



universität
wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Effekte von nicht-Transferrin gebundenem Eisen auf
myokardiale und neuronale Zellen“

Verfasserin

Marlies Moshhammer, Bakk.rer.nat.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, August 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt: Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreuer: Univ. Prof. Dr. Hans Goldenberg

Danksagung

Ich möchte Herrn Univ. Prof. Dr. Hans Goldenberg für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die wissenschaftliche Betreuung meiner Masterarbeit danken. Desweiteren bedanke ich mich herzlich für die Möglichkeit, am EIC Kongress 2011 in Louvain-la-Neuve teilzunehmen.

Mein spezieller Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Barbara Scheiber-Mojdehkar, die mir während der gesamten Zeit meiner Masterarbeit stets sehr hilfreich und geduldig zur Seite gestanden ist und ich mich jederzeit mit allen Fragen an sie wenden durfte.

Außerdem bedanke ich mich bei meiner Arbeitskollegin Carolin Cornelius für die angenehme Zusammenarbeit im Labor und die gegenseitige Hilfe, die ich während der Zeit erfahren durfte. Im diesem Zusammenhang danke ich auch meiner Freundin Teresa Mairinger, mit der ich die gesamte Studienzeit seit Beginn gemeinsam gemeistert habe, für ihre vielen wertvollen Ratschläge und ihre Unterstützung in Studienfragen ebenso wie in Privatem.

Vor allem danke ich meinen Eltern Dr. Margot und Dr. Clemens Moshhammer und meinem Freund Dr. Gregor Hrubec, die mich während der gesamten Zeit meines Studiums fürsorglich unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

I.	Abbildungsverzeichnis	
II.	Tabellenverzeichnis	
III.	Abkürzungsverzeichnis	
1.	Einleitung und Fragestellung	10
2.	Literaturüberblick	12
2.1.	Überblick der Eisenhomöostase.....	12
2.1.1.	Systemischer Eisenmetabolismus.....	12
2.1.2.	Zellulärer Eisenmetabolismus	19
2.2.	Das IRP/IRE Regulationssystem.....	22
2.2.1.	Struktur und Regulation der IRPs	23
2.3.	IRE.....	29
2.4.	Die Rolle des IRE/IRP-Regulationsnetzwerks bei der Eisenaufnahme.....	30
2.5.	Die Rolle des IRE/IRP-Regulationsnetzwerks in der Eisenspeicherung	31
2.6.	Die Rolle des IRE/IRP-Regulationsnetzwerks im Eisentransport.....	32
2.7.	Transferrin und nicht-Transferrin gebundenes Eisen (non-transferrin bound iron, NTBI)	33
2.7.1.	Transferrin.....	33
2.7.2.	Nicht-Transferrin gebundenes Eisen (NTBI).....	34
3.	Material und Methoden	45
3.1.	Zellkultur.....	45
3.2.	Zelllinie.....	45
3.3.	Herstellung des Kulturmediums.....	46
3.3.1.	Nullmedium.....	46
3.3.2.	Herstellung von komplettiertem Nährmedium.....	47
3.3.3.	Herstellung von komplettiertem Neuronennährmedium	47

3.3.4. Herstellung von komplettiertem Myokardzellnährmedium	47
3.4. Medienwechsel und Passagieren der Kulturzellen	48
3.5. Bestimmung der Zellzahl	49
3.6. Differenzieren der P19-Stammzellen zu Neuronen	50
3.7. Differenzieren der P19-Stammzellen zu Myokardzellen	52
3.8. Einfrieren der P19-Zellen	53
3.9. Auftauen der P19-Zellen.....	54
3.10. Inkubationen der differenzierten Zellen.....	54
3.10.1. Inkubation der Neuronen und Myokardzellen mit Eisen(III)-Zitrat	54
3.10.2. Inkubation der Neuronen und Myokardzellen mit Zitrat.....	55
3.10.3. Inkubation der Neuronen und Myokardzellen mit Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure (NTA).....	55
3.10.4. Inkubation der Neuronen und Myokardzellen mit Eisen(III)-Ammoniumzitrat (FAC)	56
3.11. Ernten der Zellen und Herstellung von Zelllysaten	56
3.11.1. Ernten der Zellen und Herstellung der Zelllysate für die Proteinbestimmung nach Bradford und die Eisenbestimmung nach der Ferrozin-Methode	56
3.11.2. Ernten der Zellen und Herstellung der Zelllysate für die Proteinbestimmung nach Bradford zur quantitativen Messung der Zellproliferation nach Differenzierung	57
3.12. Proteinbestimmung nach Bradford	58
3.13. Eisenbestimmung – Ferrozin-Methode	59
3.14. MTT-Cell-Proliferation-Assay	61
3.14.1. Durchführung des MTT-Assays.....	61
3.15. Messung des redox-reaktiven Eisens der Inkubationsmedien mittels 2',7'- Dichlorodihydrofluorescein.....	62
3.15.1. Chemische Hydrolyse von 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat	63
3.15.2. Herstellung der Standardreihe	63
3.15.3. Herstellung der Reaktionslösungen mit und ohne L1.....	64

3.16. SDS-PAGE und Western Blot	65
3.16.1. Probenvorbereitung	65
3.16.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	66
3.16.3. Western Blot	68
3.16.4. Färben der Nitrozellulosemembran	69
3.16.5. Immunodetektion.....	70
3.16.6. Strippen der Nitrozellulose	73
3.17. Statistik	73
4. Ergebnisse und Diskussion.....	74
4.1. Kontrolle der Differenzierung der embryonalen, murinen P19 Karzinomstamm-zellen zu Myokardzellen und Neuronen.....	74
4.2. Quantitative Messung der Zellproliferation nach erfolgter Differenzierung.....	77
4.3. Einfluss von nicht-Transferrin gebundenem Eisen auf myokardiale Zellen und Neuronen	79
4.3.1. Toxizität von nicht-Transferrin gebundenem Eisen auf myokardiale Zellen und Neuronen.....	79
4.3.2. Messung des zellulären Eisengehaltes nach Beladung der Zellen mit NTBI	87
4.3.3. Bestimmung von redox-aktivem Eisen in den jeweiligen Inkubations-medien	94
4.3.5. Bestimmung der Abhängigkeit der Viabilität von der Zitratkonzentration	97
4.3.5. Bestimmung der Korrelation der Viabilität mit dem zellulären Eisengehalt bei Inkubation von Myokardzellen und Neuronen mit Eisen(III)-Zitrat	102
5. Schlussbetrachtung	104
6. Zusammenfassung	107
7. Summary.....	109
8. Literaturverzeichnis.....	110

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die intestinale Eisenabsorption [RECALCATI et al., 2010]	12
Abbildung 2: Systemische Eisenhomöostase [RECALCATI et al., 2010]	14
Abbildung 3: Eisenmetabolismus in Makrophagen [RECALCATI et al., 2010]	15
Abbildung 4: Hepcidin-medierte Regulation der Eisenhomöostase [RECALCATI et al., 2010] ..	17
Abbildung 5: Regulation der zellulären Eisenhomöostase durch IRPs [RECALCATI et al., 2010]	20
Abbildung 6: Eisenabhängige Regulation der IRP-Bindungsaktivität [RECALCATI et al., 2010] ..	21
Abbildung 7: IRPs in Zuständen hoher und niedriger Eisenkonzentrationen [VOLZ, 2008]	23
Abbildung 8: Die Struktur von IRP1 [RECALCATI et al., 2010]	24
Abbildung 9: Rolle der Mitochondrien im zytosolischen Fe-S-Clusteraufbau in der Bildung von Fe-S-Clustern [RECALCATI et al., 2010]	26
Abbildung 10: Regulation von IRP2 [RECALCATI et al., 2010]	27
Abbildung 11: P19-Zellsuspension nach Splitten, aufgenommen mittels TC10 Automated Cellcounter von BioRad	49
Abbildung 12: Arbeitsschema zur Differenzierung von P19-Stammzellen zu Neuronen	50
Abbildung 13: Arbeitsschema zur Differenzierung von P19-Stammzellen zu Myokardzellen....	52
Abbildung 14: Strukturformel von MTT [SÁNCHEZ und KÖNIGSBERG, 2006]	61
Abbildung 15: Schichtung eines Blotsandwiches	69
Abbildung 16: Typischer Blot zum Nachweis von Neurofilament bei Verwendung von β -Actin und Calnexin als Ladekontrolle bei neuronalen Zellen	74
Abbildung 17: Typischer Blot zum Nachweis von Caveolin-2 bei Verwendung von Calnexin als Ladekontrolle bei myokardialen Zellen.....	75
Abbildung 18: Quantitative Messung der Zellproliferation nach Differenzierung der Stammzellen zu myokardialen Zellen (A) und zu neuronalen Zellen (B).....	77
Abbildung 19: Einfluss der Inkubation mit Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure im Verhältnis 1:4 auf die Viabilität von Myokardzellen	80
Abbildung 20: Einfluss der Inkubation mit Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure im Verhältnis 1:4 auf die Viabilität von neuronalen Zellen	81

Abbildung 21: Einfluss der Inkubation mit Ammoniumeisen(III)-Zitrat auf die Viabilität von myokardialen Zellen.....	82
Abbildung 22: Einfluss der Inkubation mit Ammoniumeisen(III)-Zitrat auf die Viabilität von Neuronen	83
Abbildung 23: Einfluss der Inkubation mit 100 μ M Eisen(III)-Zitrat in unterschiedlichen molaren Verhältnissen auf die Viabilität von Myokardzellen	84
Abbildung 24: Einfluss der Inkubation mit 100 μ M Eisen(III)-Zitrat in unterschiedlichen molaren Verhältnissen auf die Viabilität von neuronalen P19-Zellen	85
Abbildung 25: Zellulärer Eisengehalt bei Beladung von Myokardzellen mit Eisen(III)-Zitrat, Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure und Ammoniumeisen(III)-Zitrat	88
Abbildung 26: Zellulärer Eisengehalt bei Beladung von Neuronen mit Eisen(III)-Zitrat, Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure und Ammoniumeisen(III)-Zitrat.....	90
Abbildung 27: Abhängigkeit des zellulären Eisengehaltes von der Zitratkonzentration bei Inkubation von Myokardzellen mit Eisen(III)-Zitrat-Komplexen	92
Abbildung 28: Abhängigkeit des zellulären Eisengehaltes von der Zitratkonzentration bei Inkubation von neuronalen P19-Zellen mit Eisen(III)-Zitrat-Komplexen	93
Abbildung 29: Bestimmung von redox-aktivem Eisen in den jeweiligen Inkubationsmedien durch die Messung mit 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCDHF)	95
Abbildung 30: Bestimmung der Abhängigkeit der Viabilität von der Zitratkonzentration bei Inkubation von Myokardzellen mit 100 μ M Eisen(III)-Zitrat	97
Abbildung 31: Bestimmung der Abhängigkeit der Viabilität von der Zitratkonzentration bei Inkubation von Neuronen mit 100 μ M Eisen(III)-Zitrat	98
Abbildung 32: Bestimmung der Abhängigkeit der Viabilität von Myokardzellen von der Zitratkonzentration	100
Abbildung 33: Bestimmung der Abhängigkeit der Viabilität von der Zitratkonzentration bei Inkubation von Neuronen mit Zitrat.....	101
Abbildung 34: Bestimmung der Korrelation der Viabilität mit dem zellulären Eisengehalt bei Inkubation von Myokardzellen mit Eisen(III)-Zitrat	102
Abbildung 35: Bestimmung der Korrelation der Viabilität mit dem zellulären Eisengehalt bei Inkubation von Neuronen mit Eisen(III)-Zitrat	103

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eisengehalte verschiedener Kulturmedien	46
Tabelle 2: Pipettierschema zur Herstellung der Eisen(III)-Zitrat-Komplexe in Inkubationsmedium	55
Tabelle 3: Pipettierschema zur Herstellung des Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure-Komplexes	55
Tabelle 4: Pipettierschema zur Erstellung der Eichgerade für die Proteinbestimmung nach Bradford	58
Tabelle 5: Herstellung der Eisenstandards für die Messung von redox-reaktivem Eisen mittels 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein	63
Tabelle 6: Herstellung der Reaktionslösungen mit und ohne L1 für die Messung von redox-reaktivem Eisen mittels 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein	64
Tabelle 7: Pipettierschema für Polyacrylamidgele	67
Tabelle 8: Pipettierschema zur Herstellung der Inkubationslösung mit dem ersten Antikörper	71
Tabelle 9: Pipettierschema zur Herstellung der Inkubationslösung mit dem zweiten Antikörper	72

III. Abkürzungsverzeichnis

CIA	zytosolischer Fe-S-Cluster Aufbau
CP	Ceruloplasmin
CS	Kälberserum
DCDHF	2'-7'-Dichlorodihydrofluorescein
DcytB	Duodenal cytochrome B
DFO	Desferrioxamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT1	Divalent metal transporter 1
eALAS	Erythroide-5-Aminolävulinsäure-Synthase
FAC	Ammonium Eisen(III)-Zitrat
FBSL5	F-box and leucine-rich repeat protein 5
FCS	fötales Kälberserum
FLVCR	feline leukemia virus subgroup C receptor
FPN	Ferroportin
HAMP	hepcidin antimicrobial peptide
HBS	HEPES buffered saline
HFE	humanes Hämochromatose Protein
HIF-2 α	Hypoxie-induzierbarer Faktor 2 α
HJV	Hämojuvelin
HRP	horseradish peroxidase
IRE	iron regulatory element
IRP1	iron regulatory protein 1
IRP2	iron regulatory protein 2
ISC	Fe-S-Cluster
L1	Deferipron
LIP	labiler Eisenpool
NRAMP1	natural resistance-associated macrophage protein 1
NTA	Nitrilotriessigsäure
NTBI	Nicht-Transferrin gebundenes Eisen (non-transferrin bound iron)

PBS	phosphate buffered saline
SDH	Succinat-Dehydrogenase
STAT5	signal transducer and activator of transcription 5
Tf	Transferrin
TfR1	Transferrin Rezeptor 1
TfR2	Transferrin Rezeptor 2
UTRs	untranslated terminal regions

1. Einleitung und Fragestellung

Eisen liegt im Blutplasma physiologisch gesunder Individuen größtenteils gebunden an Transferrin vor [CRICHTON et al., 2008], dadurch wird die redox-aktive und somit potentiell für den Menschen gefährliche Natur des Eisens gebannt. [MCKIE et al., 2000]

Transferrin ist unter normalen Umständen nur zu etwa 20-50% gesättigt, in Eisenüberladungszuständen von Geweben, wie sie etwa bei Hämochromatose und aufgrund von wiederholten Eisentransfusionen bei hämolytischer Anämie vorkommen, kann auch nicht-Transferrin gebundenes Eisen (non-transferrin bound iron, NTBI) als Folge der Transferrinsättigung auftreten. Somit ist das Auftreten von NTBI eine pathologische Manifestation und wird in gesunden Menschen nicht gefunden. [BAKER et al., 1998], [BREUER et al., 2000]

Über die tatsächliche chemische Natur des NTBI ist wenig bekannt, spekuliert wird, dass es sich aus einem heterogenen Mix von Komplexen zusammensetzt. [GROOTVELD et al., 1989] Potentielle Liganden für eine Komplexbildung im Plasma sind Zitrat und Acetat [LENTNER, 1984], desweiteren Phosphat, Ascorbat und ATP. Das dreiwertige Eisen in diesen Komplexen ist redox-aktiv. [BRADBURY, 1997]

Ein weiterer Kandidatenligand zur Komplexbildung stellt das plasmatische Albumin dar, es wurde gezeigt, dass es mit Fe(III) und Fe(III)-Zitrat *in vitro* Komplexe bildet. [LOVSTAD, 1993]

Da die Bindung von Eisen an Transferrin unter normalen Umständen sein redox-aktives Potential verhindert [MCKIE et al., 2000], kommt NTBI die Rolle eines potentiellen Gesundheitsrisikos zu. NTBI fördert die Bildung von freien Hydroxylradikalen, beschleunigt die Peroxidation von Membranlipiden und führt somit zu oxidativen Schäden. [GUTTERIDGE et al., 1985]

Über den Aufnahmemechanismus des nicht-Transferrin gebundenen Eisens ist sehr wenig bekannt, NTBI gelangt über Stoffwechselwege in Zellen, die vom Transferrin Rezeptor 1 unabhängig sind. [SHVARTSMAN et al., 2007] Bei der Aufnahme von NTBI

1. Einleitung und Fragestellung

könnte jedoch der erst kürzlich entdeckte Transferrin Rezeptor 2 involviert sein. [GRAHAM et al., 2008]

In Folge der zellulären Aufnahme von Eisen könnte es zu exzessiver Akkumulation der labilen Eisenspezies kommen, die in oxidativen Schäden in Form von Organausfällen enden. [SHVARTSMAN et al., 2007]

Die anormale Verteilung des Gewebeeisens in Zuständen fortgeschrittener Eisenüberladung weist eventuell ein Muster der rezeptorvermittelten Aufnahme des NTBI in unterschiedlichen Geweben wie Herz, endokrinen Drüsen, Hypophysenvorderlappen und Leber auf. [OUDIT et al., 2003] Kardiale Myozyten reagieren sehr empfindlich auf Eisenüberladung [MUTH et al., 2001] und der Gehalt an NTBI im Gehirn ist bei neurodegenerativen Erkrankungen erhöht. [MILLEROT-SERRUOT et al., 2008]

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss mehrerer Eisenverbindungen, wie sie als NTBI im Plasma vorkommen könnten, in einem Modell zu testen, bei dem embryonale murine Karzinomzellen zu Neuronen und Myokardzellen differenziert wurden.

2. Literaturüberblick

2.1. Überblick der Eisenhomöostase

2.1.1. Systemischer Eisenmetabolismus

2.1.1.1. Eisenabsorption

Eisen wird in zwei verschiedenen Formen mit der Nahrung aufgenommen (anorganisches Eisen und Hämeisen) und im Duodenum absorbiert um die täglichen Eisenverluste zu kompensieren. [ANDERSON et al., 2009] Die Herausforderung, der sich Zellen stellen müssen, ist es, Eisen in ausreichendem Umfang aus der Umgebung aufzunehmen und imstande zu sein, sich vor der Toxizität des intrazellulären Eisens zu schützen. [PALMIERI, 2004]

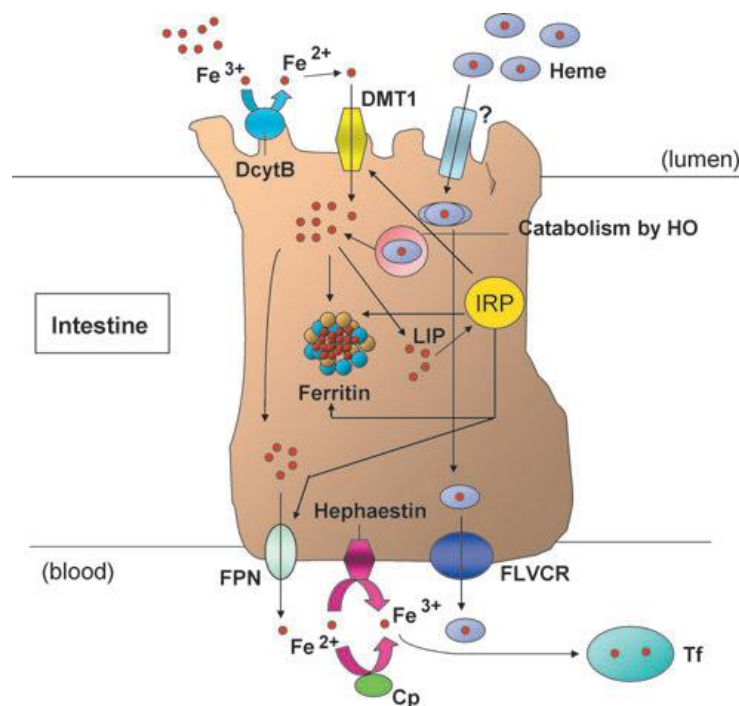


Abbildung 1: Die intestinale Eisenabsorption [RECALCATI et al., 2010]

Nachdem über die Nahrung aufgenommenes nicht-Hämeisen, welches aus Fe^{3+} besteht, an der apikalen Membran der intestinalen Enterozyten mittels Ferroxidasen zu Fe^{2+} reduziert wurde (DcytB („duodenal cytochrome B“) ist eine mögliche Reduktase) [MCKIE, 2008], [DE DOMENICO et al., 2007], passiert es die apikale Membran von absorbierenden Epithelzellen über einen Eisentransporter, den „divalenten

2. Literaturüberblick

Metalltransporter 1 (divalent metal ion transporter 1', DMT1). [MACKENZIE und GARRICK, 2005] Das Eisen, das nicht gebraucht oder von intestinalen Enterozyten als Ferritin gespeichert wird, wird ins Blut mit Hilfe des basolateralen Eisenexporters Ferroportin (FPN) transportiert und an das Eisentransportprotein Transferrin (Tf) gebunden. [WESSLING-RESNICK, 2006] Ferroxidasen dienen auch dazu, Ferroportin zu stabilisieren. [DE DOMENICO et al., 2007]

Ferroportin, ein Protein mit 12 Transmembrandomänen, ist in intrazellulären Kompartimenten ebenso vertreten wie an der basolateralen Oberfläche von Epithelzellen, sowie auch auf der Oberfläche von nicht-polarisierten Zellen [DE DOMENICO et al., 2007] Der Eisenexport via Ferroportin benötigt im Anschluss die Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} durch Ceruloplasmin (Cp), einer ‚multicopper‘-Oxidase im Blutplasma und Hephaestin an der basolateralen Membran der Enterozyten, damit Fe^{3+} an Transferrin binden kann. [WESSLING-RESNICK, 2006] Die Aufnahme und Abgabe von Häm (möglicher Hämexporter FLVCR, ‚feline leukemia virus subgroup C receptor‘) im Intestinum ist weniger klar definiert, da die Rolle der Transporter – obwohl schon einige identifiziert – noch unklar ist. [LATUNDE-DADA et al., 2006] Die Proteine, die primär an der Absorption von Eisen involviert sind, werden von ‚iron regulatory proteins‘ (IRPs) reguliert. Die IRPs werden ihrerseits vom Eisengehalt des zytosolischen labilen Eisenpools (‚labile iron pool‘ LIP) kontrolliert. [RECALCATI et al., 2010]

2.1.1.2. Eisenverteilung und Umsatz im Körper

Die Haupteisenquelle für die meisten Gewebe stellt Transferrin-gebundenes Eisen dar. Nachdem etwa 70% des Körpereisens in Hämoglobin lokalisiert ist, wird der größte Teil des zirkulierenden Eisens für die Hämsynthese durch unreife Knochenmarkshistiozyten verwendet. Diese nehmen Transferrin über den Transferrin Rezeptor 1 (TfR1) auf. [HOWER et al., 2009] Der Transferrin Rezeptor 2 (TfR2) ist in seiner Sequenz dem TfR1 sehr ähnlich, er ist hauptsächlich membrangebunden an Hepatozyten zu finden und bindet Transferrin pH-Wert-abhängig mit einer etwa 25-fach geringeren Affinität als TfR1. [KAWABATA et al., 2000]

2. Literaturüberblick

Ein Erwachsener benötigt für die tägliche Produktion von mehr als 200 Milliarden Erythrozyten mehr als 20 mg elementares Eisen. Der Großteil des Eisens stammt aus der Wiederverwertung gealterter Erythrozyten durch Makrophagen des retikuloendothelialen Systems. Nur etwa 1-2 mg des täglichen Eisenumsatzes stammen aus der intestinalen Absorption, welcher bei einem ‚steady state‘ nur dafür ausreicht, Eisen, welches durch Prozesse wie etwa Zellabschilferung und physiologische bzw. pathologische Blutungen verloren gehen, zu ersetzen. [ANDREWS, 1999]

Aufgrund ihres einzigartig hohen Bedarfs an Eisen sind die Erythrozytenvorläuferzellen gänzlich vom Transferrinzyklus abhängig, welcher sowohl eine hohe Affinität als auch eine hohe Avidität liefert um deren Eisenbedürfnis gerecht zu werden. Wenn nicht ausreichend Transferrin-gebundenes Eisen vorhanden ist, wird die Erythropoese rasch in ihrem Eisenfluss limitiert, was in weiterer Folge zu Anämie führt, wie sie in Eisenmangelsituationen oder bei chronischer Entzündung auftritt. [FLEMMING, 2008]

Die Leber speichert 10-20% des Körpereisens in Form von Ferritin, welches bei Bedarf Eisen leicht wieder bereitstellen kann. Etwa 10% des Körpereisens ist - gebunden an Häm - in Myoglobin im gestreiften Muskel lokalisiert, der Rest ist auf Gewebe verteilt.

