von 4.420 (79.551 Da), Fe₁-hTF bei einem m/z von 4.423 (79.605 Da) und Fe₂-hTF bei einem m/z von 4.426 (79.659 Da). Zusätzliche Peaks in den Massenspektren mit dem Ladungszustand +18 konnten unter anderem den entsprechenden Natrium-Addukten der genannten hTF-Spezies zugeordnet werden. Die klare Trennung der Peaksignale aller drei hTF-Spezies (apo-hTF, Fe₁-hTF, Fe₂-hTF) innerhalb eines m/z-Bereichs von nur 6 Einheiten zeigt die besondere Stärke des verwendeten Gerätes hinsichtlich Empfindlichkeit und Auflösungsvermögen. Diese Parameter sind wichtige Faktoren bei der Untersuchung des vergleichsweise schweren Proteins mittels Massenspektrometrie.

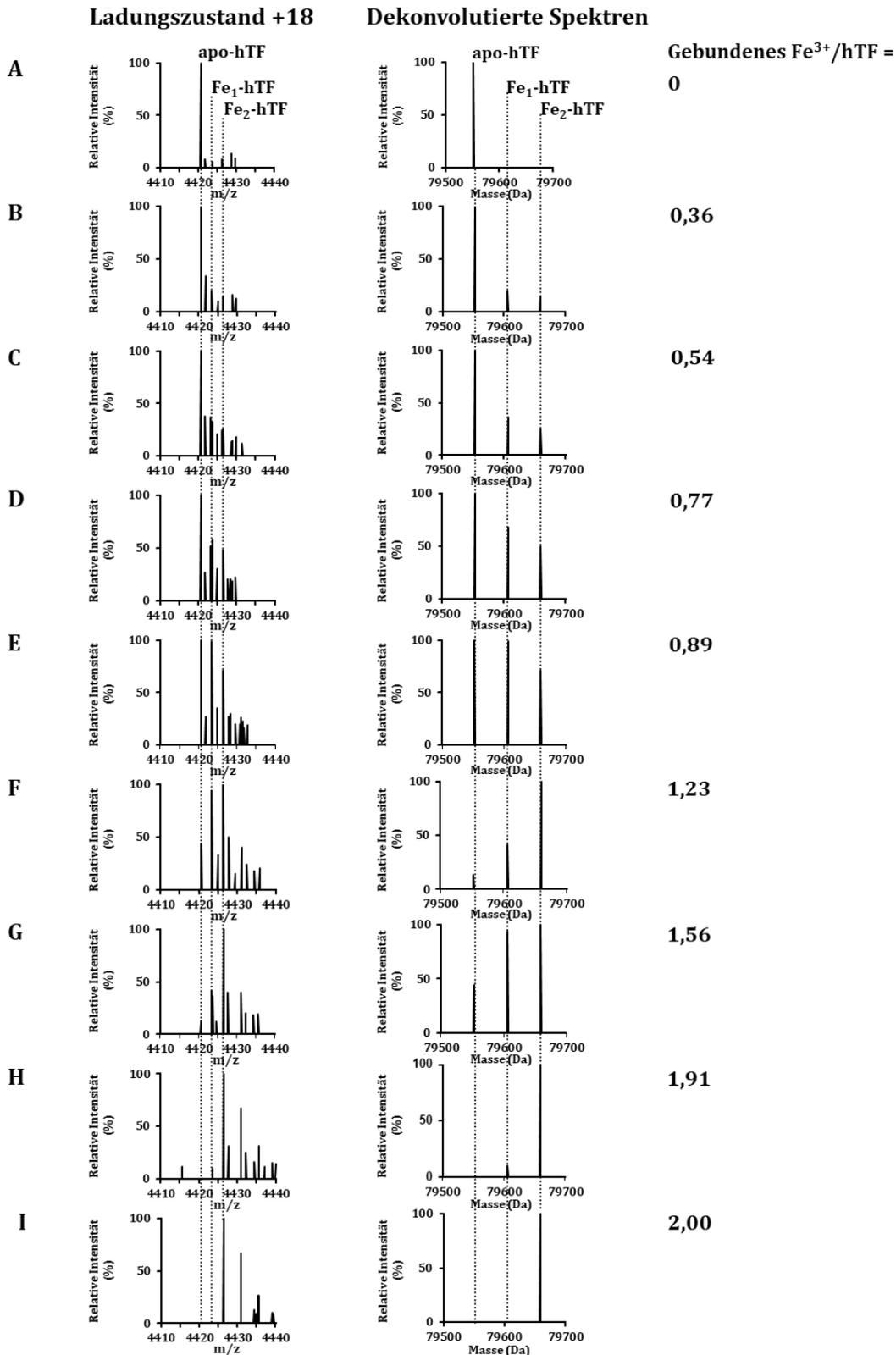


Abbildung 20: Bindung von Eisen an humanes Serum-Transferrin (hTF). Apo-hTF (5 μ M) wurde schrittweise mit Fe(acac)₃-Lösung (2,8 mM) (A-I) versetzt und die auftretenden hTF-Spezies mittels hochauflösender ESI Massenspektrometrie erfasst. Links zu sehen sind die Massenspektren der Proteine im Ladungszustand +18 und rechts die entsprechenden dekonvolvierten Spektren von apo-hTF, Fe₁-hTF und Fe₂-hTF. Die Reaktion erfolgte in HEPES (50 mM)/NH₄HCO₃ (100 mM) Puffer bei pH 7,0 und 25 °C.

Bei einem zu geringen Auflösungsvermögen des verwendeten Geräts lassen sich die Signale der einzelnen hTF-Spezies im Massenspektrum nicht klar voneinander trennen. Dies wird unter anderem durch die Studie von Zhang *et al.* (2004) zur Bindung von Indium und Bismut an hTF deutlich. Die Forscher nutzten für ihre Untersuchungen ebenfalls die Methode der ESI MS, jedoch war eine genaue Zuordnung der Massen und relativen Häufigkeit von apo-hTF, Fe₂-hTF sowie In₂-hTF anhand des Spektrums aufgrund der stark überlappenden Peaksignale der drei Protein-Spezies nicht möglich.

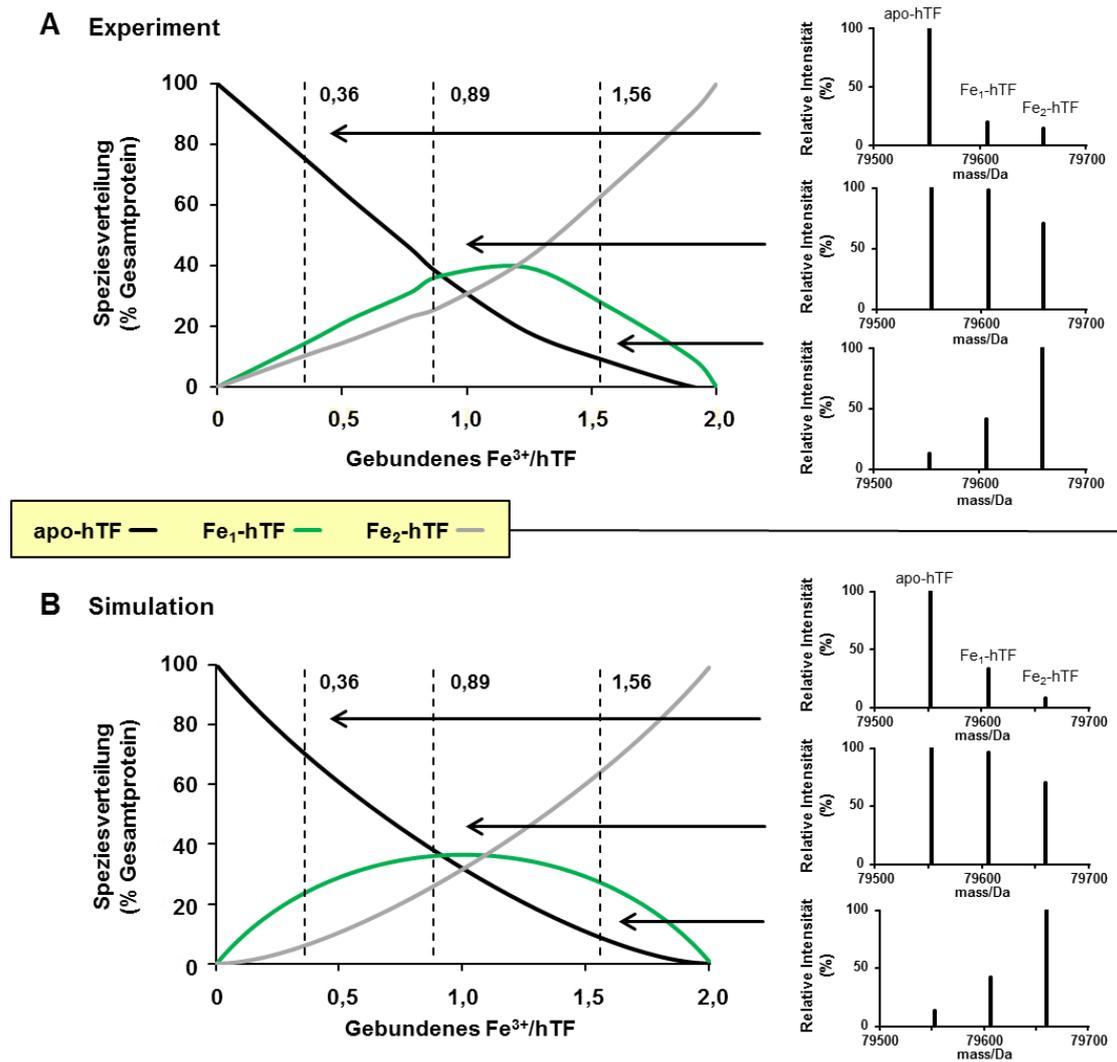


Abbildung 21: Speziesverteilung im Verlauf der Eisensättigung von hTF. Die prozentualen Anteile der Spezies apo-hTF, Fe₁-hTF und Fe₂-hTF, dargestellt als Funktion des Eisengehalts von hTF, wurden entweder experimentell (A) oder per Simulation (B) erhoben. Die experimentellen Daten basieren dabei auf den Untersuchungen zur Bindung von Eisen an apo-hTF mittels hochauflösender ESI Massenspektrometrie. Die Simulation wurde anhand des Programms HySS unter Verwendung der Bindungskonstanten (zusammengefasst in Sun *et al.*, 1999) für Fe₁- und Fe₂-hTF erstellt. Zum besseren Vergleich von Experiment und Simulation sind rechts der Abbildung zusätzlich Beispiel-Spektren bei einem geringen, mittleren und hohen Sättigungsgrad des Proteins mit Fe³⁺ aufgeführt.

Abbildung 21 zeigt die prozentualen Anteile der drei auftretenden hTF-Spezies (apo-hTF, Fe₁-hTF und Fe₂-hTF) jeweils bezogen auf den Gesamtproteingehalt der Lösung im Verlauf der Metalltitration. Hierbei werden den experimentell erhobenen Daten (Abbildung 21, A) die per Simulation entwickelten Daten (Abbildung 21, B) gegenübergestellt. Die Simulation beruht dabei auf den bereits veröffentlichten Bindungskonstanten für Fe³⁺ an hTF, $\log K_1 = 21,4$ und $\log K_2 = 20,3$ (zusammengefasst in Sun *et al.*, 1999). Rechts der Abbildung sind die entsprechenden ESI MS-Spektren zu Anfang, Mitte und Ende der Titration abgebildet. Das Ergebnis bestätigt die Untersuchungen von Huebers *et al.* (1984), nach denen die Speziesanteile vom Sättigungsgrad des Proteins mit Fe³⁺-Ionen abhängen.

Zunächst trat apo-hTF als einzig nachweisbare Spezies in der Lösung auf und dominierte das Spektrum, bis durchschnittlich 0,89 Fe³⁺-Ionen pro Molekül hTF gebunden waren. Sobald jedoch Fe³⁺-Ionen der Proteinlösung hinzugefügt wurden, nahm der Anteil an apo-hTF kontinuierlich ab, wohingegen die Anteile von Fe₁-hTF sowie Fe₂-hTF stetig zunahm. Bis zu einem Sättigungsgrad des Proteins von 1,0 bildete sich bevorzugt das einfach gesättigte Fe₁-hTF. Erst bei einem höheren Sättigungsgrad des Proteins mit Fe³⁺-Ionen stieg der prozentuale Anteil von vollständig gesättigtem Fe₂-hTF kontinuierlich bis auf 100 % an. Die gute Übereinstimmung von Simulation und Experiment bestätigen die experimentell erhobenen Daten.

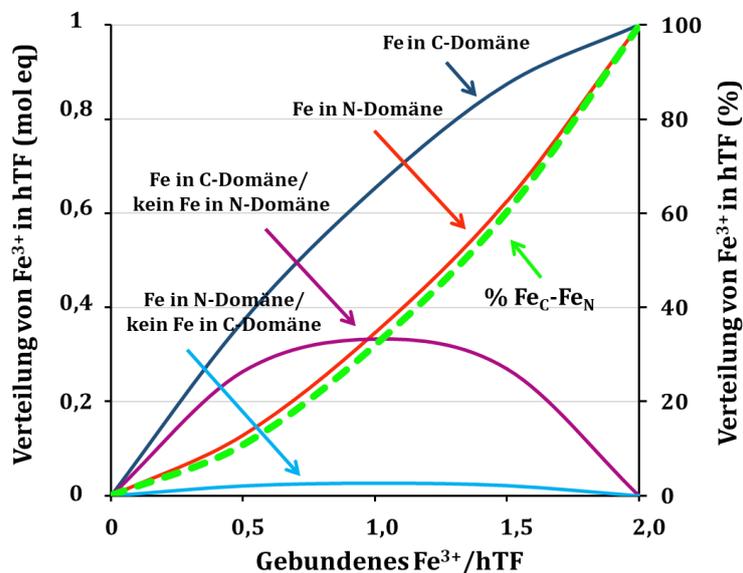


Abbildung 22: Verteilung von Fe³⁺-Ionen auf die C- und N-terminale Domäne von hTF während der schrittweisen Sättigung des Proteins mit Eisen. Die Berechnung des jeweiligen Anteils von gebundenem Fe³⁺ in der C- (blaue Linie) und N-terminalen Domäne (rote Linie) sowie ausschließlich in der C- (violette Linie) bzw. N-terminalen Domäne (cyan-blaue Linie) des Proteins erfolgte anhand der Bindungskonstanten für K_C und K_N (zusammengefasst in Sun *et al.*, 1999) und den mittels ESI MS bestimmten relativen Anteilen der einzelnen hTF-Spezies am Gesamtprotein (siehe Abb. 21, A+B). Ebenfalls angegeben ist der prozentuale Anteil des vollständig mit Fe³⁺-Ionen gesättigten Proteins (grüne, gestrichelte Linie).

Abbildung 22 informiert über die Verteilung der zur Lösung hinzutitrierten Fe^{3+} -Ionen auf die beiden Bindungsstellen von hTF, eine in der C- und eine in der N-terminalen Domäne des Proteins (siehe Kapitel 2.2.1, *Serum-Transferrin*). Die Berechnungen basieren dabei auf den bereits bekannten Bindungskonstanten für Fe^{3+} an hTF und der mittels ESI MS bestimmten Speziesverteilung (siehe Abbildung 21, A+B). Hierbei wird zwischen dem Anteil an gebundenem Fe^{3+} in der C- (blaue Kurve) beziehungsweise in der N-terminalen Domäne (rote Kurve) des Proteins unterschieden. Des Weiteren sind die Anteile von einfach gesättigtem hTF mit Fe^{3+} ausschließlich in der C- (violette Linie) beziehungsweise ausschließlich in der N-terminalen Domäne abgebildet. Die Kurven verdeutlichen die um circa eine Zehnerpotenz höhere Affinität des Proteins zur Bindung von Fe^{3+} in der C-terminalen Domäne. So erfolgte die Bindung des Metallions in der N-terminalen Domäne des Proteins fast ausschließlich bei bereits gesättigter C-Domäne.

Abschließend sei auf den prozentualen Anteil von vollständig mit Eisen gesättigtem hTF am Gesamtproteingehalt der Lösung während der Metalltitration hingewiesen (Abbildung 22; grün-gestrichelte Linie). Dieser Anteil nimmt fast deckungsgleich mit dem Anteil an gebundenem Fe^{3+} in der N-terminalen Domäne des Proteins zu.

Die Metallbindung eines Proteins bewirkt eine Veränderung seiner räumlichen Struktur. Dies kann im Fall von optisch aktiven Proteinen, wie z.B. hTF, mittels CD-Spektroskopie untersucht werden (Battistuzzi *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2004). Es ist bekannt, dass hTF durch die Aufnahme von Fe^{3+} -Ionen von einer offenen in eine geschlossene Konformation übergeht (Gumerov *et al.*, 2003). Dadurch ändert sich die chirale Umgebung der Peptidkette an den Metallbindungsstellen und im CD-Spektrum erscheint ein Signal im Wellenlängenbereich 285-530 nm, der als so genannter ‚Fingerabdruck‘ (Kelly *et al.*, 2005) des Proteins bezeichnet wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die strukturelle Veränderung von hTF im Zuge der schrittweisen Wiederaufnahme von Fe^{3+} -Ionen durch die Aufnahme von CD-Spektren festgehalten (siehe Abbildung 23) und anhand der ESI MS Daten in einen größeren Zusammenhang mit den exakt vorliegenden Bindungsverhältnissen gestellt. Apo-hTF (Verhältnis gebundenes Fe^{3+} /hTF = 0) zeigte ein Signal im Wellenlängenbereich ≤ 300 nm. Dies wurde auf eine strukturelle Veränderung des Proteins in Regionen mit aromatischen Aminosäuren zurückgeführt und bestätigt die Interpretation von anderen Wissenschaftlern (van Haeringen *et al.*, 1995). Nach der Zugabe von Fe^{3+} -Ionen erschien die charakteristische Signalform von Fe_2 -hTF im Wellenlängenbereich des ‚Fingerabdrucks‘ ($\lambda=285-530$ nm). Hier traten insgesamt zwei Signalmaxima, eines im

positiven ($\lambda=325$ nm) und eines im negativen ($\lambda=465$ nm) Bereich, auf. Das CD-Signal bei einer Wellenlänge von 305 nm wurde dabei nicht als ein eigenständiges Maximum gewertet, sondern auf Veränderungen im CD-Spektrum < 300 nm zurückgeführt. Mazurier *et al.* (1976) führten das Auftreten dichroistischer Banden im nahen UV/sichtbaren-Bereich des Lichtes auf eine Veränderung der elektronischen Umgebung sowie der Neuausrichtung einer oder mehrerer Disulfidbrücken in den Metallbindungsstellen des Proteins zurück. Eine genaue Lokalisation der Peakmaxima war in ihrer Studie zu humanem Serum-Transferrin und Lactotransferrin aufgrund der breiten Kurvenformen jedoch nicht möglich.

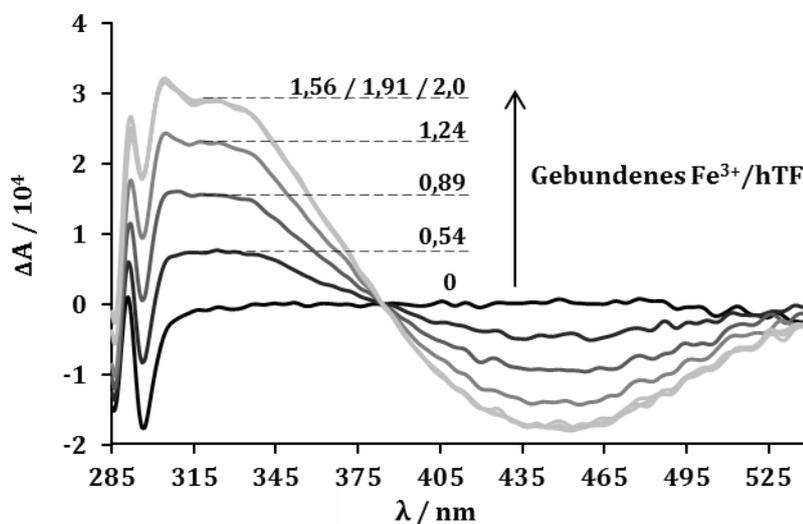


Abbildung 23: CD-Spektren zur Bindung von Eisen an apo-hTF. Apo-hTF (1,5 mg/mL) wurde schrittweise mit Fe(acac)₃-Lösung (2,8 mM) versetzt und das jeweilige CD-Spektrum aufgenommen. Die angegebenen Verhältnisse von gebundenen Fe³⁺-Ionen pro Molekül hTF beruhen dabei auf den Untersuchungen mittels ESI MS. Die Reaktion erfolgte in HEPES (50 mM)/NaHCO₃ (100 mM) Puffer bei pH 7,0 und 25 °C. Dargestellt sind die geglätteten Spektren (FFT3) im Wellenlängenbereich 285-530 nm.

Die Signalintensität der aufgenommenen CD-Spektren (Abbildung 23) stieg durch die schrittweise Zugabe von Fe(acac)₃-Lösung kontinuierlich an, bis durchschnittlich 1,56 Fe³⁺-Ionen pro Molekül hTF gebunden waren. Dies entspricht einer Sättigung des Proteins von 78 %. Die weitere Zugabe von Fe³⁺-Ionen führte zwar zur vollständigen Sättigung des Proteins, bewirkte aber keine weitere Veränderung der Signalintensität. Die Untersuchungen von Bokkhim *et al.* (2014) zur Struktur von Rinder-Lactoferrin bei unterschiedlichem Sättigungsgrad mit Eisen (0, 25, 50, 75, 85 und 100 %) kamen zu einem vergleichbaren Ergebnis. Rinder-Lactoferrin besteht wie Serum-Transferrin aus einer einzigen Polypeptidkette mit zwei spezifischen Metall-Bindungsstellen (Steijns und van Hooijdonk, 2000). Durch die Zugabe von Eisen-Ionen zu apo-Lactoferrin erschienen die charakteristischen Banden im CD-Spektrum ($\lambda=285-530$ nm), die bei einer 75 %-igen

Sättigung des Proteins ein Intensitätsmaximum erreichen. Bokkhim *et al.* (2014) interpretierten dieses Ergebnis dahingehend, dass primär die Bindung des ersten Fe³⁺-Ions die Tertiärstruktur und somit das CD-Spektrum im UV/sichtbaren-Wellenlängenbereich des Proteins bestimmte. Der Einfluss des zweiten, gebundenen Fe³⁺-Ions war ihrer Ansicht nach von untergeordneter Relevanz. Dies zeigt sich auch anhand der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zur Bindung von Fe³⁺-Ionen an hTF. Abbildung 24 veranschaulicht diesen Aspekt nochmals durch die direkte Verknüpfung von struktureller Information mit dem Grad der Proteinsättigung.

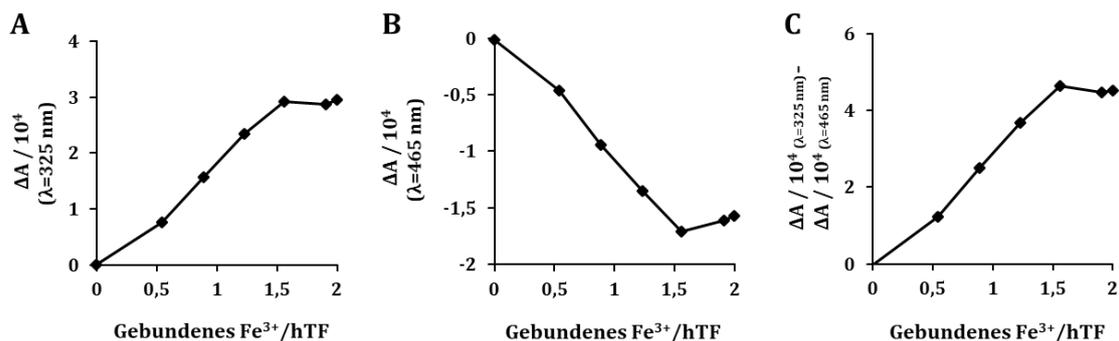


Abbildung 24: Korrelation von CD-Signalintensität und dem Anteil an gebundenem Eisen. Die Intensität des CD-Signals bei einer Wellenlänge von 325 nm (A) bzw. 465 nm (B) wurde ins Verhältnis zum Anteil an gebundenen Fe³⁺-Ionen pro Molekül hTF gesetzt. In (C) werden (A) und (B) miteinander kombiniert, indem auf der y-Achse jeweils der Abstand beider CD-Signalmaxima aufgetragen wird.