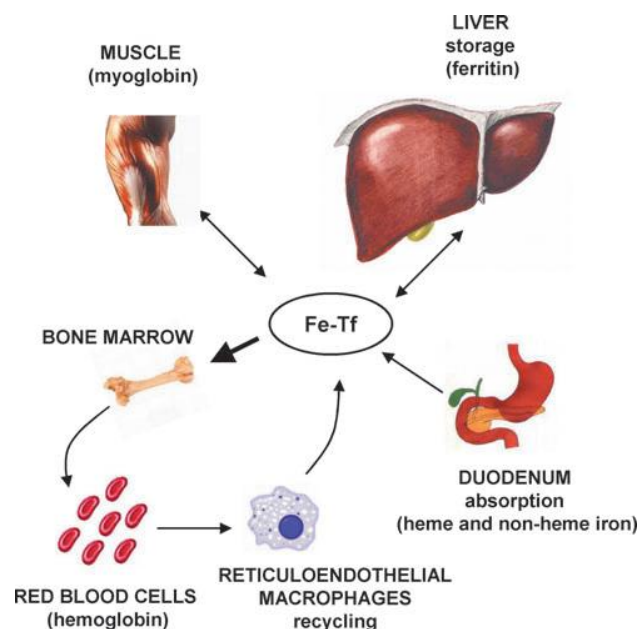


Abbildung 2: Systemische Eisenhomöostase [RECALCATI et al., 2010]

2. Literaturüberblick

Das Eisen für die Synthese von Hämoglobin stammt hauptsächlich aus der Wiederverwendung des Eisens gealterter Erythrozyten durch Makrophagen in der Leber und der Milz.

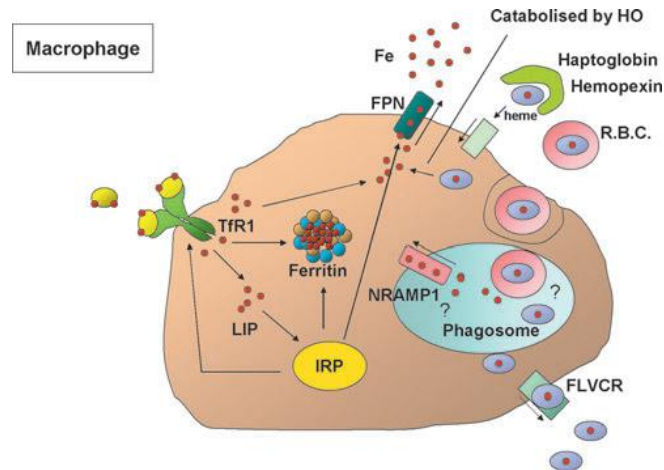


Abbildung 3: Eisenmetabolismus in Makrophagen [RECALCATI et al., 2010]

Das von Hämoglobin stammende Häm wird über einen bisher noch undefinierten Mechanismus ins Zytoplasma transportiert, wo es von der zytosolischen Häm-Oxygenase-1 abgebaut und wodurch Eisen freigesetzt wird. [KEEL et al., 2008] Hämeisen kann auch durch die Bindung an Hämopexin und Haptoglobin in die Makrophagen transportiert werden. Neben dem Hämeisen stellt jedoch auch das nicht-Hämeisen, das über den TfR1 aufgenommen wird, eine wichtige Quelle dar. [RECALCATI et al., 2010] Das so erhaltene Eisen, welches von den Zellen nicht weiter verwendet bzw. in Ferritin gespeichert wird, wird anschließend über Ferroportin (FPN) in die Zirkulation transportiert. Häm kann ebenso direkt über den ‚feline leukemia virus subgroup C receptor‘ (FLVCR), welcher sich auf den Plasmamembranen von Makrophagen befindet, in die Zirkulation abgegeben werden, was eine kritische Rolle im Exportüberschuss unreifer Erythrozyten und Hepatozyten darstellt. [KEEL et al., 2008] Der Eisenmetabolismus innerhalb der Phagosomen ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch ist bekannt, dass NRAMP1 (‚natural resistance-associated macrophage protein 1‘) dafür verantwortlich ist, Eisen über die Phagosomenmembran im Falle einer bakteriellen Infektion zu pumpen. [RECALCATI et al., 2010]

Bei erhöhter Erythropoese, bei der das Erythropoese betreibende Knochenmark einen gesteigerten Bedarf an Eisen aufweist, kann dieses auch vom Leberspeicher mobilisiert

2. Literaturüberblick

werden. Ebenso stellt die Skelettmuskulatur eine potentielle Eisenquelle nach Stimulation der Erythropoese dar, wie es in Individuen, die großen Höhenlagen ausgesetzt sind, zu beobachten ist. [ROBACH et al., 2007] Eine Eisenmobilisierung aus Muskeln wird bei Personen, denen Erythropoetin verabreicht wurde, jedoch nicht beobachtet. [ROBACH et al., 2009] Dies lässt darauf schließen, dass eine erhöhte Aktivität der Erythropoese nicht der einzige Auslöser für eine Abgabe von Muskeleisen ist und dass die hypoxische Umgebung eine Rolle spielen könnte. [RECALCATI et al., 2010]

2.1.1.3. Regulation der Eisenhomöostase

Die Eisenhomöostase wird sowohl auf systemischer als auch auf zellulärer Ebene kontrolliert. Auf der systemischen Ebene stellt Hepcidin das Schlüsselregulations-element dar [NEMETH und GANZ, 2006], auf zellulärer Ebene erfolgt die Kontrolle der Eisenhomöostase mittels der ‚iron regulatory proteins‘ IRP1 und IRP2. [MUCKENTHALER et al., 2008]

Die physiologische Regulation der Körpereisenspeicher und die Eisenverfügbarkeit im Plasma werden hauptsächlich vom Hormon Hepcidin übernommen. Hepcidin ist ein Peptid aus 25 Aminosäuren, welches primär in den Hepatozyten der Leber synthetisiert und von diesen abgegeben wird. Hepcidin zirkuliert im Plasma, wird von der Niere gefiltert und akkumuliert schlussendlich im Urin. [PARK et al., 2001]

Das Vorhandensein von Hepcidin im Plasma reguliert den Austritt von Eisen aus epithelialen Zellen und Makrophagen durch dessen Hemmung. [NICOLAS et al., 2002]

2. Literaturüberblick

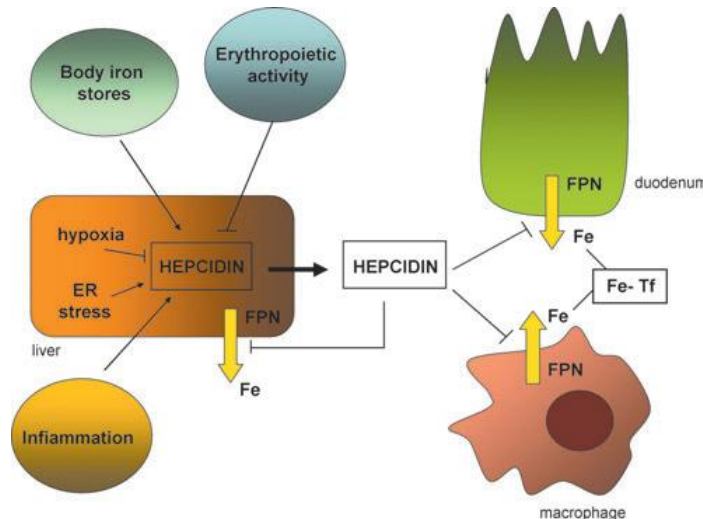


Abbildung 4: Hepcidin-mediierte Regulation der Eisenhomöostase [RECALCATI et al., 2010]

Hepcidin kontrolliert die Eisenhomöostase über die Kontrolle des Eisenexporters Ferroportin (FPN) an der Plasmamembran. [NEMETH et al., 2004] Es bindet an Ferroportin, wodurch eine Phosphorylierung der Aminosäuren induziert wird, die sich in einer intrazellulären Proteinschleife des Ferroportins befinden. Dadurch wird die Aufnahme des Hepcidin-Ferroportin-Komplexes ausgelöst, was zu einer Ubiquitinierung von Ferroportin und einem lysosomalen Abbau beider Proteine führt. [DE DOMENICO et al., 2007] Somit kann durch den Eisenexporter Ferroportin, der in Zellen des Duodenums, in Hepatozyten, Makrophagen und Plazentazellen stark exprimiert wird, kein Eisen ins Plasma transportiert werden, wodurch das Eisen in den Zellen verbleibt und die Konzentration des plasmatischen Eisens abnimmt. [NEMETH und GANZ, 2006]

Diesem Mechanismus entsprechend führt ein Mangel an Hepcidin zu einem Verbleiben von Ferroportin auf der Zellmembran und demzufolge zu einer Eisenüberladung des Organismus [VIATTE et al., 2005], wohingegen die Applikation von synthetischem Hepcidin in einem schnellen, anhaltenden Rückgang des Plasmaeisenpiegels resultiert [RIVERA et al., 2005], dies aufgrund der Abnahme des von Makrophagen exprimierten Ferroportins [DELABY et al., 2005], sowie einer Hemmung der intestinalen Eisenaufnahme. [LAFTAH et al., 2004]

2. Literaturüberblick

Eine inadäquate Expression von Hepcidin im Verhältnis zu den Körpereisenspeichern liegt einer dysregulierten duodenalen Eisenabsorption zugrunde, welche die meisten genetischen Eisenüberschusserkrankungen charakterisiert. [PIETRANGELO, 2004]

2.1.1.3.1. Hepcidin und Hereditäre Hämochromatosen

Das Verständnis der Funktion von Hepcidin und des Zusammenspiels von Hepcidin mit der Pathophysiologie primärer, hereditärer Eisenüberladungserkrankungen („hereditäre Hämochromatosen“) hat viel zur Aufklärung der zellulären und molekularen Mechanismen der Regulation der Körpereisenspeicher beigetragen.

Bisher sind mindestens eine dominante und vier autosomal rezessive genetisch unterschiedliche Formen der hereditären Hämochromatosen bekannt. Als gemeinsame Pathophysiologie haben alle eine chronische, für das Ausmaß der systemischen Eisenspeicher unangemessen hohe intestinale Eisenabsorptionsrate gemeinsam.

In den vier autosomal rezessiven Formen – aufgrund von Mutationen in Genen, die für HFE („humanes Hämochromatose Protein“) [FEDER, 1999], Hepcidin, [ROETTO, 2003] Hämojuvelin [PAPANIKOLAOU et al., 2004] und den Transferrin Rezeptor 2 [CAMASCHELLA et al., 2000] codieren – ist der Plasma- bzw. Uringehalt an Hepcidin unangemessen niedrig für das Ausmaß der systemischen Eisenspeicher. [PAPANIKOLAOU et al., 2004] Weiters scheint das Ausmaß des Mangels an Hepcidin etwa mit dem klinischen Schweregrad des Phänotyps zu korrelieren. Zusätzlich zur parenchymalen (Leber, Herz, Pankreas) Eisenüberladung gehen alle rezessiven Formen der hereditären Hämochromatosen mit einem Mangel an Eisen in den Makrophagen einher. Die parenchymale Eisenüberladung und der relative Eisenmangel in den Makrophagen sind die zellulären Hauptphänotypen des Hepcidinmangels und des Ferroportinüberschusses.

Die autosomal dominante Form der hereditären Hämochromatosen – aufgrund einer Genmutation des Ferroportin 1 Gens (FPN1) – hat einen klinisch variablen Phänotyp. Patienten mit einer klinischen Ausprägung, die der autosomal rezessiven Form der

2. Literaturüberblick

hereditären Hämochromatosen gleicht, haben Mutationen, die FPN1 für eine Hepcidin-vermittelte Herabregulation unempfindlich machen. [DRAKESMITH et al., 2005]

Somit scheint es, dass eine Dysregulation der Hepcidin-Ferroportin-Achse für viele Aspekte der systemischen und zellulären Phänotypen der hereditären Hämochromatosen verantwortlich ist. Die verminderte Expression von Hepcidin führt zu einer schnellen und schwerwiegenden Eisenüberladung. [PIGEON et al., 2001]

Einige wenige Individuen leiden an einer schweren, früh einsetzenden Form der Hämochromatose, ‚juvenile Hämochromatose‘ genannt, welche noch vor dem dreißigsten Lebensjahr aufgrund der Eisenüberladung zu Organschäden der Patienten führt. [NEMETH und GANZ, 2009]

Die ‚juvenile Hämochromatose‘ kommt in zwei unterschiedlichen Formen vor, der Typ 2A ist durch eine Mutation im Gen, das für HJV (Hämojuvelin) codiert, bedingt, wohingegen der Typ 2B durch eine Mutation im HAMP-Gen (hepcidin antimicrobial peptide), welches für Hepcidin codiert, verursacht wird. [PAPANIKOLAOU et al., 2004], [ROETTO et al., 2003]

2.1.2. Zellulärer Eisenmetabolismus

Entsprechend der systemischen Eisenhomöostase wird ein adäquater Eisengehalt im zytosolischen, zellulären Eisenpool (LIP) von der koordinierten Expression von Proteinen, die in der Aufnahme, dem Export und der Speicherung von Eisen involviert sind, aufrecht erhalten. [MUCKENTHALER et al., 2008] Der LIP ist ein Pool von schwach chelatiertem Eisen niedriger molekularer Masse, welcher Eisen rasch durch die Zelle leiten kann. Der Gehalt des LIP entspricht einem Mittel aus dem zellulären Eisenbedarf und der Gefahr der exzessiven Bildung von Hydroxylradikalen. [BREUER et al., 1997]

Dieses System wird über viele Mechanismen kontrolliert, die post-transkriptionelle Kontrolle über das IRP/IRE-System (iron regulatory protein/iron regulatory element) ist jedoch das zentrale Element, da der zelluläre Eisenmetabolismus über die Bindung von IRP1 und/oder IRP2 an cis-regulatorische mRNA-Motive - ‚iron responsive elements‘ genannt - an verschiedenen mRNA-Zielorten kontrolliert wird.

2. Literaturüberblick

Die Interaktion von IRE/IRP reguliert die Expression der mRNAs, welche für Proteine codieren, die für die Eisenbeschaffung (TfR1, DMT1), die Eisenspeicherung (H und L-Ferritin), die Eisenutilisation (Erythroide-5-Aminolävulinsäure-Synthase (eALAS), mitochondriale Aconitase, Succinat-Dehydrogenase (SDH) und Hypoxie-induzierbaren Faktor (HIF-2 α)) und den Eisenexport (Ferroportin (FPN)) verantwortlich sind. [MUCKENTHALER et al., 2008]

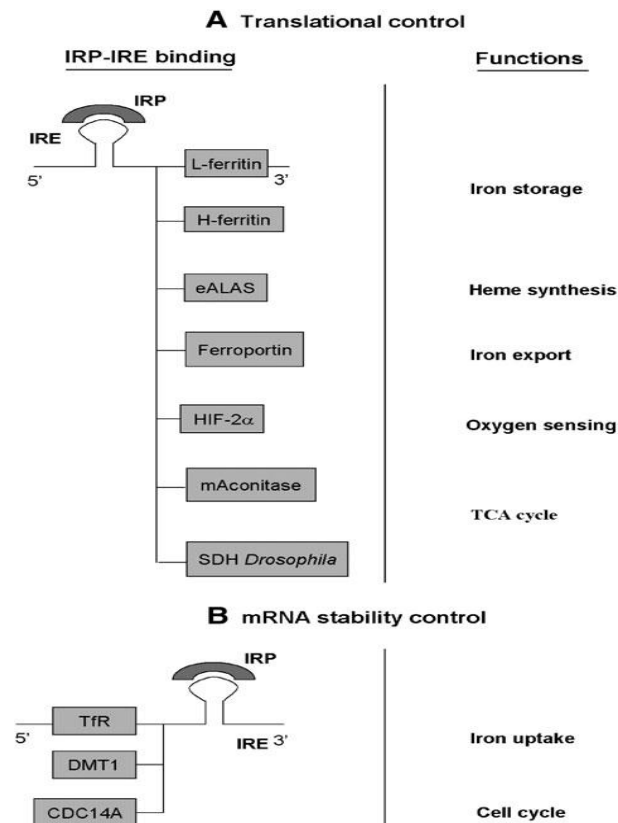


Abbildung 5: Regulation der zellulären Eisenhomöostase durch IRPs [RECALCATI et al., 2010]

Die Kapazität des IRP-Systems stellt sicher, dass all diese mRNAs zumindest unter physiologisch normalen Umständen entsprechend reguliert sind.

Neben anderen Signalen und Zuständen ist Eisen der stärkste Modulator des IRE/IRP-Netzwerks. Die allgemeine Eisenbindungskapazität von beiden IRPs ist in Zellen mit Eisenmangel hoch und in Zellen, die an Eisen übersättigt sind, niedrig. [WANG et al., 2007] Im Falle eines Eisenmangels binden IRP1 und IRP2 an IREs, wodurch die Translation der mRNA gehemmt (A) oder der Abbau der mRNA verhindert wird. (B) [RECALCATI et al., 2010]

2. Literaturüberblick

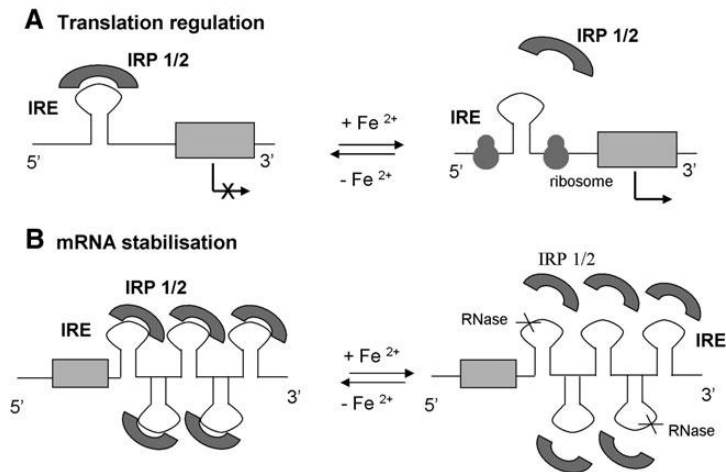


Abbildung 6: Eisenabhängige Regulation der IRP-Bindungsaktivität [RECALCATI et al., 2010]

Aus Studien mit Mäusen kann geschlossen werden, dass die zwei IRPs einander jeweils kompensieren können, da Mäuse, denen entweder IRP1 oder IRP2 fehlt, lebensfähig im Gegensatz zu solchen sind, denen beide IRPs fehlen. Unterstützt wird dieser Ansatz dadurch, dass es bei Mäusen, bei welchen IRP2 ausgeschaltet wurde, zu einem kompensatorischen Zuwachs von IRP1 und *vice versa* gekommen ist. [WANG et al., 2007]

2.2. Das IRP/IRE Regulationssystem

IRP1 und IRP2 sind zytoplasmatische Proteine, die der Überfamilie der Aconitasen angehören, welche den intrazellulären Eisenmetabolismus über Bindung an IREs in den ‚untranslated terminal regions‘ (UTRs) der mRNA mit hoher Affinität und Spezifität regulieren.

Die Regulation des Eisenmetabolismus in Pflanzen erfolgt über eisenabhängige Transkription; in Säugetieren dienen dafür IRPs, welche in zwei verschiedenen Formen vorkommen. Beide Formen der IRPs werden in allen Geweben exprimiert, wobei IRP1 besonders in der Niere und im braunen Fettgewebe exprimiert wird und IRP2 eine höhere Expression im Intestinum, Gehirn und den Zellen des retikuloendothelialen Systems aufweist. [CAIRO und PIETRANGELO, 2000]

Neben der dominierenden zytosolischen Lokalisation der IRPs wurden geringe Fraktionen von IRP1 (nicht jedoch von IRP2) identifiziert, die mit dem Golgi Apparat und dem endoplasmatischen Retikulum auf eine von Phosphorylierung [PATTON et al., 2005] und von Hypoxie [CHRISTOVA und TEMPLETON, 2007] abhängige Weise assoziiert sind, jedoch ist die Rolle des membrangebundenen IRP1 bisher noch ungeklärt.

Das regulatorische Ergebnis hängt von der Position und dem Kontext ab, in dem das IRE auf der mRNA liegt: wenn ein IRP an ein IRE auf der 5'-UTR bindet, führt dies zu einer unterdrückten Translation, wohingegen ein IRP, dass an ein IRE am 3'-Ende gebunden ist, zu einer indirekten Aktivierung der Translation durch Unterdrückung des Abbaus der mRNA führen kann. [WALLANDER et al., 2006]

Ist Eisen knapp, binden aktive IRPs an IREs und modulieren so die Expression von Proteinen, die am Eisenmetabolismus beteiligt sind. Durch die Bindung wird die mRNA, die IREs im 3'-UTR hat (wie TfR1 und DMT1), stabilisiert und die Translation der mRNAs erhöht. [GOFORTH et al., 2010]

2. Literaturüberblick

Bei hohen Eisenkonzentrationen ändert sich der Bestand der IRPs, IRP2 wird abgebaut und IRP1 bildet einen [4Fe-4S]-Cluster, um zu einer funktionierenden, zytosolischen Aconitase (C-Aconitase) zu werden. [WALLANDER et al., 2006]

Es kommt zu einer verminderten Bindungsaktivität der IRE, was in einer geringeren Stabilität der mRNA und einer reduzierten Translationsrate resultiert. [GOFORTH et al., 2010]

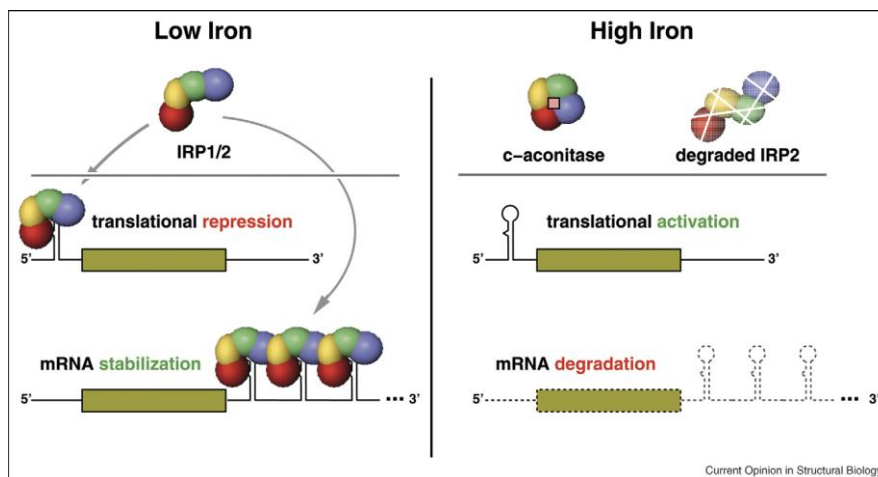


Abbildung 7: IRPs in Zuständen hoher und niedriger Eisenkonzentrationen [VOLZ, 2008]

2.2.1. Struktur und Regulation der IRPs

IRPs sind Mitglieder der Aconitasen, einer Familie bestehend aus fünf Formen Fe-S-Cluster-abhängiger Isomerasen, die die Isomerisierung von β -Hydroxysäuremetaboliten katalysieren. [ARTYMIUK und GREEN, 2006] Richtige Aconitasen sind dafür zuständig, die Isomerisation von Zitrat in Isozitrat zu vollziehen, wohingegen zwei kleinere Zweige der Aconitasefamilie für die Isomerisierung der strukturell verwandten Substanzen Isopropylmalat und Homozitrat zuständig sind.

Alle Mitglieder der Aconitasefamilie haben eine Organisation aus vier Domänen mit einigen Variationen der Anordnung der Domänen. Die ersten drei Domänen der typischen mitochondrialen Aconitasen liegen sehr eng beieinander, um den Fe-S-Cluster zu beherbergen, die vierte Domäne ist über eine Verknüpfung von einer Sequenz aus etwa 60 Aminosäuren mit den anderen Domänen verbunden.