Die Auftragung des CD-Signals ($\lambda=325$ bzw. 465 nm) auf der Y-Achse gegen den Sättigungsgrad des Proteins auf der X-Achse zeigt einen nahezu linearen Zusammenhang beider Größen, bis durchschnittlich 1,56 Fe³⁺-Ionen pro Molekül gebunden sind (Abbildung 24, A+B). Der leichte Abfall der Signalintensität bei einer Wellenlänge von 465 nm und einer Sättigung > 1,56 (Abbildung 24, B) wird nicht auf einen bestimmten Grund zurückgeführt. Abbildung 24 (C) kombiniert Abbildungen A und B, indem der Abstand beider Maxima gegen den jeweiligen Sättigungsgrad des Proteins auf der Y-Achse aufgetragen wird.

5.5.1.2 Bindung von Fe^(III) an Al-hTF

Im Folgenden wird die Bindung von Fe^(III) an Al-hTF und die damit einhergehenden strukturellen Aspekte der auftretenden hTF-Spezies betrachtet. Dafür wurde apo-hTF zunächst mit einem Überschuss an Al³⁺-Ionen versetzt und anschließend Fe³⁺-Ionen in definierten Mengen der Proteinlösung hinzutitriert.

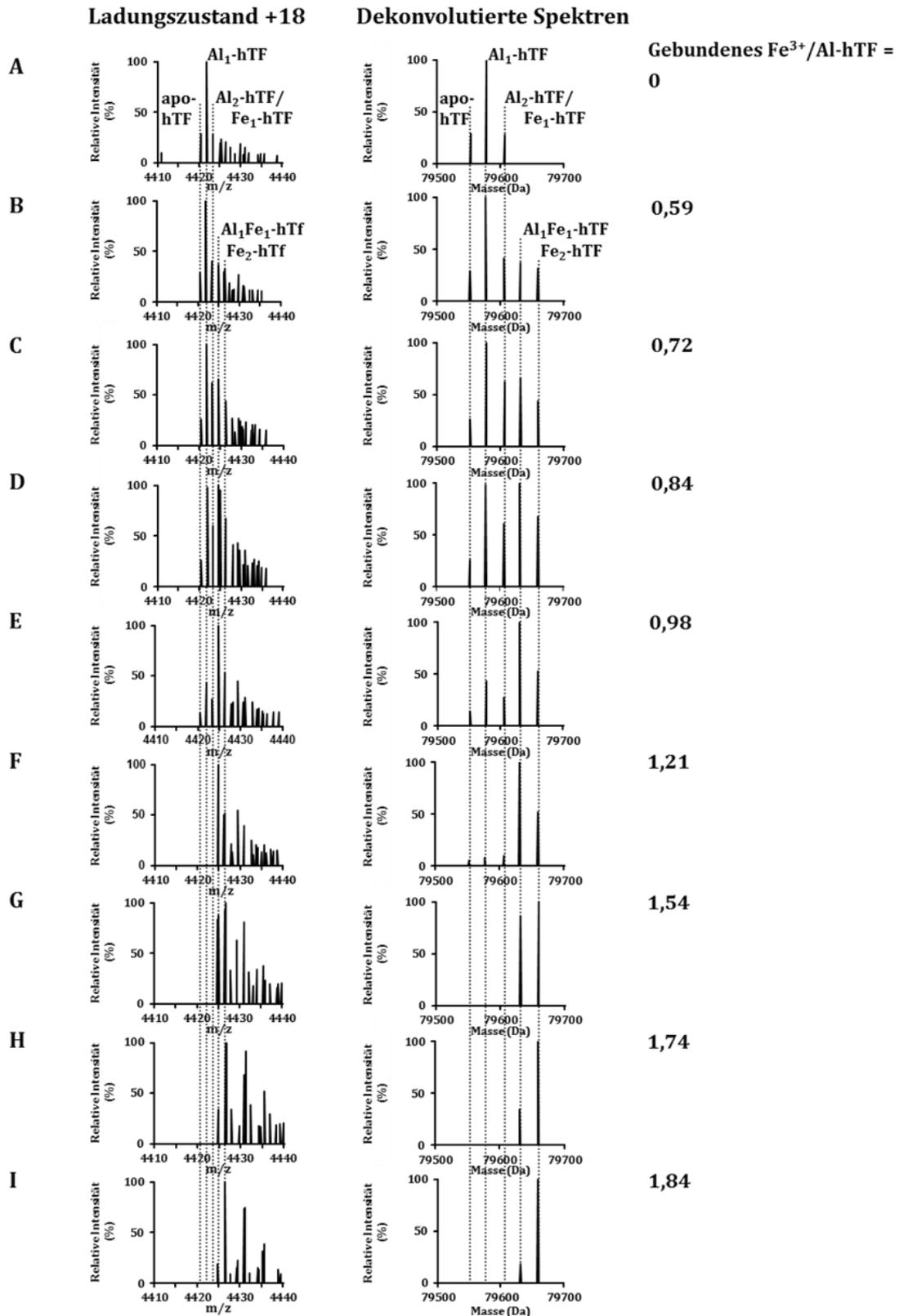


Abbildung 25: Bindung von Eisen an Aluminium-Transferrin (Al-hTF). Al-hTF (5 μ M) wurde schrittweise mit Fe(acac)₃-Lösung (2,8 mM) versetzt (A-I) und die auftretenden hTF-Spezies mittels hochauflösender ESI Massenspektrometrie erfasst. Links zu sehen sind die Massenspektren der Proteine im Ladungszustand +18 und rechts die entsprechenden dekonvolvierten Spektren von apo-hTF, Al₁-hTF und Al₂-hTF, Al₁Fe₁-hTF, Fe₁-hTF und Fe₂-hTF. Die Reaktion erfolgte in HEPES (50 mM)/NH₄HCO₃ (100 mM) Puffer bei pH 7,0 und 25 °C.

Abbildung 25 zeigt die Veränderung des Massenspektrums der Protein-Spezies im Ladungszustand +18 sowie die entsprechenden dekonvolvierten Spektren mit den Spezies apo-hTF, Al₁-hTF und Al₂-hTF, Al₁Fe₁-hTF, Fe₁-hTF und Fe₂-hTF. Der Anteil an gebundenem Eisen bezieht sich dabei auf den zu Beginn der Reaktion vorliegenden Gehalt an Aluminium-Transferrin (Al-hTF).

Zu Beginn der Titration war primär das mit Aluminium einfach gesättigte Protein Al₁-hTF in der Lösung vorhanden. Die Spezies Al₂-hTF und apo-hTF traten ebenfalls auf, ihre Anteile waren jedoch vergleichsweise gering (Abbildung 25, A). Durch die Zugabe von Fe³⁺-Ionen in molaren Äquivalenten von 0,25 oder 0,5 bezogen auf den Proteingehalt kam es zur Bildung von Al₁Fe₁-hTF, der Hybridform des Proteins, sowie zur Bildung von Fe₁- und Fe₂-hTF (Abbildung 25, B-I). Die jeweiligen Sättigungsgrade von Al-hTF mit gebundenen Fe³⁺-Ionen sind den Spektren zugeordnet. Im direkten Vergleich zur Titration von apo-hTF mit Eisen (Abbildung 20) nahm die Komplexität der Reaktion in Gegenwart des Leichtmetalls aufgrund der zunehmenden Anzahl an hTF-Spezies zu.

Abbildung 26 fasst die Entwicklung der prozentualen Anteile aller während der Titration von Al-hTF mit Fe³⁺-Ionen detektierten hTF-Spezies (ausgenommen Al₂-hTF) zusammen. Auch hier wurden den experimentell gewonnenen Daten (Abbildung 26, A) die durch Simulation erhobenen Daten (Abbildung 26, B) gegenübergestellt. Die Simulation beruht dabei auf den bereits aufgeführten Bindungskonstanten für Fe₁-/Fe₂-hTF sowie auf den Bindungskonstanten für Al₁-/Al₂-hTF, $\log K_1 = 13,5$ und $\log K_2 = 12,5$ (zusammengefasst in Sun *et al.*, 1999). Abbildung 26 zeigt, dass die Spezies Al₁-hTF und apo-hTF nur in den Anfangsstadien der Reaktion in der Lösung vorlagen. Ihre Anteile nahmen durch die Zugabe von Fe³⁺-Ionen stetig ab, so dass bei einem Verhältnis von durchschnittlich 1,54 Fe³⁺-Ionen pro Al-hTF keine der beiden Spezies mehr in der Lösung nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu bildeten sich in Gegenwart von Fe³⁺-Ionen vermehrt die Spezies Al₁Fe₁-hTF, Fe₂-hTF und in geringerem Maße Fe₁-hTF. Der Anteil von Al₁Fe₁-hTF am Gesamtproteingehalt erreichte bei einem Fe³⁺/Al-hTF-Verhältnis von durchschnittlich 1,2 (experimentell) bzw. 1,3 (simuliert) ein Maximum. Fe₂-hTF wurde bei einem Sättigungsgrad von 1,5 mit ca. 50 % zur Hauptspezies und erreichte bei einer Sättigung von 1,8 einen Anteil von > 80 %. Aufgrund der Komplexität der Reaktion und der Signalüberlappung mit Fe₁-hTF wird die Spezies Al₂-hTF, die vor Beginn der Titration nur in geringem Umfang gemessen wurde, in der Abbildung nicht mit aufgeführt.

Die Simulation der Speziesverteilung im Verlauf der Titration und die dazugehörigen Beispiel-Spektren stehen im Einklang mit den experimentell erhobenen Daten. Etwaige

Abweichungen werden der begrenzten Anzahl an Messpunkten zur Erstellung der experimentellen Kurven zugeschrieben. Insgesamt zeigt dieses Ergebnis, dass Aluminium die Bindungsaffinität von Eisen zu hTF nicht beeinflusst, und bestätigt damit das Resultat der spektroskopischen Untersuchungen von Tang *et al.* (1995) zur Interaktion von Aluminium mit Transferrin.

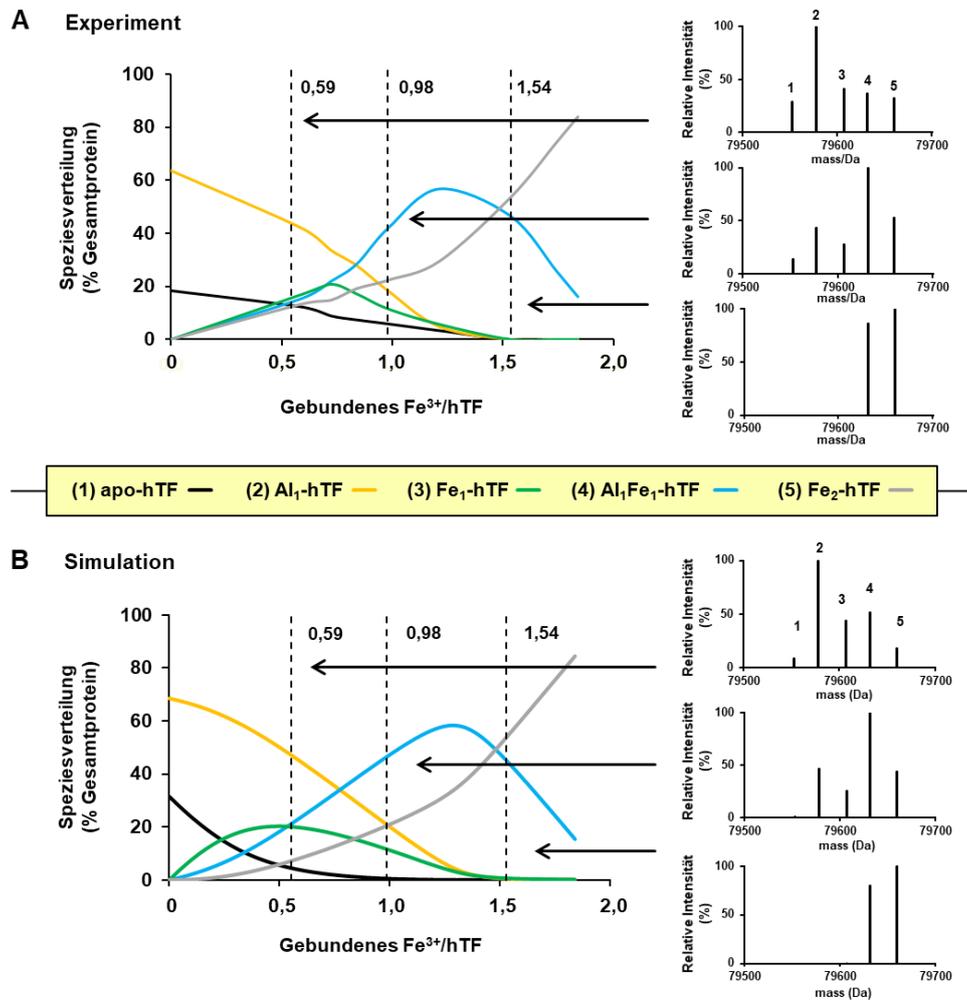


Abbildung 26: Speziesverteilung im Verlauf der Eisensättigung von hTF in Gegenwart von Aluminium. Die prozentualen Anteile der Spezies apo-hTF, Al₁-hTF, Al₁Fe₁-hTF, Fe₁-hTF und Fe₂-hTF dargestellt als Funktion des Eisengehalts von hTF wurden entweder experimentell (A) oder per Simulation (B) erhalten. Die experimentellen Daten basieren dabei auf den Untersuchungen zur Bindung von Eisen an Al-hTF mittels hochauflösender ESI MS. Die Simulation wurde anhand des Programms HySS unter Verwendung der Bindungskonstanten für Fe₁- und Fe₂-hTF sowie Al₁-hTF erstellt. Zum besseren Vergleich von Experiment und Simulation sind rechts der Abbildung Beispiel-Spektren bei einem geringen, mittleren und hohen Sättigungsgrad des Proteins mit Fe³⁺-Ionen angegeben.

Die Metallaustauschreaktion von Al³⁺-Ionen gegen Fe³⁺-Ionen wurde zudem mittels CD-Spektroskopie (Abbildung 27) untersucht. Im Fokus standen dabei die strukturellen Merkmale von Al₂-hTF im Vergleich zu den Strukturen von apo- und Fe₂-hTF (siehe Abbildung 23).

Es wird davon ausgegangen, dass beide Al^{3+} -Ionen an den für Eisen spezifischen Bindungsstellen des Proteins binden (Harris *et al.*, 2003). Trotzdem zeigt das CD-Spektrum von reinem Al-hTF (Abbildung 27, Verhältnis $\text{Fe}^{3+}/\text{Al-hTF} = 0$) im Gegensatz zum CD-Spektrum von Fe_2 -hTF kein Signal im charakteristischen ‚Fingerprint‘-Bereich des Proteins. Dies wird auf die räumliche Anordnung der Peptide der Metallbindungsstellen zurückgeführt, die trotz der Aufnahme von Al^{3+} -Ionen keine Chiralität aufwiesen. Das wiederum spricht dafür, dass sich die Proteinstrukturen von Al_2 -hTF und Fe_2 -hTF in ihren geschlossenen Konformationen voneinander unterscheiden. Dieser Aspekt wird in Kapitel 5.5.1.3 erneut aufgegriffen und in Zusammenhang mit dem toxischen Potential von Aluminium diskutiert. Dass die Tertiärstruktur des Proteins maßgeblich vom jeweiligen Bindungspartner beeinflusst wird, zeigte unter anderem die Studie von Zhang *et al.* (2004) zur Bindung von Bismut an hTF.

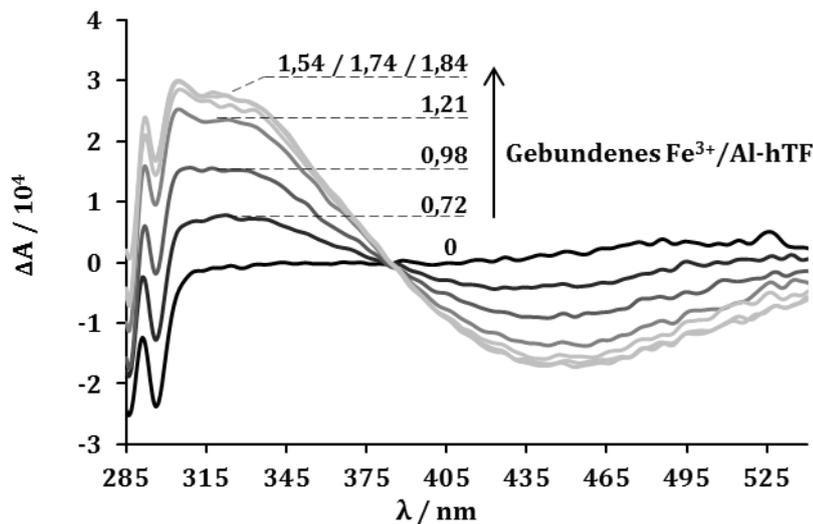


Abbildung 27: CD-Spektren zur Bindung von Eisen an Al-hTF. Al-hTF (1,5 mg/mL) wurde schrittweise mit $\text{Fe}(\text{acac})_3$ -Lösung (2,8 mM) versetzt und das jeweilige CD-Spektrum aufgenommen. Die jeweiligen Anteile an gebundenen Fe^{3+} -Ionen beruhen auf den Untersuchungen mittels ESI MS. Die Reaktion erfolgte in HEPES (50 mM)/ NaHCO_3 (100 mM) Puffer bei pH 7.0 und 25 °C. Dargestellt sind die geglätteten Spektren (FFT3) im Wellenlängenbereich 285-530 nm.

Erst bei Zugabe von Fe^{3+} -Ionen zu Al-hTF zeigte sich das charakteristische CD-Signal von Fe_2 -hTF in einem Wellenlängenbereich von 285-530 nm. Dabei verstärkte sich sowohl das positive als auch das negative CD-Signal, bis durchschnittlich 1,54 Fe^{3+} -Ionen pro Al-hTF gebunden waren. Eine weitere Zugabe von Fe^{3+} -Ionen bewirkte auch hier analog dem Ergebnis zur Titration von Eisen zu apo-hTF (siehe Abbildung 23) keine nennenswerte Veränderung des Spektrums. Dieses Ergebnis stützt die Annahme, dass Al_2 -hTF eine andere Struktur als Fe_2 -hTF aufweist. Andernfalls wäre ein stärkeres Signal bei Zugabe des ersten Fe^{3+} -Ions zur Proteinlösung zu erwarten. Des Weiteren bestätigt es die im Vergleich

zu Aluminium deutlich höhere Bindungsaffinität von Eisen zum Protein. Auch Tang *et al.* (1995) nutzten die Methode des Circular dichroismus für strukturelle Analysen von apo- und holo-hTF sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Al^{3+} -Ionen. Hierbei wurde eine leichte Konformationsänderung für apo-hTF in Gegenwart von Aluminium im fernen UV-Bereich und bei einer Wellenlänge von 288 nm festgestellt. Die Wissenschaftler führten dies auf eine Veränderung des strukturellen Umfelds von Tryptophan- und Tyrosinresten im Protein zurück. Diese Annahme wird ebenfalls von anderen Wissenschaftlern vertreten (Tomimatsu und Donovan, 1976b; Battistuzzi *et al.*, 1995). In einem höheren Wellenlängenbereich > 300 nm bewirkte die Zugabe von Al^{3+} -Ionen zu apo-hTF auch bei den Untersuchungen von Pessoa *et al.* (2014) keine Veränderung des CD-Spektrums. Des Weiteren wurde aufgrund der im Vergleich zu Eisen niedrigeren Bindungsaffinität von Aluminium zu hTF auch in dieser Studie kein Einfluss des Leichtmetalls auf das CD-Spektrum von eisengesättigtem hTF festgestellt (Tang *et al.*, 1995).

Anhand der in Abbildung 22 dargestellten Verteilung von Fe^{3+} -Ionen auf die zwei Bindungsstellen von hTF wird davon ausgegangen, dass es im Zuge der Reaktion von Fe^{3+} mit Al_2 -hTF zunächst zu einer Verdrängung von Al^{3+} aus der C-terminalen Domäne des Proteins kommt. In der daraus resultierenden Hybridform des Proteins, Al_1Fe_1 -hTF, wäre Fe^{3+} demnach in der C- und Al^{3+} in der N-terminalen Domäne gebunden.

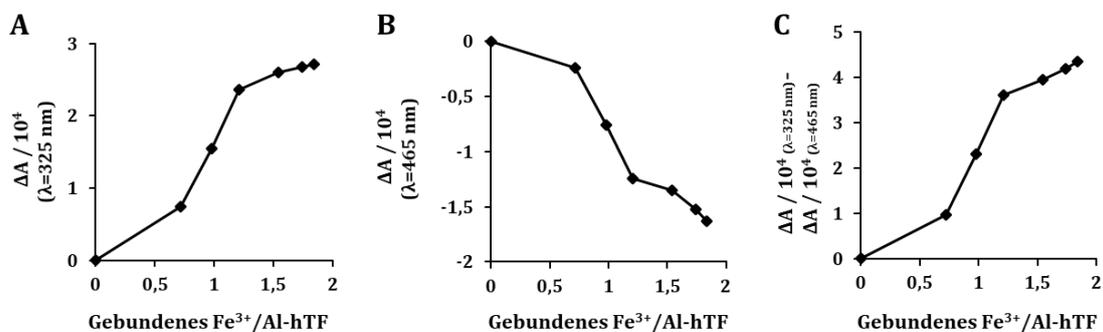


Abbildung 28: Korrelation von CD-Signalintensität und dem Anteil an gebundenem Eisen bei Titration von Eisen zu Al-hTF. Die Intensität des CD-Signals bei einer Wellenlänge von 325 nm (A) bzw. 465 nm (B) wurde ins Verhältnis zum Anteil an gebundenen Fe^{3+} -Ionen pro Molekül hTF gesetzt. In (C) werden (A) und (B) miteinander kombiniert, indem auf der y-Achse der Abstand beider CD-Signalmaxima aufgetragen wird.

In Abbildung 28 wird das CD-Signal bei 325 nm (A) bzw. 465 nm (B) gegen den Sättigungsgrad des Proteins mit Fe^{3+} -Ionen aufgetragen. Der Anteil an gebundenem Fe^{3+} -Ionen pro Molekül Al-hTF wurde dabei aus den Untersuchungen mittels ESI MS abgeleitet. Auch hier kombiniert Abbildung 28 (C) beide Signalmaxima, indem sich die y-Achse auf den Abstand beider Signalmaxima bezieht. Zunächst steigt das Signal bis zu einem

Sättigungsgrad von circa 1,5 an, um anschließend in die Plateau-Phase überzugehen. Diese Plateauphase ist jedoch nur in Abbildung 28 (A) deutlich ausgeprägt. Dieses Ergebnis stützt die Annahme, dass primär das erste in der C-terminalen Domäne von hTF gebundene Fe³⁺-Ion für die Faltung des Proteins verantwortlich ist und zwar unabhängig davon, ob Aluminium an das Protein gebunden ist oder nicht.

5.5.1.3 Toxikologische Interpretation der Bindung von Al^(III) an hTF

Bereits zu Beginn dieser Arbeit wurde auf die wissenschaftlich belegten sowie vermuteten negativen Auswirkungen von Aluminium auf die menschliche Gesundheit eingegangen (siehe Kapitel 2.1.3). Der nun folgende Abschnitt stellt die mittels ESI MS- sowie CD-Experimenten gewonnenen Erkenntnisse zur Struktur von Al₁-hTF, Al₂-hTF und Al₁Fe₁-hTF in genau diesen Kontext und bewertet sie hinsichtlich ihrer Relevanz für die Toxizität von Aluminium.

Das Auftreten von toxischen Effekten durch Aluminium ist an bestimmte Bedingungen geknüpft. Dazu gehören die Resorption des Metalls durch den Organismus, der Transport der Ionen im Blutserum und schließlich die Aufnahme von Aluminium in die Zellen der einzelnen Organe. Im Hinblick auf die Neurotoxizität beinhaltet dies das Überwinden der Blut-Hirn-Schranke und im Fall von Krebs das Passieren von Zellmembranen. Obwohl der Mensch Schätzungen zufolge täglich gegenüber Aluminium oral, dermal und inhalativ exponiert ist, wird nur ein Bruchteil des Metalls tatsächlich vom Körper aufgenommen (zusammengefasst in Klotz *et al.*, 2017). Problematisch wird es allerdings dann, wenn die natürlichen Barrierefunktionen des Körpers umgangen werden. Dies geschieht z.B. durch das Auftragen von Antitranspirantien auf eine zuvor verletzte Hautoberfläche oder die direkte Injektion aluminiumhaltiger Medikamente bzw. Infusionen unter die Haut beziehungsweise in die Blutbahn. Letzteres kann fatale Folgen haben, wie der Fall der mit kontaminierte Dialyseflüssigkeit behandelten Patienten aus der Vergangenheit zeigte (siehe 2.1.3, *Neurotoxizität und neurodegenerative Erkrankungen*). Wie bereits erwähnt, erfolgt der Transport des Leichtmetalls im Blut primär gebunden an Transferrin (80 %) (zusammengefasst in Willhite *et al.*, 2014). Offene Fragen gibt es jedoch bezüglich der zellulären Aufnahme von Aluminium sowie der Fähigkeit des Metalls, biologische Epithelien zu überwinden. Exley und Mold (2015) formulierten in diesem Zusammenhang eine Reihe von Hypothesen. Unterschieden wurde dabei zunächst zwischen einem parazellulären und einem transzellulären Transport. Beim parazellulären Transport wird die Substanz, in diesem Fall das solvatisierte Al³⁺-Ion, passiv zwischen den Zellen hindurch transportiert. Dieser Transport wird gegebenenfalls durch *tight junctions* reguliert. Die

tatsächliche Aufnahme des Metallions in die Zelle setzt jedoch einen spezifischen Transport voraus. Im Gegensatz dazu wird beim transzellulären Transport die Substanz, z.B. Aluminium gebunden in einem neutralen niedermolekularen Komplex, direkt durch die Zelle transportiert. Dies erfolgt unter anderem durch eine adsorptive bzw. rezeptorvermittelte Aufnahme des Komplexes über Endozytose und einer anschließenden Abgabe über Exozytose. Ebenfalls diskutiert wurde die Möglichkeit, dass Aluminium über spezifische Kanäle in die Zelle gelangt. An dieser Stelle sei nochmals darauf hingewiesen, dass es sich bei all diesen Vorschlägen um rein hypothetische Ansätze handelte. Zuverlässige, experimentelle Daten zum genauen Aufnahmemechanismus von Aluminium in die Zelle fehlen bislang. Dies wird primär auf die hohe Gefahr der Kontamination beim quantitativen Nachweis von Aluminium im Spurenbereich zurückgeführt.