In einer Untergruppe der Isopropylmalat-Isomerasen ist die vierte Domäne separiert, in der Gruppe der B-Aconitasen ist sie direkt zusammenhängend in der Anordnung 4-1-2-3. Diese Varianten lassen eine strukturelle, funktionelle und evolutionäre Labilität der vierten Domäne vermuten. [DUPUY et al., 2006]

2.2.1.1. IRP1

IRP1 ist eine funktionelle Aconitase, die Zitrat zu Isozitrat über cis-Aconitat als Zwischenprodukt im Zytosol reversibel umwandelt. Die Aminosäuresequenz von IRP1 ist zu 30% mit der mitochondrialen Aconitase ident, welche in der mitochondrialen Matrix dieselbe Reaktion katalysiert. [BEINERT und KENNEDY, 1993] Studien zur Kristallstruktur von IRP1 haben gezeigt, dass die mitochondriale und die zytosolische Aconitase einander sehr ähnlich sind. [DUPUY et al., 2006] In gesunden Geweben mit ausreichendem Eisengehalt ist der Großteil des IRP1 in Form der C-Aconitase zu finden. [BASILION et al., 1994]

Die aktiven Formen beider Isoformen beinhalten einen [4Fe-4S]-Cluster, bei dem drei Eisenatome von Cysteinen gebunden sind und das verbleibende vierte labile Eisen für Isomerisierungsreaktionen verfügbar ist. In Zellen, die mit Eisen übersättigt sind, ist der Cluster vollständig gebildet und IRP1 zeigt Aconitase-Aktivität; Zellen mit Eisenmangel können den Cluster nicht bilden und apo-IRP1 fungiert als RNA-Bindungsprotein. Die Bindung von IREs wird auch von dem Ausmaß der Oxidation bzw. Reduktion der Cysteinreste kontrolliert, die an der Clusteranordnung beteiligt sind. [HIRLING et al., 1994]

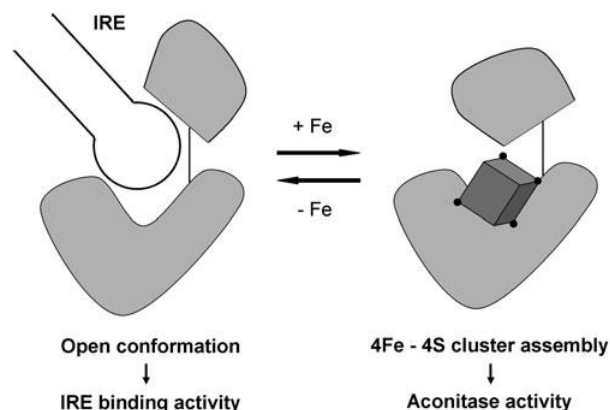


Abbildung 8: Die Struktur von IRP1 [RECALCATI et al., 2010]

2. Literaturüberblick

Obwohl die Einführung eines [4Fe-4S]-Clusters durch die Eisenverfügbarkeit begünstigt wird, ist nicht klar, über welchen Mechanismus eine hohe Eisenkonzentration zu einer Dissoziation des IRE-RNA/IRP-Komplexes führt. Eine Möglichkeit wäre, dass Eisen direkt die Bindung zwischen IRP1 und IRE schwächt. [KHAN et al., 2009]

IRP1 existiert vorherrschend in der Aconitase-Form [KENNEDY et al., 1992] und die Bildung von IRP1 oder Aconitase hängt von dem Mangel oder der Verfügbarkeit von Eisen ab. Als Antwort auf erhöhte Eisengehalte ist die clusterfreie Form wahrscheinlich für den Abbau anfälliger als die Form, die den Cluster enthält, wobei der Verlust aller vier Eisenatome, die die zytoplasmatische Aconitase zur RNA-Bindung konvertiert, wahrscheinlich nur in Abhängigkeit eines oxidativen Angriffs oder durch einen Angriff von Nitrat auf den Cluster auftritt.

Die RNA-Bindung und die Aconitase-Aktivität von IRP1 werden durch eine Protein-Kinase-C abhängige Phosphorylierung kontrolliert, dies beeinflusst den Mechanismus der Regulation von IRP1 in Abhängigkeit von Eisen. Die Phosphorylierung kann hier als indirektes Hilfsmittel zur Destabilisierung des Clusters angesehen werden, da phosphoryliertes IRP1 gegenüber einer verminderten Eisenverfügbarkeit empfindlicher ist. Dieser Mechanismus ermöglicht die Entfernung des Clusters in Abwesenheit starker Störfaktoren wie reaktiver Sauerstoff- oder Stickstoffspezies. [DE DOMENICO et al., 2005]

Es wird angenommen, dass bei der Bildung der [4Fe-4S]-Cluster nicht nur die Eisenverfügbarkeit von Bedeutung ist, denn sowohl mitochondriale, als auch zytosolische Komponenten spielen eine Rolle. Ihre Beeinträchtigung induziert die IRP1-Bindungsaktivität und könnte eine Veränderung der Eisenhomöostase hervorrufen. [CROOKS et al., 2010]

Die Biogenese zytosolischer und nukleärer Fe-S-Proteine benötigt den mitochondrialen Aufbau von Fe-S-Clustern (ISC), einen Exportmechanismus sowie die Maschinerie des zytosolischen Fe-S-Cluster-Aufbaus (CIA). Der Atm1 ABC-Transporter an der inneren Mitochondrienmembran exportiert für den Aufbau von Fe-S-Clustern eine unbekannte Komponente (X) ins Zytosol. Dort wird durch zytosolische Komponenten der CIA über

2. Literaturüberblick

die temporäre Bildung von labilen Fe-S-Clustern an ein Gerüstprotein die Bildung des Fe-S-Proteins katalysiert, bevor dieses zu Apoproteinen transportiert wird. [RECALCATI et al., 2010]

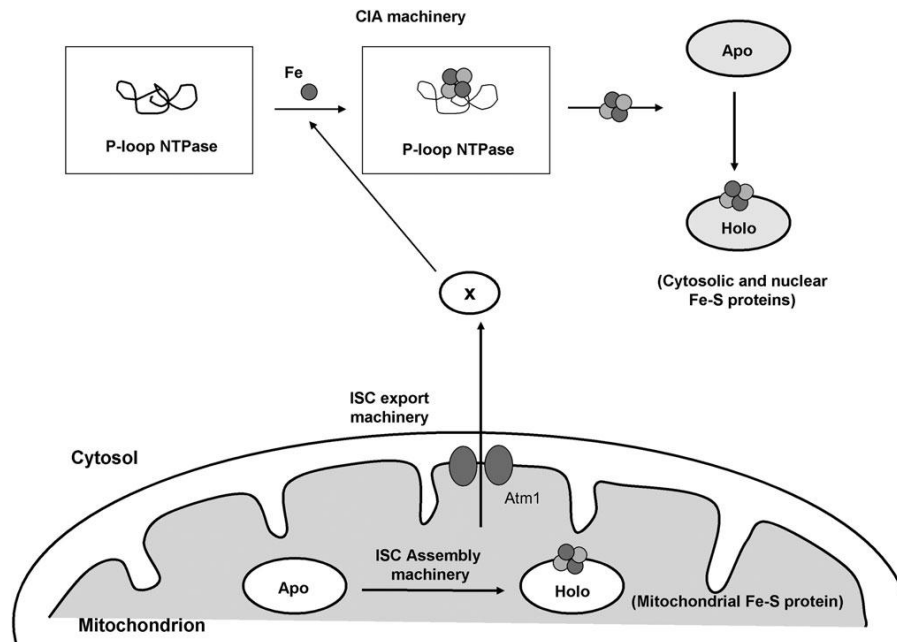


Abbildung 9: Rolle der Mitochondrien im zytosolischen Fe-S-Clusteraufbau in der Bildung von Fe-S-Clustern [RECALCATI et al., 2010]

2.2.1.2. IRP2

Die Sequenzübereinstimmung von IRP2 mit IRP1 beträgt etwa 60%, daher wird davon ausgegangen, dass beide Proteine die gleiche Faltung aufweisen. [GUO et al., 1994] Trotz der starken Ähnlichkeit von IRP2 zu IRP1 ist es nicht imstande, [4Fe-4S]-Cluster aufzubauen und hat somit keine Aconitaseaktivität. [WALLANDER et al., 2006] Eine Teilerklärung dafür ist, dass bei IRP2 - obwohl es Äquivalente zu den drei eisengebundenen Cysteinen enthält - eine Reihe an substituierten Aminosäuren im aktiven Zentrum den Clusteraufbau behindern könnte. [DUPUY et al., 2006]

IRP2 unterscheidet sich von IRP1 außerdem in den Bindungsaffinitäten zur IRE-Familie, im Allgemeinen zeigt sie eine schwächere Bindung zu den nicht-Ferritin Typen. [KE et al., 1998]

2. Literaturüberblick

Die zellulären Gehalte an IRP2 schwanken im Gegensatz zu dem von IRP1, da sich das Protein in Zellen mit Eisenmangel akkumuliert und rasch in Zellen abgebaut wird, in denen ein Überschuss an Eisen herrscht. [WALLANDER et al., 2006]

Erhöhter Eisengehalt, Phosphorylierung und Zustände, welche die Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies fördern, unterstützen den Abbau von IRP2, wohingegen durch eine Hypoxie-induzierte IRP2-Stabilisierung und STAT5-abhängige IRP2-Genexpression die Expression von IRP2 erhöht wird. (A)

Im Abbau des IRP2 scheint der lysosomale Stoffwechselweg im normalen Turnover involviert zu sein; der FBXL5-medierte Mechanismus steuert IRP2 zum proteasomalen Abbau in Abhängigkeit von den Stimuli, die in (A) gezeigt sind. (B) [RECALCATI et al., 2010]

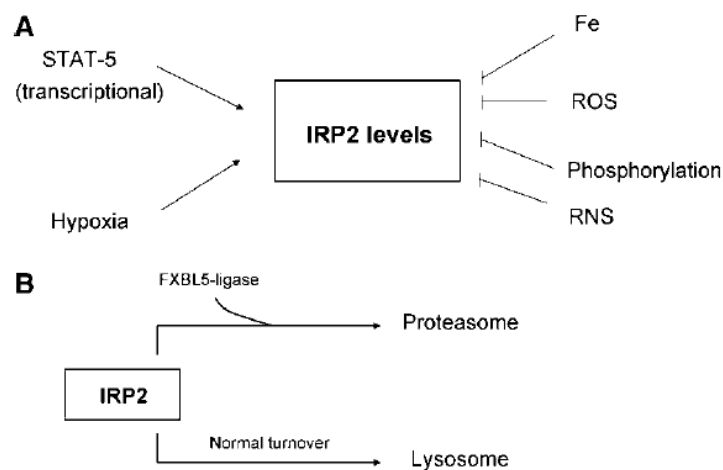


Abbildung 10: Regulation von IRP2 [RECALCATI et al., 2010]

Der Mechanismus, bei welchem IRP2 einem eisenabhängigen Abbau unterliegt, ist bisher noch nicht vollständig verstanden. Im Vergleich zu IRP1 enthält IRP2 ein zusätzliches Exon, welches für eine cysteinreiche Domäne codiert, von der angenommen wird, dass sie für den eisenabhängigen Abbau zuständig ist, dies aufgrund ihrer Fähigkeit, die eisenabhängige Oxidation, Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau zu erleichtern. [GUO et al., 1995]

Eisen könnte indirekt über die Begünstigung von oxidativem Stress wirken, jedoch könnte der Proteinabbau, der durch den eisenabhängigen oxidativen Schaden entsteht, nicht der einzige Mechanismus sein, der dem Effekt des oxidativen Stresses

2. Literaturüberblick

auf die IRP2-Bindungsaktivität unterliegt. Es wurde gezeigt, dass zwei Cysteine, die im RNA-Bindungsspalt von IRP2 liegen, unverändert bleiben bzw. reduziert werden müssen, um mit IREs zu interagieren. Somit scheint ihr Redoxstatus bei Vorliegen von oxidativem Stress ein Schlüsselfaktor in der Bindungsaktivität von IRP2 und der Eisenhomöostase zu sein. [ZUMBRENNEN et al., 2009]

Weiters könnten andere Faktoren, wie etwa der Phosphorylierungsstatus, involviert sein, da die eisenunabhängige, reversible Phosphorylierung von IRP2 Serin-157, die während einer bestimmten Phase des Zellzyklus vorkommt, zum Abbau von IRP2 führt und so die zelluläre Eisenhomöostase reguliert. [WALLANDER et al., 2008]

Der ubiquitinierungsabhängige Abbau von IRP2 in den Proteasomen scheint die vorherrschende Form zu sein, jedoch wurden die involvierten Ligasen der Ubiquitinierung noch nicht identifiziert.

Das Protein FBXL5 (F-box and leucine-rich repeat protein 5) ist an einem anderen Ubiquitin-Ligase-Komplex beteiligt, welcher die eisenabhängige Polyubiquitinierung und den Abbau von IRP2 fördert. [VASHISHT et al., 2009]

Die Eisenabhängige Abbaudomäne ist für eine Interaktion nicht von Nöten, dies wird von der Tatsache unterstrichen, dass apo-IRP1 ebenfalls von FBXL5 gebunden wird, obwohl die IRP1-Bindungsaktivität nicht von einer Genstilllegung von FBXL5 betroffen ist. Nachdem die Stabilität von FBXL5 selbst auch vom Eisen- und/oder Sauerstoffgehalt durch die Eisenbindung an eine Hämyerthrin-ähnliche Domäne im N-Terminus kontrolliert wird, akkumuliert FBXL5 bei Eisenüberschuss und wird unter Eisenmangel abgebaut. Somit hat FBXL5 eine Schlüsselfunktion in der Aufrechterhaltung der Eisenhomöostase.

Der lysosomale Abbau scheint vor allem unter physiologisch normalen Umständen eine Rolle zu spielen, wohingegen der proteasomale Abbauweg eher bei Eisenüberschuss zu Tragen zu kommen scheint. [DYCKE et al., 2008]

2.3. IRE

IREs sind hoch konservierte Bindungsstellen für IRPs, die eine etwa 30 Nukleotide umfassende Haarnadelstruktur aufweisen und in der 5'-oder 3'-UTR der mRNA-Transkripte von Genen gefunden werden, die an der Regulation des Eisenmetabolismus beteiligt sind. Bisher wurden etwa 150 IRE-Homologe identifiziert, die zu den elf Typen der IREs gehören, von denen bekannt ist, dass sie durch IRPs reguliert werden. Es scheint, dass fünf Nukleotidreste in der exanukleotid Schleife und Basenpaare in der Stammstruktur für eine volle Funktionsfähigkeit der IRE von Nöten sind. [PICCINELLI und SAMUELSSON, 2007]

Die IREs regulieren die Translation von Schlüsselproteinen, die in der Aufnahme, der Utilisation und der Speicherung von Eisen beteiligt sind. [LEIPUVIENE und THEIL, 2007]
Die Kontrolle des IRP/IRE-Netzwerks basiert auf der Selektivität der IRP1/IRE-Erkennung, welche von den Sequenz- und Strukturunterschieden innerhalb der IRE-Familie determiniert sind. Die klassische Struktur der IREs beinhaltet eine apikale Schleife von sechs Nukleotidresten mit einer halbelastischen oberen Helix aus fünf Basenpaaren, einem interhelikalen Verbindungsteil und einer variablen unteren Helix. [HENDERSON et al., 1994]

Unterschiedliche Experimente zeigten, dass verschiedene IRPs dieselbe post-transkriptionelle Regulation für einige Transkripte erfahren und dass die zwei Formen der IRPs übereinstimmende IREs mit derselben Affinität in vitro binden. [CAIRO und PIETRANGELO, 2000], [HENTZE und KÜHN, 1996]

Es wird angenommen, dass im Falle mancher mRNAs die Regulation wirkungsvoller ist. Die Translation der Ferritin-mRNA reagiert zum Beispiel sensibler auf die IRP-vermittelte Regulation als auf die der mitochondrialen Aconitase in HL-60 Zellen [SCHALINSKE et al. 1998] und im Intestinum. [GALY et al., 2008]

Jedes IRP erkennt eine exklusive Teilgruppe der IRE, kleine Unterschiede der IREs der mRNA von H- und L-Ferritin sind verantwortlich für die bevorzugte Antwort der L-

Untereinheit auf Eisen. Dieser Unterschied ist unter Hypoxie stärker ausgeprägt. [SAMMARCO et al., 2008]

2.4. Die Rolle des IRE/IRP-Regulationsnetzwerks bei der Eisenaufnahme

Alle Zellen beziehen Eisen, um ihre physiologisch normalen Funktionen aufrecht erhalten zu können. Der primäre Eisenaufnahmestoffwechselweg wird über den TfR1 vermittelt, welcher eisenbeladenes Transferrin aufnimmt. Die Expression des TfR1 wird über eine Reihe von Zellzuständen, unter anderem dem Eisen- und Sauerstoffstatus [CAIRO und PIETRANGELO], kontrolliert und auf transkriptioneller Ebene vom ‚Hypoxie-induzierenden Faktor‘ HIF1 in Abhängigkeit eines niedrigen Sauerstoffgehalts und eines Eisenmangels [BIANCHI et al., 1999] oder von inflammatorischen Mediatoren reguliert. [TACCHINI et al., 2008]

Der TfR1 ist ebenso ein direktes Ziel von STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) in den Erythrozyten [KERENYI et al., 2008], seine Promotorregion enthält mögliche Bindungsstellen für viele Transkriptionsfaktoren wie c-myc. [O'DONNELL et al., 2006]

Die Expression von TfR1 wird überwiegend post-transkriptionell über die Interaktion zwischen IRPs und fünf IREs kontrolliert, die die Expression über die zelluläre Eisenkonzentration regulieren. Diese IREs sind in der 3'-UTR lokalisiert, durch die Bindung von IRP wird die mRNA stabilisiert und so die Expression von TfR1 unter Eisenmangel erhöht.

DMT1 ist ein Glykoprotein, das aus zwölf Transmembrandomänen besteht, welche die Charakteristika eines Eisentransportkanals aufweisen. Die Expression erfolgt an der apikalen Membran der duodenalen Enterozyten. [MACKENZIE und GARRICK, 2005] DMT1 wird für die intestinale Eisenabsorption herangezogen und ist im Transport von Eisen aus endozytierten Vesikeln ins Zytoplasma zuständig, nachdem die Aufnahme von Fe-Tf über den TfR1 erfolgt ist. Das Gen des DMT1 codiert für vier Transkripte, die das Ergebnis alternativen Splicings am 3'-oder 5'-Ende sind. Eine der durch Splicing entstandenen Formen, die auf seiner 3'-UTR eine IRE-Struktur enthält, wird durch

Eisenmangel hochreguliert. [MACKENZIE und GARRICK, 2005], [WALLANDER et al., 2006] Die Regulation von DMT1 ist ein komplexer Mechanismus und es ist noch nicht gesichert, dass sie von IREs vermittelt wird. Die Entfernung beider IRPs in intestinalen Epithelzellen senkt den Gehalt an IRE-enthaltender DMT1-mRNA und die DMT1-abhängige intestinale Eisenaufnahme [GALY et al., 2008].

2.5. Die Rolle des IRE/IRP-Regulationsnetzwerks in der Eisenspeicherung

Ferritin, das Hauptprotein für die Speicherung von Eisen, kommt im Zytoplasma sowie in den Mitochondrien und dem Zellkern vor. [AROSIO et al., 2009] In Vertebraten wird zytoplasmatisches Ferritin in nahezu allen Geweben exprimiert, das Molekül besteht aus schweren („heavy“ H) und leichten („light“ L) Kettenuntereinheiten. Die Hülle des 24-mer Ferritins hat variable Verhältnisse von H- und L-Ketten, was zu Ferritinisoformen führt, die entweder saurer (reich an H-Ketten) oder basischer (reich an L-Ketten) sind. [ARIOSO et al., 1978] Gewebe wie Leber und Milz sind überwiegend reich an L-Ketten, wohingegen Herz und Nieren vorwiegend reich an H-Ketten sind. [HASINOFF und HERMAN, 2007] Ferritin ist ebenso im Plasma und anderen Körperflüssigkeiten enthalten, obgleich der Sekretionsmechanismus noch unbekannt ist. In Fällen eines Eisenüberschusses oder von Entzündungen ist der Ferritingehalt im Plasma erhöht, die Funktion ist jedoch nicht klar, eine Möglichkeit wäre, dass Ferritin eine Funktion in der Regulation der Bildung von Blutgefäßen [COFFMAN et al., 2009] und der Immunität/Autoimmunität zukommt. [RECALCATI et al., 2008]

Das bestcharakterisierte System, welches die Expression von Ferritin reguliert, ist der post-transkriptionelle, eisenabhängige Mechanismus, der auf der Interaktion zwischen IRPs und IREs, die auf der 5'-UTR der mRNA von H- und L-Ferritin liegen, basiert. Die Syntheserate und die Menge an Ferritin können bis zum 50-fachen der üblichen Konzentration in Abhängigkeit von Veränderungen der Eisenverfügbarkeit schwanken und somit sind die Transkripte von H- und L-Ferritinketten die Prototypen der IRP-vermittelten Translationskontrolle. [ZHRINGER et al., 1976]

IRP1 und IRP2 binden an der Haarnadelstruktur der IRE von Ferritin und verhindern so die Translation der mRNA, wodurch das System zeitgleich die H- und L-Ketten reguliert, deren IRE-Sequenzen weitgehend ident sind. [LIU et al., 2004] So geschieht es bei Normoxie, unter Hypoxie jedoch spricht die L-Untereinheit auf Eisen stärker an. [SANCHEZ et al., 2006] Mitochondrialem Ferritin, das aus einem retrotranskribierten Pseudogen stammt und die nicht übersetzten IRE in translatierte Domänen wandelt, die für mitochondriale Zielproteine codieren, fehlt es an IRE, und es reagiert demnach nicht auf Eisen. [LEVI und AROSIO, 2004]

2.6. Die Rolle des IRE/IRP-Regulationsnetzwerks im Eisentransport

Der einzig bekannte Eisenexporter ist das Transmembranprotein Ferroportin (FPN). [DONOVAN et al., 2005] FPN wird ubiquitär exprimiert, kommt jedoch vermehrt an der basolateralen Membran polarisierter Enterozyten des Duodenums [WESSLING-RESNICK, 2006] und an retikuloendothelialen Zellen vor. [WEISS, 2009]

FPN wird post-transkriptionell über Hepcidin reguliert [DE DOMENICO, et al., 2005], der Mechanismus ist in Kapitel 2.1.1.3. beschrieben.

Daten zeigen, dass die gleichzeitige Entfernung von IRP1 und IRP2 in Mäusen die intestinale Expression von FPN deutlich erhöht, trotzdem die Erhöhung der hepatischen Hepcidinexpression darauf schließen lässt, dass IRPs ebenso kritisch für die physiologische Hepcidinexpression im Intestinum sind wie Hepcidin. [GALY et al., 2008]

Eine weitere Indikation für die Wichtigkeit der IRP/IRE-Interaktion in der Expression von FPN ist, dass eine Mikrodeletion in der Promotorregion des FPN1-Gens, welches das IRE entfernt, zu erhöhten Gehalten an FPN in Mäusen mit Polyzythämie führt. [MOK et al., 2005] Darüber hinaus wurde eine Punktmutation nahe dem IRE von FPN in Patienten mit Hämochromatose gefunden. [LIU et al., 2005]

2.7. Transferrin und nicht-Transferrin gebundenes Eisen (non-transferrin bound iron, NTBI)

2.7.1. Transferrin

Unter physiologisch normalen Umständen ist plasmatisches Eisen größtenteils an Transferrin gebunden und kann von diesem über rezeptorvermittelte Prozesse an Zellen abgegeben werden. Für gewöhnlich ist Transferrin nur zu etwa einem Drittel gesättigt [CRICHTON et al., 2008], in Zuständen, in denen Gewebe jedoch mit Eisen überladen sind, kann Transferrin auch fast bis ganz vollständig gesättigt sein und zusätzliches, nicht-Transferrin gebundenes Eisen (NTBI) im Plasma vorliegen. [CRICHTON, 2001]

Die Eisenbindungskapazität des Transferrins, welcher der Ligand mit der höchsten Affinität zur Eisenbindung ist und dafür zwei Eisenbindungsstellen aufweist, beträgt normalerweise etwa 45-80 μM . In gesunden Individuen reicht diese Eisenbindungskapazität des Transferrins aus, um Eisen, welches selbst in hohen Bolusgaben in den Stoffwechsel eintritt, effizient zu binden. Durch die Bindung an Transferrin wird das Eisen effektiv von Reaktionen abgeschirmt, bei denen es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies kommt. [MCKIE et al., 2000]

Normalerweise liegt der plasmatische Eisengehalt weit unter der Bindungskapazität des Transferrins und es wird angenommen, dass die Freisetzung von Eisen ins Plasma sehr eng reguliert ist. Daher wird angenommen, dass das Vorhandensein von NTBI im Plasma aus einem Ungleichgewicht im Eisenmetabolismus resultiert. [GROOTVELD et al., 1989]

Die Hauptquellen für plasmatisches Eisen sind die Absorption über den Gastrointestinaltrakt und das Recycling von gealterten Erythrozyten und Makrophagen. [MCKIE et al., 2000]

2.7.2. Nicht-Transferrin gebundenes Eisen (NTBI)

2.7.2.1. Chemische Natur und Quellen von NTBI

Trotz der wichtigen Rolle des Eisens in pathophysiologischen Zuständen wie Eisenüberladung ist wenig über den chemischen Aufbau von NTBI bekannt, das in schneller und weniger schnell chelatierbaren Formen im Plasma zu bestehen scheinen. [BREUER et al., 2000]

Über die chemische Natur des NTBI wird spekuliert, dass es aus einem heterogenen Mix von Komplexen besteht, dessen Zusammensetzung mit dem Grad und dem Typus der Eisenüberladung variieren. Die Löslichkeit des Eisenions Fe^{3+} in physiologischen Salzlösungen ist extrem gering; sofern also nicht Liganden vorhanden sind, die in der Lage sind, multiple Bindungsstellen für eine stabile Bindung zu bilden, werden unlösliche, polynukleäre Aggregate mit Chloriden und Oxiden gebildet. [GROOTVELD et al., 1989]

Eine Reihe an solch potentiellen Liganden, die Eisen binden können, sind im Plasma verfügbar, unter anderem Zitrat und Acetat in Konzentrationen zwischen 60 und 140 μM bzw. 20 und 40 μM [LENTNER, 1984], des weiteren Phosphat, Ascorbat und ATP; das Fe^{3+} in diesen Komplexen ist redox-aktiv. [BRADBURY, 1997]

Analysen von NTBI in Seren von Patienten mit Hämochromatose zeigten die Anwesenheit von Zitrat-Eisen- und von Zitrat-Acetateisen-Komplexen. [GROOTVELD et al., 1989] Die langsame Austauschrate von Eisen zwischen Eisenzitratkomplexen und Desferrioxamin spricht gegen die Vermutung, dass die vorherrschende Spezies des NTBI monomeres Eisenzitrat darstellen soll. [FALLER und NICK, 1994]

Die chemische Natur von Eisenzitrat ist weder einfach, noch ist sie bis jetzt klar definiert. [PIERRE und GAUTIER-LUNEAU, 2000] Wassermoleküle würden in wässrigen Lösungen mit Zitrat als Liganden für Fe^{3+} konkurrieren und in der Ausfällung von unlöslichen Fe^{3+} -Hydroxid-Spezies resultieren. Speziesbestimmungsmethoden, die die Speziesverteilung bei einem pH-Wert von 7,4 erheben, deuten darauf hin, dass Zitrat nur dann effektiv mit Wasser in Konkurrenz treten kann, wenn es in molaren

2. Literaturüberblick

Verhältnissen von Eisen zu Zitrat von $\geq 1:100$ vorliegt, wobei Fe^{3+} -Zitrat 100% der Spezies repräsentiert. Bei Verhältnissen von 1:1 und 1:10 repräsentiert die Eisenzitratspezies nur 0 bzw. 10% der vorhandenen Spezies, wenn die vorherrschende Spezies entsprechend Fe^{3+} -Hydroxid-Komplexe sind. [GAUTIER-LUNEAU et al., 2005]

Evidenz für die heterogene Natur des NTBI wird durch die unterschiedliche Zugänglichkeit für Chelatoren geliefert. Hochauflösende NMR-Analysen haben gezeigt, dass die Chelatierung von NTBI mit den Chelator Desferrioxamin einen sehr langsamen Prozess darstellt. [GROOTVELD et al., 1989]

Bei Verwendung eines fluoreszierenden Analoges zu Desferrioxamin, um die Eisengehalte in Seren von Patienten mit Eisenüberladung zu testen, wurde bei Patienten mit Hämochromatose, die einen Transferrinsättigungsgehalt von 80-85% aufwiesen, kein detektierbares, von Desferrioxamin chelatiertes Eisen gefunden. Dennoch war NTBI in den Patientenseren vorhanden und konnte nach Mobilisierung mit Oxalat detektiert werden. [BREUER et al., 2000]

Im Gegensatz dazu konnten in Seren von Thalassämiepatienten mit einer Transferrinsättigung von über 90% sowohl das durch Desferrioxamin chelatierte, als auch das durch Oxalat mobilisierte Eisen detektiert werden. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass zumindest zwei Formen von NTBI existieren, eine, die mit Desferrioxamin chelatiert werden kann und eine, bei der dies nicht möglich ist. Patienten mit Hämochromatose neigen dazu, in ihrem Plasma nur die von Desferrioxamin alternativ chelatierbare Form von NTBI zu haben, wohingegen Patienten der β -Thalassämie beide Formen aufweisen. Vermutlich unterscheiden sich diese Formen in ihren Ligandentypen und dem Ausmaß der Aggregation.

Die Existenz von für Chelatoren unzugänglichen Formen von NTBI könnte eine Erklärung dafür darstellen, dass NTBI auch in Seren vorhanden ist, bei denen die Transferrinsättigung unter 100% liegt.

Offenbar muss das Eisen in diesen Fällen in die Zirkulation in einer für Transferrin nicht verfügbaren Form eintreten, sofern nicht mit einem mobilisierenden Agens supplementiert wurde. [BREUER et al., 2000]

2. Literaturüberblick

Diese Erklärung könnte für Eisen aus exogenen Quellen zutreffen, wie etwa solchem aus intravenösen Supplementen, die als kolloidale Polysaccharidkomplexe verabreicht werden und unzureichend von Transferrin gebunden werden. Dieses wird offenbar von Makrophagen und der Leber verarbeitet und in den Stoffwechsel als für Transferrin zugängliche Form abgeliefert. [SCHEIBER und GOLDENBERG, 1998]

Plasma-Ferritin könnte eine andere mögliche Quelle des NTBI darstellen. Obwohl plasmatisches Ferritin dazu neigt, wenig Eisen zu enthalten, können die Konzentrationen von Ferritin-gebundenem Eisen im Plasma bis zu 9 μM in Fällen von massiver Eisenüberladung mit hohen Plasma-Ferritingehalten erreichen. In Anbetracht der Tatsache, dass die Konzentrationen an NTBI generell zwischen 1-10 μM schwanken, wird vermutet, dass Plasma-Ferritin zu NTBI beitragen könnte. [POOTRAKUL et al., 1988]

Die direkte Eisenmobilisierung aus Ferritin mittels verschiedener Chelatoren und Mobilisierungsagenzien ist langsam und ineffektiv, sofern nicht reduzierende Agenzien zugefügt werden. [FUNK et al., 1985]

Daher ist die Wahrscheinlichkeit, dass Plasma-Ferritin zu den meisten Typen des NTBI beiträgt, gering, in den Fällen, in denen es auftritt, befindet es sich wahrscheinlich unter der Detektionsgrenze. [GOSRIWATANA et al., 1999]

Einen anderen Kandidatenliganden für NTBI stellt Albumin dar, es wurde gezeigt, dass es mit Fe(III) und Fe(III)-Zitrat Komplexe *in vitro* bildet. [LOVSTAD, 1993]

Obwohl die Affinität von Albumin für dreiwertige Metalle eher gering ist, könnte dieser Umstand durch die hohe Konzentration von Albumin im Serum (etwa 0,5 mM) kompensiert werden. [BREUER et al., 2000]

2.7.2.2. Zellulärer Transport von NTBI

Über den Mechanismus der Aufnahme von nicht-Transferrin gebundenem Eisen ist sehr wenig bekannt, NTBI gelangt über vom Transferrin-Rezeptor unabhängige Stoffwechselwege in Zellen. [SHVARTSMAN et al., 2007]

2. Literaturüberblick

Der TfR2 könnte jedoch in die Aufnahme von NTBI involviert sein. Zellen, die TfR2 überexprimieren, internalisieren mehr NTBI und mit höheren Aufnahmeraten im Vergleich zu Kontrollzellen, was auf die Beteiligung von TfR2 hinweisen könnte. [GRAHAM et al., 2008] Das Ausmaß und der genaue Mechanismus der Aufnahme von NTBI mittels TfR2 sind jedoch nicht geklärt, möglich ist, dass die Anwesenheit des TfR2 die Expression von NTBI-Transportern induziert und in einer höheren Aufnahme von NTBI resultiert. Der TfR2 könnte jedoch auch eine direktere Rolle in der Aufnahme von NTBI spielen: es wurde gezeigt, dass Fe^{3+} -Zitrat an einer spezifischen Bindungsstelle an Hepatozyten bindet. Somit könnte der NTBI-Komplex an TfR2 binden, wodurch Eisen an einen Transporter, wie etwa DMT1, abgegeben wird. [GRAHAM et al., 1998], [SCHEIBER-MOJDEHKAR et al., 1999], [TRINDER und MORGAN, 1998]

In Folge der Eisenaufnahme könnte es zu exzessiver zellulärer Akkumulation der labilen Eisenspezies kommen und in oxidativer Schädigung bis hin zu Organausfällen resultieren. Ein Großteil des Eisens gelangt in die Mitochondrien, in welchen auch die Produktion von Prooxidantien stattfindet, wobei der Eisentransport in die Mitochondrien erst wenig verstanden ist. [SHVARTSMAN et al., 2007]

Die anormale Verteilung des Eisens in Geweben bei fortgeschrittener Eisenüberladung repräsentiert möglicherweise ein Muster der rezeptorvermittelten Aufnahme von NTBI in unterschiedlichen Geweben wie Herz, endokrine Drüsen, Hypophysenvorderlappen und Leber. [OUDIT et al., 2003]

Es wird angenommen, dass eine Akkumulation des Eisens in diesen Organen für deren Dysfunktion in Thalassämiepatienten, welche zu viele Transfusionen erhalten haben, verantwortlich ist. Daher wird angestrebt, mittels Chelatoren eine negative Eisenbalance in diesen Patienten zu erreichen, um so plasmatisches NTBI zu entfernen. NTBI kann die Fenton-Reaktion ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}\cdot + \text{OH}^-$) katalysieren und dadurch schädliche Hydroxylradikale und ähnliche Spezies in Geweben und Körperflüssigkeiten produzieren. [ARUOMA et al., 1988], [PARKASH, 2007]

2.7.2.3. Das Auftreten von NTBI

NTBI ist generell eine pathologische Manifestation und wird in gesunden Individuen nicht gefunden. Im Prinzip kann durch jeden Zustand oder jede Behandlung, in der entweder über kürzere oder längere Zeit ein Überschuss an Eisen besteht, NTBI auftreten. Dieses kann fortschreitend über lange Zeiträume als Ergebnis von wiederholten Transfusionen (hämolytische Anämie) oder Hyperabsorption aus der Nahrung (Hämochromatose) akkumulieren. Das Auftreten von NTBI kann jedoch auch ein kurzzeitiges sein und NTBI kann binnen weniger Stunden oder Tage wieder verschwinden. Beispiele sind intravenöse Eisensupplemente, arzneimittelinduziertes Ungleichgewicht im Erythrozyten-Turnover - wenn beispielsweise die Rate des Erythrozytenabbaus die der Eisenwiederverwertung für die Erythropoese übersteigt (Chemotherapie), massive Hämolyse, wie sie während kardiopulmonalen Bypass-Operationen auftreten kann und ein beschleunigter Erythrozyten-Turnover, wie es bei Frühgeborenen beobachtet wird. In den meisten dokumentierten Fällen geht das Auftreten von NTBI einer Steigerung der Transferrinsättigung voraus oder tritt mit dieser gleichzeitig auf, hinweisend auf die Abgabe von großen Mengen an Eisen an den Stoffwechsel. [BREUER et al., 2000]

Desweiteren wurden erhöhte Gehalte an NTBI in Dialysepatienten - im Vergleich zu Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen ohne Dialyse und gesunden Kontrollen - beobachtet, die jedoch keine Eisensupplementierung erhalten haben. [PARKASH, 2007]

Das einfachste Szenario für das Auftreten von NTBI ist das einer Atransferrinämie, bei welcher das gesamte Eisen, welches in den Stoffwechsel eintritt, als NTBI verbleibt. Ein anderer Fall ist der, bei dem das plasmatische Transferrin vollständig gesättigt wird und in einer verminderten Eisenbindungskapazität resultiert. Das eintretende Eisen wird auch hier als NTBI akkumuliert. Solche extremen Eisenüberladungszustände können bei einer massiven Eisenaufnahme oder bei wiederholten Transfusionen, wie sie bei Patienten mit hämolytischer Anämie (z. B. Thalassämie oder Aplasie)

2. Literaturüberblick

verabreicht werden, auftreten. In eben diesen Patienten werden die höchsten Konzentrationen an NTBI (bis zu 10 μM) gefunden. [GROOTVELD et al., 1989]

Im Falle der Hämochromatose bleibt die Frage nach dem Ursprung des für Chelatoren und Transferrin unerreichbaren Eisens bisher ungeklärt. Es ist möglich, dass das NTBI hier aus Überresten von Hämosiderin-ähnlichen Aggregaten zusammengesetzt ist, die in eisengeladenen Zellen in der Leber, dem Pankreas und den Makrophagen gebildet werden. [IANCU et al., 1997] Diese könnten durch Extrusion oder als Ergebnis von Zellzerstörung in den Metabolismus gelangen. NTBI könnte ebenfalls als Resultat von unvollständig abgebauten Erythrozyten vorkommen. Es wurde gezeigt, dass Monozyten, welche Eisen von phagozytierten Makrophagen erhalten haben, dieses als eine heterogene Mixtur aus Hämoglobin, Ferritin und als Fraktionen mit niedrigem Molekulargewicht abgeben. Dieser Mechanismus würde speziell in Situationen zutreffen, in denen der Erythrozyten-Turnover beschleunigt ist, was in eisenbelasteten Makrophagen resultiert, wie es bei hämolytischen Anämien vorkommt. [MOURA et al., 1998]

Eine kurzlebige Form von NTBI, zusammengesetzt aus Chelator-Eisen-Komplexen, tritt bei Patienten unter Therapie mit Chelatoren auf. Zum Beispiel kann die Plasmakonzentration an Deferipron-Eisen nach einer Verabreichung von Deferipron die Konzentration von 10 μM übersteigen und über mehrere Stunden bestehen bleiben. [BREUER et al., 2000]

Die hydrophobe Substanz Deferipron erlangt über die Zellmembran rasch einen Gleichgewichtszustand und mobilisiert Eisen aus Geweben ins Plasma. Nachdem Deferipron-Eisen-Komplexe effizient binnen Stunden ausgeschieden werden, stellen sie nur einen vorübergehenden Pool am NTBI dar. Dennoch muss ihr mögliches Vorhandensein in Studien von NTBI in Patienten, die einer Therapie mit Chelatoren unterliegen, berücksichtigt werden. [KONTOGHIORGHES, 1995]

2.7.2.3.1. β -Thalassämie

Die β -Thalassämie ist eine erblich bedingte Form der Anämie, die aus einem quantitativen Defizit der Produktion der β -Kette des Hämoglobins resultiert. Der Mangel der β -Kette führt zu einer intrazellulären Ausfällung der im Übermaß vorhandenen α -Globin-Kette, was eine ineffektive Erythropoese bedingt. In den schlimmsten Fällen, wie sie in Homozygoten (Thalassämie major) oder Heterozygoten (Thalassämie minor) vorkommt, ist die Anämie innerhalb der ersten Lebensjahre bei Abwesenheit einer Therapie letal. Die Transfusionstherapie ist lebensrettend und zielt darauf ab, die Anämie zu korrigieren, die massive Erythropoese zu unterdrücken und die erhöhte gastrointestinale Absorption von Eisen zu verhindern. [WEATHERALL, 2001]

Die Folge von Transfusionstherapien ist eine Überladung mit Eisen, welche unbehandelt ebenfalls lebensgefährdend ist. Die Vermeidung und die Behandlung solcher Eisenüberladungszustände sind die primären Ziele des Krankheitsmanagements. [GIARDINA und GRADY, 2001] Die einzige Möglichkeit, die Krankheit zu heilen, ist über eine homologe Transplantation von Knochenmark. [GIARDINI und LUCARELLI, 1994]

Kardiale Erkrankungen sind die hauptsächliche Todesursache bei transfusionsabhängigen β -Thalassämie major Patienten. [OLIVIERI et al., 1994] Die größte Komplikation einer Transfusion von Erythrozyten über lange Zeit ist die Deposition von Eisen, welche im Herz funktionelle Beeinträchtigungen bedingt. [OLIVIERI, 1999]

Patienten der β -Thalassämie major mit anormal erhöhten plasmatischen Gehalten an NTBI erkranken im Vergleich zu Patienten mit normalen NTBI-Werten häufiger an Kardiomyopathie. [KOREN et al., 2010]

2.7.2.4. NTBI als mögliches Gesundheitsrisiko

Durch die Bindung des Eisens an Transferrin wird dessen Beteiligung an Redoxreaktionen, bei denen es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies kommen kann, verhindert. [MCKIE et al., 2000]

Es wurde gezeigt, dass NTBI die Bildung von freien Hydroxylradikalen fördert und die Peroxidation von Membranlipiden beschleunigt und somit zu oxidativem Schaden führt. [GUTTERIDGE et al., 1985]

Es gibt eine hohe Evidenz, dass erhöhte Gewebe- und Plasmaeisenkonzentrationen mit einem Abbau von Antioxidantien und verschiedenen pathologischen Zuständen korrelieren. [HERSHKO et al., 1998] Nachdem die Effekte eines Eisenüberladungszustandes multifaktoriell sind, scheint NTBI nur einer von vielen mitwirkenden Faktoren für den beobachteten oxidativen Stress zu sein. Aufgrund der Anwesenheit von NTBI im Metabolismus könnte es Schäden an zahlreichen Stellen im Körper hervorrufen. Es gab zum Beispiel Hinweise, dass erhöhte Körpereisenspeicher das Risiko von kardiovaskulären Erkrankungen erhöhen könnte und dass es die Oxidation von ‚low density Lipoproteinen‘, von denen angenommen wird, dass sie einer der Auslöser von Arteriosklerose sind, katalysieren. [MEYERS, 1996], [DE VALK und MARY, 1999], [HEINECKE, 1998] Die spezifische Korrelation zwischen NTBI und kardiovaskulären Erkrankungen muss jedoch noch geklärt werden.

Bei einer Sättigung des Transferrins, die 85% überschreitet, werden kardiale Probleme, welche mit der Eisenüberladung in Zusammenhang stehen, vorherrschend. [JENSEN et al., 2003]

Die heterogene Natur des NTBI macht es schwierig, die chemische Reaktivität vorherzusagen. Es muss beachtet werden, dass die Aufnahme von NTBI in Zellen, im Gegensatz zur rezeptorvermittelten Aufnahme von Transferrin-gebundenem Eisen, kein durch Feedback regulierter Prozess ist. [KAPLAN et al., 1991], [KLAUSNER et al., 1993]

Möglicherweise könnte ein Übermaß an Eisen in Form von NTBI in Zellen aufgenommen und in Lysosomen mobilisiert werden und dadurch schlussendlich eine zelluläre Eisenüberladung bedingen. Daher könnte NTBI – obwohl es bisher nicht direkt als Gesundheitsrisiko erkannt wurde – toxisches Potential haben, weshalb das Auftreten von NTBI im Plasma nicht ignoriert werden darf. [BREUER et al., 2000]

2.7.2.5. Therapie von Eisenüberladungskrankheiten mit Chelatoren

Die Fraktion des ‚labilen Plasma Eisens‘ des NTBI repräsentiert die labilste Form des NTBI, welche leicht in Zellen eintreten kann und sehr redox-aktiv ist. Diese Fraktion ist eines der Ziele von Eisenchelatoren. [CABANTCHIK et al., 2005]

Die gängige Therapieform von Eisenüberladungskrankheiten erfolgt primär mittels DFO (Desferrioxamin), das über intravenöse Infusionen appliziert wird, gemeinsam mit Deferipron und Deferasirox, welche oral aktive Chelatoren darstellen. Obwohl diese Chelatoren sehr effektiv in der Verminderung des Eisenüberladungszustandes wirken, sind sie mit einer Reihe an Nebenwirkungen assoziiert.

Es wird vermutet, dass eine kombinierte Administration eines kleineren, zweizähnigen Chelators und eines größeren, sechszähnigen Chelators wie DFO, in einer verbesserten Entfernung von Eisen resultieren würde als die Behandlung mit einem dieser Chelatoren allein. [GRADY et al., 1998] Der kleine, kinetisch labile zweizähnige Chelator kann rasch auf den intrazellulären Eisenpool zugreifen. Das gefangene Eisen wird anschließend auf den kinetisch trägen sechszähnigen Chelator übertragen, welcher einen stabileren Komplex formt und ausgeschieden wird. Auf diesem Weg fungiert der zweizähnige Chelator als ein ‚Shuttle‘-Molekül und der sechszähnige als ‚Ableiter‘. [SCHUBERT und DERR, 1978]

Dies wiederum könnte zu einer Verminderung der zu verabreichenden Dosis an Chelatoren führen. [GRADY et al., 1998]

Es ist bekannt, dass DFO nicht imstande ist, Eisen von Transferrin zu entfernen, wahrscheinlich aufgrund seiner Größe. [EVANS et al., 1992] Vermutet wird demnach,

dass in Anwesenheit eines kleineren, zweizähligen Chelators Eisen von Transferrin auf DFO transferiert werden kann. [POLLACK et al., 1976]

Nachdem gezeigt wurde, dass Deferipron imstande ist, Eisen in Herzgeweben zu chelatieren und dieses zu entfernen, könnte eine Kombination aus Deferipron und DFO Eisen aus Herzgeweben effizienter entfernen. [PENG et al., 2003]

In einer die Sicherheit und die Effektivität vergleichenden Studie von Deferipron und DFO in Patienten mit β -Thalassämie wurde demonstriert, dass beide Chelatoren die selbe Fähigkeit besitzen, Eisen aus der Leber zu entfernen, jedoch wurde mit der Behandlung mit Deferipron eine größere Verbesserung der Herzfunktion beobachtet. [PENG et al., 2003]

2.7.2.6. Quantifizierung von NTBI

Die Testprinzipien, die für die Methoden zur Quantifizierung von NTBI beschrieben werden, kann man grob in zwei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe mobilisiert NTBI über ein ‚Shuttle Molekül‘ wie EDTA oder Nitrilotriessigsäure, gefolgt von einer Separierung des chelatierten Eisens von Serumproteinen, wozu Mikrofilter verwendet werden, die Molekulargewichte bis 30.000 kD abscheiden können. Das Ultrafiltrat kann dann mittels Atomabsorption, Spektrometrie, ‚High-performance liquid chromatography‘ (HPLC) oder Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelter Plasmaspektrometrie (ICP) analysiert werden. [GOSRIWATANA et al., 1999]

Die zweite Methodengruppe mobilisiert und detektiert NTBI in der gleichen Reaktionsmischung, jedoch ohne Separation von Serumprotein vom chelatierten Eisen. Ein Beispiel ist die Bleomycin-Methode, welche den Gehalt an NTBI im Serum über die Messung von redox-aktivem Eisen abschätzt. Ascorbinsäure, die dem Serum zugefügt wird, reduziert Fe^{3+} zu Fe^{2+} , welches anschließend vom Antibiotikum Bleomycin chelatiert wird. Dieser Komplex bindet an DNA und bedingt einen oxidativen Abbau des Desoxyriboseteils. Diese Abbauprodukte werden über einen kolorimetrischen Test ermittelt, da ihre Konzentration der Menge an vorhandenem Eisen proportional ist. [VON BONSDORFF et al., 2002] Das Problem dieser Methode ist, dass es sich um eine

2. Literaturüberblick

indirekte Messung handelt, die durch andere Substanzen im Serum, welche ähnliche Eigenschaften wie Eisen aufweisen, beeinflusst werden kann. Desweiteren könnte nicht sämtliches Fe^{3+} zu Fe^{2+} durch Ascorbinsäure umgewandelt werden und es ist unklar, ob alles oligomere Eisen mit dieser Methode detektiert wird. [HIDER, 2002]

Ein weiteres Beispiel für die zweite Methodengruppe sind Methoden, welche Eisen-sensitive Fluoreszenzsonden, wie etwa Fluorescein-markiertes DFO und Fluoreszenz-markiertes Apotransferrin verwenden, um NTBI in 96-Wellplatten zu quantifizieren. Diese Methoden detektieren bei Anwesenheit von NTBI ein vermindertes Fluoreszenzsignal im Vergleich zu Signalen, die von normalem Serum stammen. Ursprünglich wurden mit DFO gecoatete Wells verwendet, bei denen DFO als Chelator zur Extraktion von NTBI aus der Probe dient und freies Calcein einer Calcein-Eisenlösung das Fluoreszenzsignal induziert. Das freie Calcein stammt aus dem Calcein-Eisen-Komplex, aus dem das verbleibende, verfügbare DFO Eisen extrahiert, wenn kein weiteres NTBI verfügbar ist. Später wurden die mit DFO gecoateten Wells durch gewöhnliche Wells ersetzt und eine Fluoreszenz-markierte Apotransferrinlösung zur Bindung von NTBI verwendet, wodurch das Fluoreszenzsignal vermindert wurde. [BREUER et al., 2000], [BREUER und CABANTCHIK, 2001] Ein Nachteil dieser Methoden ist deren Tendenz, durch Bedingungen wie der Serumfarbe und der Trübung beeinflusst zu werden. Der Vorteil liegt in der Einfachheit, wodurch sie für Routinemessungen mit großem Probenumfang geeignet ist. [VON BONSDORFF et al., 2002]

Bei Verwendung verschiedener Methoden bei derselben Probe ergeben sich unterschiedliche Ergebnisse. Daher ist es notwendig, dass vor der Einführung von NTBI-Messungen in der klinischen Praxis reproduzierbare Protokolle zur quantitativen Erfassung von NTBI etabliert werden. [JACOBS et al., 2005]

3. Material und Methoden

3.1. Zellkultur

Die Einhaltung von Sterilität ist einer der wichtigsten zu beachtenden Aspekte im Umgang mit Zellkulturen. Um weitgehend sterile Bedingungen zu erschaffen, werden alle Tätigkeiten in einer Sterilwerkbank ausgeführt (SafeFAST Elite; FASTER). Vor Beginn der Arbeit wird diese, ebenso wie Hände bzw. Handschuhe und alle Oberflächen von Gegenständen, mit denen in der Sterilwerkbank gearbeitet wird, mit 70%igem Ethanol gesäubert.

Sämtliche Materialien, die für die Arbeit mit Zellkulturen verwendet werden, müssen in sterilem Zustand sein. Um dies zu erreichen, werden bspw. Glaspipetten, Pasteurpipetten oder Glasflaschen acht Stunden bei 160°C in einem Heißluftsterilisator (WTB Binder) sterilisiert. Destilliertes Wasser für den Brutschrank, sowie Pipettenspitzen aus Kunststoff werden mit Hilfe eines Autoklaven (Certoclav) bei 120-140°C und einem Druck von 2 bar 20 Minuten lang autoklaviert und so keimfrei gemacht.