Die Frage bleibt, wie Aluminium zur Entfaltung seines toxischen Potentials körpereigene Barrieren überwindet. Aufgrund der Bindung des Leichtmetalls an hTF wurde lange Zeit davon ausgegangen, dass $\text{Al}_2\text{-hTF}$ dem gleichen Aufnahmemechanismus wie $\text{Fe}_2\text{-hTF}$ folgt. Dies beinhaltet die Bindung an den hTF-Rezeptor, gefolgt von einer endozytotischen Aufnahme des gesättigten Metall-Protein-Komplexes in die Zelle (McGregor *et al.*, 1990; Cochran *et al.*, 1991; Kasai *et al.*, 1991). Neuere Studien bezweifeln jedoch diesen Mechanismus zur Aufnahme von $\text{Al}_2\text{-hTF}$ (Hémadi *et al.*, 2003; Sakajiri *et al.*, 2010; Chahine *et al.*, 2012). Dies gilt auch für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Strukturuntersuchungen mittels CD-Spektroskopie. Hierbei zeigten sich klare Unterschiede in den Tertiärstrukturen von $\text{Al}_1\text{-hTF}$ und $\text{Al}_2\text{-hTF}$ im Vergleich zu $\text{Fe}_2\text{-hTF}$. Eine Bindung von $\text{Al}_1\text{-hTF}$ bzw. $\text{Al}_2\text{-hTF}$ an den Rezeptor mit anschließender Aufnahme des Komplexes in die Zelle wird daher als unwahrscheinlich angesehen. Doch gilt dies auch für die mittels ESI MS detektierte Hybridform des Proteins, $\text{Al}_1\text{Fe}_1\text{-hTF}$? Dieser Frage wird im folgenden Abschnitt nachgegangen.

Nur etwa 30 % der im Blutkreislauf zirkulierenden hTF-Moleküle enthalten Eisen. Unsere Untersuchungen zeigen, dass es sich hierbei immer um eine Mischung aus einfach gesättigtem $\text{Fe}_1\text{-hTF}$ und vollständig gesättigtem $\text{Fe}_2\text{-hTF}$ handelt (siehe Abbildung 22). Die Wahrscheinlichkeit der Bildung von $\text{Al}_1\text{Fe}_1\text{-hTF}$ steigt demnach mit einer zunehmenden Konzentration von Al^{3+} -Ionen im Blutkreislauf. Wie bereits erwähnt, bindet das Fe^{3+} -Ion in der Hybridform bevorzugt in der C- und das Al^{3+} -Ion bevorzugt in der N-terminalen Domäne des Proteins. Beide Bindungsstellen haben jedoch einen unterschiedlich starken Einfluss auf die Faltung des Proteins. Hierbei überwiegt der Einfluss der C-terminalen Bindungsstelle. Dies wird durch die zweistufige Interaktion des gesättigten Proteins mit dem Rezeptor bestätigt (Hémadi *et al.*, 2004). Auf struktureller

Ebene erscheint demnach eine Bindung der Hybridform an den Rezeptor als wahrscheinlich. Im Rahmen der Untersuchungen von Hémadi *et al.* (2003) konnte jedoch keine Interaktion von $\text{Al}_1\text{Fe}_1\text{-hTF}$ mit dem hTF-Rezeptor auf molekularer Ebene nachgewiesen werden. Dies stellt die rezeptorvermittelte Endozytose der Hybridform als möglichen Aufnahmemechanismus für Al^{3+} -Ionen in die Zelle trotz der strukturellen Ähnlichkeiten von $\text{Al}_1\text{Fe}_1\text{-hTF}$ und $\text{Fe}_2\text{-hTF}$ in Frage. Da es sich bei den Aussagen von Hémadi *et al.* (2003) bezüglich $\text{Al}_1\text{Fe}_1\text{-hTF}$ jedoch bislang um eine einzelne Studie handelt, wäre es gut, dieses Ergebnis durch gezielte Untersuchungen zu $\text{Al}_1\text{Fe}_1\text{-hTF}$ auf Proteinebene abzusichern.

5.5.2 Einfluss von Aluminium auf das Eisenspeicherprotein Ferritin

Die genaue Regulation des Eisenhaushalts und die Aufrechterhaltung der zellulären Eisenhomöostase sind so bedeutend für den menschlichen Organismus, dass eine Vielzahl an Proteinen in diesen Prozess involviert ist (zusammengefasst in Hentze *et al.*, 2004). Ferritin fungiert dabei als der wichtigste zelluläre Eisenspeicher. Nicht nur die ausreichende Versorgung der Zelle mit dem essentiellen Spurenelement wird dadurch gewährleistet, sondern auch das Auftreten ungebundener, redoxaktiver Eisen-Ionen verhindert (zusammengefasst in Harrison und Arosio, 1996; Arosio *et al.*, 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Ergebnisse erster *in vitro* Untersuchungen zum Einfluss von Aluminium auf die zelluläre Ferritin-Konzentration vorgestellt. Dafür wurden A549-Zellen für 24 Stunden mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ beziehungsweise $\text{C}_6\text{H}_5\text{AlO}_7$ inkubiert. Diese zwei Aluminiumverbindungen differieren sehr stark in ihren chemischen Eigenschaften. Die anschließende quantitative Bestimmung des Ferritin-Gehalts erfolgte mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Das Ergebnis der Untersuchungen wird hinsichtlich der Frage diskutiert, inwieweit das Protein Ferritin als Indikator für die zelluläre Aufnahme von Aluminium herangezogen werden kann.

Abbildung 29 (A) zeigt den Einfluss von $\text{Al}(\text{acac})_3$ auf den Ferritin-Gehalt von A549-Zellen im Konzentrationsbereich 50-200 μM . Die ermittelten Werte sind jeweils als prozentualer Anteil des Ferritin-Gehalts der Kontrolle angegeben. Hierbei handelte es sich um Zellen, die ausschließlich mit dem für die Aluminium-Stammlösung verwendeten Lösemittel DMSO (0,2 % v/v) inkubiert worden waren. Die Behandlung der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ bewirkte zunächst eine konzentrationsabhängige Abnahme des zellulären Ferritin-Gehalts bis auf 75 % bei einer Konzentration von 100 μM . Bei Behandlung der Zellen mit 125 μM $\text{Al}(\text{acac})_3$ zeigte sich tendenziell wieder eine leichte Zunahme des Ferritin-Gehalts, die sich jedoch unter Berücksichtigung der Standardabweichung relativierte. Erst die Inkubation

der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ in den Konzentrationen 150 und 200 μM äußerte sich in einem signifikanten Anstieg des zellulären Ferritin-Gehalts auf 150 bzw. 225 % bezogen auf den Ferritin-Gehalt der Kontrolle.

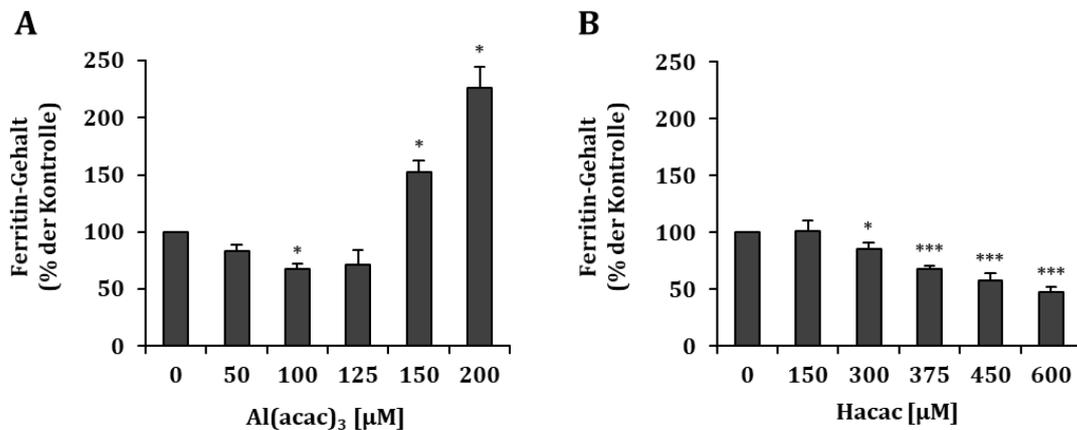


Abbildung 29: Einfluss von $\text{Al}(\text{acac})_3$ sowie Hacac auf den intrazellulären Ferritin-Gehalt. A549-Zellen wurden für 24 h mit der Aluminiumverbindung (A) bzw. dem Liganden Hacac (B) inkubiert. Die Bestimmung des Ferritin-Gehalts erfolgte mittels SimpleStep ELISA Kit. Gezeigt sind die Mittelwerte + SD aus 3 unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen. Statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle nach ANOVA mit anschließendem Dunnett T-, beziehungsweise Dunnett T3-Test: * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$.

Für die Interpretation dieses Ergebnisses wurde ebenfalls der Einfluss des Liganden Acetylaceton (Hacac) auf den zellulären Ferritin-Gehalt separat untersucht (Abbildung 29, B). Die getesteten Konzentrationen entsprachen dabei den für die Behandlung mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ eingesetzten Konzentrationen an Acetylacetonat (Acac^-) unter Berücksichtigung der Dreifach-Komplexierung von Al^{3+} durch diesen zweizähligen, organischen Chelator. Die Angabe des Ferritin-Gehalts bezieht sich wie bereits bei $\text{Al}(\text{acac})_3$ auf den Ferritin-Gehalt der mitgeführten Kontrolle. In diesem Fall handelte es sich dabei um unbehandelte A549-Zellen. Anhand von Abbildung 29 (B) wird deutlich, dass der Ligand selbst den Ferritin-Gehalt der Zellen beeinflusste. So führte die Behandlung der Zellen mit Hacac ab 300 μM zu einer konzentrationsabhängigen, signifikanten Abnahme des zellulären Ferritin-Gehalts. Dieser erreichte bei der höchsten, getesteten Konzentration von 600 μM Hacac noch knapp 50 % des Ferritin-Gehalts der Kontrolle.

Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass sowohl die Inkubation der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ als auch mit Hacac im niedrigen Konzentrationsbereich zu einer Abnahme des zellulären Ferritin-Gehalts führten. Diese Abnahme wird im Fall von $\text{Al}(\text{acac})_3$ jedoch nicht auf das Metall, sondern in erster Linie auf den Liganden zurückgeführt. Für diesen wird angenommen, dass er in der Zelle mit dem Eisenspeicherprotein um die Bindung von Fe^{3+} -Ionen konkurrierte. Eine verstärkte Bindung der Metallionen durch den Liganden

bewirkte dabei eine verringerte Synthese von Ferritin, so dass die zelluläre Konzentration des Proteins sank.

Erst im höheren Konzentrationsbereich zeigten sich Unterschiede bezüglich der Wirkungen von $\text{Al}(\text{acac})_3$ und Hacac auf den intrazellulären Ferritin-Gehalt. Die vermehrte Bildung des Eisenspeicherproteins bei Behandlung der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ in den Konzentrationen 150 bzw. 200 μM kann dabei unterschiedliche Ursachen haben.

Möglicherweise handelte es sich um einen Abwehrmechanismus der Zelle gegen vermehrt frei vorliegende Al^{3+} -Ionen. Diese Annahme basiert auf den Studienergebnissen anderer Wissenschaftler, die Ferritin als detoxifizierendes Agens identifizierten (Fleming und Joshi, 1987; Rama Kumar und Prasad, 1999; Sakamoto *et al.*, 2004; Bottcher *et al.*, 2011). An dieser Stelle soll auf das *in vivo* Experiment von Sakamoto *et al.* (2004) mit männlichen Wistar-Ratten etwas näher eingegangen werden. Die Forscher behandelten die Tiere für sieben Wochen mit Aluminiumlactat und untersuchten anschließend den Gehalt von Aluminium pro Molekül Ferritin. Im Vergleich zur Gruppe der Kontrolltiere stieg der Anteil an Aluminium pro Molekül Ferritin durch die Behandlung stark an. Der Anteil an gebundenem Eisen blieb dabei unverändert. Die Forscher interpretierten das Ergebnis dahingehend, dass Aluminium durch die Bindung an Ferritin abgeschirmt wurde und auf diese Weise direkt toxische Effekte durch das Metall verhindert wurden.

Im Hinblick auf die steigende Ferritin-Konzentration ebenfalls denkbar ist eine Zunahme der intrazellulären Konzentration an Fe^{3+} -Ionen aufgrund einer durch Aluminium induzierten, gesteigerten Aufnahme des Spurenelements in die Zelle. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu Ferritin lassen an dieser Stelle jedoch keine Aussage bezüglich einer Veränderung des zellulären Eisen-Gehalts oder einer vermehrten Bindung von Fe^{3+} an Ferritin zu. Hierfür bedarf es z.B. einer quantitativen Bestimmung des Eisengehalts der Ferritin-Moleküle.

Aufgrund des lipophilen Charakters von $\text{Al}(\text{acac})_3$, der eine zelluläre Aufnahme des Metalls über einfache Membrandiffusion als wahrscheinlich erscheinen lässt, wird der Anstieg des Ferritin-Gehalts zum jetzigen Zeitpunkt primär als Abwehrmechanismus der Zelle gegen eine zunehmende Anzahl freier Al^{3+} -Ionen im Zytoplasma gewertet. Untersuchungen zeigten, dass es im Zuge der Diffusion zu einer Interaktion dieser Verbindung sowohl mit der Außen- als auch der Innenseite der Lipiddoppelschicht kommt. Dies kann zu einer Veränderung der Membran sowohl auf struktureller als auch auf funktioneller Ebene führen (Suwalsky *et al.*, 1999).

Es bleibt die Frage, inwieweit Ferritin als Indikator für die zelluläre Aufnahme von Aluminium herangezogen werden kann? Dazu wurde der Einfluss einer weiteren Aluminiumverbindung, nämlich Aluminiumcitrat ($C_6H_5AlO_7$), auf den Ferritin-Gehalt von A549-Zellen untersucht. Citrat ist, wie bereits erwähnt, der wichtigste, niedermolekulare Ligand für Al^{3+} -Ionen im Blut (zusammengefasst in Martin, 1986; Willhite *et al.*, 2014). Im Gegensatz zu $Al(acac)_3$ handelt es sich jedoch nicht um eine lipophile Verbindung, deren zelluläre Aufnahme inklusive dem dabei zugrundeliegenden Mechanismus experimentell bislang nicht belegt ist.

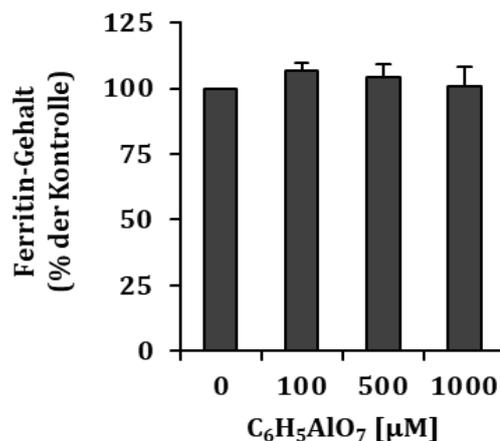


Abbildung 30: Einfluss von Aluminiumcitrat auf den intrazellulären Ferritin-Gehalt. A549-Zellen wurden für 24 h mit $C_6H_5AlO_7$ inkubiert. Die Bestimmung des Ferritin-Gehalts erfolgte mittels SimpleStep ELISA Kit. Gezeigt sind die Mittelwerte + SD aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

Abbildung 30 fasst das Ergebnis der Untersuchungen zum Einfluss von Aluminiumcitrat auf das Eisenspeicherprotein zusammen. Die Behandlung der Zellen mit der Substanz hatte demnach keinen Einfluss auf den zellulären Ferritin-Gehalt. Selbst bei Inkubation der Zellen mit 1 mM $C_6H_5AlO_7$ zeigten sich keine Effekte. Dies wird auf eine fehlende Aufnahme von Aluminium in die Zelle zurückgeführt.

Die quantitative Bestimmung von Aluminium im Spurenbereich stellt aufgrund der hohen Kontaminationsgefahr mit dem Metall hohe Anforderungen an die Probengewinnung, Probenaufarbeitung und anschließende Analytik (zusammengefasst in Ščančar und Milačič, 2006; Tria *et al.*, 2007). Die Bestimmung des Aluminiumgehalts erfolgt dabei klassischerweise mittels AAS oder ICP-MS (Fairman *et al.*, 1998; Selvi *et al.*, 2017) gerne auch in Kombination mit weiteren Analysemethoden (zusammengefasst in Bi *et al.*, 2001). Dies wird dann unter dem Begriff der Hybridtechnik zusammengefasst, bei der einer Detektionseinheit (z.B. Flammen-AAS) meist eine Trenneinheit (z.B. HPLC) vorgeschaltet wird. Dadurch werden nicht nur Informationen zum Aluminiumgehalt, sondern auch zur

Speziesverteilung des Leichtmetalls in der Probe erhalten (Frankowski *et al.*, 2010). Die Probenaufarbeitung und anschließende Bestimmung des Metallgehalts erfolgt dabei im Idealfall unter Reinraumbedingungen. Da sich dies jedoch nicht für alle Labore realisieren lässt, sind weniger kontaminationsanfällige Methoden zur Bestimmung von Aluminium in biologischen Proben erforderlich. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Untersuchungen zum Einfluss von Aluminium auf den Ferritin-Gehalt von A549-Zellen geben erste Hinweise darauf, dass das Eisenspeicherprotein als möglicher Indikator für die zelluläre Aufnahme von Aluminium in Frage kommt. Voraussetzungen dafür sind jedoch die Aufnahme ausreichend hoher Mengen des Leichtmetalls sowie die separate Untersuchung des Einflusses des jeweiligen Liganden. Die Idee, Ferritin nicht nur als Indikator für den Eisen-Status (zusammengefasst in Worwood, 1997), sondern auch als Indikator für das Auftreten weiterer Metalle heranzuziehen, ist nicht neu (Lu *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2015). In den epidemiologischen Untersuchungen von Kim *et al.* (2015) wurde z.B. die Serum-Konzentrationen der Metalle Mangan, Blei und Cadmium auf den Ferritin-Gehalt des Blutserums bezogen. Dies ermöglichte es den Wissenschaftlern, erste Aussagen über die Belastung der Bewohner des amerikanischen Bundesstaats Ohio hinsichtlich der genannten Metalle zu treffen.

Anhand von weiteren Experimenten mit lipophilen und nicht lipophilen Aluminiumverbindungen gilt es, die Eignung von Ferritin als Indikator für die zelluläre Aufnahme von Aluminium bei gleichzeitigem Monitoring des Eisengehalts zu überprüfen.

6 Zusammenfassende Diskussion

Aluminium gehört zur Gruppe der Leichtmetalle und ist nach Sauerstoff und Silizium das dritthäufigste Element in der Erdkruste. Seine geringe Dichte und natürliche Omnipräsenz in der Umwelt machen dieses Metall zu einem sehr attraktiven Werkstoff für industrielle Anwendungen, hier vor allem zu nennen der Fahrzeugbau und die Elektrotechnik. Weitere Eigenschaften bedingen seinen Einsatz in der Pharma- und in der Kosmetikindustrie. All dies führt zu einer vielfältigen Exposition des Menschen gegenüber Aluminium primär über das Trinkwasser und die Nahrung, aber auch über Medizinprodukte und Kosmetika. Für einen Arbeiter aus der Metallindustrie kann insbesondere das Arbeitsumfeld zu einer gesteigerten, inneren Belastung mit dem Metall führen. Im Vordergrund steht dabei die inhalative Aufnahme feinsten Aluminiumpartikel (zusammengefasst in Priest, 2004; Willhite *et al.*, 2014; BfR, 2017; Klotz *et al.*, 2017).

Nach derzeitigem Stand des Wissens übernimmt Aluminium keine essentielle Funktion im menschlichen Körper. Trotzdem lässt sich das Metall im gesamten Organismus, vor allem im Knochen und in der Lunge, nachweisen (Exley, 2013). In sehr hohen Konzentrationen wirkt Aluminium dabei neurotoxisch und kann bei einer gesteigerten inhalativen Exposition am Arbeitsplatz zu einer sogenannten Aluminiumstaublunge führen (Parkinson *et al.*, 1981; Kraus *et al.*, 2006; Petrik *et al.*, 2007; zusammengefasst in Bharathi *et al.*, 2008). Weitere negative Auswirkungen des Metalls auf die Gesundheit des Menschen werden kontrovers diskutiert. Vermehrt stellt sich hierbei die Frage nach dem genotoxischen, kanzerogenen Potential des Metalls (Darbre, 2005; Klotz *et al.*, 2017).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb vertiefende Untersuchungen zum Einfluss von Aluminium in Form der lipophilen Modellsubstanz $\text{Al}(\text{acac})_3$ auf die genomische Stabilität durchgeführt. In Anlehnung an die beruflich bedingte, inhalative Exposition des Menschen gegenüber dem Metall am Arbeitsplatz erfolgten die Analysen *in vitro* mit A549-Lungenkarzinomzellen aus dem Alveolartrakt. Getestet wurde dabei zunächst die zytotoxische Wirkung der Verbindung im Konzentrationsbereich 50-200 μM anhand der Parameter Zellviabilität und metabolischer Aktivität. Die 24-stündige Inkubation der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ führte dabei im Vergleich zur Kontrolle erst ab einer behandelnden Konzentration von 125 μM zu einer Abnahme der Zellzahl auf circa 86 % sowie zu einer verringerten Koloniebildungsfähigkeit der Zellen auf circa 60 %. Bei einer Konzentration von 150 μM $\text{Al}(\text{acac})_3$ wurden nahezu keine Kolonien mehr gebildet. Dies spricht für eine stark zytotoxische Wirkung der Substanz in den Zellen. Ein negativer Einfluss auf die metabolische Aktivität der Zellen gemessen am ATP-Gehalt wurde bei dieser

Konzentration hingegen nicht festgestellt. Ein ähnliches Ergebnis zeigten die Untersuchungen zur zytotoxischen Wirkung der Verbindung bei 24-stündiger Inkubation der Zellen in Kombination mit einer zusätzlichen Bestrahlung von 1 Gray und einer Nachinkubationszeit von 8 Stunden in frischem Medium. Erst die Behandlung der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3 \geq 150 \mu\text{M}$ führte dabei zu einer starken Abnahme der Zellzahl sowie dem Verlust der Koloniebildungsfähigkeit. Die zusätzliche Bestrahlung der Zellen bewirkte ausschließlich im Konzentrationsbereich $\leq 100 \mu\text{M}$ $\text{Al}(\text{acac})_3$ eine signifikant stärkere Abnahme der Koloniebildungsfähigkeit im Vergleich zur korrespondierenden, nicht bestrahlten Probe. Die festgestellten Effekte konnten dabei eindeutig auf das Metall zurückgeführt werden, da der Ligand selbst, mit und ohne Bestrahlung, keinen Einfluss auf die Zellviabilität beziehungsweise die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen hatte.

Es stellte sich die Frage nach der Ursache für die im Rahmen der Zytotoxizitätsexperimente festgestellte Abnahme der Zellzahl sowie dem Verlust der Koloniebildungsfähigkeit der A549-Zellen. In diesem Zusammenhang diskutiert und durchflusszytometrisch untersucht wurde zum einen das Auslösen von Zelltodmechanismen, zum anderen die Induktion eines Zellzyklusarrests. Hierbei zeigte sich, dass die Abnahme der Zellzahl beziehungsweise der Verlust der Koloniebildungsfähigkeit bei Inkubation der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3 \geq 150 \mu\text{M}$ nicht durch ein vermehrtes Zellsterben hervorgerufen wurde. Eine geringfügige Zunahme an apoptotischen Zellen wurde ausschließlich bei 24-stündiger Inkubation der Zellen mit 150 beziehungsweise $200 \mu\text{M}$ $\text{Al}(\text{acac})_3$ mit und ohne Bestrahlung und einer anschließenden Nachinkubationszeit von 8 Stunden festgestellt. Hingegen bestätigte sich der Verdacht eines Zellzyklusarrests durch die Detektion eines G_2 -Arrests gepaart mit einem zeitlich verzögert einsetzenden G_1 -Arrest. Der Anteil an Zellen in der S-Phase nahm infolgedessen von ursprünglich 10 auf $< 5 \%$ ab. Dieser Effekt trat nur in den mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ $150 \mu\text{M}$ behandelten Zellproben auf und wurde durch die zusätzliche Bestrahlung verstärkt. Die Behandlung der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ der Konzentrationen 50 beziehungsweise $100 \mu\text{M}$ sowie mit dem Liganden hatte hingegen keinen Einfluss auf den Zellzyklus.

Im Anschluss daran verlagerte sich der Fokus dieser Arbeit auf den direkten Einfluss des Leichtmetalls in Form der Verbindung $\text{Al}(\text{acac})_3$ auf die DNA und damit assoziierte Reparaturwege. Die Untersuchungen erfolgten mithilfe der Alkalischen Entwindung, der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) sowie der Immunfluoreszenzspektroskopie. Es ist bekannt, dass Aluminium in Form seines dreifach positiv geladenen Ions primär mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der DNA und den Sauerstoffatomen der DNA-Basen wechselwirkt. Strukturelle Veränderungen der DNA können als Folge auftreten und sind

möglicherweise ein wichtiger Faktor im Hinblick auf die toxische Wirkung des Metalls (Rao und Stein, 2003; Achary *et al.*, 2008; Sappino *et al.*, 2012).

Die 24-stündige Behandlung der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3 \leq 200 \mu\text{M}$ bewirkte keine Zunahme an DNA-Einzelstrangbrüchen und keine Hemmung ihrer Reparatur. Dies wurde durch die Methode der Alkalischen Entwindung festgestellt. Im Gegensatz dazu induzierte $\text{Al}(\text{acac})_3$ in einer Konzentration von $150 \mu\text{M}$ DNA-Doppelstrangbrüche in den A549-Zellen und führte zu einer Hemmung ihrer Reparatur. Die allgemeinen Untersuchungen erfolgten dabei mithilfe der PFGE und vertiefend durch den spektroskopischen Nachweis von γH2AX - beziehungsweise Rad51-Foci. Die Anzahl von γH2AX -Foci im Zellkern stieg in Folge der Behandlung der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3 150 \mu\text{M}$ deutlich an. Dieser Effekt zeigte sich verstärkt in der bestrahlten Probe. Hierbei nahm die Anzahl detektierter γH2AX -Foci von 6 in der bestrahlten Kontrolle auf 13 in der mit $\text{Al}(\text{acac})_3 150 \mu\text{M}$ behandelten und bestrahlten Probe signifikant zu. Der Ligand hatte keinen Einfluss auf die Entstehung von γH2AX -Foci.

Auch Sappino *et al.* (2012) untersuchten die DNA-schädigende Wirkung von Aluminium mithilfe der Immunfluoreszenzspektroskopie und detektierten eine konzentrations- sowie zeitabhängige Zunahme an γH2AX -Foci in humanen MCF-10A Brustepithelzellen bei einer Behandlung mit AlCl_3 . Dieser Effekt beschränkte sich dabei auf proliferierende Zellen und deutet auf die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch das Metall hin. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit stellten die Wissenschaftler keine Hemmung der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen im Zuge der Behandlung mit AlCl_3 bei einer zusätzlichen Bestrahlung der Zellen fest. Allerdings wurde bei der Auswertung die Zellzyklusphasenverteilung der MCF-10A Zellen nicht berücksichtigt, was als problematisch angesehen wird.

Bei den Untersuchungen zur Entstehung von Rad51-Foci wurden 2 Stunden nach der Bestrahlung der Zellen mit 1 Gray in der mit $150 \mu\text{M}$ $\text{Al}(\text{acac})_3$ behandelten Probe signifikant weniger Rad51-Foci (< 5) nachgewiesen als in der Kontrolle (~ 18). Dieses Ergebnis konnte mittels Western Blot auf eine starke Abnahme des zellulären Rad51-Proteingehalts zurückgeführt werden. Bei 24-stündiger Inkubation der Zellen mit $150 \mu\text{M}$ $\text{Al}(\text{acac})_3$ lag der Gehalt an Rad51 noch bei circa 20 % bezogen auf die Kontrolle.

Die im Anschluss durchgeführten Genexpressionsanalysen zeigten, dass die starke Abnahme der zellulären Rad51-Konzentration auf einer verminderten Transkription des für das Protein codierenden Gens beruht. Dafür eingesetzt wurde die Methode der *High-throughput RT-qPCR*, die die simultane Untersuchung von 95 Genen unterschiedlicher Signalwege in 96 Proben ermöglicht (Fischer *et al.*, 2016). Die 24-stündige Behandlung

der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ führte dabei zu einer verminderten Expression eines Großteils der untersuchten Gene aus dem Bereich der DNA-Schadensantwort und der DNA-Reparatur. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig und der kritische Wert von ≤ -1 wurde erst bei der höchsten Behandlungskonzentration von $150 \mu\text{M}$ unterschritten. Möglicherweise lässt sich dies auf eine Hemmung wichtiger Transkriptionsfaktoren wie z.B. p53 oder aber der Stabilisierung der DNA-Doppelhelix durch Aluminium zurückführen (Karlik *et al.*, 1980; Johnson *et al.*, 2004). Da der Ligand keinen Einfluss auf die Expression der betrachteten Gene hatte, konnten die auftretenden Effekte dem Metall zugeschrieben werden. Ein vergleichbares Ergebnis wurde für die zusätzlich bestrahlten Proben erhalten. Besonders deutliche Effekte zeigten sich in diesem Zusammenhang hinsichtlich der DNA-Doppelstrangbruchreparatur mittels HR. Weitere Reparaturwege schienen jedoch ebenfalls durch das Leichtmetall negativ beeinflusst zu werden. Dies gilt es anhand von weiteren Untersuchungen zu klären.

Anhand der Genexpressionsanalysen bestätigte sich zudem der Einfluss des Metalls auf die Proliferation der A549-Zellen und wichtige Transkriptionsfaktoren.

Abbildung 31 fasst die gewonnenen Erkenntnisse zum Einfluss von Aluminium auf den Zellzyklus, die Zelltodmechanismen und die DNA sowie ihrer Reparatur zusammen. Es handelt sich um eine stark vereinfachte Darstellung der komplexen Prozesse.

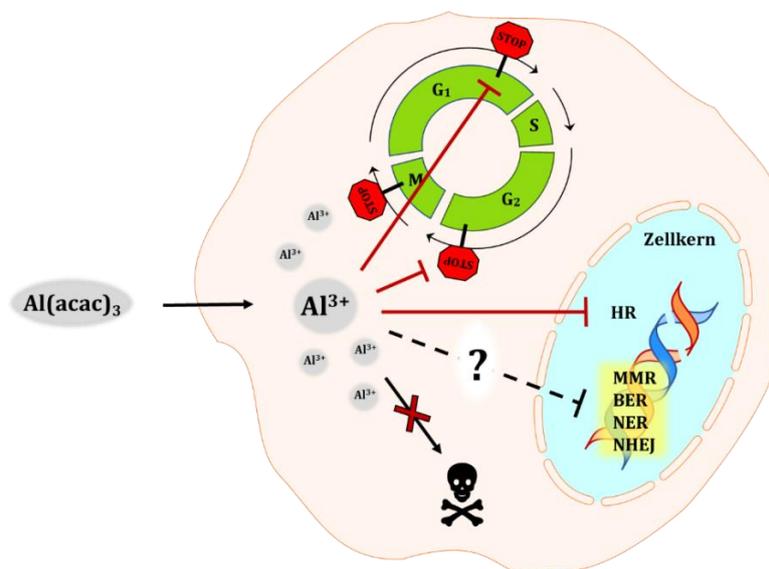


Abbildung 31: Einfluss von Aluminium auf zelluläre Prozesse in A549-Zellen – ein Überblick. Die lipophile Verbindung $\text{Al}(\text{acac})_3$ ist in der Lage, biologische Membranen zu überwinden und führt dadurch zu einem Anstieg der Konzentration an Al^{3+} -Ionen in der Zelle. Bei ausreichend hohen Konzentrationen kommt es infolgedessen zu einem Zellzyklusarrest in der G₁- und der G₂-Phase. Ein vermehrtes Zellsterben konnte in diesem Zusammenhang nicht festgestellt werden. Im Hinblick auf die DNA zeigte sich eine deutliche Hemmung der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, allerdings erst bei stark zytotoxischen Konzentrationen. Inwieweit weitere Reparaturwege betroffen sind, gilt es in nachfolgenden Untersuchungen zu klären.

Im zweiten Teil dieser Arbeit lag der Schwerpunkt auf der Interaktion von Aluminium mit Schlüsselproteinen des Eisenhaushalts. Betrachtet wurde dabei zum einen die Bindung des Leichtmetalls an das Transportprotein Serum-Transferrin und zum anderen der Einfluss von Aluminium in Form der Verbindung $\text{Al}(\text{acac})_3$ beziehungsweise Aluminium-citrat auf die zelluläre Konzentration des Eisenspeicherproteins Ferritin.

Humanes Serum-Transferrin (hTF) ist für den sicheren Transport von Fe^{3+} -Ionen im Körper verantwortlich (zusammengefasst in Sun *et al.*, 1999). Gleichzeitig stellt es den wichtigsten Bindungspartner für Al^{3+} -Ionen im Blutserum dar. Circa 80 % des bei neutralem pH-Wert nahezu unlöslichen Leichtmetalls werden auf diese Weise in Lösung gehalten und über den Blutkreislauf im Organismus verteilt (zusammengefasst in Willhite *et al.*, 2014). In diesem Zusammenhang vermehrt diskutiert wird die Aufnahme des Metalls gebunden an hTF über den Transferrinrezeptor (TFR). Aktuelle Studien konnten dies für den mit Al-gesättigten Metall-Protein-Komplex nicht bestätigen (Hémadi *et al.*, 2003; Sakajiri *et al.*, 2010; Chahine *et al.*, 2012). Sie zeigen jedoch, wie wichtig eine detaillierte Untersuchung der Bindungsverhältnisse im Protein und der jeweiligen Struktur des Metall-Protein-Komplexes ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden nun zwei leistungsstarke Analysemethoden zur detaillierten Untersuchung der Bindung von Aluminium zusammen mit Eisen an hTF eingesetzt. Bei den verwendeten Methoden handelte es sich zum einen um die ultrahochauflösende ESI-Massenspektrometrie (ESI MS), zum anderen um die spektroskopische Methode des Circular dichroismus (CD). Die ESI MS Experimente gaben dabei Hinweise bezüglich des Vorkommens sowie der Verteilung aller auftretenden Aluminium/Eisen hTF-Spezies bei unterschiedlichem Sättigungsgrad des Proteins mit Fe^{3+} -Ionen. Die spektroskopischen Untersuchungen mittels CD informierten über die strukturellen Eigenschaften der detektierten Proteinspezies. Durch die anschließende Verknüpfung beider Methoden konnte somit ein direkter Zusammenhang zwischen der Tertiärstruktur und dem jeweiligen Bindungszustand des Proteins hergestellt werden.

Die Titration von Fe^{3+} -Ionen zum metallfreien Protein apo-hTF zeigte, dass Fe_1 -hTF nur zusammen mit Fe_2 -hTF in der Proteinlösung auftrat und maximal 40 % am Gesamtproteingehalt ausmachte. Dieses Ergebnis wurde durch die Simulation des Experiments unter Verwendung der Bindungskonstanten für Fe^{3+} -Ionen an hTF bestätigt. Die Verteilung der zur Lösung hinzutitrierten Fe^{3+} -Ionen auf die C- und N-terminale Bindungsstelle von hTF unterstreicht die anhand der Bindungskonstanten festgestellte 10-fach höhere Affinität des Metalls zur Bindungsstelle in der C-terminalen Proteindomäne (zusammengefasst in Sun *et al.*, 1999). Im Zuge der Metallbindung geht das Protein von

einer offenen (apo-hTF) in eine geschlossene Konformation ($\text{Fe}_2\text{-hTF}$) über (Zhang *et al.*, 2004), was sich anhand der CD-Untersuchungen durch ein auftretendes Signal im Wellenlängenbereich 300-500 nm bei Titration von Fe^{3+} -Ionen zu apo-hTF äußert.

Im Zuge der Titration von Fe^{3+} -Ionen zu $\text{Al}_2\text{-hTF}$ wurden eine Reihe unterschiedlicher Metall-Protein-Spezies detektiert, unter anderem die Hybridform $\text{Al}_1\text{Fe}_1\text{-hTF}$. Bei den nachfolgenden Untersuchungen mittels CD-Spektroskopie zeigten sich klare Unterschiede in den Tertiärstrukturen von $\text{Al}_2\text{-hTF}$ und $\text{Fe}_2\text{-hTF}$. Nach Sakajiri *et al.* (2010) verbleibt das Protein bei Bindung von Al^{3+} -Ionen in einer halbgeöffneten Konformation. Dies begründeten die Wissenschaftler unter anderem mit dem hydrodynamischen Radius von $\text{Al}_2\text{-hTF}$ (38,8 Å), der zwischen den Radien von apo-hTF (42,6 Å) und $\text{Fe}_2\text{-hTF}$ (37,2 Å) liegt. Eine Bindung von $\text{Al}_2\text{-hTF}$ an den Rezeptor mit anschließender Aufnahme des Metall-Protein-Komplexes in die Zelle wird daher als unwahrscheinlich angesehen. Dies wurde durch weitere Studien bestätigt (Hémadi *et al.*, 2003; Chahine *et al.*, 2012). In diesem Zusammenhang ebenfalls diskutiert wurde die Möglichkeit der Interaktion von $\text{Al}_1\text{Fe}_1\text{-hTF}$ mit dem Transferrin-Rezeptor. In der Hybridform bindet das Fe^{3+} -Ion bevorzugt in der C- und das Al^{3+} -Ion bevorzugt in der N-terminalen Domäne von hTF. Die Faltung des Proteins wird dabei maßgeblich durch die C-terminale Domäne bestimmt (Hémadi *et al.*, 2004). Rein auf struktureller Ebene erscheint daher die rezeptorvermittelte Aufnahme von $\text{Al}_1\text{Fe}_1\text{-hTF}$ aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu $\text{Fe}_2\text{-hTF}$ als potentiell möglich. Hémadi *et al.* (2003) stellten jedoch bei ihren Untersuchungen keine Interaktion der Hybridform mit dem hTF-Rezeptor auf molekularer Ebene fest, was gegen eine rezeptorvermittelte Aufnahme von $\text{Al}_1\text{Fe}_1\text{-hTF}$ spricht. Dies gilt es durch gezielte weitere Untersuchungen abzusichern, da der zelluläre Aufnahmemechanismus von Al^{3+} -Ionen bislang experimentell nicht ausreichend aufgeklärt ist.

Abbildung 32 fasst den Einfluss des Leichtmetalls auf die Struktur des Eisentransportproteins im Hinblick auf die Möglichkeit einer rezeptorvermittelten Aufnahme von $\text{Al}_2\text{-hTF}$ und $\text{Al}_1\text{Fe}_1\text{-hTF}$ zusammen. Zum besseren Verständnis wurde die Aufnahme des mit Eisen-gesättigten Proteins ($\text{Fe}_2\text{-hTF}$) über den Rezeptor ebenfalls mit aufgeführt.

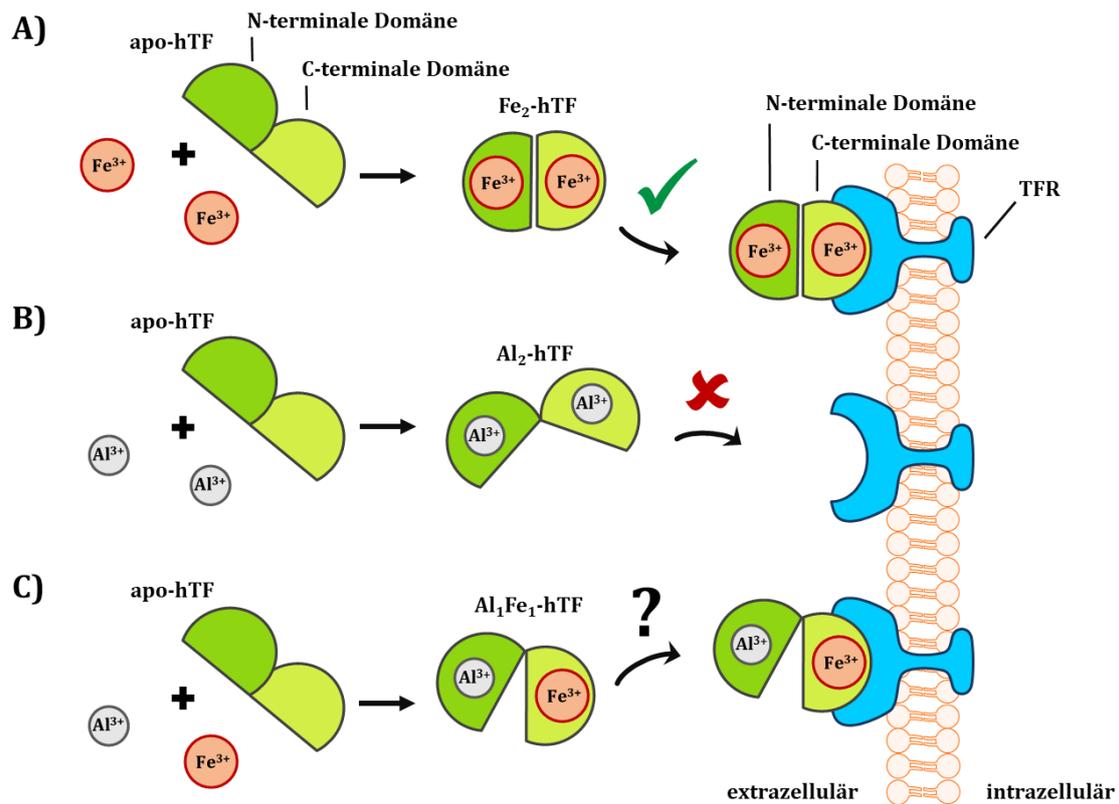


Abbildung 32: Einfluss von Aluminium auf die Proteinstruktur von hTF im Hinblick auf die Möglichkeit einer rezeptorvermittelten Aufnahme des Metall-Protein-Komplexes in die Zelle. A) Durch die Aufnahme von 2 Fe^{3+} -Ionen geht das Protein von einer offenen (apo-hTF) in eine geschlossene Konformation (Fe_2 -hTF) über und wird über den Transferrinrezeptor (TFR) in die Zelle aufgenommen (Zhang *et al.*, 2004). B) Bei Bindung von 2 Al^{3+} -Ionen verbleibt das Protein in einer teilweise geöffneten Konformation (Sakajiri *et al.*, 2010), so dass keine Aufnahme über den Rezeptor erfolgt (Hémadi *et al.*, 2003; Chahine *et al.*, 2012). C) In der Hybridform Al_1Fe_1 -hTF bindet das Fe^{3+} -Ion bevorzugt in der C- und das Al^{3+} -Ion bevorzugt in der N-terminalen Domäne des Proteins. Da die C-terminale Domäne primär für die Interaktion mit TFR verantwortlich ist (Hémadi *et al.*, 2004), erscheint dieser Aufnahmemechanismus auf rein struktureller Ebene als wahrscheinlich. Dies gilt es durch gezielte Untersuchungen zu überprüfen.

Der Einfluss von Aluminium auf die intrazelluläre Ferritin-Konzentration wurde mithilfe eines *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) untersucht. Hierbei führte die 24-stündige Inkubation der A549-Zellen mit $Al(acac)_3$ ab einer Konzentration von $150 \mu M$ zu einem signifikanten Anstieg des Ferritin-Gehaltes auf $\geq 150 \%$ bezogen auf die Kontrolle. Hierbei handelte es sich möglicherweise um einen Abwehrmechanismus der Zelle gegenüber frei vorliegender Al^{3+} -Ionen. Diese Annahme basiert auf den Studien anderer Wissenschaftler, die Ferritin als detoxifizierendes Agens identifizierten (Fleming und Joshi, 1987; Rama Kumar und Prasad, 1999; Sakamoto *et al.*, 2004; Bottcher *et al.*, 2011). Ebenfalls diskutiert wurde eine durch Aluminium induzierte, gesteigerte Aufnahme von Fe^{3+} -Ionen in die Zelle. Dies könnte durch eine quantitative Bestimmung des Eisengehalts

aller Ferritin-Moleküle vor und nach der Inkubation der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3$ überprüft werden.

Die Behandlung der Zellen mit dem Liganden Hacac führte hingegen zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme des zellulären Ferritin-Gehaltes, der bei einer Behandlung der Zellen mit $600 \mu\text{M}$ noch knapp 50 % des Ferritin-Gehaltes der Kontrolle ausmachte. Es wird vermutet, dass Hacac in der Zelle mit Ferritin um die Bindung von Fe^{3+} -Ionen konkurriert und die Zelle dementsprechend ihre Produktion an Ferritin herunterreguliert.

Abbildung 33 stellt den Einfluss von Aluminium in Form der Verbindung $\text{Al}(\text{acac})_3$ und von Hacac auf den Ferritin-Gehalt der A549-Zellen dar und informiert über die in diesem Zusammenhang diskutierten Mechanismen.

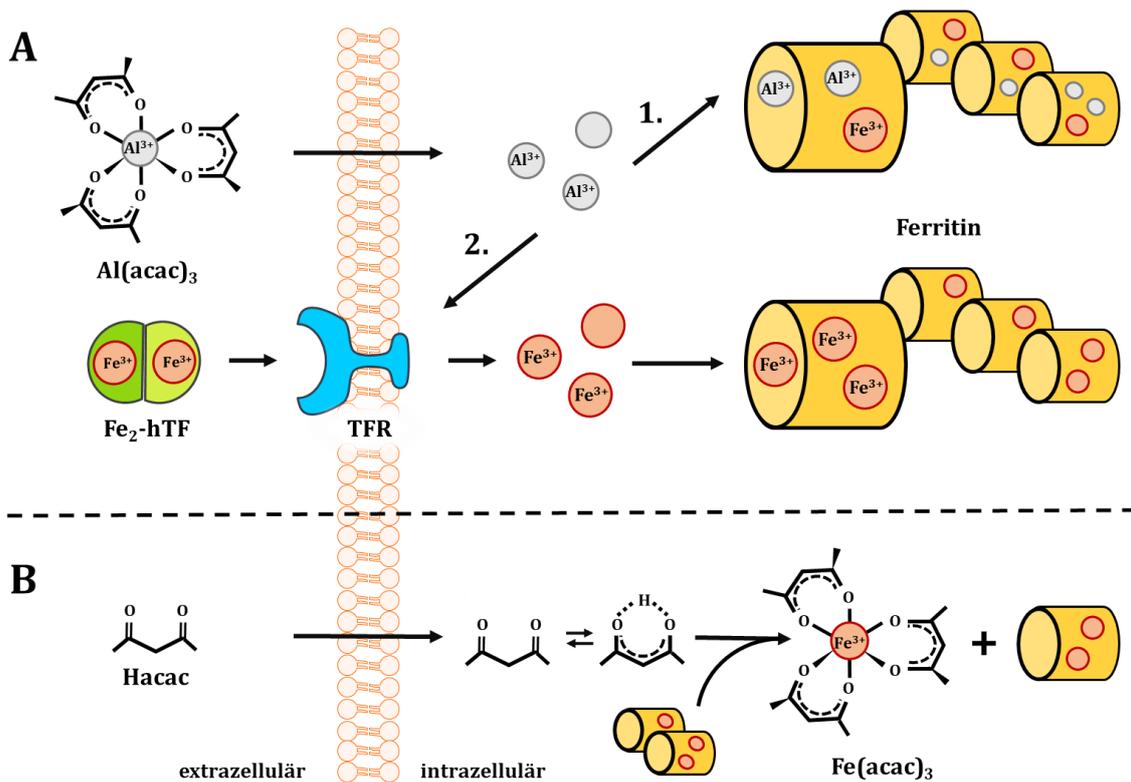


Abbildung 33: Einfluss von $\text{Al}(\text{acac})_3$ bzw. Hacac auf den Ferritin-Gehalt von A549-Zellen und möglicher zugrundeliegender Mechanismus. Die Behandlung der Zellen mit $\text{Al}(\text{acac})_3 \geq 150 \mu\text{M}$ führte zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären Ferritin-Konzentration. Dies wurde auf eine vermehrte Speicherung von Al^{3+} -Ionen in Ferritin zurückgeführt (A,1.). Ebenfalls diskutiert wurde eine durch Aluminium induzierte, gesteigerte Aufnahme von Fe^{3+} -Ionen in die Zelle über den Transferrin-Rezeptor (TFR) (A,2.). Der Ligand selbst bewirkte eine Abnahme der zellulären Ferritin-Konzentration. Dies wurde auf die Konkurrenz von Hacac mit Ferritin um die Bindung von Fe^{3+} -Ionen zurückgeführt.