Um Lösungen, mit denen in der Zellkultur gearbeitet wird, in sterilen Zustand zu bringen, werden diese mit Hilfe eines Sterilfilters mit einer Porengröße von 0,22 µm (Rotilabo) filtriert.

Die Kultivierung der Zellen findet in einem Brutschrank (Fa. Binder) statt, in dem eine Temperatur von 37°C mit 5%iger CO₂-Atmosphäre herrscht.

3.2. Zelllinie

Für die Versuche wurde die Zelllinie P19 verwendet. Diese Zellen stammen aus embryonalen Karzinomzellen des Mäusestamms C3H/He, es handelt sich um adhärente, pluripotente Zellen. Mittels Dimethylsulfoxid können diese zu Myokardzellen differenziert werden, mit Hilfe von Retinsäure zu Neuronen.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in komplettiertem α -MEM-Kulturmedium, welches alle 48 Stunden erneuert wurde. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen gesplittet.

3.3. Herstellung des Kulturmediums

Um das optimale Medium für die Kultivierung der P19 Stammzellen und die nachfolgenden Versuche zu bestimmen, wurden vorab zwei verschiedene Kulturmedien auf deren Eisengehalt getestet. Die Eisenbestimmung erfolgte nach der Ferrozin-Methode, wie sie in Kapitel 3.13. beschrieben wird.

Kulturmedium	Eisengehalt (μg Eisen/ml Medium)
α -MEM-Nullmedium	0,0025
α -MEM-Kulturmedium, komplettiert	1,98
DMEM-Nullmedium	0,083
DMEM-Kulturmedium, komplettiert	1,77

Tabelle 1: Eisengehalte verschiedener Kulturmedien

Aufgrund der Tatsache, dass das α -MEM-Nullmedium die geringste Eisenmenge im Vergleich zu den anderen Kulturmedien aufweist, wurde dieses zur Kultivierung der P19 Zellen verwendet.

3.3.1. Nullmedium

Um das α -MEM-Nullmedium herzustellen, wird das Trockenmedium in Pulverform (Euroclone) in sieben Litern bidestilliertem Wasser zur Gänze aufgelöst. Anschließend werden 22 g Natriumhydrogencarbonat zugefügt und der pH-Wert mittels 1M HCl auf 7,2 eingestellt. Schlussendlich wird das Volumen auf 10 Liter aufgefüllt.

Um das Medium in sterilen Zustand zu versetzen, wird es in der Sterilwerkbank über eine Schlauchpumpe (Masterflex; Cole Parmer Instrument Co.) durch einen Sterilfilter mit der Porengröße von 0,20 μm (Sartolab P plus, Sartorius) in sterile Glasflaschen mit dem Fassungsvermögen von 500 ml gefüllt. Die Lagerung des α -MEM-Nullmediums erfolgt bei 4°C.

3.3.2. Herstellung von komplettiertem Nährmedium

Um ein optimales Wachstum der Kulturzellen ermöglichen zu können und ein Bakterienwachstum zu vermeiden, werden zu 450 ml des Nullmediums folgende sterile Zusätze beigefügt:

- 37,5 ml CS (calf serum), (PAA Laboratories GmbH)
- 12,5 ml FCS (fetal calf serum), (GIBCO BRL)
- 5,0 ml L-Glutamin (200 mM) (100x), (PAA Laboratories GmbH)
- 5,0 ml non essential amino acids solution (100x), (PAA Laboratories GmbH)
- 0,5 ml Gentamycin (50 mg/ml), (GEBRU Biotechnik GmbH)

3.3.3. Herstellung von komplettiertem Neuronennährmedium

Zu 464 ml α -MEM-Nullmedium erfolgt die sterile Versetzung mit:

- 19 ml hitzeinaktiviertem CS (calf serum), (PAA Laboratories GmbH)
- 6,5 ml hitzeinaktiviertem FCS (fetal calf serum), (GIBCO BRL)
- 5,0 ml L-Glutamin (200 mM) (100x), (PAA Laboratories GmbH)
- 5,0 ml non essential amino acids solution (100x), (PAA Laboratories GmbH)
- 0,5 ml Gentamycin (50 mg/ml), (GEBRU Biotechnik GmbH)

Die Hitzeinaktivierung des CS und FCS erfolgt durch eine 30 minütige Erwärmung im Wasserbad bei einer Temperatur von 55°C.

3.3.4. Herstellung von komplettiertem Myokardzellnährmedium

Zu 450 ml des α -MEM-Nullmediums werden folgende sterile Zusätze beigemischt:

- 50 ml FCS (fetal calf serum), (GIBCO BRL)
- 5,0 ml L-Glutamin (200 mM) (100x), (PAA Laboratories GmbH)
- 0,5 ml Gentamycin (50 mg/ml), (GEBRU Biotechnik GmbH)

3.4. Medienwechsel und Passagieren der Kulturzellen

Die Zellen werden in verschiedenen großen sterilen Zellkulturflaschen (TPP) kultiviert (Bodenfläche 25 cm² und 75 cm²). Damit eine logarithmische Wachstumsphase erhalten bleiben kann, muss das Kulturmedium regelmäßig ausgetauscht werden, da es zu einem Abbau der darin enthaltenen Nährstoffe bei der Bebrütungstemperatur von 37°C kommt.

Wenn die Zellen ihre maximale Dichte erreicht haben, teilen sie sich aufgrund einer kontaktinduzierten Wachstumshemmung nicht mehr. Aus diesem Grund müssen die Zellen in einer entsprechenden Verdünnung in neue Kulturflaschen passagiert werden. Vor der Arbeit mit den Kulturzellen müssen alle verwendeten Lösungen durch Erwärmen im Wasserbad auf 37°C gebracht werden.

Da es sich bei der P19-Zelllinie um adhärente Zellen handelt, müssen diese zum Passagieren zuerst vom Boden der Kulturflasche abgelöst werden, nachdem das alte Medium abgesaugt wurde. Dazu bedeckt man den Zellrasen mit etwa 1-2 ml Trypsin-EDTA (1x) (PAA Laboratories GmbH) und lässt dieses zwei Minuten bei Raumtemperatur einwirken. Nach Ablauf der Zeit wird das Trypsin-EDTA (1x) bis auf einen geringen Rest abgesaugt und die Kulturflasche mit den mit Trypsin-EDTA (1x) benetzten Zellen weitere 4-5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Daraufhin runden sich die Zellen durch die Einwirkung des Trypsins ab und lösen sich vom Boden der Kulturflasche. Um die Wirkung des Trypsins zu stoppen und eine Vereinzelung der Zellen zu erreichen, werden diese in frischem, komplettiertem Kulturmedium resuspendiert und nach Bestimmung der Zellzahl mit der entsprechenden Menge Kulturmedium in neue Kulturflaschen überführt, wodurch eine Subkultur erhalten wird.

Die Zellzahl wird bei 2-3 maligem Passagieren pro Woche jeweils auf etwa eine Million Zellen pro 20 ml Kulturmedium für Kulturflaschen mit einer Bodenfläche von 75 cm² eingestellt.

3.5. Bestimmung der Zellzahl

Für das Anlegen von Arbeitskulturen ist es von Nöten, die genaue Anzahl an in Suspension befindlichen Zellen zu kennen, weshalb vor der Weiterkultivierung die Ermittlung der Zellzahl erforderlich ist. Die Bestimmung erfolgt mittels elektronischen Zellzählers (Microcellcounter CC-108; Fa. Sysmex). Dafür werden unter sterilen Bedingungen 0,5 ml der Zellsuspension entnommen und anschließend davon 200 µl in ein Countergefäß pipettiert. Vor der Zellzählung wird die Zellsuspension mit 9,8 ml Counterflüssigkeit (Cellpack PK-30L; Fa. Sysmex) verdünnt und sorgfältig gemischt. Zu beachten ist, dass bei dieser Methode der Bestimmung der Zellzahl nicht zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden kann.

Bei der Zählung der Zellen mit dem Zellzählgerät TC10 Automated Cellcounter von BioRad konnte ermittelt werden, dass die Viabilität der gesplitteten Zellen bei etwa 95% liegt, da durch die Färbung der Zellen mit Trypanblau eine Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen möglich ist.

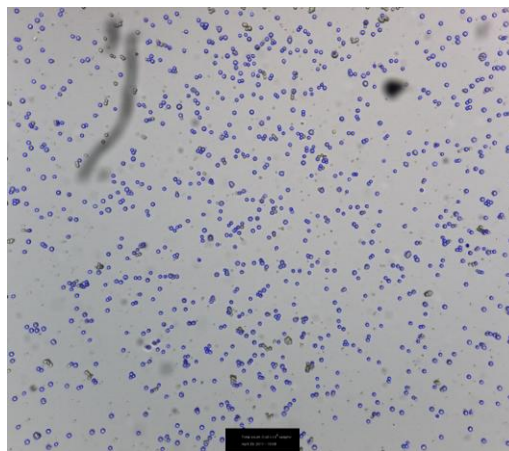


Abbildung 11: P19-Zellsuspension nach Splitten, aufgenommen mittels TC10 Automated Cellcounter von BioRad

3.6. Differenzieren der P19-Stammzellen zu Neuronen

Da P19-Zellen pluripotent sind, können sie durch den Zusatz von Retinsäure unter anderem zu Neuronen differenziert werden. [MCBURNEY, 1993]

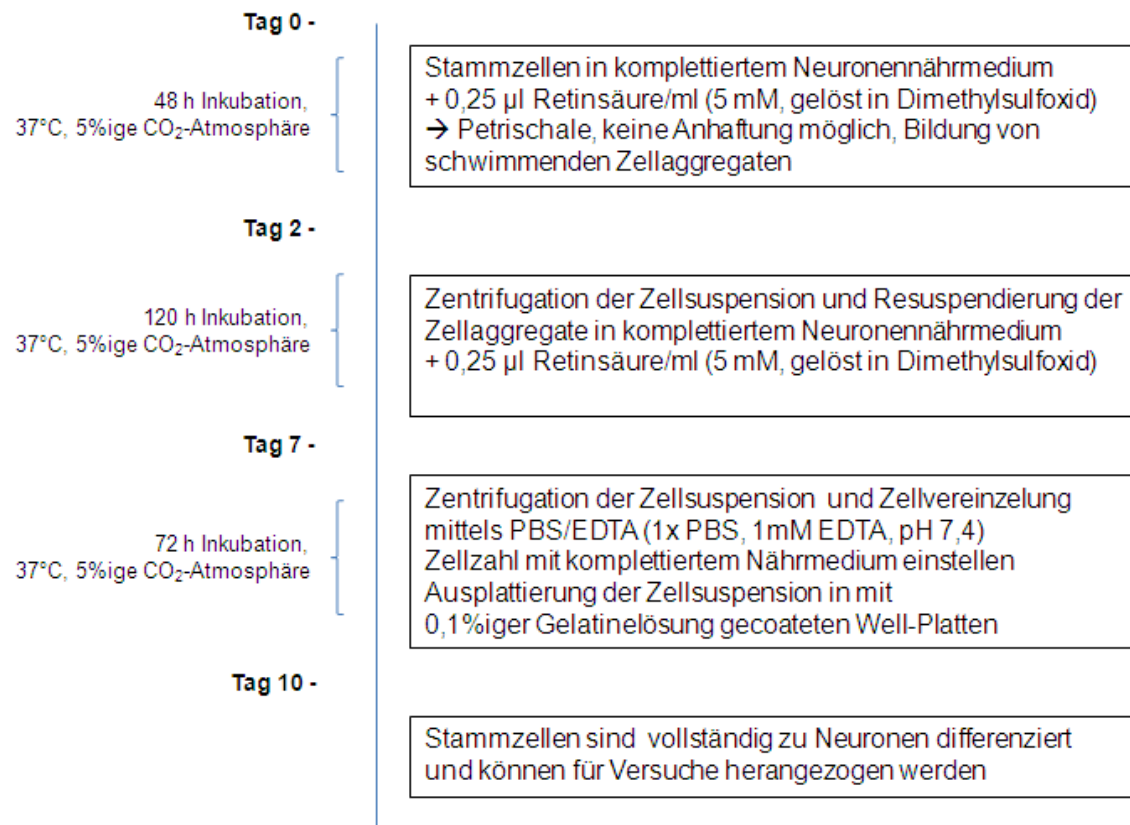


Abbildung 12: Arbeitsschema zur Differenzierung von P19-Stammzellen zu Neuronen

Zur Differenzierung werden die Zellen in frischem, komplettiertem Neuronennährmedium auf eine Zellzahl von 0,3 Millionen/ml eingestellt und 10 ml der Zellsuspension in eine Bakterien-Petrischale (Sterilin) transferiert, an deren Boden die Zellen nicht anhaften können. Durch den Zusatz von 0,25 µl Retinsäure/ml (Sigma) (5 mM, gelöst in Dimethylsulfoxid) wird die Differenzierung zu Neuronen induziert. Während der weiteren Kultivierung der Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre für 48 Stunden bilden die Zellen abgerundete, schwimmende Zellaggregate.

Nach diesen zwei ersten Tagen muss das Medium der Zellen gewechselt werden. Hierfür transferiert man das alte Medium, in dem sich die gebildeten Zellaggregate

3. Material und Methoden

befinden, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner bio-one) und lässt die Aggregate über einen Zeitraum von 10 Minuten zu Boden sinken. Anschließend wird das Röhrchen bei einer Temperatur von 4°C drei Minuten bei 100*g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das so erhaltene Zellpellet wird in frischem, komplettiertem Neuronennährmedium resuspendiert und die Differenzierung durch die neuerliche Zugabe von Retinsäure in derselben Konzentration fortgesetzt. Abschließend wird die Zellsuspension wieder in dieselbe Petrischale überführt, die sich während des Arbeitsschrittes zur Verhinderung einer Austrocknung im Brutschrank befunden hat.

Nach weiteren fünf Tagen werden die Zellen in Wellplatten ausgesetzt, welche zuvor mit 0,1%iger Gelatinelösung (Sigma G2500) gecoatet wurden.

Dafür wird die Zellsuspension erneut in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, und nach 10 minütiger Wartezeit bei 4°C drei Minuten bei 100*g zentrifugiert. Das alte Medium wird anschließend ohne Verletzung des Zellpellets abgesaugt und das Pellet in 1-2 ml PBS/EDTA (PBS, 1 mM EDTA, pH 7,4) resuspendiert und auf 10 ml mit frischem, komplettierten Nährmedium ergänzt.

Nach Bestimmung der Zellzahl werden von der entsprechenden Verdünnung mit komplettiertem Nährmedium jeweils 200 µl in eine 96-Wellplatte (PAA Laboratories GmbH) pipettiert - in welche zuvor zur Beschichtung der Well-Böden 150 µl einer 0,1%igen Gelatinelösung pipettiert und nach 30 minütiger Wartezeit bei Raumtemperatur wieder abgesaugt wurde - wobei die Zellzahl auf 0,4 Millionen/ml eingestellt wird.

Bei der Verwendung von 6-Wellplatten werden diese mit 1,5 ml 0,1%iger Gelatinelösung gecoatet und anschließend jeweils 2 ml der 0,4 Millionen Zellen/ml enthaltenden Zellsuspension hinein pipettiert.

Nach Ablauf weiterer drei Tage sind die Zellen vollständig zu Neuronen differenziert und können für Versuche verwendet werden. Die Kontrolle der Differenzierung erfolgte durch Detektierung zellspezifischer Marker mittels SDS-PAGE und Western Blot.

3.7. Differenzieren der P19-Stammzellen zu Myokardzellen

Mit Hilfe des Zusatzes von Dimethylsulfoxid (DMSO) können P19-Stammzellen zu Myokardzellen differenziert werden. [SKERJANC, 1999]

Dies ist nur eines von vielen Protokollen, andere Substanzen, um die Differenzierung von P19-Stammzellen in Myokardzellen zu induzieren, sind bspw. Oxytocin [PAQUIN et al., 2002] oder Retinsäure. [WOBUS et al., 1994]

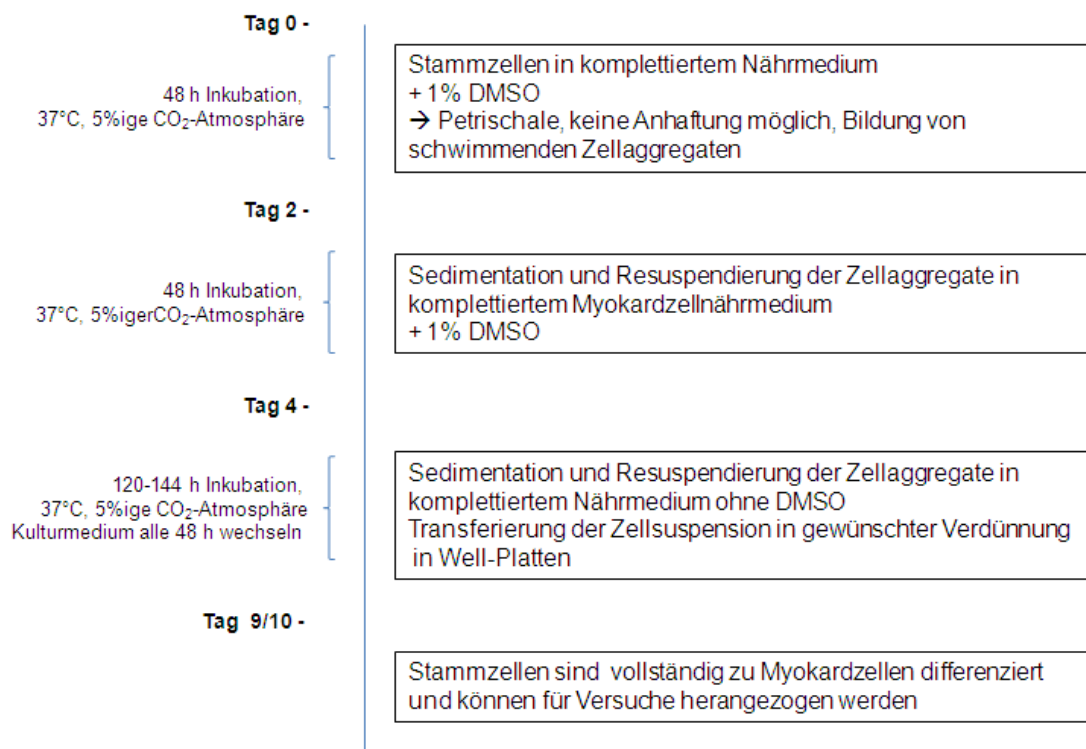


Abbildung 13: Arbeitsschema zur Differenzierung von P19-Stammzellen zu Myokardzellen

Für die Differenzierung werden 0,2 Millionen Zellen/ml mit komplettiertem Nährmedium, welches 1% DMSO (Sigma) enthält, versetzt und 10 ml der Zellsuspension in eine Bakterien-Petrischale (Sterilin), an deren Boden die Zellen nicht anhaften können, transferiert. Die Kultivierung erfolgt im Brutschrank bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre für 48 Stunden, wobei sich auch hier schwimmende, abgerundete Zellaggregate bilden.

Nach Ablauf der zwei Tage muss das Medium der Zellen gewechselt werden, wofür die Zellsuspension in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt wird und die Zellaggregate

innerhalb von 15 Minuten zu Boden sinken. Im Anschluss wird das alte Medium vorsichtig abgesaugt, die Aggregate in frischem, komplettiertem Myokardzellnährmedium, in welchem 1% DMSO enthalten ist, resuspendiert und in dieselbe Petrischale, die in der Zwischenzeit im Brutschrank aufbewahrt wurde, transferiert.

Nach weiteren 48 Stunden wird das Medium der Zellaggregate erneut gewechselt, wobei es sich bei dem frischen Medium um komplettiertes Nährmedium ohne den Zusatz von DMSO handelt. Die Suspension wird nach sorgfältigem Resuspendieren in Wellplatten transferiert, nach 5-6 weiteren Tagen der Kultivierung im Brutschrank, während derer das Kulturmedium alle zwei Tage gewechselt werden muss, ist eine gänzliche Differenzierung zu Myokardzellen erfolgt und die Zellen können für Versuche herangezogen werden. Um die Differenzierung zu kontrollieren, wurden zellspezifische Marker mittels SDS-PAGE und Western Blot detektiert.

3.8. Einfrieren der P19-Zellen

P19-Zellen können bei -80°C in flüssigem Stickstoff über längere Zeiträume gelagert werden.

Die entsprechende Menge Zellsuspension, bei welcher die gewünschte Zellzahl eingestellt wurde (etwa 5 Millionen Zellen/ml), wird in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4°C 5 Minuten mit 250*g zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand vorsichtig und rasch abgesaugt, dasselbe Volumen, welches zuvor abgesaugt wurde, durch CM-1 Einfriermedium (cell lines service) (4°C) ersetzt und das Zellpellet darin resuspendiert. Die so erhaltene Suspension wird zügig und nicht zu voll in Cryoröhrchen (Cryovial) gefüllt und diese sofort auf Eis gestellt. Nach Beendigung der Arbeit werden die Cryoröhrchen in einen freezing container (Nalgene Cryo 1°C Freezing Container) überführt und bei -80°C eingefroren, wobei die Temperatur der Zellsuspension so pro Stunde um 1°C sinkt. Nach über 80 Stunden können die Cryoröhrchen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff umgelagert werden.

3.9. Auftauen der P19-Zellen

Die in den Cryoröhrchen befindliche Zellsuspension wird möglichst rasch aufgetaut, indem sie in ein 37°C warmes Wasserbad getaucht und währenddessen geschüttelt wird. Die daraufhin flüssige Zellsuspension wird in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und in 8 ml komplettiertem Nährmedium suspendiert. Im Anschluss wird das Zentrifugenröhrchen 10 Minuten lang bei 21°C und 250*g zentrifugiert, der Überstand, in dem sich nun das Einfriermedium befindet, abgesaugt, das Zellpellet in entsprechender Menge komplettiertem Nährmedium resuspendiert und in 75 cm² Kulturflaschen überführt. Die weitere Kultivierung erfolgt bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre.

3.10. Inkubationen der differenzierten Zellen

Für die Inkubationen werden P19-Zellen verwendet, die zuvor vollständig zu Neuronen bzw. zu Myokardzellen differenziert wurden.

Die Inkubationen erfolgen jeweils mit komplettiertem Nährmedium, welchem unterschiedliche Eisenchelate beigelegt wurden. Die Inkubationsmedien werden vor den jeweiligen Versuchen immer frisch hergestellt, die Inkubationszeiten betragen jeweils 24 Stunden.

3.10.1. Inkubation der Neuronen und Myokardzellen mit Eisen(III)-Zitrat

P19-Zellen wurden mit unterschiedlichen Eisen(III)-Zitrat-Komplexen unterschiedlicher Konzentrationen inkubiert.

Die dafür verwendeten sterilen Stammlösungen Tri-Natriumzitrat-Dihydrat ($C_6H_5Na_3O_7 \times 2 H_2O$) (Merck) (100 mM) und Eisen(III)-Chlorid ($FeCl_3$) (Merck) (100 mM) wurden in unterschiedlichen Verhältnissen miteinander vereint. Zuerst wurden die jeweiligen Volumina an Zitrat vorgelegt, anschließend wurde die Eisenlösung hinzu pipettiert. Dies geschah langsam, tropfenweise und unter ständigem Mischen, um eine gute Komplexbildung zu garantieren. Dabei ist zu beachten, dass sich bei unterschiedlichen

3. Material und Methoden

Konzentrationen an Zitrat mit Eisen auch unterschiedliche Komplexe bilden. Die Lösungen, mit denen inkubiert wurde, enthielten jeweils 100 µM Eisen.

Verhältnisse (FeCl ₃ :Na ₃ Zitrat)	µl FeCl₃	µl Na₃Zitrat	µl Eisen(III)-Zitrat-Komplex in je 2ml komplettiertem Nährmedium
1:1,5	20	30	5
1:4	20	80	10
1:10	20	200	22
1:20	20	400	42
1:50	20	1000	102

Tabelle 2: Pipettierschema zur Herstellung der Eisen(III)-Zitrat-Komplexe in Inkubationsmedium

3.10.2. Inkubation der Neuronen und Myokardzellen mit Zitrat

P19-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen einer sterilen Lösung Tri-Natriumzitrat-Dihydrat (C₆H₅Na₃O₇ x 2 H₂O) (Merck) (100 mM) inkubiert. Das Pipettierschema dafür entspricht Tabelle 2, anstatt FeCl₃ wurde komplettiertes Nährmedium eingesetzt. Die Konzentrationen an Zitrat der Inkubationslösungen entsprachen 150 µM, 400 µM, 1000 µM, 2000 µM und 5000 µM.

3.10.3. Inkubation der Neuronen und Myokardzellen mit Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure (NTA)

Für die Inkubation der differenzierten P19-Zellen wurde aus den sterilen Stammlösungen Eisen(III)-Chlorid (FeCl₃) (Merck) (100 mM) und Nitrilotriessigsäure (Tritriplex I; C₉H₉NO₆) (Merck) (100 mM) im Verhältnis 1:4 ein Komplex gebildet. Die Konzentration der Inkubationslösung betrug 100 µM Eisen.

Verhältnis (FeCl ₃ :NTA)	µl FeCl₃	µl NTA	µl Eisen(III)-NTA-Komplex in je 2ml komplettiertem Nährmedium
1:4	20	80	10

Tabelle 3: Pipettierschema zur Herstellung des Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure-Komplexes

3.10.4. Inkubation der Neuronen und Myokardzellen mit Eisen(III)-Ammoniumzitrat (FAC)

Für die Inkubation der differenzierten P19-Zellen wurde eine sterile 300 mM Eisen(III)-Ammoniumzitrat-Stammlösung (Merck) verwendet, von der 1,67 µl zu 5 ml komplettiertem Nährmedium hinzugefügt wurden, um eine Endkonzentration von 100 µM Eisen zu erhalten.

3.11. Ernten der Zellen und Herstellung von Zelllysaten

3.11.1. Ernten der Zellen und Herstellung der Zelllysate für die Proteinbestimmung nach Bradford und die Eisenbestimmung nach der Ferrozin-Methode

Da es sich bei P19-Zellen um adhärente Zellen handelt, müssen diese zur Herstellung von Zelllysaten vom Boden der Wells abgeschabt werden.

Zu Beginn des Arbeitsschrittes wird die 6-Well-Platte mit den sich darin befindlichen Zellen und dem sie bedeckenden Inkubationsmedium 5 Minuten auf Eis gestellt, um laufende Reaktionen zu stoppen. Die nachfolgenden Arbeiten erfolgen ebenfalls auf Eis, die verwendeten Lösungen haben eine Temperatur von 4°C.

Im Anschluss an das erste Abkühlen der Zellen wird das Inkubationsmedium abgesaugt und die Zellen ein Mal mit 2 ml einer Eisenchelator beinhaltenden Waschlösung (DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure) 50 mM, in PBS, pH 7,4) und im Anschluss zwei Mal mit jeweils 2 ml PBS, pH 7,4 gewaschen.

Pro Well werden 2 ml PBS, pH 7,4 zugesetzt, die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers (Cell Scraper; Greiner bio-one) vom Boden der Wells abgeschabt, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4°C 10 Minuten bei 250*g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wird nun vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet bei -20°C eingefroren, wodurch ein erstes Aufbrechen der Zellmembranen erfolgt.

3. Material und Methoden

Zur Herstellung des PBS (phosphate buffered saline) (5x), pH 7,4 werden

- 40 g NaCl (Carl Roth GmbH + Co. KG)
- 1 g KCl (Merck)
- 1 g KH_2PO_4 (Merck)
- 14,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck)

in dest. H_2O vollständig gelöst, im Anschluss der pH-Wert auf 7,4 eingestellt, auf einen Liter mit dest. H_2O aufgefüllt und bei 4°C gelagert. Um PBS (1x) zu erhalten, wird PBS (5x) mit dest. H_2O im Verhältnis 1:5 verdünnt.

Nachdem das Zellpellet gefroren ist, werden bei weiterem Arbeiten auf Eis 300 μl Lysispuffer (0,5 M KOH (Merck); 0,1% Triton X 100 (Merck)) zugegeben, sorgfältig gevortext und zur 10 minütigen Einwirkzeit auf Eis stehen gelassen. Nach Behandlung der Zellsuspension mit Ultraschall für 15 Sekunden (Sonofier B-12 Cell Disrupter; Branson Sonic Power Company), wodurch die letzten Zellen aufgesprengt werden, erhält man das fertige Zelllysate, welches bei -20°C bis zu weiteren Untersuchungen gelagert wird.

3.11.2. Ernten der Zellen und Herstellung der Zelllysate für die Proteinbestimmung nach Bradford zur quantitativen Messung der Zellproliferation nach Differenzierung

Zur Herstellung der Zelllysate wird die 6-Well-Platte, in der sich die Zellen befinden, fünf Minuten auf Eis gestellt, um laufende Reaktionen abzustoppen. Im Anschluss wird das die Zellen bedeckende Kulturmedium sehr sorgfältig abgesaugt, je 500 μl Lysispuffer (0,5 M KOH (Merck); 0,1% Triton X 100 (Merck)) hinzupipettiert und die Zellen damit 30 Minuten inkubiert, um eine Auflösung der Zellstrukturen zu erwirken. Darauf wird das entstandene Zelllysate 15 Sekunden mit Ultraschall (Sonofier B-12 Cell Disrupter; Branson Sonic Power Company) behandelt, um die letzten verbliebenen Zellstrukturen zu zerstören, wodurch man das fertige Zelllysate erhält, das für weitere Untersuchungen bei -20°C gelagert wird.

3.12. Proteinbestimmung nach Bradford

Um den Proteingehalt der Proben zu ermitteln, wird eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. [BRADFORD, 1976]

Die Methode basiert darauf, dass der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 an die freien Aminogruppen von Proteinen bindet. Aufgrund dieser Komplexbildung erfolgt in saurem Milieu eine Farbveränderung von braun zu blau, wobei das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschoben wird.

Die Proteinkonzentrationen der Proben werden mittels einer Eichgeraden mit den Standardkonzentrationen 2, 4, 6, 8 und 10 µg/ml eines BSA-Proteinstandards (1 mg BSA/ml, bovine serum albumin) erstellt. Dieser wird zuvor 1:10 mit dest. H₂O verdünnt.

Konzentration (µg/ml)	µl BSA-Lösung (verdünnt)	µl H ₂ O dest.
Leerwert	/	800
2	20	780
4	40	760
6	60	740
8	80	720
10	100	700

Tabelle 4: Pipettierschema zur Erstellung der Eichgerade für die Proteinbestimmung nach Bradford

Jeweils 0,5 und 1 µl der Proben werden im Doppelansatz mit dest. H₂O auf 800 µl Gesamtvolumen ergänzt und sorgfältig gemischt. Im Anschluss werden jeweils 200 µl BIORAD-Reagenz (Bio-Rad Laboratories GmbH) mit Hilfe eines Handdispensers zu den Standards und den Proben pipettiert, diese gut gevortext und mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit werden 200 µl der Standards und der Proben nach neuerlichem vortexen in eine 96-Well ELISA Platte (Greiner) pipettiert und die Absorption bei 595 nm mittels Photometer (Anthos Zenyth 3100) frühestens nach 20 Minuten, jedoch spätestens nach einer Stunde bestimmt.

Die Auswertung der Messwerte erfolgt über eine Standardkurvenberechnung mit Hilfe des Programms ‚GraphPad Prism‘.

3.13. Eisenbestimmung – Ferrozin-Methode

Um den Gehalt an Eisen der Proben zu ermitteln, wird eine Eisenbestimmung mit der Ferrozin-Methode durchgeführt. Die Methode basiert darauf, dass der Eisenchelator für zweiwertiges Eisen – Ferrozin – einen violettfarbigen Eisen(II)-Ferrozin-Komplex bildet, welcher bei einer Wellenlänge von 540 nm photometrisch erfasst werden kann.

Vorher wird durch saures Permanganat und die anschließende Inkubation bei 60°C das Eisen aus stabilen Eisenkomplexen und Proteinen freigesetzt. Im Anschluss wird es durch Ascorbinsäure zur Gänze zu zweiwertigem Eisen reduziert und mit Ferrozin quantitativ komplexiert. Da Kupferionen aufgrund ihrer Reaktionsfähigkeit mit Ferrozin die Messung stören könnten, wird dem Reagenz B der Kupferchelator Neocuproin zugesetzt, da Cu-Neocuproin bei 540 nm kein Licht absorbiert.

Um die Ferrozin-Eisenbestimmung durchzuführen, werden jeweils 50 µl bzw. 100 µl der Zellysate (das Volumen richtet sich nach dem durch einen Vortest ermittelten Eisengehalt der Proben) mit H₂O dest. auf 500 µl Gesamtvolumen ergänzt. Sowohl die Messung der Proben als auch die Standardreihe werden in Doppelbestimmung durchgeführt.

Zur Herstellung der Standardreihe werden mit einer Eisenstandardlösung (20 µg Eisen/ml) Standards mit Konzentrationen zwischen 0,025 und 2,5 µg Eisen/ml hergestellt.

Im Anschluss werden zu den Proben, den Standards und dem Leerwert (H₂O dest.) 250 µl Reagenz A mittels Handdispenser zugefügt und nach sorgfältigem Vortexen zwei Stunden im 60°C warmen Wasserbad inkubiert.

Reagenz A:

0,45 g KMnO₄ (Merck) werden in 10 ml H₂O dest. gelöst; im Anschluss werden lichtgeschützt unter dem Abzug 10 ml 1,2 M HCl hinzugefügt und gut gevortext; Reagenz A muss immer frisch hergestellt werden;

3. Material und Methoden

Nach Ablauf der zweistündigen Inkubationszeit erfolgt die Zugabe von 50 µl Reagenz B mit Hilfe des Handdispensers.

Reagenz B:

- 64 mg Ferrozin [3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(4-Phenyl)sulfonic acid)-1,2,4-Triazine](Sigma)
- 64 mg Neocuproin Hydrochlorid Hydrat (Sigma)
- 7 g Ascorbinsäure (Merck)
- 7,8 g Ammoniumacetat (Merck)

werden auf 20 ml mit H₂O dest. lichtgeschützt aufgefüllt; Reagenz B ist lichtgeschützt bei 4°C vier Wochen haltbar.

Nach neuerlichem Vortexen werden nun je 200 µl der Standards und der Proben in eine 96-Well ELISA Platte (Greiner) aufgetragen. Die Messung erfolgt 30 Minuten nach Zugabe des Reagenz B am Plattenphotometer (Victor² 1420 Multilabel Counter; Wallac) bei 540 nm. Die Auswertung der Messdaten erfolgt mit Hilfe des ,GraphPad Prism'-Programms.

3.14. MTT-Cell-Proliferation-Assay

Mit Hilfe des MTT-Tests ist es möglich, die Viabilität und Proliferation von Zellen zu ermitteln, gemessen wird der Anteil an lebenden Zellen, welche mit entsprechenden Substanzen inkubiert wurden, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen.

Beim MTT-Assay handelt es sich um einen quantitativen, photometrischen Test, welcher darauf basiert, dass gelbes Tetrazoliumsalz MTT-(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) von metabolisch aktiven Zellen zu purpurfarbenem Formazan reduziert wird. Aufgrund ihrer mitochondrialen und mikrosomalen Dehydrogenasen besitzen lebende Zellen im Vergleich zu Toten diese Fähigkeit.

Durch photometrische Bestimmung des Formazangehaltes kann die Viabilität der Zellen gemessen werden, da die Farbintensität und die Viabilität der Zellen direkt proportional sind. [BUSHNELL et al., 1999]

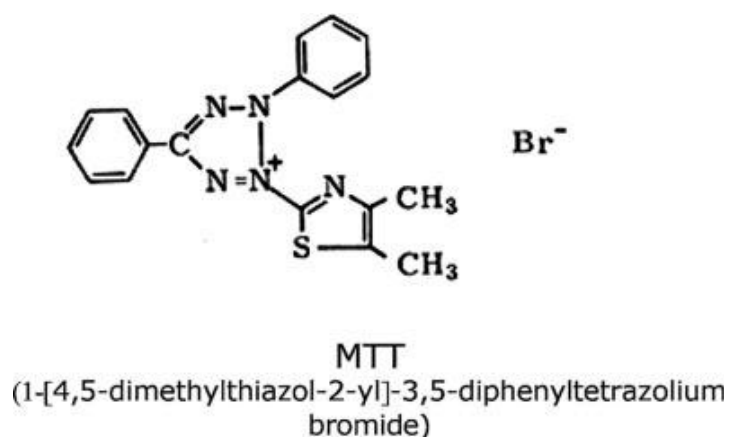


Abbildung 14: Strukturformel von MTT [SÁNCHEZ und KÖNIGSBERG, 2006]

3.14.1. Durchführung des MTT-Assays

Zu den Zellen in 96-Well-Platten (PAA Laboratories GmbH), welche mit den jeweiligen Substanzen inkubiert wurden, wird jeweils 20 µl MTT (5 mg/ml (Carl Roth GmbH + Co. KG) in PBS, pH 7,4 gelöst) pro 100 µl Medium im Well hinzu pipettiert. Nach 30 minütiger Inkubationszeit im Brutschrank bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre ist die blaue Färbung der Zellen unter dem Mikroskop erkennbar. Daraufhin wird der Inhalt der 96-Well-Platte vorsichtig ausgeleert, abgeklopft und im Anschluss jeweils 150 µl MTT-Solvent-Lösung (4 mM HCl, 0,1% Nonidet P-40 (Fluka) in Isopropanol (Merck) gelöst) in die Wells pipettiert, um ein Abstoppen der Farbreaktion zu erwirken. Durch

das anschließende 20 minütige, lichtgeschützte Schütteln am Belly Dancer werden die MTT-Formazankristalle gelöst. Zur Messung der Farbintensität wird die Absorption zuerst bei 595 nm (Messwellenlänge) und anschließend bei 620 nm (Referenzwellenlänge, wird bei der Auswertung subtrahiert) im Photometer (Anthos Zenyth 3100) gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem Programm ‚GraphPad Prism‘.

3.15. Messung des redox-reaktiven Eisens der Inkubationsmedien mittels 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein

Die Verwendung von 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat zur Detektion der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies ist zu einer der populärsten Methoden geworden. [BRUBACHER und BOLS, 2001]

Durch chemische Hydrolyse von 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat, bei der die Acetatgruppen abgespalten werden, entsteht der Fluorophor 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCDHF), welcher durch verschiedene Oxidantien von seiner nicht-fluoreszierenden Form in seine fluoreszierende Form gewandelt wird.

Der zeitabhängige Fluoreszenzanstieg wird bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm gemessen.

Um ausschließlich redox-aktives Eisen zu ermitteln, werden die Standardreihe und die Proben sowohl ohne als auch mit Zusatz des Eisenchelators Deferipron (auch L1 genannt) gemessen, welcher mit Eisenionen einen redox-inaktiven Chelatkomplex bildet. Somit entspricht die später gebildete Differenz der Oxidationsrate von DCDHF mit und ohne den Zusatz von Deferipron der Redox-Aktivität des nicht-Transferrin gebundenen Eisens.

3.15.1. Chemische Hydrolyse von 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat

Um den redox-sensitiven Fluorophor Dichlorofluorescein herzustellen, muss eine chemische Hydrolyse von 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat erfolgen.

Dafür werden 5 µl einer 60 mM 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetatlösung zu 300 µl dest. H₂O langsam und unter mehrmaligem Schütteln am Vortex hinzugefügt. 250 µl dieser Lösung werden mit 1 ml 0,01 N NaOH gemischt und 30 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert, um dann mit 5 ml 25 mM Natriumphosphatpuffer (NaH₂PO₄ (Merck), pH 7,2) neutralisiert zu werden.

Alle verwendeten Inkubationsmedien werden mit HBS (HEPES buffered saline, 20 mM HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure) (Merck), 150 mM NaCl (Carl Roth GmbH + Co. KG), pH 7,4;) welches durch Behandlung mit 5% Serdolit CHE (Serva) eisenfrei gemacht wurde, gepuffert.

3.15.2. Herstellung der Standardreihe

Um Standards unterschiedlicher Eisenkonzentrationen zu erhalten, wird eine Verdünnungsreihe erstellt. Als Eisenstandard wird Eisen-NTA (1:7) (2 mM Eisen, 14 mM NTA) verwendet, welches in unterschiedlichen Konzentrationen mit α-MEM-Nullmedium, das mit 40 mg/ml BSA (bovine serum albumin) versehen und mittels Zusatz von 5% Serdolit CHE zuvor eisenfrei gemacht wurde, gemischt wird.

Zur Herstellung von Standard 1 werden 25 µl Eisen-NTA (1:7) (2 mM Eisen, 14 mM NTA) mit 475 µl α-MEM-BSA sorgfältig gemischt. Die restlichen Standards werden mittels Verdünnungsreihe in 1:1 Verdünnungsschritten hergestellt.

250 µl Standard 1 +	250 µl α-MEM-BSA	→ Standard 2
250 µl Standard 2 +	250 µl α-MEM-BSA	→ Standard 3
250 µl Standard 3 +	250 µl α-MEM-BSA	→ Standard 4
250 µl Standard 4 +	250 µl α-MEM-BSA	→ Standard 5
250 µl Standard 5 +	250 µl α-MEM-BSA	→ Standard 6
250 µl Standard 6 +	250 µl α-MEM-BSA	→ Standard 7
250 µl Standard 7 +	250 µl α-MEM-BSA	→ Standard 8
250 µl Standard 8 +	250 µl α-MEM-BSA	→ Standard 9

Tabelle 5: Herstellung der Eisenstandards für die Messung von redox-reaktivem Eisen mittels 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein

Anschließend erfolgt eine 30 minütige Inkubation der Standards sowie der Proben bei 37°C im Wasserbad.

3.15.3. Herstellung der Reaktionslösungen mit und ohne L1

Reaktionslösung ohne L1	Reaktionslösung mit L1
17,5 ml HBS	17,5 ml HBS
7,5 µl Ascorbinsäure, 400 mM (Merck)	7,5 µl mM Ascorbinsäure, 400 mM (Merck)
2,5 ml Dichlorodihydrofluorescein	2,5 ml Dichlorodihydrofluorescein
100 µl H ₂ O dest.	100 µl L1, 5 mM

Tabelle 6: Herstellung der Reaktionslösungen mit und ohne L1 für die Messung von redox-reaktivem Eisen mittels 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein

Vor deren Verwendung werden beide Reaktionslösungen im Wasserbad auf 37°C temperiert.

In eine schwarze 96-Well ELISA Platte (Greiner) werden je 20 µl der Standards sowie der unterschiedlichen eisenhaltigen Inkubationsmedien im Vierfachansatz pipettiert. Zu immer je zwei der vier Ansätze werden entweder 180 µl Reaktionslösung ohne L1 bzw. Reaktionslösung mit L1 pipettiert und die Platte bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre 90 Minuten inkubiert. Anschließend wird der Fluoreszenzanstieg alle fünf Minuten über einen Zeitraum von zwei Stunden bei 37°C in einem Fluoreszenzplattenlesegerät (Anthos Zenyth 3100) bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm gemessen. Die Platte verbleibt zwischen den einzelnen Messungen im Messgerät.

Die Auswertung der Daten erfolgt mittels des ,GraphPad Prism'-Programms.

3.16. SDS-PAGE und Western Blot

3.16.1. Probenvorbereitung

Für die Proben werden Zellpellets, wie im Kapitel 3. 11. Beschreiben, hergestellt und bei -20°C eingefroren, um eine erste Aufspaltung der Zellmembranen zu bewirken.

Anschließend werden die gefrorenen Pellets wieder aufgetaut und mit der entsprechend Menge Lysipuffer (Promega Cell Culture Lysis Reagent 5x), welcher zuvor 1:5 verdünnt und mit 1µl/ml PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)/DMSO versehen wurde, versetzt. Nachdem die Proben sorgfältig gevortex wurden, werden mit einer Ultraschallbehandlung von 20 Sekunden (Sonofier B-12 Cell Disrupter; Branson Sonic Power Company) die noch verbliebenen Zellen aufgesprengt und die Suspension 12 Minuten bei 10.000*g in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand entspricht nun dem Zelllysate, welches bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert wird.

Um die Proben für die Gelelektrophorese vorbereiten zu können, muss zunächst deren Proteingehalt mittels Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt werden, um die Proben jeweils auf einen Proteingehalt von 30 µg einzustellen. Damit die Proben dasselbe Endvolumen von 20 – maximal 30 µl haben, werden sie mit Sample Buffer ergänzt.

Ist das Volumen an eingesetztem Lysat, welches 30 µg Protein enthält, nahe dem Endvolumen von 20-30 µl, wird die Probe mit Sample Buffer 4x im Verhältnis 3:1 ergänzt. Wird jedoch nur wenig Lysat verwendet, ergänzt man mit Sample Buffer 2x im Verhältnis 1:1. Um schlussendlich das exakt gleiche Volumen zu erreichen, werden die Proben mit Sample Buffer 1x auf das endgültige Endvolumen ergänzt.

Zur Herstellung des Sample Buffers 2x werden

- 2,5 ml 1M Tris-HCl, pH 6,8 (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)
- 4,0 ml Glycerol (Merck)
- 1,0 g 10% SDS
- 1,0 ml 0,1% (w/v) Bromphenolblau (Pharmacia Biotech)

auf 20 ml mit dest. H₂O aufgefüllt.

Das so erhaltene Probenvolumen wird sorgfältig gevortext und 1 Minute bei 5000 rpm zentrifugiert.

3.16.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Methode der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wird diesem das anionische Detergens SDS (Natrium-Dodecylsulfat) zugesetzt, wodurch beinahe alle nicht-kovalenten Bindungen zerstört werden und es in weiterer Folge zu einer Entfaltung des Polypeptids kommt. Durch die Bindung von SDS an die denaturierten Polypeptide erhalten diese eine negative Ladung und wandern beim Anlegen eines elektrischen Feldes an das Gel zur Anode. Direkt proportional dem Molekulargewicht der Polypeptide erfolgt das Ausmaß der Bindung von SDS, wodurch die Proteine ihrer Größe entsprechend unterschiedlich weit wandern. Die Ladungen, die die Proteine ursprünglich hatten, spielen hierbei keine Rolle.

Dem Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine entsprechend werden unterschiedlich starke Trenn- und Sammelgele hergestellt. Für die Detektion der verwendeten Antigene eignet sich ein 10%iges Trenngel in Kombination mit einem 5%igen Sammelgel.

3.16.2.1. Gießen der Elektrophoresegele

Anfänglich müssen die verwendete Apparatur von BioRad, sowie die entsprechenden Glasplatten, die 1,5 mm Spacer und die 1,5 mm 10-Well-Kämme mit 70%igem Ethanol von Schmutz und Staub befreit werden. Sind alle Gegenstände wieder vollständig getrocknet, kann die Apparatur aufgebaut werden.

3. Material und Methoden

Für die Herstellung der Trenn-und Sammelgele werden folgende Bestandteile zusammenpipettiert:

	10%iges Trenngel (für 2 Gele)	5%iges Sammelgel (für 2 Gele)
dest. H ₂ O	10,6 ml	3,75 ml
ProSieve®50 Gel Solution ¹	4 ml	0,5 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	5 ml	/
1 M Tris-HCl, pH 6,8	/	0,65 ml
10% SDS-Solution ²	200 µl	50 µl
10% APS ³	200 µl	50 µl
TEMED ⁴	8 µl	5 µl

Tabelle 7: Pipettierschema für Polyacrylamidgele

¹ Cambrex

² Carl Roth GmbH & Co

³ Ammoniumpersulfat, Pharmacia Biotech

⁴ N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin, BioRad

Da APS und TEMED für den Start der Polymerisation der Gele verantwortlich sind, werden diese erst kurz vor dem Einfüllen der Gellösungen in die Apparatur zugegeben. Nachdem etwa 7 ml der Gellösung des 10%igen Trenngels eingefüllt wurden, werden diese mit 25%igem Isopropanol überschichtet und zur Polymerisation 30-60 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wird das Isopropanol vorsichtig ausgeleert und die sich zwischen den Glasplatten befindlichen Reste mit einem Filterpapier entfernt. Nachdem die 10-Well-Kämme zwischen den Glasplatten befestigt wurden, wird nun das Sammelgel gegossen, welches im ebenfalls 30-60 Minuten bei Raumtemperatur polymerisiert.

Im Anschluss werden die Kämme entfernt und die Probenauftragsstellen mit Hilfe einer Spritze mit Elektrophorese-Puffer gespült um danach die Proben entweder gleich aufzutragen, oder die Gele von feuchten Tüchern umhüllt bei 4°C zu lagern.

3.16.2.2. Elektrophorese

Das gesamte Volumen der vorbereiteten Proben wird nun mit speziellen Pipettenspitzen (Biozym) auf das Gel aufgetragen. Als Standard werden 5 µl Spectra Multicolor High Range Protein Ladder (Fermentas) eingesetzt.

Nachdem die Elektrophoreseapparatur mit Elektrophoresepuffer gefüllt wurde, läuft diese 35 Minuten bei 180 Volt und 4°C.

Herstellung des Elektrophoresepuffers

100 ml Tris-Tricin (10x) Puffer werden mit 10 ml 10% SDS auf einen Liter mit dest. H₂O aufgefüllt. (Der pH-Wert des Puffers darf nicht eingestellt werden.)

Herstellung des Tris-Tricin (10x) Puffers

121 g Tris (Merck) werden mit 179 g Tricin (Amresco) auf einen Liter mit dest. H₂O aufgefüllt. (Der pH-Wert des Puffers darf nicht eingestellt werden.)

Die verwendeten Puffer können mehrmals wiederverwendet werden.