Inwieweit Ferritin als Indikator für die zelluläre Aufnahme von Aluminium herangezogen werden kann, lässt sich anhand der bislang vorliegenden Untersuchungsergebnisse nicht abschließend klären. Fakt ist, dass die quantitative Bestimmung von Aluminium im Spurenbereich aufgrund der hohen Kontaminationsgefahr mit dem Metall oft problematisch und nur unter großem Aufwand möglich ist (zusammengefasst in Ščančar und Milačič, 2006; Tria *et al.*, 2007). Ein indirekter und im Testsystem bereits vorliegender Indikator für den zellulären Aluminiumgehalt scheint deshalb besonders reizvoll. Weitere gezielte Untersuchungen sowohl mit lipophilen als auch nicht lipophilen Aluminiumverbindungen werden deshalb empfohlen.

7 Literaturverzeichnis

Abdizadeh, H., Atilgan, A., Atilgan, C., Dedeoglu, B., 2017. Computational approaches for deciphering the equilibrium and kinetic properties of iron transport proteins. *Metalomics* 9, 1513-1533.

Achary, V.M.M., Jena, S., Panda, K.K., Panda, B.B., 2008. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70, 300-310.

Ahmad, R., Naoui, M., Neault, J., Diamantoglou, S., Tajmir-Riahi, H., 1996. An FTIR spectroscopic study of calf-thymus DNA complexation with Al (III) and Ga (III) cations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 13, 795-802.

Aisen, P., 2004. Transferrin receptor 1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 2137-2143.

Aisen, P., Leibman, A., Zweier, J., 1978. Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *The Journal of Biological Chemistry* 253, 1930-1937.

Al Juhaiman, L.A., 2012. Estimating aluminum leaching from aluminum cookware in different vegetable extracts. *International Journal of Electrochemical Science* 7, 7283-7294.

Al Zubaidy, E.A., Mohammad, F.S., Bassioni, G., 2011. Effect of pH, salinity and temperature on aluminum cookware leaching during food preparation. *International Journal of Electrochemical Science* 6, 6424-6441.

Alderighi, L., Gans, P., Ienco, A., Peters, D., Sabatini, A., Vacca, A., 1999. Hyperquad simulation and speciation (HySS): a utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species. *Coordination Chemistry Reviews* 184, 311-318.

Alfrey, A.C., LeGendre, G.R., Kaehny, W.D., 1976. The dialysis encephalopathy syndrome: Possible aluminum intoxication. *New England Journal of Medicine* 294, 184-188.

Andrews, S.C., Harrison, P.M., Yewdall, S.J., Arosio, P., Levi, S., Bottke, W., von Darl, M., Briat, J.-F., Lahlère, J.-P., Lobreaux, S., 1992. Structure, function, and evolution of ferritins. *Journal of Inorganic Biochemistry* 47, 161-174.

Arosio, P., Ingrassia, R., Cavadini, P., 2009. Ferritins: A family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790, 589-599.

Bassett, M., 2001. Haemochromatosis: iron still matters. *Internal Medicine Journal* 31, 237-242.

- Battistuzzi, G., Calzolari, L., Messori, L., Sola, M., 1995.** Metal-induced conformational heterogeneity of transferrins: a spectroscopic study of indium(III) and other metal(III)-substituted transferrins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 206, 161-170.
- Baumann, P., West, S.C., 1998.** Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends in Biochemical Sciences* 23, 247-251.
- Beard, J., Tobin, B., 2000.** Iron status and exercise. *The American Journal of Clinical Nutrition* 72, 594S-597S.
- Bertoli, C., Skotheim, J.M., De Bruin, R.A., 2013.** Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14, 518.
- Beucher, A., Birraux, J., Tchouandong, L., Barton, O., Shibata, A., Conrad, S., Goodarzi, A.A., Krempler, A., Jeggo, P.A., Löbrich, M., 2009.** ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *The EMBO Journal* 28, 3413-3427.
- BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung), 2012.** Aluminiumgehalte in Säuglingsanfangs und Folgenahrung. Aktualisierte Stellungnahme Nr. 012/2012 des BfR vom 20. April 2012.
- BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung), 2014.** Aluminiumhaltige Antitranspirantien tragen zur Aufnahme von Aluminium bei. Stellungnahme Nr. 007/2014 des BfR vom 26. Februar 2014.
- BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung), 2017.** Fragen und Antworten zu Aluminium in Lebensmitteln und verbrauchernahen Produkten. Aktualisierte FAQ des BfR vom 8. Juni 2017.
- Bharathi, V.P., Govindaraju, M., Palanisamy, A., Sambamurti, K., Rao, K., 2008.** Molecular toxicity of aluminium in relation to neurodegeneration. *Indian Journal of Medical Research* 128, 545-556.
- Bhattacharjee, S., Zhao, Y., Hill, J.M., Culicchia, F., Kruck, T.P., Percy, M.E., Pogue, A.I., Walton, J., Lukiw, W.J., 2013.** Selective accumulation of aluminum in cerebral arteries in Alzheimer's disease (AD). *Journal of Inorganic Biochemistry* 126, 35-37.
- Bi, S.-P., Zhang, F.-p., Wang, X.-l., Zou, G.-w., 2001.** Analytical methodologies for aluminium speciation in environmental and biological samples – a review. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 370, 984-996.
- Boffi, F., Ascone, I., Della Longa, S., Girasole, M., Yalovega, G., Soldatov, A., Varoli-Piazza, A., Castellano, A.C., 2003.** X-ray absorption near-edge spectroscopy of transferrins: a theoretical and experimental probe of the metal site local structure. *European Biophysics Journal* 32, 329-341.

Bokkhim, H., Tran, T., Bansal, N., Grøndahl, L., Bhandari, B., 2014. Evaluation of different methods for determination of the iron saturation level in bovine lactoferrin. *Food Chemistry* 152, 121-127.

Bondy, S., Guo-Ross, S., Pien, J., 1998. Mechanisms underlying the aluminum-induced potentiation of the pro-oxidant properties of transition metals. *Neurotoxicology* 19, 65-71.

Bottcher, A., Nobile, P.M., Martins, P.F., Conte, F.F., Azevedo, R.A., Mazzafera, P., 2011. A role for ferritin in the antioxidant system in coffee cell cultures. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 24, 225-237.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., Chen, D.J., 2001. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry* 276, 42462-42467.

Burrell, S.-A.M., Exley, C., 2010. There is (still) too much aluminium in infant formulas. *BMC Pediatrics* 10, 63.

Camaschella, C., 2017. New insights into iron deficiency and iron deficiency anemia. *Blood Reviews* 31, 225-233.

Camaschella, C., Roetto, A., Calì, A., De Gobbi, M., Garozzo, G., Carella, M., Majorano, N., Totaro, A., Gasparini, P., 2000. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nature Genetics* 25, 14.

Campbell, A., Hamai, D., Bondy, S.C., 2001. Differential toxicity of aluminum salts in human cell lines of neural origin: implications for neurodegeneration. *Neurotoxicology* 22, 63-71.

Celik, H., Celik, N., Kocyigit, A., Dikilitas, M., 2012. The relationship between plasma aluminum content, lymphocyte DNA damage, and oxidative status in persons using aluminum containers and utensils daily. *Clinical Biochemistry* 45, 1629-1633.

Chahine, J.-M.E.H., Hémadi, M., Ha-Duong, N.-T., 2012. Uptake and release of metal ions by transferrin and interaction with receptor 1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1820, 334-347.

Chairuangkitti, P., Lawanprasert, S., Roytrakul, S., Aueviriyavit, S., Phummiratch, D., Kulthong, K., Chanvorachote, P., Maniratanachote, R., 2013. Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. *Toxicology in Vitro* 27, 330-338.

Chang, L., Karin, M., 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37.

- Cochran, M., Chawtur, V., Jones, M., Marshall, E., 1991.** Iron uptake by human reticulocytes at physiologic and sub-physiologic concentrations of iron transferrin: the effect of interaction with aluminum transferrin. *Blood* 77, 2347-2353.
- Corain, B., Bombi, G., Tapparo, A., Perazzolo, M., Zatta, P., 1996.** Aluminium toxicity and metal speciation: established data and open questions. *Coordination Chemistry Reviews* 149, 11-22.
- Corain, B., Tapparo, A., Sheikh-Osman, A.A., Bombi, G.G., Zatta, P., Favarato, M., 1992.** The solution state of aluminium (III) as relevant to experimental toxicology: recent data and new perspectives. *Coordination Chemistry Reviews* 112, 19-32.
- Cox, L.A., Adrian, G.S., 1993.** Posttranscriptional regulation of chimeric human transferrin genes by iron. *Biochemistry* 32, 4738-4745.
- Darbre, P.D., 2005.** Aluminium, antiperspirants and breast cancer. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99, 1912-1919.
- Darbre, P.D., Bakir, A., Iskakova, E., 2013a.** Effect of aluminium on migratory and invasive properties of MCF-7 human breast cancer cells in culture. *Journal of Inorganic Biochemistry* 128, 245-249.
- Darbre, P.D., Mannello, F., Exley, C., 2013b.** Aluminium and breast cancer: Sources of exposure, tissue measurements and mechanisms of toxicological actions on breast biology. *Journal of Inorganic Biochemistry* 128, 257-261.
- Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A., Lodish, H.F., 1983.** pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80, 2258-2262.
- Davis, M., Clarke, S., 2013.** Influence of microRNA on the maintenance of human iron metabolism. *Nutrients* 5, 2611-2628.
- De Sole, P., Rossi, C., Chiarpotto, M., Ciasca, G., Bocca, B., Alimonti, A., Bizzarro, A., Rossi, C., Masullo, C., 2013.** Possible relationship between Al/ferritin complex and Alzheimer's disease. *Clinical Biochemistry* 46, 89-93.
- Dedman, D.J., Treffry, A., Candy, J., Taylor, G., Morris, C., Bloxham, C., Perry, R., Edwardson, J., Harrison, P., 1992.** Iron and aluminium in relation to brain ferritin in normal individuals and Alzheimer's-disease and chronic renal-dialysis patients. *Biochemical Journal* 287, 509-514.
- Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung, Schweizerische Vereinigung für Ernährung, 2017.** Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. 2. Auflage, 3 aktualisierte Ausgabe.

DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft), 2018. MAK- und BAT-Werte-Liste 2018: Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen und Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte. Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. Weinheim, Wiley-VCH Mitteilung 54.

Dix, D.J., Lin, P.-N., McKenzie, A.R., Walden, W.E., Theil, E.C., 1993. The influence of the base-paired flanking region on structure and function of the ferritin mRNA iron regulatory element. *Journal of Molecular Biology* 231, 230-240.

Dix, D.J., Lin, P.N., Kimata, Y., Theil, E.C., 1992. The iron regulatory region of ferritin mRNA is also a positive control element for iron-independent translation. *Biochemistry* 31, 2818-2822.

Donovan, A., Lima, C.A., Pinkus, J.L., Pinkus, G.S., Zon, L.I., Robine, S., Andrews, N.C., 2005. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metabolism* 1, 191-200.

Efeyan, A., Serrano, M., 2007. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle* 6, 1006-1010.

EFSA, 2008. Safety of aluminium from dietary intake - Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Food Contact Materials (AFC). *EFSA Journal* 754, 1-34.

Eisenstein, R.S., 2000. Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annual Review of Nutrition* 20, 627-662.

Exley, C., 2004. The pro-oxidant activity of aluminum. *Free Radical Biology & Medicine* 36, 380-387.

Exley, C., 2013. Human exposure to aluminium. *Environmental Science: Processes & Impacts* 15, 1807-1816.

Exley, C., Mold, M.J., 2015. The binding, transport and fate of aluminium in biological cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 30, 90-95.

Exley, C., Vickers, T., 2014. Elevated brain aluminium and early onset Alzheimer's disease in an individual occupationally exposed to aluminium: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 8, 41.

Fairman, B., Sanz-Medel, A., Jones, P., Evans, E.H., 1998. Comparison of fluorimetric and inductively coupled plasma mass spectrometry detection systems for the determination of aluminium species in waters by high-performance liquid chromatography. *The Analyst* 123, 699-703.

Fernandez-Lorenzo, J.R., Cocho, J.A., Rey-Goldar, M.L., Couce, M., Fraga, J.M., 1999. Aluminum contents of human milk, cow's milk, and infant formulas. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 28, 270-275.

Fimreite, N., Hansen, O.O., Pettersen, H.C., 1997. Aluminum concentrations in selected foods prepared in aluminum cookware, and its implications for human health. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 58, 1-7.

Fischer, B.M., Neumann, D., Piberger, A.L., Risnes, S.F., Köberle, 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.

Flarend, R., Bin, T., Elmore, D., Hem, S., 2001. A preliminary study of the dermal absorption of aluminium from antiperspirants using aluminium-26. *Food and Chemical Toxicology* 39, 163-168.

Flaten, T.P., 2001. Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water. *Brain Research Bulletin* 55, 187-196.

Flaten, T.P., 2002. Aluminium in tea - concentrations, speciation and bioavailability. *Coordination Chemistry Reviews* 228, 385-395.

Fleming, J., Joshi, J., 1987. Ferritin: isolation of aluminum-ferritin complex from brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84, 7866-7870.

Frankowski, M., Ziola-Frankowska, A., Siepak, J., 2010. New method for speciation analysis of aluminium fluoride complexes by HPLC-FAAS hyphenated technique. *Talanta* 80, 2120-2126.

Gatter, K.C., Brown, G., Trowbridge, I., Woolston, R., Mason, D., 1983. Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance. *Journal of Clinical Pathology* 36, 539-545.

Gerhardsson, L., Oskarsson, A., Skerfving, S., 1994. Acid precipitation - effects on trace elements and human health. *Science of the Total Environment* 153, 237-245.

Ginsberg, D., 2002. E2F1 pathways to apoptosis. *FEBS Letters* 529, 122-125.

Gkouvatsos, K., Papanikolaou, G., Pantopoulos, K., 2012. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1820, 188-202.

Goodhead, D.t., 1994. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *International Journal of Radiation Biology* 65, 7-17.

Guengerich, F.P., 2001. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical Research in Toxicology* 14, 611-650.

Gumerov, D.R., Mason, A.B., Kaltashov, I.A., 2003. Interlobe communication in human serum transferrin: metal binding and conformational dynamics investigated by electrospray ionization mass spectrometry. *Biochemistry* 42, 5421-5428.

Hahm, E.-R., Singh, S.V., 2007. Honokiol causes G0-G1 phase cell cycle arrest in human prostate cancer cells in association with suppression of retinoblastoma protein level/phosphorylation and inhibition of E2F1 transcriptional activity. *Molecular Cancer Therapeutics* 6, 2686-2695.

Halbrooks, P.J., Mason, A.B., Adams, T.E., Briggs, S.K., Everse, S.J., 2004. The oxalate effect on release of iron from human serum transferrin explained. *Journal of Molecular Biology* 339, 217-226.

Han, J., Han, J., Dunn, M.A., 1999. Effect of dietary aluminum on tissue nonheme iron and ferritin levels in the chick. *Toxicology* 142, 97-109.

Hanas, J.S., Gunn, C., 1996. Inhibition of transcription factor IIIA-DNA interactions by xenobiotic metal ions. *Nucleic Acids Research* 24, 924-930.

Harris, W.R., Sheldon, J., 1990. Equilibrium constants for the binding of aluminum to human serum transferrin. *Inorganic Chemistry* 29, 119-124.

Harris, W.R., Wang, Z., Hamada, Y.Z., 2003. Competition between transferrin and the serum ligands citrate and phosphate for the binding of aluminum. *Inorganic Chemistry* 42, 3262-3273.

Harrison, P.M., Arosio, P., 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1275, 161-203.

Hartwig, A., 2013. Metal interaction with redox regulation: an integrating concept in metal carcinogenesis? *Free Radical Biology & Medicine* 55, 63-72.

Hartwig, A., Klyszcz-Nasko, H., Schlepegrell, R., Beyersmann, D., 1993. Cellular damage by ferric nitrilotriacetate and ferric citrate in V79 cells: interrelationship between lipid peroxidation, DNA strand breaks and sister chromatid exchanges. *Carcinogenesis* 14, 107-112.

Helmig, S., Haibel, N., Walter, D., 2018. In vitro toxicity studies of aluminum compounds. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 134, 643-651.

Hémadi, M., Kahn, P.H., Miquel, G., El Hage Chahine, J.-M., 2004. Transferrin's mechanism of interaction with receptor 1. *Biochemistry* 43, 1736-1745.

Hémadi, M., Miquel, G., Kahn, P.H., El Hage Chahine, J.-M., 2003. Aluminum exchange between citrate and human serum transferrin and interaction with transferrin receptor 1. *Biochemistry* 42, 3120-3130.

Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., Andrews, N.C., 2004. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117, 285-297.

Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., Galy, B., Camaschella, C., 2010. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 142, 24-38.

- Herschleb, J., Ananiev, G., Schwartz, D.C., 2007.** Pulsed-field gel electrophoresis. *Nature Protocols* 2, 677.
- Heyer, W.-D., Ehmsen, K.T., Liu, J., 2010.** Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annual Review of Genetics* 44, 113-139.
- Hirose, M., 2000.** The structural mechanism for iron uptake and release by transferrins. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64, 1328-1336.
- Hirsch, J., Al-Samman, T., 2013.** Superior light metals by texture engineering: Optimized aluminum and magnesium alloys for automotive applications. *Acta Materialia* 61, 818-843.
- Hoeijmakers, J.H., 2001.** Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366.
- Hoenic, N.A., Levin, R., 2003.** The implications of water quality in hemodialysis. *Seminars in Dialysis* 16 (6), 492-497.
- Huebers, H.A., Josephson, B., Huebers, E., Csiba, E., Finch, C.A., 1984.** Occupancy of the iron binding sites of human transferrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81, 4326-4330.
- Hurrell, R., Egli, I., 2010.** Iron bioavailability and dietary reference values. *The American Journal of Clinical Nutrition* 91, 1461S-1467S.
- Hustedt, N., Durocher, D., 2017.** The control of DNA repair by the cell cycle. *Nature Cell Biology* 19, 1.
- Iyama, T., Wilson, D.M., 2013.** DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair* 12, 620-636.
- Jacks, T., Remington, L., Williams, B.O., Schmitt, E.M., Halachmi, S., Bronson, R.T., Weinberg, R.A., 1994.** Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Current Biology* 4, 1-7.
- Johnson, V.J., Kim, S.-H., Sharma, R.P., 2004.** Aluminum-maltolate induces apoptosis and necrosis in neuro-2a cells: potential role for p53 signaling. *Toxicological Sciences* 83, 329-339.
- Joshi, J.G., Sczekan, S.R., Fleming, J.T., 1989.** Ferritin - a general metal detoxicant. *Biological Trace Element Research* 21, 105-110.
- Kaltashov, I.A., Bobst, C.E., Zhang, M., Leverence, R., Gumerov, D.R., 2012.** Transferrin as a model system for method development to study structure, dynamics and interactions of metalloproteins using mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1820, 417-426.

Kaneko, N., Sugioka, T., Sakurai, H., 2007. Aluminum compounds enhance lipid peroxidation in liposomes: insight into cellular damage caused by oxidative stress. *Journal of Inorganic Biochemistry* 101, 967-975.

Karlik, S., Eichhorn, G., Lewis, P., Crapper, D., 1980. Interaction of aluminum species with deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 19, 5991-5998.

Kasai, K., Hori, M.T., Goodman, W.G., 1991. Transferrin enhances the antiproliferative effect of aluminum on osteoblast-like cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 260, E537-E543.

Kawabata, H., Yang, R., Hirama, T., Vuong, P.T., Kawano, S., Gombart, A.F., Koeffler, H.P., 1999. Molecular cloning of transferrin receptor 2 A new member of the transferrin receptor-like family. *Journal of Biological Chemistry* 274, 20826-20832.

Kawahara, M., Kato-Negishi, M., 2011. Link between aluminum and the pathogenesis of Alzheimer's disease: the integration of the aluminum and amyloid cascade hypotheses. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2011, 276393.

Kawahara, M., Kato, M., Kuroda, Y., 2001. Effects of aluminum on the neurotoxicity of primary cultured neurons and on the aggregation of beta-amyloid protein. *Brain Research Bulletin* 55, 211-217.

Kelly, S.M., Jess, T.J., Price, N.C., 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1751, 119-139.

Kherrouche, Z., Blais, A., Ferreira, E., De Launoit, Y., Monté, D., 2006. ASK-1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) is a direct E2F target gene. *Biochemical Journal* 396, 547-556.

Kiesswetter, E., Schaper, M., Buchta, M., Schaller, K.H., Rossbach, B., Kraus, T., Letzel, S., 2009. Longitudinal study on potential neurotoxic effects of aluminium: II. Assessment of exposure and neurobehavioral performance of Al welders in the automobile industry over 4 years. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 82, 1191-1210.

Kiesswetter, E., Schaper, M., Buchta, M., Schaller, K.H., Rossbach, B., Scherhag, H., Zschiesche, W., Letzel, S., 2007. Longitudinal study on potential neurotoxic effects of aluminium: I. Assessment of exposure and neurobehavioural performance of Al welders in the train and truck construction industry over 4 years. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 81, 41-67.

Kim, Y., Lobdell, D.T., Wright, C.W., Gocheva, V.V., Hudgens, E., Bowler, R.M., 2015. Blood metal concentrations of manganese, lead, and cadmium in relation to serum ferritin levels in Ohio residents. *Biological Trace Element Research* 165, 1-9.

Kim, Y., Olivi, L., Cheong, J.H., Maertens, A., Bressler, J.P., 2007. Aluminum stimulates uptake of non-transferrin bound iron and transferrin bound iron in human glial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 220, 349-356.

- Klotz, K., Weistenhofer, W., Neff, F., Hartwig, A., van Thriel, C., Drexler, H., 2017.** The Health Effects of Aluminum Exposure. *Deutsches Ärzteblatt International* 114, 653-659.
- Kowalik, T.F., DeGregori, J., Schwarz, J.K., Nevins, J.R., 1995.** E2F1 overexpression in quiescent fibroblasts leads to induction of cellular DNA synthesis and apoptosis. *Journal of Virology* 69, 2491-2500.
- Kraus, T., Schaller, K., Angerer, J., Hilgers, R.-D., Letzel, S., 2006.** Aluminosis-detection of an almost forgotten disease with HRCT. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 1:4.
- Krewski, D., Yokel, R.A., Nieboer, E., Borchelt, D., Cohen, J., Harry, J., Kacew, S., Lindsay, J., Mahfouz, A.M., Rondeau, V., 2007.** Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical Reviews* 10 Suppl 1, 1-269.
- Kumar, V., Bal, A., Gill, K.D., 2009.** Aluminium-induced oxidative DNA damage recognition and cell-cycle disruption in different regions of rat brain. *Toxicology* 264, 137-144.
- Lane, D.P., 1992.** Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16.
- Lankoff, A., Banasik, A., Duma, A., Ochniak, E., Lisowska, H., Kuszewski, T., Gozdz, S., Wojcik, A., 2006.** A comet assay study reveals that aluminium induces DNA damage and inhibits the repair of radiation-induced lesions in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicology Letters* 161, 27-36.
- Latha, K.S., Anitha, S., Rao, K.S.J., Viswamitra, M.A., 2002.** Molecular understanding of aluminum-induced topological changes in (CCG) 12 triplet repeats: relevance to neurological disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1588, 56-64.
- Layat, E., Probst, A.V., Tourmente, S., 2013.** Structure, function and regulation of Transcription Factor IIIA: From *Xenopus* to *Arabidopsis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1829, 274-282.
- Legrand, D., Mazurier, J., Montreuil, J., Spik, G., 1988.** Structure and spatial conformation of the iron-binding sites of transferrins. *Biochimie* 70, 1185-1195.
- Levi, S., Santambrogio, P., Cozzi, A., Rovida, E., Corsi, B., Tamborini, E., Spada, S., Albertini, A., Arosio, P., 1994.** The role of the L-chain in ferritin iron incorporation: studies of homo and heteropolymers. *Journal of Molecular Biology* 238, 649-654.
- Levi, S., Yewdall, S., Harrison, P., Santambrogio, P., Cozzi, A., Rovida, E., Albertini, A., Arosio, P., 1992.** Evidence of H- and L-chains have co-operative roles in the iron-uptake mechanism of human ferritin. *Biochemical Journal* 288, 591-596.
- Lill, R., 2009.** Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* 460, 831.

- Lima, P., Leite, D., Vasconcellos, M., Cavalcanti, B., Santos, R., Costa-Lotufo, L., Pessoa, C., Moraes, M., Burbano, R., 2007.** Genotoxic effects of aluminum chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. *Food and Chemical Toxicology* 45, 1154-1159.
- 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.
- Llobet, J.M., Colomina, M.T., Sirvent, J.J., Domingo, J.L., Corbella, J., 1995.** Reproductive toxicology of aluminum in male mice. *Fundamental and Applied Toxicology* 25, 45-51.
- López, F.F., Cabrera, C., Lorenzo, M.L., Lopez, M.C., 2002.** Aluminium content of drinking waters, fruit juices and soft drinks: contribution to dietary intake. *Science of the Total Environment* 292, 205-213.
- Lu, L., Zhang, L.-l., Li, G.J., Guo, W., Liang, W., Zheng, W., 2005.** Alteration of serum concentrations of manganese, iron, ferritin, and transferrin receptor following exposure to welding fumes among career welders. *Neurotoxicology* 26, 257-265.
- Mah, L., El-Osta, A., Karagiannis, T., 2010.** γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 24, 679.
- Mannello, F., Tonti, G.A., Medda, V., Simone, P., Darbre, P.D., 2011.** Analysis of aluminium content and iron homeostasis in nipple aspirate fluids from healthy women and breast cancer-affected patients. *Journal of Applied Toxicology* 31, 262-269.
- Martin, R.B., 1986.** The chemistry of aluminum as related to biology and medicine. *Clinical Chemistry* 32, 1797-1806.
- Matzapetakis, M., Kourgiantakis, M., Dakanali, M., Raptopoulou, C., Terzis, A., Lakatos, A., Kiss, T., Banyai, I., Iordanidis, L., Mavromoustakos, T., 2001.** Synthesis, pH-dependent structural characterization, and solution behavior of aqueous aluminum and gallium citrate complexes. *Inorganic Chemistry* 40, 1734-1744.
- Matzapetakis, M., Raptopoulou, C., Terzis, A., Lakatos, A., Kiss, T., Salifoglou, A., 1999.** Synthesis, structural characterization, and solution behavior of the first mononuclear, aqueous aluminum citrate complex. *Inorganic Chemistry* 38, 618-619.
- Mazurier, J., Aubert, J.P., Loucheux-Lefevre, M.H., 1976.** Comparative circular dichroism studies of iron-free and iron-saturated forms of human serotransferrin and lactotransferrin. *FEBS Letters* 66, 238-242.
- McGrath, K.G., 2003.** An earlier age of breast cancer diagnosis related to more frequent use of antiperspirants/deodorants and underarm shaving. *European Journal of Cancer Prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)* 12, 479-485.

- McGregor, S., Naves, M., Oria, R., Vass, J., Brock, J., 1990.** Effect of aluminium on iron uptake and transferrin-receptor expression by human erythroleukaemia K562 cells. *Biochemical Journal* 272, 377-382.
- McKnight, G.S., Lee, D.C., Hemmaplardh, D., Finch, C., Palmiter, R., 1980.** Transferrin gene expression. Effects of nutritional iron deficiency. *Journal of Biological Chemistry* 255, 144-147.
- Merryweather-Clarke, A.T., Cadet, E., Bomford, A., Capron, D., Viprakasit, V., Miller, A., McHugh, P.J., Chapman, R.W., Pointon, J.J., Wimhurst, V.L., 2003.** Digenic inheritance of mutations in HAMP and HFE results in different types of haemochromatosis. *Human Molecular Genetics* 12, 2241-2247.
- Mirick, D.K., Davis, S., Thomas, D.B., 2002.** Antiperspirant use and the risk of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 94, 1578-1580.
- Mirza, A., King, A., Troakes, C., Exley, C., 2017.** Aluminium in brain tissue in familial Alzheimer's disease. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 40, 30-36.
- Miyazaki, E., Kato, J., Kobune, M., Okumura, K., Sasaki, K., Shintani, N., Arosio, P., Niitsu, Y., 2002.** Denatured H-ferritin subunit is a major constituent of haemosiderin in the liver of patients with iron overload. *Gut* 50, 413-419.
- Morimura, S., Matsumoto, H., 1978.** Effect of aluminium on some properties and template activity of purified pea DNA. *Plant and Cell Physiology* 19, 429-436.
- Muckenthaler, M., Gray, N.K., Hentze, M.W., 1998.** IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. *Molecular Cell* 2, 383-388.
- Müller, J.P., Steinegger, A., Schlatter, C., 1993.** Contribution of aluminium from packaging materials and cooking utensils to the daily aluminium intake Beitrag des Aluminiums im Verpackungsmaterial und in Kochgeräten zur täglichen Aluminiumaufnahme. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 197, 332-341.
- Namer, M., Luporsi, E., Gligorov, J., Lokiec, F., Spielmann, M., 2008.** The use of deodorants/antiperspirants does not constitute a risk factor for breast cancer. *Bulletin du cancer* 95, 871-880.
- Nasiadek, M., Chmielnicka, J., 2000.** Interaction of aluminum with exogenous and endogenous iron in the organism of rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45, 284-290.
- Norgate, T., Jahanshahi, S., Rankin, W., 2007.** Assessing the environmental impact of metal production processes. *Journal of Cleaner Production* 15, 838-848.
- Ohman, L.-O., Martin, R.B., 1994.** Citrate as the main small molecule binding Al³⁺ in serum. *Clinical Chemistry* 40, 598-601.

Orre, L.M., Stenerlöv, B., Dhar, S., Larsson, R., Lewensohn, R., Lehtiö, J., 2006. p53 is involved in clearance of ionizing radiation-induced RAD51 foci in a human colon cancer cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342, 1211-1217.

Pantopoulos, K., Porwal, S.K., Tartakoff, A., Devireddy, L., 2012. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry* 51, 5705-5724.

Parkinson, I., Ward, M., Kerr, D., 1981. Dialysis encephalopathy, bone disease and anaemia: the aluminum intoxication syndrome during regular haemodialysis. *Journal of Clinical Pathology* 34, 1285.

Parshad, R., Gantt, R., Sanford, K.K., Jones, G.M., 1984. Chromosomal radiosensitivity of human tumor cells during the G2 cell cycle period. *Cancer Research* 44, 5577-5582.

Pérez, G., Garbossa, G., Sasseti, B., Di Risio, C., Nesse, A., 1999. Interference of aluminium on iron metabolism in erythroleukaemia K562 cells. *Journal of Inorganic Biochemistry* 76, 105-112.

Petrik, M.S., Wong, M.C., Tabata, R.C., Garry, R.F., Shaw, C.A., 2007. Aluminum adjuvant linked to Gulf War illness induces motor neuron death in mice. *NeuroMolecular Medicine* 9, 83-100.

Pineau, A., Guillard, O., Fauconneau, B., Favreau, F., Marty, M.-H., Gaudin, A., Vincent, C.M., Marraud, A., Marty, J.-P., 2012. In vitro study of percutaneous absorption of aluminum from antiperspirants through human skin in the Franz™ diffusion cell. *Journal of Inorganic Biochemistry* 110, 21-26.

Ponka, P., Lok, C.N., 1999. The transferrin receptor: role in health and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31, 1111-1137.

Priest, N., 2004. The biological behaviour and bioavailability of aluminium in man, with special reference to studies employing aluminium-26 as a tracer: review and study update. *Journal of Environmental Monitoring* 6, 375-403.

Przybyszewska, J., Zekanowska, E., 2014. The role of hepcidin, ferroportin, HCP1, and DMT1 protein in iron absorption in the human digestive tract. *Przegląd Gastroenterologiczny* 9, 208-213.

Rama Kumar, T., Prasad, M.N., 1999. Metal binding properties of ferritin in *Vigna mungo* (L.) Hepper (black gram): possible role in heavy metal detoxification. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 62, 502-507.

Rao, K.S.J., Stein, R., 2003. First evidence on induced topological changes in supercoiled DNA by an aluminium D-aspartate complex. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 8, 823-830.

Reeves, A.J., McEvoy, M.A., MacDonald-Wicks, L.K., Barker, D., Attia, J., Hodge, A.M., Patterson, A.J., 2017. Calculation of haem iron intake and its role in the development of iron deficiency in young women from the Australian longitudinal study on women's health. *Nutrients* 9, 515.

Rodrigo, K., Rathnapala, D., Senaratne, W., Constantine, S., 2015. Pulmonary fibrosis with cholesterol granulomata in a patient exposed to Aluminum powder while at work in fireworks manufacturing industry. *Ceylon Medical Journal* 60.

Rondeau, V., Commenges, D., Jacqmin-Gadda, H., Dartigues, J.-F., 2000. Relation between aluminum concentrations in drinking water and Alzheimer's disease: an 8-year follow-up study. *American Journal of Epidemiology* 152, 59-66.

Roos, W.P., Thomas, A.D., Kaina, B., 2016. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nature Reviews Cancer* 16, 20.

Rossbach, B., Buchta, M., Csanady, G.A., Filser, J.G., Hilla, W., Windorfer, K., Stork, J., Zschiesche, W., Gefeller, O., Pfahlberg, A., Schaller, K.H., Egerer, E., Escobar Pinzon, L.C., Letzel, S., 2006. Biological monitoring of welders exposed to aluminium. *Toxicology Letters* 162, 239-245.

Sakajiri, T., Yamamura, T., Kikuchi, T., Ichimura, K., Sawada, T., Yajima, H., 2010. Absence of binding between the human transferrin receptor and the transferrin complex of biological toxic trace element, aluminum, because of an incomplete open/closed form of the complex. *Biological Trace Element Research* 136, 279-286.

Sakamoto, T., Ogasawara, Y., Ishii, K., Takahashi, H., Tanabe, S., 2004. Accumulation of aluminum in ferritin isolated from rat brain. *Neuroscience Letters* 366, 264-267.

Sappino, A.P., Buser, R., Lesne, L., Gimelli, S., Bena, F., Belin, D., Mandriota, S.J., 2012. Aluminium chloride promotes anchorage-independent growth in human mammary epithelial cells. *Journal of Applied Toxicology* 32, 233-243.

Ščančar, J., Milačič, R., 2006. Aluminium speciation in environmental samples: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386, 999-1012.

Selvi, E.K., Şahin, U., Şahan, S., 2017. Determination of Aluminum in Dialysis Concentrates by Atomic Absorption Spectrometry after Coprecipitation with Lanthanum Phosphate. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR* 16, 1030.

Silva, B., Faustino, P., 2015. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1852, 1347-1359.

Smolkova, P., Nakladalova, M., 2014. The etiology of occupational pulmonary aluminosis - the past and the present. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 158, 535-538.

Smolkova, P., Nakladalova, M., TICHÝ, T., Hampalova, M., KOLEK, V., 2014. Occupational pulmonary aluminosis: a case report. *Industrial Health* 52, 147-151.

Solomon, E.I., Brunold, T.C., Davis, M.I., Kemsley, J.N., Lee, S.-K., Lehnert, N., Neese, F., Skulan, A.J., Yang, Y.-S., Zhou, J., 2000. Geometric and electronic structure/function correlations in non-heme iron enzymes. *Chemical Reviews* 100, 235-350.

Spada, P., Rossi, C., Alimonti, A., Bocca, B., Ricerca, B., Bocci, M., Carvelli, M., Vulpio, C., Luciani, G., De Sole, P., 2009. Iron, zinc and aluminium ferritin content of hemodialysis hyperferritinemic patients: comparison with other hyperferritinemic clinical conditions and normoferritinemic blood donors. *Clinical Biochemistry* 42, 1654-1657.

Stahl, T., Taschan, H., Brunn, H., 2011. Aluminium content of selected foods and food products. *Environmental Sciences Europe* 23, 37.

Steijns, J.M., van Hooijdonk, A.C., 2000. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *The British Journal of Nutrition* 84 Suppl 1, S11-17.

Stuschke, M., Sak, A., Wurm, R., Sinn, B., Wolf, G., Stüben, G., Budach, V., 2002. Radiation-induced apoptosis in human non-small-cell lung cancer cell lines is secondary to cell-cycle progression beyond the G2-phase checkpoint. *International Journal of Radiation Biology* 78, 807-819.

Sun, H., Li, H., Sadler, P.J., 1999. Transferrin as a metal ion mediator. *Chemical Reviews* 99, 2817-2842.

Suwalsky, M., Ungerer, B., Villena, F., Norris, B., Cardenas, H., Zatta, P., 1999. Interactions of Al(acac)₃ with cell membranes and model phospholipid bilayers. *Journal of Inorganic Biochemistry* 75, 263-268.

Tang, S., MacColl, R., Parsons, P.J., 1995. Spectroscopic study of the interaction of aluminum ions with human transferrin. *Journal of Inorganic Biochemistry* 60, 175-185.

Teagarden, D.L., Hem, S.L., 1982. Conversion of aluminum chlorohydrate to aluminum hydroxide. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 33, 281-295.

Terwilliger, N.B., 1998. Functional adaptations of oxygen-transport proteins. *Journal of Experimental Biology* 201, 1085-1098.

Tomimatsu, Y., Donovan, J.W., 1976a. Spectroscopic evidence for perturbation of tryptophan in Al (III) and Ga (III) binding to ovotransferrin and human serum transferrin. *FEBS Letters* 71, 299-302.

Tomimatsu, Y., Donovan, J.W., 1976b. Spectroscopic evidence for perturbation of tryptophan in Al(III) and Ga(III) binding to ovotransferrin and human serum transferrin. *FEBS Letters* 71, 299-302.

- Tomioka, H., Kaneda, T., Katsuyama, E., Kitaichi, M., Moriyama, H., Suzuki, E., 2016.** Elemental analysis of occupational granulomatous lung disease by electron probe microanalyzer with wavelength dispersive spectrometer: Two case reports. *Respiratory Medicine Case Reports* 18, 66-72.
- Torrallba, J.d., Da Costa, C., Velasco, F., 2003.** P/M aluminum matrix composites: an overview. *Journal of Materials Processing Technology* 133, 203-206.
- Trapp, G.A., 1983.** Plasma aluminum is bound to transferrin. *Life Sciences* 33, 311-316.
- Tria, J., Butler, E.C., Haddad, P.R., Bowie, A.R., 2007.** Determination of aluminium in natural water samples. *Analytica Chimica Acta* 588, 153-165.
- Trumbo, P., Yates, A.A., Schlicker, S., Poos, M., 2001.** Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 101, 294.
- Umweltbundesamt, 1998.** Aluminium: Stellungnahme der Kommission "Human-Biomonitoring" des Umweltbundesamtes. *Bundesgesundheitsblatt* 41, 271.
- van Haeringen, B., de Lange, F., van Stokkum, I.H., Srail, S.K., Evans, R.W., van Grondelle, R., Bloemendal, M., 1995.** Dynamic structure of human serum transferrin from transient electric birefringence experiments. *Proteins* 23, 233-240.
- van Veelen, L.R., Essers, J., van de Rakt, M.W., Odijk, H., Pastink, A., Zdzienicka, M.Z., Paulusma, C.C., Kanaar, R., 2005.** Ionizing radiation-induced foci formation of mammalian Rad51 and Rad54 depends on the Rad51 paralogs, but not on Rad52. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 574, 34-49.
- Ventura, A., Kirsch, D.G., McLaughlin, M.E., Tuveson, D.A., Grimm, J., Lintault, L., Newman, J., Reczek, E.E., Weissleder, R., Jacks, T., 2007.** Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 445, 661.
- Vincent, J.B., Love, S., 2012.** The binding and transport of alternative metals by transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1820, 362-378.
- Volkert, D., Kreuel, K., Heseker, H., Stehle, P., 2004.** Energy and nutrient intake of young-old, old-old and very-old elderly in Germany. *European Journal of Clinical Nutrition* 58, 1190.
- Waldmann, A., Koschizke, J.W., Leitzmann, C., Hahn, A., 2004.** Dietary iron intake and iron status of German female vegans: results of the German vegan study. *Annals of Nutrition and Metabolism* 48, 103-108.
- Wang, C., Li, X., Wang, Y., Liu, Z., Fu, L., Hu, L., 2013.** Enhancement of radiation effect and increase of apoptosis in lung cancer cells by thio-glucose-bound gold nanoparticles at megavoltage radiation energies. *Journal of Nanoparticle Research* 15, 1642.

- Wang, W., Knovich, M.A., Coffman, L.G., Torti, F.M., Torti, S.V., 2010.** Serum ferritin: past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1800, 760-769.
- Ward, J., 1990.** The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: a review. *International Journal of Radiation Biology* 57, 1141-1150.
- Ward, R.J., Zhang, Y., Crichton, R.R., 2001.** Aluminium toxicity and iron homeostasis. *Journal of Inorganic Biochemistry* 87, 9-14.
- Wedrychowski, A., Schmidt, W.N., Hnilica, L., 1986.** The in vivo cross-linking of proteins and DNA by heavy metals. *Journal of Biological Chemistry* 261, 3370-3376.
- Weisser, K., Heymans, L., Keller-Stanislawski, B., 2015.** Paul-Ehrlich Institut: Sicherheitsbewertung von Aluminium in Impflösungen. *Bulletin zur Arzneimittelsicherheit* 03, 7-11.
- Willhite, C.C., Karyakina, N.A., Yokel, R.A., Yenugadhati, N., Wisniewski, T.M., Arnold, I.M., Momoli, F., Krewski, D., 2014.** Systematic review of potential health risks posed by pharmaceutical, occupational and consumer exposures to metallic and nanoscale aluminum, aluminum oxides, aluminum hydroxide and its soluble salts. *Critical Reviews in Toxicology* 44 Suppl 4, 1-80.
- Winterbourn, C.C., 1995.** Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters* 82-83, 969-974.
- Wisniewski, H., Wen, G., 1992.** Aluminium and Alzheimer's disease. *Aluminium in Biology and Medicine* 169, 142.
- Worwood, M., 1997.** The laboratory assessment of iron status - an update. *Clinica Chimica Acta* 259, 3-23.
- Wu, Z., Du, Y., Xue, H., Wu, Y., Zhou, B., 2012.** Aluminum induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production. *Neurobiology of Aging* 33, 199. e1-199. e12.
- Yoshino, M., Ito, M., Haneda, M., Tsubouchi, R., Murakami, K., 1999.** Prooxidant action of aluminum ion-stimulation of iron-mediated lipid peroxidation by aluminum. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 12, 237-240.
- Yuan, S.-S.F., Chang, H.-L., Eva, Y.-H.L., 2003.** Ionizing radiation-induced Rad51 nuclear focus formation is cell cycle-regulated and defective in both ATM^{-/-} and c-Abl^{-/-} cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 525, 85-92.
- Zhang, L., Li, X., Gu, Q., Zhu, Y., Zhao, H., Li, Y., Zhang, Z., 2011.** Effects of subchronic aluminum exposure on serum concentrations of iron and iron-associated proteins in rats. *Biological Trace Element Research* 141, 246-253.

Zhang, M., Gumerov, D.R., Kaltashov, I.A., Mason, A.B., 2004. Indirect detection of protein-metal binding: interaction of serum transferrin with In^{3+} and Bi^{3+} . *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 15, 1658-1664.

Zhang, R.Y., Liu, Y., Pang, D.W., Cai, R.X., Qi, Y.P., 2002. Spectroscopic and voltammetric study on the binding of aluminium(III) to DNA. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry* 18, 761-766.

Zhu, Y., Li, X., Chen, C., Wang, F., Li, J., Hu, C., Li, Y., Miao, L., 2012. Effects of aluminum trichloride on the trace elements and cytokines in the spleen of rats. *Food and Chemical Toxicology* 50, 2911-2915.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Acac ⁻	Acetylacetonat
Al(acac) ₃	Aluminiumacetylacetonat
AlCl ₃	Aluminiumchlorid
Al-hTF	Aluminium gebunden an humanes Serum-Transferrin
Al ₁ -hTF	Aluminium gebunden an humanes Serum-Transferrin (einfach gesättigt)
Al ₂ -hTF	Aluminium gebunden an humanes Serum-Transferrin (gesättigt)
Al ₁ Fe ₁ -hTF	Aluminium/Eisen gebunden an humanes Serum-Transferrin (Hybridform)
Al(OH) ₃	Aluminiumhydroxid
Al ₂ (SO ₄) ₃	Aluminiumsulfat
Al ₂ -TF	Aluminium gebunden an Serum-Transferrin (gesättigt)
Annexin V-FITC	Annexin V als Fluorescein-Isothiocyanat-Konjugat
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
apo-hTF	Metallfreies humanes Serum-Transferrin
apo-TF	Metallfreies Serum-Transferrin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAT-Wert	Biologischer Arbeitsstoff-Toleranzwert
BER	Basenexzisionsreparatur
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bidest.	bidestilliert
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CCT	Kollisionszellentechnologie
CD	Circulardichroismus
cDNA	komplementäre DNA
CENP-F	Zentromerprotein F
C ₆ H ₅ AlO ₇	Aluminiumcitrat
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCYT _B	<i>Duodenal cytochrome B</i>
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung

Anhang

DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT1	<i>Divalent metal transporter 1</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds DNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E2Fs	<i>E2 promoter-binding factors</i>
E2F1	<i>E2F transcription factor 1</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ESI MS	Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
Fe(acac) ₃	Eisen(III)acetylacetonat
Fe-hTF	Eisen gebunden an humanes Serum-Transferrin
Fe ₁ -hTF	Eisen gebunden an humanes Serum-Transferrin (einfach gesättigt)
Fe ₂ -hTF	Eisen gebunden an humanes Serum-Transferrin (gesättigt)
Fe-TF	Eisen gebunden an Serum-Transferrin
Fe ₁ -TF	Eisen gebunden an Serum-Transferrin (einfach gesättigt)
Fe ₂ -TF	Eisen gebunden an Serum-Transferrin (gesättigt)
FFT	<i>fast Fourier transform</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
G ₁ -Phase	<i>Gap 1-Phase</i>
G ₂ -Phase	<i>Gap 2-Phase</i>
GVS	<i>German Vegan Study</i>
Hacac	Acetylaceton
HAMP	<i>Hepcidin antimicrobial peptide</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HCl	Salzsäure
HFE	<i>Homeostatic iron regulator</i>
His	Histidin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hTF	humanes Serum-Transferrin
HR	Homologe Rekombination

HRCT	Hochauflösende Computertomographie
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HySS	<i>Hyperquad Simulation and Specification</i>
ICP MS	<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
IF	Immunfluoreszenz
In ₂ -hTF	Indium gebunden an humanes Serum-Transferrin (gesättigt)
IRPs	<i>Iron regulatory proteins</i>
IREs	<i>Iron responsive elements</i>
KP	Kaliumpuffer
LBP	Lysepuffer
MAK-Kommission	Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheits-schädlicher Arbeitsstoffe
MAK-Wert	Maximale Arbeitsplatz-Konzentration
MMR	Mismatch-Reparatur
M-Phase	Mitose-Phase
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaP	Natriumpuffer
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	nicht-homologes <i>end-joining</i>
NH ₄ HCO ₃	Ammoniumhydrogencarbonat
NK	Negativkontrolle
NRC	<i>No reaction control</i>
NTC	<i>No template control</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PI	Propidiumiodid
PK	Positivkontrolle
PS	Phosphatidylserin
RAD51	<i>RAD51 recombinase</i>
Rb	Retinoblastom-Protein
RNA	Ribonukleinsäure

Anhang

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institut</i>
RT	Raumtemperatur
RT qPCR	<i>Real-time quantitative</i> Polymerase-Kettenreaktion
SD	Standardabweichung
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
s.p.	suprapur
S-Phase	Synthese-Phase
ss DNA	einzelsträngige DNA
STA	<i>Specific target amplification</i>
STS	Staurosporin
TF	Transferrin
TFR	Transferrin-Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TWI	<i>Tolerable weekly intake</i>
Tyr	Tyrosin
WB1/WB2	Waschpuffer 1 / Waschpuffer 2
γ H2AX	phosphoryliertes Histon H2AX