3.16.3. Western Blot

Das Prinzip des Western Blots ist, dass die mit der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert werden. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Da bei dieser Prozedur das anionische Detergens SDS ausgewaschen wird, können die Proteine renaturieren und teilweise ihre ursprüngliche Sekundär- und Tertiärstruktur, nicht aber ihre Quartiärstruktur einnehmen. Über die anschließende Immunodetektion mit Antikörpern können die Proteine bestimmt werden.

Für den Western Blot wird das Stacking Gel des Polyacrylamidgels abgeschnitten und ein Stück Nitrozellulose mit einer Porengröße von 0,2 µm, welches zuvor in Blotpuffer getränkt wurde, auf das restliche Gel gelegt. Unter und oberhalb des Gels bzw. der Nitrozellulose befinden sich jeweils ein Stück Filterpapier und ein Schwamm, welche zuvor ebenfalls in Blotpuffer getränkt wurden. Das so erhaltene „Blotsandwich“ wird in

ein Support Pad geklemmt in die Blotapparatur (BioRad) gestellt. Zur Kühlung befindet sich während des Blottens ein Eisbehälter in der mit Blotpuffer gefüllten Apparatur. Das Blotten erfolgt 35 Minuten bei 0,5 Ampere bei 4°C.

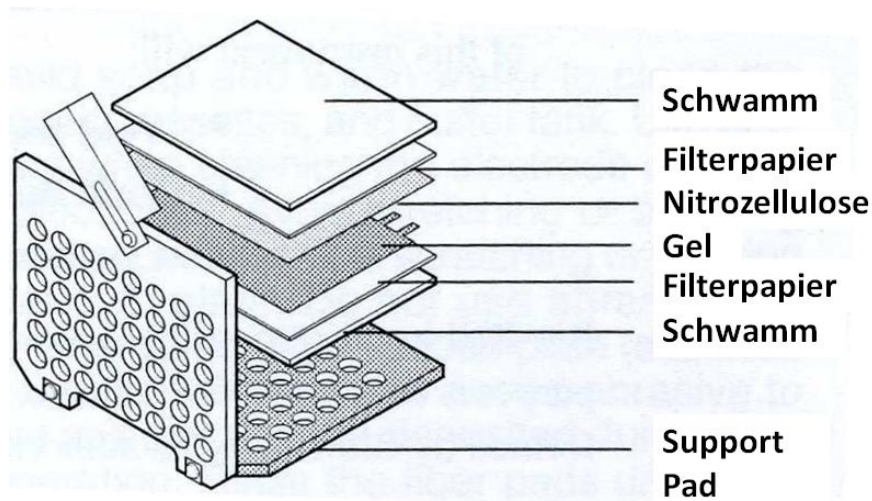


Abbildung 15: Schichtung eines Blotsandwiches. Quelle: Instruction Manual Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell, BioRad; (modifiziert)

Herstellung des Blotpuffers

- 100 ml Tris-Glycin (10x) Puffer
- 200 ml Methanol
- 200 µl 10% SDS

werden mit dest. H₂O auf einen Liter ergänzt. (Der pH-Wert des Puffers darf nicht eingestellt werden.)

Herstellung des Tris-Glycin (10x) Puffers

- 30 g Tris (Merck)
- 144 g Glycin (Amresco)

werden mit dest. H₂O auf einen Liter aufgefüllt. (Der pH-Wert des Puffers darf nicht eingestellt werden.)

3.16.4. Färben der Nitrozellulosemembran

Im Anschluss an das Blotten werden die Proteine auf der Nitrozellulosemembran mit 0,05%iger Ponceau-Lösung (Merck) gefärbt, und diese nach 2-3 minütiger Einwirkzeit vorsichtig mit dest. H₂O abgespült.

3.16.5. Immunodetektion

Um spezifische Proteine auf der Nitrozellulosemembran nachweisen zu können, erfolgt eine Inkubation mit bestimmten Antikörpern.

In einem ersten Schritt werden alle unspezifischen Bindungen mit Milchpulver blockiert, anschließend wird mit Hilfe eines ersten Antikörpers nach dem Zielprotein durch spezifische Bindung an das Epitop des nachzuweisenden Proteins gesucht. Nach mehreren Waschschritten mit Waschpuffer zur Entfernung von nicht gebundenem Antikörper wird die Nitrozellulosemembran mit einem zweiten Antikörper inkubiert, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist. Der zweite Antikörper hat das Enzym HRP (horseradish peroxidase) gekoppelt. Im Anschluss kann das Signal, welches durch die Freisetzung einer reaktiven Substanz aus Luminol durch das Enzym HRP produziert wird, mittels Chemilumineszenz-Detektor gemessen werden.

3.16.5.1. Blockieren der Nitrozellulosemembran

Das Blockieren erfolgt entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Dafür wird die Nitrozellulosemembran in 20 ml einer Blockierlösung (Waschpuffer mit 5% Milchpulver) gelegt und am Belly Dancer geschüttelt.

Herstellung des Waschpuffers:

Einem Liter PBS, pH 7,4 werden 500 µl 0,05% Tween 20 zugefügt.

Anschließend wird die Nitrozellulosemembran drei Mal mit 10-15 ml Waschpuffer je etwa zwei Minuten am Belly Dancer gewaschen.

3. Material und Methoden

3.16.5.2. Inkubation der Nitrozellulosemembran mit dem ersten Antikörper

Die Nitrozellulosemembran wird unter ständigem Schütteln über Nacht bei 4°C mit den jeweiligen ersten Antikörpern am Belly Dancer inkubiert.

Die jeweiligen Volumina der ersten Antikörper werden zu je 3 ml Waschpuffer mit 1% Milchpulver und 1% Natriumazid (NaN_3) pipettiert.

Antikörper	zuzusetzendes Volumen
Anti-Neurofilament 200 (Sigma-Aldrich), Rabbit: Verdünnung 1:2000	1,5 µl
Anti-β-Actin 127 (Sigma-Aldrich), Mouse: Verdünnung 1:15000	0,2 µl
Anti-Calnexin (abcam), Rabbit: Verdünnung 1:1500	2 µl
Anti-α-Actinin (monoclonal, sarkomer) (Sigma), Mouse: Verdünnung 1:800	3,75 µl
Anti-Caveolin-2 (Sigma), Rabbit: Verdünnung 1:1500	2 µl

Tabelle 8: Pipettierschema zur Herstellung der Inkubationslösung mit dem ersten Antikörper

Nach der Inkubation wird der erste Antikörper mit je etwa 10-15 ml Waschpuffer gewegewaschen:

2x 5 Minuten

1x 15 Minuten

2x 5 Minuten

3.16.5.3. Inkubation der Nitrozellulosemembran mit dem zweiten Antikörper

Die Inkubation des zweiten Antikörpers erfolgt für eine Stunde bei Raumtemperatur am Belly Dancer.

3. Material und Methoden

Zu 20 ml Waschpuffer mit 1% Milchpulver wird 1 µl des jeweiligen zweiten Antikörpers zugefügt.

Erster Antikörper	Zweiter Antikörper
Anti-Neurofilament 200 (Sigma-Aldrich), Rabbit: Verdünnung 1:2000	Goat Anti-Rabbit HRP (Dako), Verdünnung 1:20000
Anti-β-Actin 127 (Sigma-Aldrich), Mouse: Verdünnung 1:15000	Anti-Mouse (Dako), Verdünnung 1:20000
Anti-Calnexin (abcam), Rabbit: Verdünnung 1:1500	Goat Anti-Rabbit HRP (Dako), Verdünnung 1:20000
Anti-α-Actinin (monoclonal, sarkomer) (Sigma), Mouse: Verdünnung 1:800	Anti-Mouse (Dako), Verdünnung 1:20000
Anti-Caveolin-2 (Sigma), Rabbit: Verdünnung 1:1500	Goat Anti-Rabbit HRP (Dako), Verdünnung 1:20000

Tabelle 9: Pipettierschema zur Herstellung der Inkubationslösung mit dem zweiten Antikörper

Nach der Inkubation wird der zweite Antikörper mit je etwa 10-15 ml Waschpuffer gewegewaschen:

2x 5 Minuten

1x 15 Minuten

2x 5 Minuten

3.16.5.4. Detektion mit Chemilumineszenz

Vor der Belichtung der Nitrozellulosemembran werden zwei Lösungen (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate) von Millipore im Verhältnis 1:1 gemischt und die Nitrozellulosemembran fünf Minuten in diese Lösung gelegt. Nach Ablauf der Zeit erfolgt die Detektion der Lichtemission mittels Chemilumineszenz Detektor (Fusion Fx7 peqLab) bei unterschiedlichen Belichtungszeiten. Die detektierten Banden werden im Anschluss mit dem Programm ‚Chemilmager 4400‘ (Alpha Innotech) ausgewertet.

3.16.6. Strippen der Nitrozellulose

Um einen Blot zur Detektion einer anderen Bande wiederverwenden zu können, muss dieser durch den Vorgang des Strippens von anhaftenden Antikörpern befreit werden.

Dafür wird die Nitrozellulose in 20 ml Strippingpuffer am Belly Dancer inkubiert, wodurch sich die Antikörper ablösen.

Bei Proteinen, die auf der Nitrozellulosemembran in nicht sehr hohen Gehalten vorhanden sind, wird diese 30-60 Minuten mit einem Strippingpuffer (100 mM Glycin, pH 2,9) inkubiert.

Bei hohen Proteinmengen auf der Nitrozellulosemembran, an denen dementsprechend auch mehr Antikörper gebunden sind, wird ein aggressiverer Strippingpuffer benötigt, um die Antikörper ablösen zu können. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei Raumtemperatur.

15 g Glycin werden mit 10 ml SDS 10% und 10 ml Tween 20 auf einen Liter mit dest. H₂O aufgefüllt und der pH-Wert mit 5 M HCl auf 2,2 eingestellt.

Im Anschluss wird die Nitrozellulosemembran bei der ersten Methode für 2x 5 Minuten, 1x 15 Minuten und 2x 5 Minuten und bei der zweiten Methode zwei Mal je 30 Minuten mit Waschpuffer gewaschen, erneut mit Blockierlösung blockiert und mit erstem und zweitem Antikörper inkubiert.

3.17. Statistik

Die statistische Auswertung der erhaltenen Messdaten erfolgt mit dem Programm ‚GraphPad Prism‘. Um die statistischen Signifikanzen zu überprüfen, wurde ein zweiseitiger t-Test verwendet. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollen werden in den jeweiligen Graphiken mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) und *** ($p < 0,001$) angegeben.

Messdaten von Westernblots wurden mit dem Programm ‚Chemilmager 4400‘ (Alpha Innotech) ausgewertet.

4. Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die möglichen Effekte verschiedener Formen von nicht-Transferrin gebundenem Eisen auf Neuronen und Myokardzellen untersucht. Hierfür wurde als Modell die Stammzelllinie P19 verwendet, die wie im Teil „Material und Methoden“ in Kapitel 3.6. und 3.7. beschrieben zu Neuronen und Myokardzellen differenziert wurden, da diese Zellen auf nicht-Transferrin gebundenes Eisen sehr empfindlich reagieren und dieses in Zuständen von Eisenüberladung akkumulieren. [OUDIT et al., 2009]

4.1. Kontrolle der Differenzierung der embryonalen, murinen P19 Karzinomstammzellen zu Myokardzellen und Neuronen

Um nachzuweisen, dass die Differenzierung der Stammzellen zu myokardialen Zellen bzw. zu Neuronen vonstatten gegangen ist, wurden mit SDS-PAGE und Western Blot zellspezifische Marker detektiert.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ‚Chemilmager 4400‘ (Alpha Innotech).

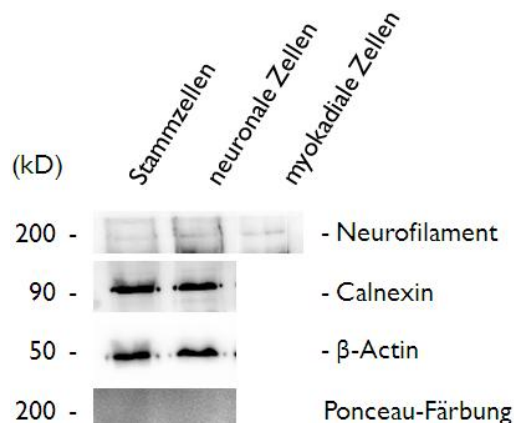


Abbildung 16: Typischer Blot zum Nachweis von Neurofilament bei Verwendung von β-Actin und Calnexin als Ladekontrolle bei neuronalen Zellen

Zelllysate von P19 Stammzellen sowie von ausdifferenzierten Neuronen und Myokardzellen wurden wie im Teil „Material und Methoden“ in Kapitel 3.16.1 beschrieben hergestellt, mittels 10%-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Neurofilament, β-Actin und Calnexin wurden mit Rabbit Anti-Neurofilament, Rabbit Anti-Calnexin und Mouse monoklonalem Anti-β-Actin sichtbar gemacht. Die entstandenen Banden wurden semiquantitativ ausgewertet. Calnexin und β-Actin dienten dabei als Ladekontrollen.

4. Ergebnisse und Diskussion

Sowohl durch die Immunodetektion mit dem Antikörper Anti-Neurofilament, der spezifisch das in Neuronen exprimierte Neurofilament bindet, als auch durch morphologische Betrachtung der Zellen kann gezeigt werden, dass die P19 Stammzellen vollständig zu Neuronen differenziert sind. [JONES-VILLENEUVE et al., 1982]

Die Expression von Neurofilament verdoppelte sich in den zu Neuronen differenzierten Zellen im Vergleich zu undifferenzierten Stammzellen relativ zu den Ladekontrollen (β -Actin und Calnexin), somit ist die Differenzierung der P19 Stammzellen in Neuronen erwiesen.

In differenzierten Myokardzellen konnte keine Veränderung der Expression an Neurofilament in Vergleich zu undifferenzierten Stammzellen beobachtet werden.

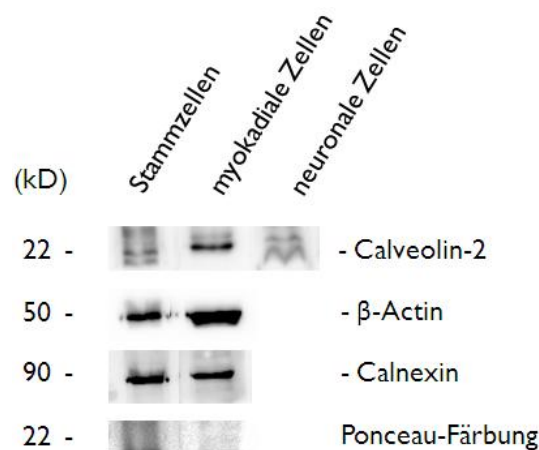


Abbildung 17: Typischer Blot zum Nachweis von Caveolin-2 bei Verwendung von Calnexin als Ladekontrolle bei myokardialen Zellen

Zelllysate von P19 Stammzellen sowie von ausdifferenzierten Myokardzellen und Neuronen wurden wie im Teil „Material und Methoden“ in Kapitel 3.16.1 beschrieben hergestellt, mittels 10%-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Caveolin-2, β -Actin und Calnexin wurden mit Rabbit Anti-Caveolin-2, Rabbit Anti-Calnexin und Mouse monoklonalem Anti- β -Actin sichtbar gemacht. Die entstandenen Banden wurden semiquantitativ ausgewertet. Calnexin diente dabei als Ladekontrolle.

Der Nachweis der Differenzierung von P19 Stammzellen zu Myokardzellen erfolgte über die Verwendung des Antikörpers Anti-Caveolin-2 als zellspezifischen Marker zur Detektion von Myokardzellen. [RYBIN et al., 2003] Als Ladekontrolle wurde Anti-

4. Ergebnisse und Diskussion

Calnexin herangezogen. Im Vergleich zu undifferenzierten Stammzellen hat sich die Expression an Caveolin-2 nahezu verdreifacht. Auch morphologisch konnte die Differenzierung zu Herzzellen beobachtet werden.

Die Expression an Caveolin-2 in differenzierten neuronalen Zellen unterschied sich von der der Stammzellen nicht.

Die Verwendung von β -Actin als Ladekontrolle war nicht möglich, da die Expression während der Differenzierung unerwarteter Weise nicht stabil war und sich verdoppelte. Dieser Effekt wurde eventuell deshalb beobachtet, da es sich bei dem Antikörper von SIGMA um einen monoklonalen Antikörper handelt, welcher nur ein Epitop erkennt, welches bei den myokardialen Zellen scheinbar höher exprimiert war. Daher wurde in weiterer Folge mit Calnexin als Ladekontrolle gearbeitet.

4.2. Quantitative Messung der Zellproliferation nach erfolgter Differenzierung

Da zur Bestimmung des Einflusses von nicht-Transferrin gebundenem Eisen Toxizitätstests durchgeführt wurden, war es notwendig zu klären, ob die Zellen nach erfolgter Differenzierung weiter proliferieren. Bei weiterer Proliferation der Zellen wären die Ergebnisse der Toxizitätstest in Vergleich zu einer ausbleibenden weiteren Proliferation anders zu interpretieren.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit Hilfe des Programms ‚GraphPad Prism‘.

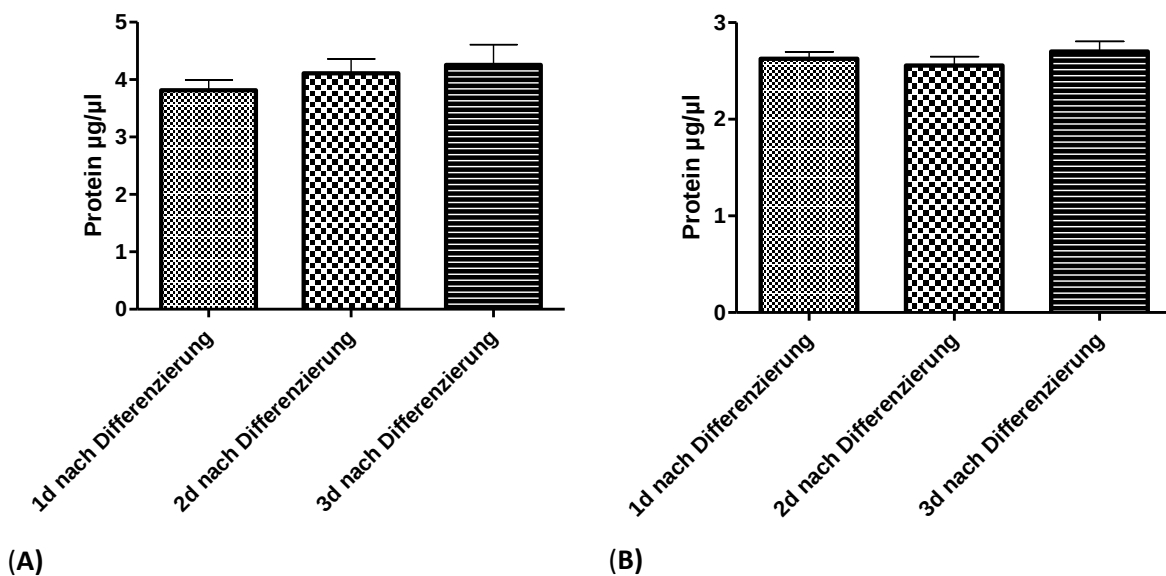


Abbildung 18: Quantitative Messung der Zellproliferation nach Differenzierung der Stammzellen zu myokardialen Zellen (A) und zu neuronalen Zellen (B)

Die Bestimmung der weiteren Zellproliferation nach stattgefundenener Differenzierung erfolgte mittels Proteinbestimmung, welche im Teil „Material und Methoden“ in Kapitel 3.12. beschrieben wird. Die Zelllysate aus Myokardzellen bzw. Neuronen wurden wie in Kapitel 3.11.2. beschrieben jeweils am ersten, zweiten und dritten Tag nach abgeschlossener Differenzierung hergestellt. Die einzelnen Balken zeigen Mittelwerte $\pm$ SEM (n=3)

Den Abbildungen ist zu entnehmen, dass weder bei ausdifferenzierten Myokardzellen noch bei neuronalen Zellen signifikante Unterschiede im Proteingehalt am zweiten und dritten Tag nach der Differenzierung verglichen mit dem ersten Tag nach Abschluss der Differenzierung vorhanden sind und eine weitere Zellproliferation nach vollständiger

4. Ergebnisse und Diskussion

Differenzierung daher in der Zeitspanne, in der die Experimente durchgeführt wurden, auszuschließen ist.

Daher kann bei der Interpretation der nachfolgenden Versuche davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Effekte durch die Inkubationen mit verschiedenen Substanzen nicht durch eine Veränderung der Zellmasse verfälscht worden sind.

4.3. Einfluss von nicht-Transferrin gebundenem Eisen auf myokardiale Zellen und Neuronen

4.3.1. Toxizität von nicht-Transferrin gebundenem Eisen auf myokardiale Zellen und Neuronen

Über den chemischen Aufbau von NTBI ist wenig bekannt trotz der wichtigen Rolle des Eisens in pathophysiologischen Zuständen wie Eisenüberladung. [BREUER et al., 2000]

Spekuliert wird, dass NTBI aus einem heterogenen Komplexmix besteht. Eine Reihe potentieller Liganden zur Eisenbindung sind im Plasma verfügbar, unter anderem Ziträt und Acetat [LENTNER, 1984], des weiteren Phosphat, Ascorbat und ATP; das in diesen Komplexen enthaltene Fe^{3+} ist redox-aktiv. [BRADBURY, 1997]

Ammonium Eisen(III)-Ziträt und Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure sind Verbindungen, die häufig dazu verwendet werden, Zellen mit Eisen zu beladen und anschließend die zelluläre Eisenaufnahme zu messen. [PARKES et al., 1995]

4.3.1.1. Einfluss der Inkubation mit Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure (NTA) im Verhältnis 1:4 auf die Viabilität von Myokardzellen und neuronalen Zellen

Ziel dieses Versuchs war es, aufzuzeigen, welchen Effekt die Inkubation mit Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure in Neuronen und Myokardzellen im Vergleich zu Kontrollzellen erzielt.

Die Zellen wurden mit Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure im Verhältnis 1:4 24 Stunden inkubiert. Die Viabilität der Zellen wurde jeweils im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen mittels MTT-Test ermittelt.

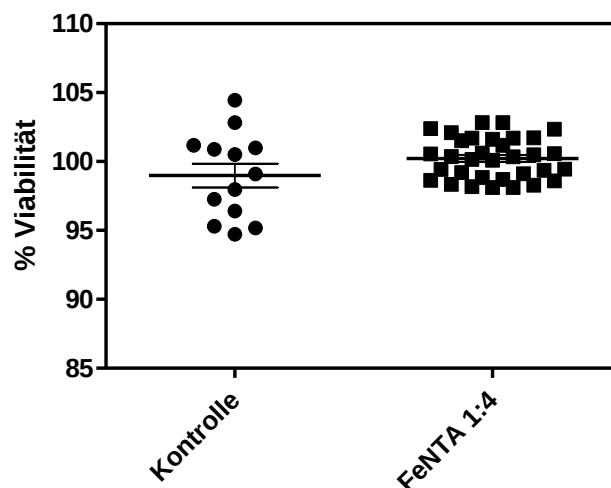


Abbildung 19: Einfluss der Inkubation mit Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure im Verhältnis 1:4 auf die Viabilität von Myokardzellen

Die in 96-Well-Platten ausgesetzten, vollständig differenzierten myokardialen Zellen wurden in komplettiertem Nährmedium (7,5% CS; 2,5% FCS; 1% Glutamin; 1% non essential amino acids; 0,1% Gentamycin) mit Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure im Verhältnis 1:4 in einer Konzentration von 100 μ M Eisen 24 Stunden bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Der Komplex wurde jeweils frisch aus den sterilen Stammlösungen Eisen(III)-Chlorid (100 mM) und Nitrilotriessigsäure (Tritriplex I) (100 mM) gebildet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde ein MTT-Test wie im Teil „Material und Methoden“ in Kapitel 3.14.1. beschrieben, durchgeführt. Gezeigt sind die einzelnen Messwerte (n=13 und 33) sowie die Mittelwerte $\pm$ SEM, die in drei voneinander unabhängigen Versuchen erhoben wurden.

4. Ergebnisse und Diskussion

Wie in Abbildung 19 deutlich ersichtlich, führte die Inkubation von Myokardzellen mit Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure im Verhältnis 1:4 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen zu keinem Unterschied in der gemessenen Viabilität.

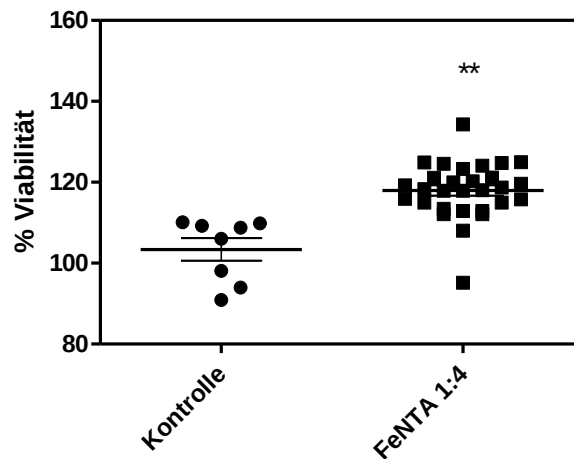


Abbildung 20: Einfluss der Inkubation mit Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure im Verhältnis 1:4 auf die Viabilität von neuronalen Zellen

Die in 96-Well-Platten ausgesetzten, vollständig zu Neuronen differenzierten Zellen wurden in komplettiertem Nährmedium (7,5% CS; 2,5% FCS; 1% Glutamin; 1% non essential amino acids; 0,1% Gentamycin) mit Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure im Verhältnis 1:4 in einer Konzentration von 100 μ M Eisen 24 Stunden bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Weitere Legende siehe Abbildung 19.