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung von Aluminium im Organismus des Menschen.....	9
Abbildung 2:	Orale Eisenaufnahme sowie Resorption des Metalls im Dünndarm...	15
Abbildung 3:	Regulation der Eisenhomöostase auf zellulärer Ebene – ein schematischer Überblick.....	18
Abbildung 4:	Löslichkeit von $AlCl_3$, $Al_2(SO_4)_3$, $C_6H_5AlO_7$ und $Al(acac)_3$ in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM).....	51
Abbildung 5:	Einfluss von Aluminium auf die Zellviabilität sowie die metabolische Aktivität von A549-Zellen.....	54
Abbildung 6:	Einfluss von Aluminium auf die Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit von A549-Zellen bei zusätzlicher Bestrahlung.....	55
Abbildung 7:	Einfluss von Aluminium auf die Viabilität und metabolische Aktivität von A549-Zellen gemessen am ATP-Gehalt bei zusätzlicher Bestrahlung.....	56
Abbildung 8:	Einfluss von Aluminium auf die Apoptose und die Nekrose in A549-Zellen mit und ohne Bestrahlung.....	58
Abbildung 9:	Einfluss von Aluminium auf die Zellzyklusphasenverteilung mit und ohne Bestrahlung.....	59
Abbildung 10:	Einfluss von Aluminium auf den Anteil an doppelsträngiger (ds) DNA in A549-Zellen als Indikator für die Entstehung von DNA-Einzelstrangbrüchen.....	62
Abbildung 11:	Aufnahmen einer Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) zur Untersuchung des Einflusses von Aluminium auf die Entstehung und Reparatur von DSB.....	64
Abbildung 12:	Einfluss von Aluminium auf die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen gemessen an der Anzahl von γ H2AX-Foci in Zellen der G_2 -Phase.....	65
Abbildung 13:	Einfluss von Aluminium auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen gemessen an der Anzahl von Rad51-Foci in Zellen der G_2 -Phase.....	68
Abbildung 14:	Einfluss von Aluminium auf den intrazellulären Gehalt von Rad51....	69
Abbildung 15:	Einfluss von Aluminium auf die Expression ausgewählter Gene in A549-Zellen, dargestellt in Form einer Heatmap.....	70
Abbildung 16:	Einfluss von Aluminium auf die relative Expression ausgewählter Gene, die für wichtige Transkriptionsfaktoren codieren.....	71

Abbildung 17: Einfluss von Aluminium auf die relative Expression ausgewählter Gene, die in Zusammenhang mit der Proliferation und des Zellzyklus stehen.....	72
Abbildung 18: Einfluss von Aluminium auf die relative Expression ausgewählter Gene, die in Zusammenhang mit der Apoptose stehen.....	73
Abbildung 19: Einfluss von Aluminium auf die relative Expression ausgewählter Gene, die in Zusammenhang mit der DNA-Reparatur stehen.....	74
Abbildung 20: Bindung von Eisen an humanes Serum-Transferrin (hTF).....	80
Abbildung 21: Speziesverteilung im Verlauf der Eisensättigung von hTF.....	81
Abbildung 22: Verteilung von Fe ³⁺ -Ionen auf die C- und N-terminale Domäne von hTF während der schrittweisen Sättigung des Proteins mit Eisen.....	82
Abbildung 23: CD-Spektren zur Bindung von Eisen an apo-hTF.....	84
Abbildung 24: Korrelation von CD-Signalintensität und dem Anteil an gebundenem Eisen.....	85
Abbildung 25: Bindung von Eisen an Aluminium-Transferrin (Al-hTF).....	86
Abbildung 26: Speziesverteilung im Verlauf der Eisensättigung von hTF in Gegenwart von Aluminium.....	88
Abbildung 27: CD-Spektren zur Bindung von Eisen an Al-hTF.....	89
Abbildung 28: Korrelation von CD-Signalintensität und dem Anteil an gebundenem Eisen bei Titration von Eisen zu Al-hTF.....	90
Abbildung 29: Einfluss von Al(acac) ₃ sowie Hacac auf den intrazellulären Ferritin-Gehalt.....	94
Abbildung 30: Einfluss von Aluminiumcitrat auf den intrazellulären Ferritin-Gehalt.....	96
Abbildung 31: Einfluss von Aluminium auf zelluläre Prozesse in A549-Zellen – ein Überblick.....	101
Abbildung 32: Einfluss von Aluminium auf die Proteinstruktur von hTF im Hinblick auf die Möglichkeit einer rezeptorvermittelten Aufnahme des Metall-Protein-Komplexes in die Zelle.....	104
Abbildung 33: Einfluss von Al(acac) ₃ bzw. Hacac auf den Ferritin-Gehalt von A549-Zellen und möglicher zugrundeliegender Mechanismus.....	105
Abbildung 34: Einfluss von Aluminium auf die Apoptose (A) und die Nekrose (B) in A549-Zellen.....	149
Abbildung 35: Einfluss von Aluminium auf die Expression ausgewählter Gene in A549-Zellen mit und ohne Bestrahlung, dargestellt in Form einer Heatmap.....	150

8.3 Verwendete Chemikalien und Kits

2x Assay loading reagent	Fluidigm (San Francisco)
2x TaqMan® PreAmp Master Mix, 10000 mg/L	Applied Biosystems (Darmstadt)
5x Exonuklease Reaktionspuffer	New England Bio Labs (Frankfurt)
7-Aminoactinomycin D	Biolegend (London)
20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco)
Acetylaceton (Hacac)	Alfa Aesar (Karlsruhe)
Acrylamid (37,5:1), Rotiphorese®	Roth (Karlsruhe)
Albumin Fraktion V	Roth (Karlsruhe)
Aluminium 2,4-pentanedionate 99,995% (Al(acac) ₃)	Alfa Aesar (Karlsruhe)
Aluminium Plasma Standard Solution (10 mg/mL)	Alfa Aesar (Karlsruhe)
Aluminiumchlorid-Hexahydrat (AlCl ₃ x 6H ₂ O)	Roth (Karlsruhe)
Aluminiumcitrat (C ₆ H ₅ AlO ₇)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Aluminiumsulfat-Hydrat (Al ₂ (SO ₄) ₃ x H ₂ O, n=14-18)	Alfa Aesar (Karlsruhe)
Ammoniumhydrogencarbonat (NH ₄ HCO ₃)	BDH (Kanada)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Annexin V FITC-konjugiert	Biolegend (London)
Beryllium Plasma Standard Solution (10 mg/mL)	Alfa Aesar (Karlsruhe)
Bradford-Reagenz	BioRad (München)
CasyTon®	OLS (Bremen)
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega GmbH (Mannheim)
CHEF Mammalian Genomic DNA Plug Kit	BioRad (München)
DAPI (CyStain® DNA/Protein)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth (Karlsruhe)
DMEM	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DNA-Suspensionspuffer	TEKnova (Kristiansand)
ECL-Detektionsreagenz	GE Healthcare (Freiburg)
Eisen(III)acetylacetonat (Fe(acac) ₃ , ≥ 99,9 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Eisen Standard (AAS)	Perkin Elmer (Waltham)
Ethanol (Rotipuran)	Roth (Karlsruhe)
Ethanol, vergällt (96 %)	Roth (Karlsruhe)
Etylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Roth (Karlsruhe)

Anhang

Exonuklease I (20 U/ μ L)	New England Bio Labs (Frankfurt)
FACS Flow	BD (Heidelberg)
Ferritin (FTL) Human SimpleStep ELISA® Kit	Abcam (Cambridge)
Fetales Kälberserum	Invitrogen (Darmstadt)
Formaldehyd (37 %)	Roth (Karlsruhe)
Gel-Red®	VWR (Darmstadt)
Giemsa® Stammlösung	Roth (Karlsruhe)
HEPES	Roth (Karlsruhe)
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Hydroxylapatit	Merck (Darmstadt)
Immersionsöl	Zeiss (Jena)
Indium Plasma Standard Solution (10 mg/mL)	Alfa Aesar (Karlsruhe)
Isopropanol (2-Propanol)	Roth (Karlsruhe)
i/qScript cDNA Synthese Kit	BioRad (München)
Kaliumchlorid (KCl)	Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung (10 %)	AppliChem (Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Roth (Karlsruhe)
NucleoSpin® RNA Plus Kit	Macherey-Nagel (Düren)
PageRuler Prestained Protein Ladder (10 – 170 kDa)	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
PCR Certified Water	TEKnova (Kristiansand)
Penicillin/Streptomycin (P: 5.000 U/mL, S: 5mg/L)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Primer Eurofins	Eurofins (Ebersberg)
Primer Fluidigm	Fluidigm (San Francisco)
Propidiumiodid (1 mg/mL)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Protease Inhibitor Cocktail (cOmpete)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Pulsed Field Certified™ Agarose	BioRad (München)
RNase	Roche Diagnostics (Mannheim)
RNase Away	VWR (Darmstadt)
Salpetersäure Supra-Qualität (HNO_3)	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure (HCl, 0,1 N)	Roth (Karlsruhe)
Serum-Transferrin (holo, human)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low ROX	BioRad (München)

Anhang

Staurosporin (1mM)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
SYBR Green Supermix	VWR (Darmstadt)
TE-Puffer	TEKnova (Kristiansand)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
TRIS Ultra Qualität	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100 10 % Lösung	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Trypsin, 10-fach	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Vectashield Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories (Burlingame)
Wasserstoffperoxid Suprapur® (30 %)	Merk Millipore (Darmstadt)

8.4 Antikörper, Primer, Puffer und Lösungen

8.4.1 Antikörper (Immunfluoreszenz (IF) und Western Blot (WB))

Anti-Actin (<i>goat polyclonal</i>), WB	Santa Cruz (Heidelberg)
Anti-CENP-F (<i>mouse polyclonal</i>), IF	Santa Cruz (Heidelberg)
Anti-CENP-F (<i>rabbit polyclonal</i>), IF	Santa Cruz (Heidelberg)
Anti-mouse Alexa Fluor® 488-konjugiert, IF	Invitrogen (Darmstadt)
Anti-rabbit Cy3-konjugiert, IF	Jackson (Suffolk)
Anti-Rad51 (<i>rabbit polyclonal</i>), IF/WB	Abcam (Cambridge)
Anti-γH2AX (<i>mouse monoclonal</i>), IF	Merck Millipore (Darmstadt)
IgG-HRP (<i>donkey anti-rabbit</i>), WB	Santa Cruz (Dallas)
IgG-HRP (<i>donkey anti-goat</i>), WB	Santa Cruz (Dallas)

8.4.2 Primer (*High-throughput RTqPCR*)

Transkript Gen ID	Sequenz der ,forward' Primer (5'→3')	Sequenz der ,reverse' Primer (5'→3')
Referenzgene		
<i>ACTB</i> 60	CCAACCGCGAGAAGATGAC	TAGCACAGCCTGGATAGCAA
<i>B2M</i> 567	AAGATGAGTATGCCTGCCGTGT	TCTTCAAACCTCCATGATGCTGCT
<i>GAPDH</i> 2597	ACACCATGGGGAAGGTGAAG	GTGACCAGGCGCCAATA
<i>GUSB</i> 2990	CATCGATGACATCACCGTCAC	ACAGGTTACTGCCCTTGACA
<i>HPRT1</i> 3251	GCTTTCCTTGGTCAGGCAGTA	ACTTCGTGGGGTCCTTTTCAC
Transkriptionsfaktoren		
<i>AXIN2</i> 8313	TGATAAGGTCCTGGCAACTCA	GCGTGGTCTCTGTCTCTCT
<i>BTRC</i> 8945	GAGCAGTGGTCAGAGTCAGAT	ACACAAGTTCAGCAGCACATAG
<i>JUN</i> 3725	AAGAACTCGGACCTCCTCAC	TGGATTATCAGGCGCTCCA
<i>KEAP1</i> 9817	AACTTCGCTGAGCAGATTGG	CGTAGAACCGTCGCTGTT
<i>MAP3K5</i> 4217	ATCATTCGGAAGGCGGTACA	ACTCTCAGATGCAAGGCTGAA
<i>MDM2</i> 4193	CCATGATCTACAGGAAGTTGGTA	GACACCTGTTCTCACTCACA

Anhang

<i>MT1X</i> 4501	ACCACGCTTTTCATCTGTCC	GAGCAGTTGGGGTCCATTTTC
<i>MT2A</i> 4502	AACCTGTCCCGACTCTAG	GAAGTCGCGTTCTTTACA
<i>NFE2L2</i> 4780	CAGTCAGCGACGGAAAGAGTA	GGGCAACCTGGGAGTAGTT
<i>NFKB1</i> 4790	AGAGTGCTGGAGTTCAGGATAAC	TGAAGGTGGATGATTGCTAAGTGT
<i>NFKB1A</i> 4792	ACTTTCGAGGAAATACCC	GATAGAGGCTAAGTGTAGAC
<i>NFKB2</i> 4791	CCTGACTTTGAGGGACTGTATC	GGCTAGATGCAAGGCTGTT
<i>SLC30A1</i> 7779	AGAAGTGGTGATACAGTGGAAGT	GGGTCAGGGAAACATGGATTC
<i>VEGFA</i> 7422	TACATCTTCAAGCCATCC	CTGTAGGAAGCTCATCTC

DNA-Schadensantwort

<i>APEX1</i> 328	ACTGTGCCTTCAAGAGACCAAATG	TCCTCATCGCCTATGCCGTAA
<i>ATM</i> 472	TACCAAGCAGCATGGAGGAA	GATTCATGGTAACTGGTTCCTTCTAC
<i>ATR</i> 545	CATTCAAAGCGCCACTGAA	CGCTGCTCAATGTCAAGAACA
<i>BRCA1</i> 672	GCTTGACACAGTTTTGGAGTATGC	GAGAGTTGGACACTGAGACTGGTT
<i>BRCA2</i> 675	ATGCAGCAGACCCAGCTTA	TCCATGGCCTTCCCTAATTTCCA
<i>DDB1</i> 1642	GGAGTCAATCACCTATCACAATGG	GGTATGTCAAGCACTCAGCAAT
<i>DDB2</i> 1643	TCAAAGGGATTGGAGCTGGAG	GTGACCACCATTCGGCTACTA
<i>DDIT3</i> 1649	TTAAGTCTAAGGCACTGAG	GGTGTGGTGATGTATGAA
<i>ERCC1</i> 2067	GCCGACTGCACATTGATCC	TCCGCTGGTTTCTGCTCATA
<i>ERCC2</i> 2068	TACCCCGAGCAGTTCTCCTA	CTGAGGGCATCTCCAGGAC
<i>ERCC5</i> 2073	TTGATGGGGATGCTCCACTA	TGGAGTCACTGGACGCTAA
<i>ERRC4</i> 2072	CTTCTGGAATCTCTGAGAGCAA	GAGGTGCTGGAGTCAAGAAA
<i>GADD45A</i> 1647	GCTCCTGCTCTTGGAGAC	CAGGATCCTTCCATTGAGATGAA
<i>LIG1</i> 3978	TGGGAAGTACCCGGACATCA	GCTTCGGTGTCCAGGATGAA
<i>LIG3</i> 3980	TCCAGGACTTCCTTCGGAAA	CAGCAGCAGCTTCACTGTTA

Anhang

<i>MGMT</i> 4255	TGTGAAATTCGGAGAAGTGA	GAGGATGGGGACAGGATT
<i>MLH1</i> 4292	CTTCACCCAGACTTTGCTACC	GGCATAGACCTTATCACTACTTCC
<i>MSH2</i> 4436	CCAGCAGCAAAGAAGTGCTA	TGTTTCACCTTGGACAGGAAC
<i>OGG1</i> 4968	GTGTACTAGCGGATCAAGTATGGA	CAGTCGCACACCTTGGAAATT
<i>PARP1</i> 142	TTCTGGAGGACGACAAGGAA	GTTGCTACCGATCACCGTAC
<i>PCNA</i> 5111	TCTGAGGGCTTCGACACCTA	CATTGCCGGCGCATTTTAGTA
<i>POLB</i> 5423	AAGAAATTGCCTGGAGTAGGAACA	CAGATGGACCAATGCCACTAACT
<i>POLD1</i> 5424	AGCTGGTGGAGTCTAAGTACAC	GACGGAGTCAGTGTACCATA
<i>RAD50</i> 10111	TCCCTCCTGGAACCAAAGGAA	AGACGAATCTGGGCTCTCACA
<i>RAD51</i> 5888	GGGAAGACCCAGATCTGTCA	ATGTACATGGCCTTTCCTTCAC
<i>RRM2B</i> 50484	CCTTGCGATGGATAGCAGATAGA	AGTCCTGGCATAAGACCTCTC
<i>XPA</i> 7507	ACATCATTCACAATGGGGTGATA	ACCCCAAACCTCAAGAGACC
<i>XPC</i> 7508	TAAAGGGGTCCATGAGGACACA	CTGGCTGGCTGCAGATGTTA
<i>XRCC5</i> 7520	TGATTTGCTGGAGGACATTGAAAG	AATCGGCTGCTGAGGTCA

Apoptose

<i>APAF1</i> 317	ACCGTCTCCGCATTCTGA	TCTGTAACACTCTTGTCTCTGGTT
<i>BAX</i> 581	GGGTTGTGCCCCTTTTCTAC	TCTTGGATCCAGCCCAACA
<i>BBC3</i> 27113	ACGACCTCAACGCACAGTA	ATGCTACATGGTGCAGAGAAAG
<i>BCL2</i> 596	TGACAGAGGATCATGCTGTACTTA	TCCAATTCCTTTCGGATCTTTATTTCA
<i>BCL2L1</i> 598	CCTCTCCCACCTGTGATAC	GGCTCAACCAGTCCATTGTC
<i>PMAIP1</i> 5366	CAGTTGGAGGCTGAGGTTC	TCCTGAGTTGAGTAGCACACT
<i>TNFRSF10B</i> 8795	GCACCACGACCAGAAACAC	ACAATCACCGACCTTGACCAT
<i>XIAP</i> 331	AGGAGTGTCTGGTAAGAACTACTG	GCATACTGTCTTCTGAGCATTCA

Zellzykluskontrolle

<i>CCND1</i> 595	AGAGGCGGAGGAGAACAAA	AGGGCGGATTGGAAATGAAC
<i>CDKN1A1</i> 1026	GCAGACCAGCATGACAGATTTTC	ACAAACTGAGACTAAGGCAGAAGA
<i>CDKN1B</i> 1027	AGGAAGCGACCTGCAACC	TTGGGGAACCGTCTGAAACA
<i>CDKN2B</i> 1030	TTACGGCCAACGGTGGATTA	GGCATGCCCTTGTTCTCC
<i>E2F1</i> 1869	AGCTCATTGCCAAGAAGTCCAA	TCCTGGGTCAACCCCTCAA
<i>EGFR</i> 1956	GAACCCCGAGGGCAAATACA	CACGAGCCGTGATCTGTCA
<i>IL8</i> 3576	TTCAGAGACAGCAGAGCACAC	AAGTTCTTTAGCACTCCTTGCCA
<i>MYC</i> 4609	GCCGCATCCACGAAACTTTG	GAGGCTGCTGGTTTTTCCACTAC
<i>PLK3</i> 1263	ACTGTCCAGGTGAACTTC	GAAGCGAGGTAAGTACAAG
<i>PPM1D</i> 8493	AGCCAGAACTTCCCAAGGAAA	ACTACACGATTCACCCCAGAC
<i>SIRT2</i> 22933	TCAAGCCAACCATCTGTCACTA	CTCCACCAAGTCCTCCTGTT
<i>TP53</i> 7157	CGAGATGTTCCGAGAGCTGAAT	TTTATGGCGGGAGGTAGACTGA

Fremdstoffmetabolismus

<i>ABCB1</i> 5243	AACACCACTGGAGCATTGAC	ACAGCAAGCCTGGAACCTA
<i>ABCC1</i> 4363	CCTGTTCTCGGAAACCATCC	AAGGTGATCCTCGACAGGAA
<i>ADH</i> 125	GGTGGACATCAACAAGGACAA	CAACATAACAGGGAAGCCATCAT
<i>ALDH1A1</i> 216	CTGATGCCGACTTGGACAATG	ATACTTCTTAGCCCGCTCAACA
<i>CYP1A1</i> 1543	AAACCAGTGGCAGATCAACC	AGGGGTGAGAAACCGTTCA
<i>EPHX1</i> 2052	CCACGACTTACACCAGAGGAT	AATCTCCACCTGCTTCTTCCA
<i>GSTP1</i> 2950	CACCCTGTACCAGTCCAATACC	TCCTGCTGGTCCCTTCCCATA
<i>NAT1</i> 9	AGGAAGAAGCAGCAATCTGTCT	TCGGATCTGGTGTTGAAGAATGT
<i>NQO1</i> 1728	TTTATGGCGGGAGGTAGACTGA	AAAGTTCGCAGGGTCCTTCA
<i>SULT1A1</i> 6817	AAGTTCATGGTCGGAGAAGTGT	ACGGTGGTGTAGTTGGTCATAG

Anhang

<i>UGT1</i> 54658	TCCCAGGAATTTGAAGCCTACAT	TCGTGTTGTTGCAAGATTTCG
Oxidative Stressantwort		
<i>CAT</i> 847	AGAAGTGCGGAGATTCAACAC	CCTCATTGAGCAGGTTTCCACA
<i>FTH1</i> 2495	TTACCTGTCCATGTCTTAC	CATCACAGTCTGGTTTCT
<i>G6PD</i> 2539	GCCGTCACCAAGAACATTCA	CTCCCGAAGGGCTTCTCC
<i>GCLC</i> 2729	TGGATGCCATGGGATTTGGAA	CTCAGATATACTGCAGGCTTGGAA
<i>GPX1</i> 2876	CACCCTCTCTTCGCCTTCC	GAGCTTGGGGTCGGTCATAA
<i>GPX2</i> 2877	GCTTTCATTGCCAAGTCCTTCTAT	TCATTCTGACAGTTCTCCTGATGT
<i>GSR</i> 2936	TTGCGTGAATGTTGGATGTGTA	ATGGGACTTGGTGAGATTGTTT
<i>HMOX1</i> 3162	CAGTCAGGCAGAGGGTGATA	GCTCCTGCAACTCCTCAAA
<i>HSP1A1</i> 3303	TCCTGTGTTTGCAATGTTGAA	CTGCATGTAGAAACCGGAAAA
<i>PRDX1</i> 5052	GCCTTCCAGTTCACACTGACAA	TTCGGCTGAATCTGAAGTCTTG
<i>SEPP1</i> 6414	AAACTGCTCTCTCACGACTCTC	AGGTGCTGATGTCCATGATTGT
<i>SOD1</i> 6647	TGATCTCACTCTCAGGAGACCAT	ACCACAAGCCAAACGACTTC
<i>SOD2</i> 6648	AGGATCCACTGCAAGGAACA	GTGCTCCCACACATCAATCC
<i>TFRC</i> 7037	CACCATCAAGCTGCTGAATGA	GCCTTACTATACGCCACATAACC
<i>TXN</i> 7295	TTACAGCCGCTCGTCAGA	CCCACCTTTTGTCCCTTCTT
<i>TXNRD1</i> 7296	GCATCCCTGGTGACAAAGAA	CCAACAACCAGGGTCTTACC

8.4.3 Puffer und Lösungen

Zellkultur

Die Medien und Puffer zur Zellkultivierung und für Zellkulturversuche wurden vor ihrer Verwendung entweder sterilfiltriert oder autoklaviert.

PBS (pH 7,4) 0,1 M NaCl
 0,0045 M KCl
 0,007 M Na₂HPO₄
 0,003 M KH₂PO₄
 in bidest. H₂O

PBS-EDTA (pH 7,4) 0,005 M EDTA
 in PBS

Trypsin-Lösung 0,25 % Trypsin
 in PBS-EDTA

Zelltodmechanismen: Apoptose versus Nekrose

Ringerlösung (pH 7,0) 147 mM NaCl
 402 mM KCl
 297 mM CaCl₂

Alkalische Entwindung

Alkalische Lösung 2,625 g NaCl
 1,5 mL NaOH (1 M)
 1 mL Na₂HPO₄ (0,5 M)
 auf 50 mL mit bidest. H₂O aufgefüllt

Hydroxylapatit-Lösung pro Säule: 0,1 g Apatit und 1,0 mL NaP (0,01 M)

KP-Puffer (0,15 M) 15,3 mL KH₂PO₄ (0,5 M)
 14,7 mL K₂HPO₄ (0,5 M)
 auf 100 mL mit bidest. H₂O aufgefüllt

KP-Puffer (0,35 M) 35,7 mL KH₂PO₄ (0,5 M)
 34,3 mL K₂HPO₄ (0,5 M)
 auf 100 mL mit bidest. H₂O aufgefüllt

Anhang

KP-Puffer (0,5 M)	51 mL KH_2PO_4 (0,5 M) 49 mL K_2HPO_4 (0,5 M)
NaP-Puffer (0,01 M)	1,96 mL Na_2HPO_4 (0,5 M) 2,04 mL NaH_2PO_4 (0,5 M) auf 200 mL mit bidest H_2O aufgefüllt

Pulsfeldgelelektrophorese

0,5x TBE-Puffer (pH 8,3)	45 mM Tris 45 mM Borsäure 1 M EDTA in bidest. H_2O
--------------------------	---

Proteinbestimmung nach Bradford

Lysepuffer	Tris-HCl (50 mM) NaCl (250 mM) EDTA (1 mM) Triton X-100, 0,1 % 1x Protease-Inhibitor
------------	--

SDS-PAGE & Western Blot

Sammelgel (4 %)	2,93 mL bidest. H_2O 500 μL Tris (1 M, pH = 6,8) 80 μL EDTA (0,1 M) 40 μL SDS (10 %) 400 μL Acrylamid (40 %) 40 μL Ammoniumpersulfat (10 %) 10 μL TEMED
Trenngel (10 %)	2,245 mL bidest. H_2O 1,25 mL Tris (1,5 M, pH = 8,8) 100 μL EDTA (0,1 M) 50 μL SDS (10 %) 50 μL Glycerol 1,25 mL Acrylamid (40 %) 50 μL Ammoniumpersulfat (10 %) 5 μL TEMED

Anhang

Ladepuffer (4x)	Tris-HCl (200 mM, pH = 6,8) SDS 8 % Glycerol 40 % Bromphenolblau 0,1 % β-Mercaptoethanol 4 %
10x Puffer	Tris (0,25 M) Glycin (1,92 M) auf 1 L mit bidest H ₂ O aufgefüllt (pH = 8,5)
Laufpuffer	890 mL bidest. H ₂ O 100 mL 10x Puffer 10 mL SDS (10 %)
Transferpuffer	700 mL bidest. H ₂ O 200 mL MeOH 100 mL 10x Puffer
Blockierlösung	Magermilchpulver (5 %) in PBST

8.5 Verbrauchsmaterialien

24-Loch-Platte, transparent	TPP (Trasadingen)
96-Loch-Platte, transparent	TPP (Trasadingen)
96-Loch-Platte	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)
Amicon® Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheiten	Merk Millipore (Darmstadt)
Deckgläschen (Ø 12 mm)	Roth (Karlsruhe)
Dynamic Array IFC	Fluidigm (San Francisco)
Einmalspritzen Omnifix 3 mL	B.Braun (Melsungen)
Falcon Tubes 3,5 mL	BD (Heidelberg)
Glasfaserfilter GF/D	GE Healthcare (Freiburg)
Glaspipetten (1, 2, 5, 10 und 20 mL)	Roth (Karlsruhe)
Handschuhe Conform Latex	VWR (Darmstadt)
Kanüle (0,4 x 20 mm)	Terumo (Eschborn)
Kryoröhrchen mit Gewinde, 1,8 mL	Sarstedt (Nürnbrecht)
Küvetten	Hellma Analytics (Müllheim)
Mikroplatten-Verschlussfolie	VWR (Darmstadt)
Mikroreaktionsgefäße, 1,5 mL	Sarstedt (Nürnbrecht)
Mikroreaktionsgefäße, 2,0 mL	Sarstedt (Nürnbrecht)
Mini PROTEAN® System Glass Plates	BioRad (München)
Multiply ProGefäße, 0,5 mL	Sarstedt (Nürnbrecht)
Nano Eppendorf (Multiply-11 Strip 0,2 ml Kette)	Sarstedt (Nürnbrecht)
Nano Eppendorf Deckelkette für 0,2 ml Kette	Sarstedt (Nürnbrecht)
Nitrocellulose Blotting Membrane	GE Healthcare Life Science (Freiburg)
Objektträger (76 x 26 mm)	Roth (Karlsruhe)
Parafilm	Bremis (Oshkosh)
Pasteur-Pipetten Glas, 145 mm	Brand (Wertheim)
Pipettenspitzen LTS 20 µL	Mettler Toledo (Gießen)
Pipettenspitzen, 0,1-10 µL	Brand (Weinheim)
Pipettenspitzen, 100-1000 µl	Brand (Wertheim)
Pipettenspitzen, 1-200 µL	Sarstedt (Nürnbrecht)
Pipettenspitzen, 500-5000 µL	Eppendorf (Hamburg)
Plastik-Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Sarstedt (Nürnbrecht)
Plastik-Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Sarstedt (Nürnbrecht)
Sterilfilter (500 mL), 0,2 µM, PES (Ø 75 mm)	VWR (Darmstadt)

Anhang

Sterilfilter, 0,2 µM (Ø 25 mm)	VWR (Darmstadt)
Sterilindikatorband Autoklav	Roth (Karlsruhe)
Sterilindikatorband Heißluft	Roth (Karlsruhe)
THGA Graphite Tubes	Perkin Elmer (Waltham)
Vernichtungsbeutel	VWR (Darmstadt)
Whatman-Papier, 3 mm	Whatman (Dassel)
Zellkulturflasche (□ 25 cm ²)	Sarstedt (Nürnbrecht)
Zellkulturschalen, (Ø 150 mm)	Sarstedt (Nürnbrecht)
Zellkulturschalen, (Ø 100 mm)	Sarstedt (Nürnbrecht)
Zellkulturschalen, (Ø 60 mm)	Sarstedt (Nürnbrecht))
Zellkulturschalen, (Ø 35 mm)	Sarstedt (Nürnbrecht)
Zellschaber	VWR (Darmstadt)
Zellzählcups	Roche Diagnostics (Mannheim)

8.6 Verwendete Geräte

Atomabsorptionsspektrometer PINAAcle 900T	Perkin Elmer (Waltham)
Autosampler AS900	Perkin Elmer (Waltham)
Autoklav D150	Systec (Linden)
Badthermostate Haake mit Integralbad	PSL Systemtechnik (Osterode am Harz)
Biofreezer Herafreeze top	Thermo Scientific (Langenselbold)
Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
BioMark PCR Genetic Analysis	Fluidigm (San Francisco)
Blotting Kammer	Peqlab (Erlangen)
Brutschrank Heracell 150i	Thermo Scientific (Langenselbold)
Casy® TTC Cell Couter & Analyser System	OLS (Mannheim)
Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Centrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)
Colony Counter BZG-30	WTW (Weilheim)
Cryo 1 °C Cooler	VWR Interanational (Darmstadt)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen)
Elektrophoreseapparatur PowerPac™ Basic	BioRad (München)
Eppendorf Pipette 0,1-2,5 µL	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 0,5-10 µL	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 10-100 µL	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 20-200 µL	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 100-1000 µL	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipette 1000-5000 µL	Eppendorf (Hamburg)
Feinwaage BP 61 S	Sartorius (Göttingen)
Galaxy Mini Centrifuge	VWR International (Darmstadt)
Glaspipetten 5, 10, 20 mL	Roth (Karlsruhe)
Heißluftsterilisator	Memmert (Schwabach)
Heizschüttler MKR 13	HLC-BioTech (Bovenden)
Heizschüttler SH26	Cat (Staufen)
Heizschüttler TS-100	Peqlab (Erlangen)
ICP-MS XSeriesII mit CCT	Thermo Fisher Scientifique (Langenselbold)
IFC Controller HX	Fluidigm (San Francisco)
JASCO J-815 CD Spektrometer	JASCO Deutschland GmbH (Pfungstadt)

Kühl- und Gefrierschränke	Bosch (Gerlingen)
LSRII Fortessa FACS	Becton-Dickinson (Heidelberg)
Luminescent Image Analyzer LAS-3000	Fujifilm (Düsseldorf)
Magnetrührer Variomag® Poly Komet	VWR (Darmstadt)
Megafuge 1.0	Heraeus (Hanau)
MicroCentrifuge	Roth (Karlsruhe)
Mikroskop Axio Imager Z2	Carl Zeiss AG (Feldbach)
Mikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss AG (Feldbach)
Multipipette plus	Eppendorf
Multipipette® Pipette Lite XLS® 0,5-10 µl	Mettler Toledo (Gießen)
NanoQuant Platte	Tecan (Männedorf)
PCR Workstation Pro	Peqlab (Erlangen)
PFGE CHEF-DR III	BioRad (München)
pH-Meter 3210	WTW (Weilheim)
Pinzetten	Roth (Karlsruhe)
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Q-Exactive Quadrupole Orbitrap Massenspektrometer	Thermo Fisher Scientific (Kanada)
Reinstwasseranlage Milli-Q	Merck Millipore (Darmstadt)
Röntgenröhre CellRad	Faxitron (Much)
SC-2 Autosampler + Probengefäße	ESI Elemental Scientific (Mainz)
Sonifizierungsapparatur Sonifier W-250 D	Branson Ultrasonics (Danbury)
Sterilwerkbank HERAsafeKS	Thermo Scientific (Langenselbold)
Taumler 3012	Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel)
Tecan Infinite® M200 Pro	Tecan Group (Männedorf)
Teflonmagnetrührkerne	Roth (Karlsruhe)
Thermal Cycler C100 (CFX 96 Real Time System)	BioRad (München)
Timer	Roth (Karlsruhe)
Tischzentrifuge Mikroreaktionsgefäße	VWR International (Darmstadt)
UV/Vis-Spektrometer	Shimadzu Deutschland GmbH (Duisburg)
Vakuum System BVC21NT	Vakuubrand (Wertheim)
Vortex-Genie 2T	Scientific Industries (New York)
Waage VWR 1502	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	Memmert (Schwabach)

8.7 Verwendete Software

AIDA Image Analyzer	Raytest (Straubenhardt)
BD FACSDiva™	Becton-Dickinson (Heidelberg)
Fluidigm Real Time PCR Analysis	Fluidigm (San Francisco)
GenEx	MultiD Analyses (Götberg)
HySS2009 (Hyperquad Simulation and Speciation)	siehe Alderighi <i>et al.</i> (1999)
IBM SPSS Statistics 24	SPSS Statistics (Chicago)
Python-Skript (intern)	Agriculture and Agri-Food Canada
Thermo Xcalibure®	Thermo Fisher Scientific (Kanada)

8.8 Ergänzende Daten

8.8.1 Gutachten zur Authentifizierung der A549-Zellen



**D-48161 Münster, 25.06.2015
im Derdel 8**
Telefon: (0 25 34) 53 86 910
Telefax: (0 25 34) 53 86 914
E-Mail: info@ifg.ms
Internet: <http://www.ifg.ms>

Institut für Forensische Genetik, im Derdel 8, 48161 Münster

**Herrn
Dipl.-Biol. Garcia-Käufer
iuk Uniklinikum Freiburg
AG NANO- und Umwelttoxikologie
Breisacher Straße 115 b
79106 Freiburg**

Unser Zeichen: 2-0081-15
Bezug: Ihr Auftrag vom 03.06.2015

Gemäß Auftrag vom 03.06.2015 (Eingang der Proben hier: 09.06.2015) wird ein

molekulargenetisches Gutachten zur Zell-Linien-Authentifizierung

erstattet.

I. UNTERSUCHUNGSMATERIALIEN UND DURCHGEFÜHRTE UNTERSUCHUNGEN

Das Probenmaterial wurde für eine PCR-basierte Amplifizierung (Quantifiler human, PowerPlex ESX-17) und Kapillargelelektrophorese nach Standardverfahren eingesetzt (Abschluss der laborseitigen Untersuchungen: 24.06.2015).

Institut für Forensische Genetik GmbH
Geschäftsführende Gesellschafter: Prof. Dr. Bernd Brinkmann, Dr. Carsten Hohoff, Dr. Miriam Müller
Registriergericht: AG Münster, HRB 12192; USt-IdNr: DE 205 899 608

Tabelle 1: Eingegangenes Probenmaterial

Bezeichnung	Beschreibung Asservat	IFG Proben-Nr.
A549 Zellen	Zell-Pellet	2015-0318

II. BEWERTUNG DER BEFUNDE

In der Probe „A549 Zellen“ (s. Tab. 1) wurde ein DNA-Profil mit männlichem Amelogenin-Befund nachgewiesen, das mit dem für die Zelllinie A549 (ATCC CCL-185™) hinterlegten DNA-Profil und eigenen Untersuchungsergebnissen übereinstimmt.

Die Häufigkeit der übereinstimmenden DNA-Merkmalskombination beträgt unter Verwendung eines von Prof. Dr. Baur, ehem. Direktor des Instituts für medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie der Universität Bonn, entwickelten Verwandtschaftsprogramms, in den 15 vergleichbaren Systemen etwa $3,6 \times 10^{-22}$, d.h. eine Person unter **mehr als 3 Trilliarden** nicht-verwandten Personen aus der europäischen Bevölkerung weist statistisch diese DNA-Merkmalskombination auf.

Demnach handelt es sich bei der untersuchten Probe zweifelsfrei um die Zell-Linie A549.

III. BEMERKUNG

Die Reste der DNA-Extrakte werden -sofern kein anderweitiger Auftrag erteilt wird- hier bis zur Vernichtung tiefgekühlt aufbewahrt.

Dr. rer. nat. C. Hohoff
Stellv. Institutsdirektor

Prof. Dr. med. B. Brinkmann
Institutsdirektor

8.8.2 Einfluss von Aluminium auf die Koloniebildungsfähigkeit - Ergänzende Daten

Tabelle 2: Einfluss von Aluminium auf die Koloniebildungsfähigkeit von A549-Zellen bei zusätzlicher Bestrahlung – genaue Werte. Die Zellen wurden für 24 h mit Al(acac)₃ inkubiert, nicht bestrahlt oder bestrahlt (1 Gy) und für 8 h nachinkubiert. Die Mittelwerte ± SD der Koloniebildungsfähigkeit (CFA) aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen sind der Tabelle zu entnehmen.

Al(acac) ₃ [µM]	CFA nicht bestrahlte Proben MW ± SD (%)	CFA bestrahlte Proben (1 Gy) MW ± SD (%)
0	100,0 ± 0,0	86,6 ± 1,1
50	98,7 ± 0,6	84,4 ± 1,9
100	97,1 ± 1,9	81,3 ± 1,7
150	2,5 ± 4,4	4,3 ± 2,4
200	0	0,1 ± 0,2

8.8.3 Einfluss von Aluminium auf Zelltodmechanismen - Ergänzende Daten

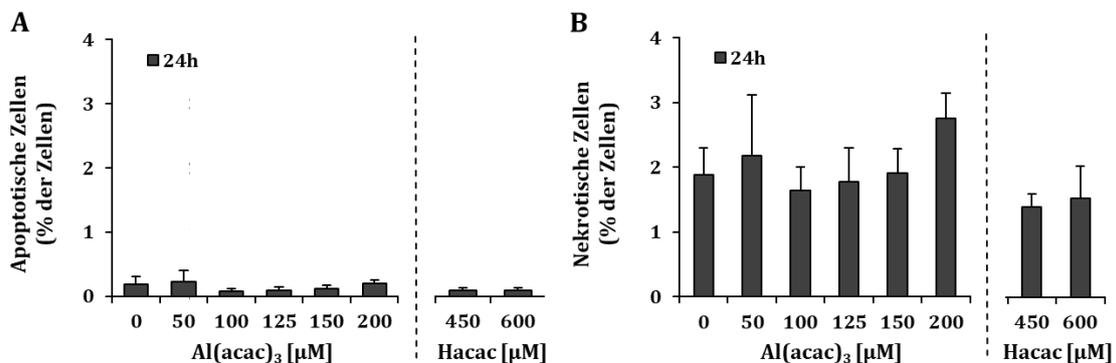


Abbildung 34: Einfluss von Aluminium auf die Apoptose (A) und die Nekrose (B) in A549-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit Al(acac)₃ bzw. Hacac inkubiert und der Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen anhand der Annexin V-FITC und PI-Färbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte + SD von drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

8.8.4 Einfluss von Aluminium auf die Genexpression in A549-Zellen
- Ergänzende Daten

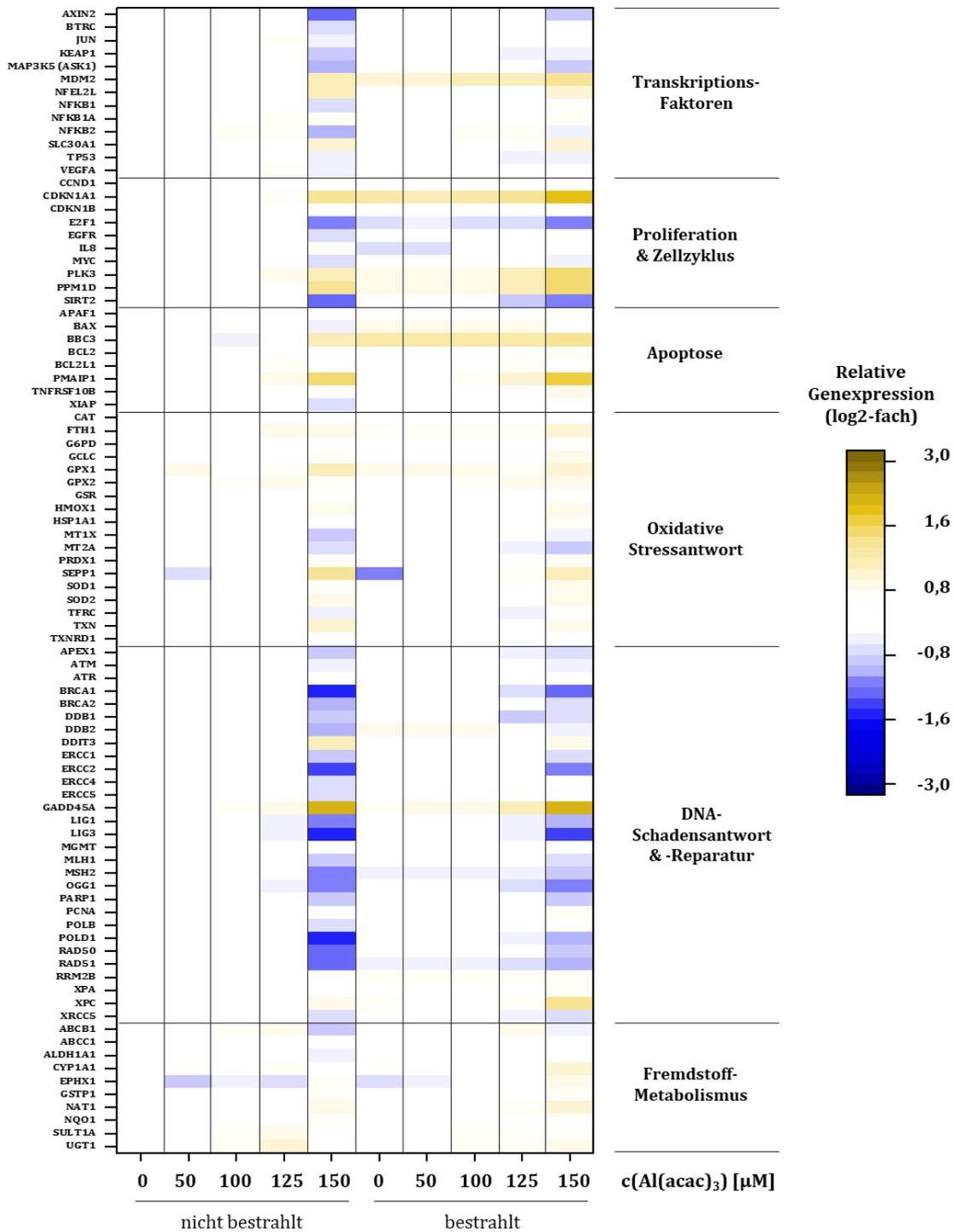


Abbildung 35: Einfluss von Aluminium auf die Expression ausgewählter Gene in A549-Zellen mit und ohne Bestrahlung, dargestellt in Form einer Heatmap. Die Zellen wurden für 24 h mit Al(acac)₃ behandelt, mit 1 Gy bestrahlt oder nicht bestrahlt und für 8 h in frischem Medium nachinkubiert. Die relative Genexpression wurde mittels *High-throughput RT-qPCR* bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (log₂-fach) aus drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen. Ein Wert ≥ 1 (Braunfärbung) steht für die Induktion des entsprechenden Gens, ein Wert ≤ -1 (Blaufärbung) hingegen für eine Repression.

9 Publikationsliste

Publikationen

- D.B. Ott, A. Hartwig, M.J. Stillman (2019) „*Competition between Al³⁺ and Fe³⁺ binding to human transferrin and toxicological implications: structural investigations using ultra-high resolution ESI MS and CD spectroscopy*”
Metalomics

Publikationen in Vorbereitung

- D.B. Ott, A. Hartwig (2019) „*Impact of aluminum on DNA double strand break induction and repair*”

Vorträge auf Fachtagungen

- 44. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Karlsruhe (2015)
„*Aktivierung des Keap1/Nrf2-Systems durch den sekundären Pflanzeninhaltsstoff Sulforaphan: Vergleich unters. Testsysteme und deren Aussagekraft*”
D.B. Ott, B.M. Strauch, A.L. Piberger, A. Hartwig
- 4. Workshop „Nachwuchsförderung“ der Gesellschaft für Umwelt – Mutationsforschung e.V., München (2016)
Gesellschaft für Umwelt- und Mutationsforschung (GUM)
„*Toxicological profile of different aluminum compounds in human lung epithelial cells*”
D.B. Ott, A. Hartwig
- 6th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry, Parry Sound - Ontario - Kanada (2017)
„*Insight into Al³⁺ and Fe³⁺ binding competition for the shuttle protein serum transferrin by ESI MS*”
D.B. Ott, A. Hartwig, M.J. Stillman

- The 6th International Symposium on Metallomics, Wien - Österreich (2017)
„Deeper insight into Fe(III) and Al(III) binding to the shuttle protein serum transferrin using ESI mass spectrometry and circular dichroism”
D.B. Ott, A. Hartwig, M.J. Stillman
- 15th Biennial Meeting of the German Society for DNA repair, Karlsruhe (2018)
„Aluminum and genotoxicity – is there a link? Investigations on DNA damage induction, DNA damage response and repair inhibition in A549 cells”
D.B. Ott, A. Hartwig

Poster auf Fachtagungen

- ToxNet-BW Symposium 2016, Konstanz (2016)
BWTOX.NET – Toxikologie-Netzwerk Baden-Württemberg
„Aluminum interferes with gene expression related to genome stability”
D.B. Ott, A. Hartwig
- 29. GUM Meeting der Gesellschaft für Umwelt- und Mutationsforschung e.V., München (2016)
Gesellschaft für Umwelt- und Mutationsforschung (GUM)
„Toxicological profile of different aluminum compounds in human lung epithelial cells”
D.B. Ott, A. Hartwig
- 4th German-French DNA Repair Meeting, Köln (2017)
Deutsche Gesellschaft für DNA-Reparaturforschung
„Aluminum-induced genotoxicity? Deeper insight into DNA damage induction, DNA damage response and repair inhibition”
D.B. Ott, C. Soballa, A. Hartwig

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz persönlich bei denjenigen Menschen bedanken, die auf unterschiedliche Art und Weise zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Doktormutter Frau Prof. Dr. Andrea Hartwig. Liebe Andrea, du hast mir dieses 'Alu-Projekt' zugetraut, mir große Forschungsfreiheiten gelassen und mich von Anfang an bei meinem Auslandsaufenthalt in Kanada unterstützt. Ich möchte mich bei dir für dein Vertrauen, deine Zeit und alle Hilfe aufrichtig bedanken.

Ebenfalls bedanke ich mich ganz herzlich bei meinem Koreferenten Herrn Prof. Dr. Mirko Bunzel für alle Zeit und Mühe, die in die Begutachtung dieser Arbeit geflossen sind.

Mein besonderer Dank gehört Prof. Dr. Martin Stillman und seiner Bioinorganic Group an der Western University in London, Kanada. Lieber Martin, der wissenschaftliche und persönliche Austausch mit dir sowie die Teilnahme an der Konferenz CanBIC bleiben mir in wertvoller Erinnerung. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch beim Karlsruhe House of Young Scientists (KHYS) für die Förderung dieses Auslandsaufenthalts bedanken.

Dem Arbeitskreis Hartwig und dem Arbeitskreis Bunzel sowie allen Ehemaligen sage ich Danke für das gute Miteinander am Institut. Insbesondere Beate Köberle, Sonya, Rebecca, Matze und Doris. Liebe Beate, deine große Hilfsbereitschaft, dein fachliches Feedback und deine persönliche Anteilnahme haben mich immer wieder neu berührt - danke! Liebe Sonya, deine treue Freundschaft in Freud und Leid ist ein ganz besonderes Geschenk für mich - danke! Liebe Rebecca, dass du zu mir ins Büro gezogen bist und mir immer wieder Mut gemacht hast, vergesse ich dir nie - danke! Lieber Matze, behalte deine ehrliche, treue Art, ich habe sie als sehr wertschätzend empfunden - danke! Liebe Doris, deine immer offene Tür und dein großes Herz haben mich stets mit Freude erfüllt - danke!

Ein Leben als Doktorandin ist nichts ohne Freunde. Mein besonderer Dank gehört Christina und Frank mit Familie, Rebecca und Tim mit Familie, Frauke und Michael sowie vielen weiteren, lieben Menschen. An dieser Stelle auch ein herzliches Dankeschön an Rolf Hahn für das Lesen dieser Arbeit.

Das Beste und Wichtigste kommt bekanntlich zum Schluss: Meine Familie!

Auch wenn euch meine 'Laborwelt' oft so fremd war, habt ihr versucht mich zu verstehen und mich auf eure Art und Weise zu unterstützen - danke! Liebe Mama, lieber Papa, ihr beide habt dies in ganz besonderer Weise getan, deshalb ist diese Arbeit euch gewidmet. Liebevoll und treu habt ihr mich in den vergangenen 4 Jahren begleitet und meinen Blick immer wieder auf den gerichtet, der die Basis unseres Lebens ist: der dreieinige Gott.