Gezeigt sind die einzelnen Messwerte (n=8 und 29) sowie die Mittelwerte $\pm$ SEM, die in drei voneinander unabhängigen Versuchen erhoben wurden.

Die Inkubation mit Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure im Verhältnis 1:4 wirkte sich bei neuronalen Zellen im Unterschied zu Myokardzellen in einer unerwarteten Zunahme der Zellviabilität aus. Ein Grund für diese Beobachtung könnte die verbesserte zelluläre Eisenverfügbarkeit aufgrund der Beladung der Zellen mit Eisen sein.

Die Viabilität der mit Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure inkubierten Neuronen stieg um 15% an.

4.3.1.2. Einfluss der Inkubation mit Ammoniumeisen(III)-Zitrat (FAC) auf die Viabilität von Myokardzellen und neuronalen Zellen

Um den Einfluss einer Inkubation mit Ammoniumeisen(III)-Zitrat auf myokardiale und neuronale Zellen zu zeigen, wurde dieses Experiment im Vergleich mit unbehandelten Kontrollzellen durchgeführt.

Dafür wurden differenzierte Zellen mit Ammoniumeisen(III)-Zitrat 24 Stunden inkubiert und eine Veränderung der Viabilität im Vergleich zur Kontrolle ermittelt.

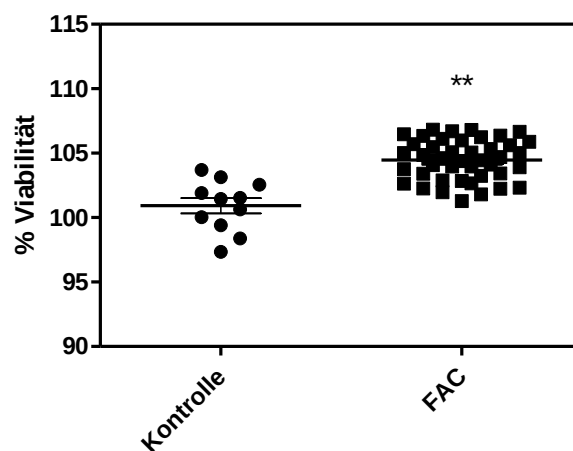


Abbildung 21: Einfluss der Inkubation mit Ammoniumeisen(III)-Zitrat auf die Viabilität von myokardialen Zellen

Die in 96-Well-Platten ausgesetzten, vollständig differenzierten myokardialen Zellen wurden in komplettiertem Nährmedium (7,5% CS; 2,5% FCS; 1% Glutamin; 1% non essential amino acids; 0,1% Gentamycin) mit Ammoniumeisen(III)-Zitrat in einer Konzentration von 100 μ M Eisen bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre 24 Stunden inkubiert. Weitere Legende siehe Abbildung 19. Gezeigt sind die einzelnen Messwerte (n=11 und 43) sowie die Mittelwerte $\pm$ SEM, die in drei voneinander unabhängigen Versuchen erhoben wurden.

Die Inkubation von Myokardzellen mit Ammoniumeisen(III)-Zitrat resultiert in einer leicht verbesserten Viabilität im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Die Steigerung beträgt im Durchschnitt 4%.

Wiederum könnte ein Grund für die verbesserte Viabilität die erhöhte zelluläre Eisenverfügbarkeit aufgrund der Beladung der Zellen mit Eisen sein.

4. Ergebnisse und Diskussion

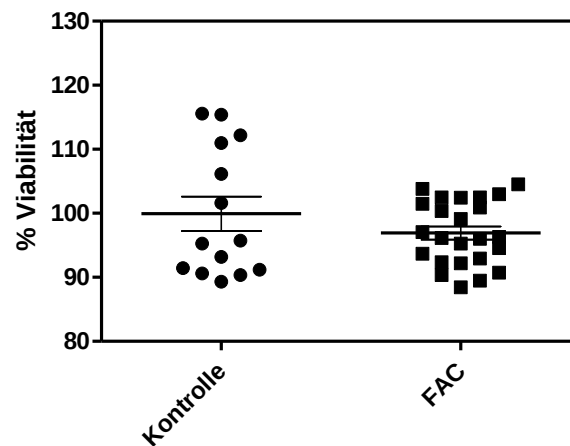


Abbildung 22: Einfluss der Inkubation mit Ammoniumeisen(III)-Zitrat auf die Viabilität von Neuronen

Die in 96-Well-Platten ausgesetzten, vollständig differenzierten Neuronen wurden in komplettiertem Nährmedium (7,5% CS; 2,5% FCS; 1% Glutamin; 1% non essential amino acids; 0,1% Gentamycin) mit Ammoniumeisen(III)-Zitrat in einer Konzentration von 100 μ M Eisen bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre 24 Stunden inkubiert. Weitere Legende siehe Abbildung 19. Gezeigt sind die einzelnen Messwerte (n=14 und 24) sowie die Mittelwerte $\pm$ SEM, die in drei voneinander unabhängigen Versuchen erhoben wurden.

Im Unterschied zur Inkubation von myokardialen Zellen resultiert die Inkubation mit Ammoniumeisen(III)-Zitrat bei Neuronen in keinem zu beobachtenden Effekt auf die Viabilität im Vergleich zu nicht behandelten Kontrollzellen.

4.3.1.3. Einfluss der Inkubation mit Eisen(III)-Zitrat in unterschiedlichen molaren Verhältnissen von Eisen zu Zitrat auf die Viabilität von Myokardzellen und neuronalen Zellen

Mit diesem Versuch soll gezeigt werden, wie sich die Inkubation mit Eisen(III)-Zitrat-Komplexen in verschiedenen molaren Verhältnissen auf die Viabilität von Myokardzellen und Neuronen im Vergleich zu Kontrollzellen auswirkt.

Die Zellen wurden mit Eisen(III)-Zitrat in verschiedenen molaren Verhältnissen von Eisen zu Zitrat 24 Stunden inkubiert. Die Viabilität der Zellen wurde mit Hilfe eines MTT-Tests ermittelt.

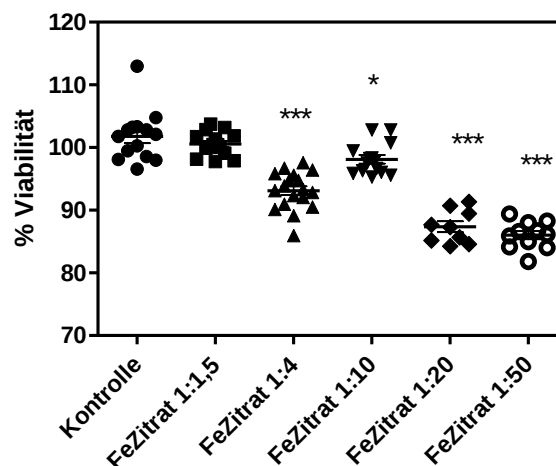


Abbildung 23: Einfluss der Inkubation mit 100 μ M Eisen(III)-Zitrat in unterschiedlichen molaren Verhältnissen auf die Viabilität von Myokardzellen

Die in 96-Well-Platten ausgesetzten, zu Myokardzellen differenzierten P19-Zellen wurden in komplettiertem Nährmedium (7,5% CS; 2,5% FCS; 1% Glutamin; 1% non essential amino acids; 0,1% Gentamycin) mit Eisen(III)-Zitrat-Komplexen in einer Konzentration von 100 μ M Eisen in den molaren Verhältnissen Eisen zu Zitrat von 1:1.5, 1:4, 1:10, 1:20 und 1:50 bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre 24 Stunden inkubiert. Die jeweiligen Komplexe wurden vor der Inkubation immer frisch aus den sterilen Stammlösungen Tri-Natriumzitrat-Dihydrat (100 mM) und Eisen(III)-Chlorid (100 mM) hergestellt. Weitere Legende siehe Abbildung 19. Gezeigt sind die einzelnen Messwerte (n=9-18) sowie die Mittelwerte $\pm$ SEM, die in drei voneinander unabhängigen Versuchen erhoben wurden.

Abbildung 23 zeigt sehr deutlich, dass die Viabilität der Myokardzellen, welche mit Eisen(III)-Zitrat 24 Stunden inkubiert wurden, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei steigendem Verhältnis von Zitrat zu Eisen bei einer fixen Eisenkonzentration geringer wird. Demzufolge ist der stärkste Effekt –also die geringste Viabilität– bei einem Verhältnis von Eisen zu Zitrat von 1:50 zu beobachten, der Unterschied zu den Kontrollzellen beträgt hier 15%.

Nachdem bei der Proteinbestimmung von Zelllysaten ausdifferenzierter Zellen keine signifikanten Unterschiede in der Proteinmenge festgestellt wurden und daher die weitere Zellproliferation nach Ausdifferenzierung der Zellen ausgeschlossen werden kann (siehe Abbildung 18), könnte der beobachtete Effekt auf die Toxizität der Eisen-Zitrat-Komplexe zurückgeführt werden und nicht etwa auf eine verringerte zelluläre Eisenverfügbarkeit durch die Chelatierung des Eisens mittels Zitrat, wodurch es für eine weitere Zellproliferation nicht mehr zur Verfügung stehen würde. Daher wurde in weiterer Folge der zelluläre Eisengehalt von differenzierten Myokardzellen und Neuronen gemessen. (siehe Abbildung 25)

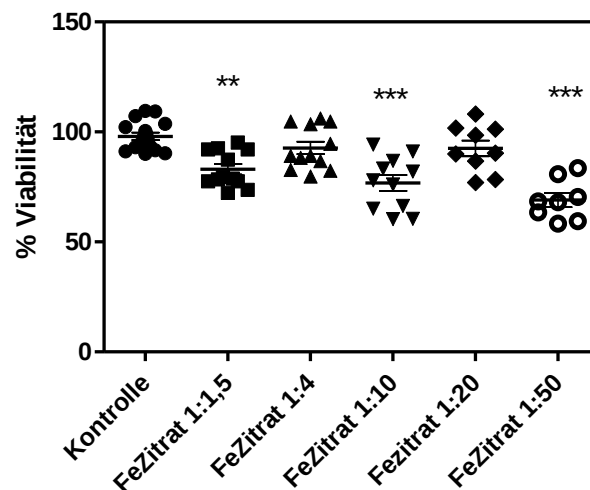


Abbildung 24: Einfluss der Inkubation mit 100 μ M Eisen(III)-Zitrat in unterschiedlichen molaren Verhältnissen auf die Viabilität von neuronalen P19-Zellen

Die in 96-Well-Platten ausgesetzten, vollständig zu Neuronen differenzierten P19-Zellen wurden in komplettiertem Nährmedium (7,5% CS; 2,5% FCS; 1% Glutamin; 1% non essential amino acids; 0,1% Gentamycin) mit Eisen(III)-Zitrat-Komplexen in einer Konzentration von 100 μ M Eisen in den Verhältnissen Eisen zu Zitrat von 1:1,5, 1:4, 1:10, 1:20 und 1:50 bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre 24

4. Ergebnisse und Diskussion

Stunden inkubiert. Weitere Legende siehe Abbildung 23. Gezeigt sind die einzelnen Messwerte (n=8-16) sowie die Mittelwerte $\pm$ SEM, die in drei voneinander unabhängigen Versuchen erhoben wurden.

Ebenso wie bei der Inkubation von Myokardzellen zeigt sich auch in Abbildung 24, dass die Inkubation von neuronalen Zellen mit Eisen(III)-Zitrat die Viabilität der Zellen umso mehr verringert, je höher der Gehalt an Zitrat in den Eisen(III)-Zitrat-Komplexen ist.

Der stärkste Effekt wird dementsprechend wiederum bei dem Verhältnis Eisen zu Zitrat von 1:50 beobachtet, hier ist die Viabilität der Neuronen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um 30% geringer.

4.3.2. Messung des zellulären Eisengehaltes nach Beladung der Zellen mit NTBI

Im Gegensatz zu zweiwertigem Eisen, welches stark wasserlöslich ist, ist dreiwertiges Eisen in Wasser beinahe unlöslich (Löslichkeitsprodukt 10^{-39} M). Signifikante Konzentrationen an in Wasser gelösten, dreiwertigen Eisenspezies können nur durch starke Komplexbildung erreicht werden [CRICHTON, 2001], um eine Präzipitation von unlöslichem Eisen(III)-Hydroxid zu vermeiden. [EVANS et al., 2008]

Aus diesem Grund war es nötig, eine Komplexbildung des dreiwertigen Eisens mit den Liganden Zitrat bzw. Nitritotriessigsäure zu forcieren, um dieses in Lösung zu halten.

Aus der Literatur ist bekannt, dass bei Verhältnissen von Eisen zu Zitrat zwischen 1:10 und 1:1000 bei einem pH-Wert von 7,4 die Komplexe stabil sind und keine Präzipitate beobachtet werden können.

Einzig bei einem Verhältnis von Eisen zu Zitrat von 1:1 konnten Präzipitate festgestellt werden. [EVANS et al., 2008]

Daraus ist zu schließen, dass das Verhältnis 1:1,5 von Eisen zu Zitrat das Niedrigste darstellt, um die Lösung des dreiwertigen Eisens zu sichern.

4.3.2.1. Messung des zellulären Eisengehaltes bei Beladung von Myokardzellen und Neuronen mit Eisen(III)-Zitrat, Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure und Ammoniumeisen(III)-Zitrat

Um zu messen, bei welchen molaren Verhältnissen von Eisen zu Zitrat bzw. ob bei Inkubation mit Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure und Ammoniumeisen(III)-Zitrat die ausdifferenzierten Zellen imstande sind, Eisen aufzunehmen, wurde dieser Versuch durchgeführt.

Die differenzierten Myokardzellen bzw. Neuronen wurden 24 Stunden mit Eisen(III)-Zitrat-Komplexen in unterschiedlichen molaren Verhältnissen von Eisen zu Zitrat bzw. mit Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure und Ammoniumeisen(III)-Zitrat inkubiert. Die Messung der Eisenaufnahme erfolgte mit der Ferrozin-Methode, der ermittelte Eisengehalt wurde mit dem Proteingehalt in Verhältnis gesetzt.

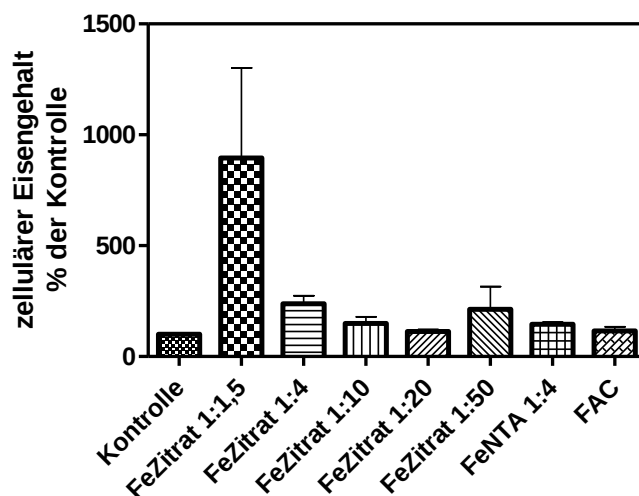


Abbildung 25: Zellulärer Eisengehalt bei Beladung von Myokardzellen mit Eisen(III)-Zitrat, Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure und Ammoniumeisen(III)-Zitrat

Differenzierte myokardiale Zellen wurden in komplettiertem Nährmedium (7,5% CS; 2,5% FCS; 1% Glutamin; 1% non essential amino acids; 0,1% Gentamycin) mit Eisen(III)-Zitrat-Komplexen in den molaren Verhältnissen Eisen zu Zitrat von 1:1,5, 1:4, 1:10, 1:20 und 1:50, mit Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure im molaren Verhältnis Eisen zu Nitrilotriessigsäure von 1:4 und mit Ammoniumeisen(III)-Zitrat jeweils in den Konzentrationen von 100 µM Eisen bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre 24 Stunden inkubiert. Die jeweiligen Komplexe wurden vor der Inkubation immer frisch aus

4. Ergebnisse und Diskussion

sterilen Stammlösungen hergestellt. Für die Eisen(III)-Zitrat-Komplexe wurden die Stammlösungen Tri-Natriumzitrat-Dihydrat (100 mM) und Eisen(III)-Chlorid (100 mM) herangezogen, für den Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure-Komplex wurden die Stammlösungen Eisen(III)-Chlorid (100 mM) und Nitrilotriessigsäure (Tritriplex I) (100 mM) verwendet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden wie im Teil „Material und Methoden“ in Kapitel 3.11.1. beschrieben Zelllysate hergestellt. Mit diesen wurden im Anschluss eine Eisenbestimmung und eine Proteinbestimmung durchgeführt. Die einzelnen Balken zeigen Mittelwerte $\pm$ SEM, die in drei voneinander unabhängigen Versuchen erhoben wurden. Die Standardabweichungen der Werte der Kontrolle, FeZitrat 1:20 und FeNTA 1:4 sind so gering, dass sie auf der Graphik nicht zu erkennen sind.

Messwerte wurden in % der Kontrollen angegeben (Kontrolle=100%).

Absolute Mittelwerte [ng Eisen/ μ g Protein]: Kontrolle: 0,118; Eisen(III)-Zitrat, 1:1.5: 0,749; Eisen(III)-Zitrat, 1:4: 0,379; Eisen(III)-Zitrat, 1:10: 0,178; Eisen(III)-Zitrat, 1:20: 0,138; Eisen(III)-Zitrat, 1:50: 0,125; Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure: 0,548, Ammoniumeisen(III)-Zitrat: 0,070;

Aus Abbildung 25 ist zu entnehmen, dass myokardiale Zellen bei Inkubation mit Eisen(III)-Zitrat im molaren Verhältnis Eisen zu Zitrat von 1:1.5 Eisen aufnehmen können. Hier verneunfachte sich der durchschnittliche Eisengehalt im Vergleich zur Kontrolle. Bei den restlichen Inkubationsmedien ist im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle kein signifikant erhöhter Eisengehalt zu beobachten.

4. Ergebnisse und Diskussion

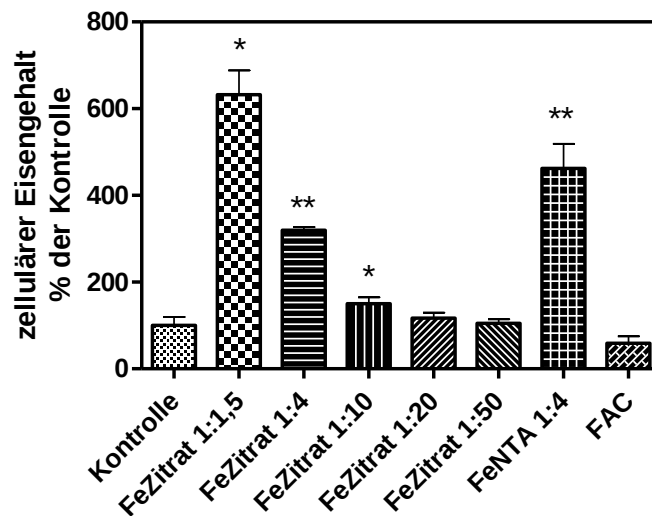


Abbildung 26: Zellulärer Eisengehalt bei Beladung von Neuronen mit Eisen(III)-Zitrat, Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure und Ammoniumeisen(III)-Zitrat

Differenzierte neuronale P19-Zellen wurden in komplettiertem Nährmedium (7,5% CS; 2,5% FCS; 1% Glutamin; 1% non essential amino acids; 0,1% Gentamycin) mit Eisen(III)-Zitrat-Komplexen in den molaren Verhältnissen Eisen zu Zitrat von 1:1,5, 1:4, 1:10, 1:20 und 1:50, mit Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure im molaren Verhältnis Eisen zu Nitrilotriessigsäure von 1:4 und mit Ammoniumeisen(III)-Zitrat jeweils in den Konzentrationen von 100 μ M Eisen bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre 24 Stunden inkubiert. Weitere Legende siehe Abbildung 25. Die einzelnen Balken zeigen Mittelwerte $\pm$ SEM, die in drei voneinander unabhängigen Versuchen erhoben wurden.

Messwerte wurden in % der Kontrollen angegeben (Kontrolle=100%).

Absolute Mittelwerte [ng Eisen/ μ g Protein]: Kontrolle: 0,764; Eisen(III)-Zitrat, 1:1,5: 3,103; Eisen(III)-Zitrat, 1:4: 0,825; Eisen(III)-Zitrat, 1:10: 0,520; Eisen(III)-Zitrat, 1:20: 0,392; Eisen(III)-Zitrat, 1:50: 0,737; Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure: 0,506; Ammoniumeisen(III)-Zitrat: 0,064;

Auf Abbildung 26 ist deutlich zu erkennen, dass Neuronen bei Inkubation mit Eisen(III)-Zitrat mit den molaren Verhältnissen Eisen zu Zitrat von 1:1,5, 1:4 und 1:10 und bei Inkubation mit Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure (1:4) imstande sind, Eisen aufzunehmen.

Beim Verhältnis 1:1,5 von Eisen zu Zitrat versechsfachte sich der mittlere zelluläre Eisengehalt, beim Verhältnis 1:4 ist eine Verdreifachung zu beobachten und beim Verhältnis 1:10 ist eine Erhöhung um 50% zu verzeichnen.

Durch die Inkubation mit Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure konnte eine Steigerung des zellulären Eisengehaltes auf das viereinhalbfache beobachtet werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

Bei Inkubation der Zellen mit Eisen(III)-Zitrat mit den molaren Verhältnissen Eisen zu Zitrat von 1:20 und 1:50, sowie bei Inkubation mit Ammoniumeisen(III)-Zitrat kann im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen kein signifikant erhöhter Eisengehalt beobachtet werden.

4.3.2.2. Abhängigkeit des zellulären Eisengehaltes von der Zitratkonzentration

bei Inkubation von differenzierten Myokardzellen und Neuronen mit Eisen(III)-

Zitrat

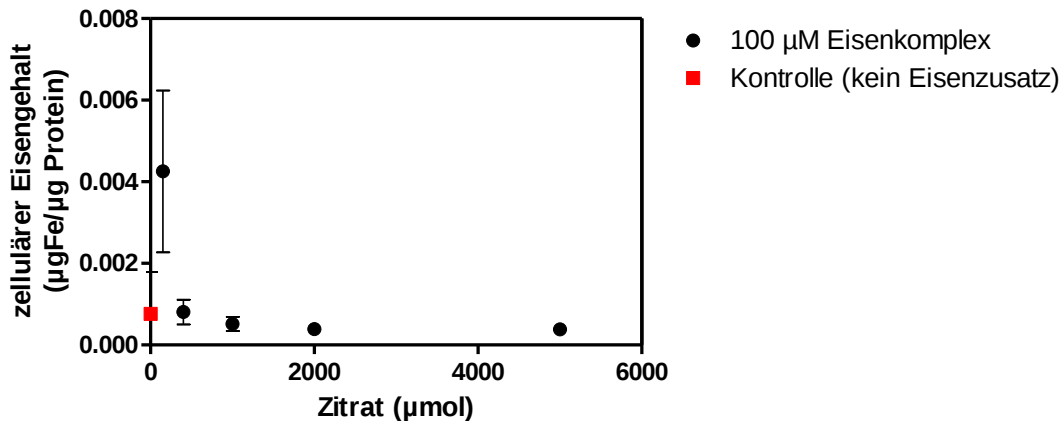


Abbildung 27: Abhängigkeit des zellulären Eisengehaltes von der Zitratkonzentration bei Inkubation von Myokardzellen mit Eisen(III)-Zitrat-Komplexen

Differenzierte P19-Myokardzellen wurden in komplettiertem Nährmedium (7,5% CS; 2,5% FCS; 1% Glutamin; 1% non essential amino acids; 0,1% Gentamycin) mit Eisen(III)-Zitrat-Komplexen in einer Konzentration von 100 µM Eisen in den molaren Verhältnissen Eisen zu Zitrat von 1:1,5, 1:4, 1:10, 1:20 und 1:50 bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre 24 Stunden inkubiert. Die jeweiligen Komplexe wurden vor der Inkubation immer frisch aus den sterilen Stammlösungen Tri-Natriumzitrat-Dihydrat (100 mM) und Eisen(III)-Chlorid (100 mM) hergestellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden wie im Teil „Material und Methoden“ in Kapitel 3.11.1. beschrieben Zelllysate hergestellt. Mit diesen wurde im Anschluss eine Eisenbestimmung und Proteinbestimmung durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM, die in drei voneinander unabhängigen Versuchen erhoben wurden. Die Standardabweichungen der Proben, welche mit Eisen(III)-Zitrat-Komplexen in molaren Verhältnissen von 1:20 bzw. 1:50 inkubiert wurden, sind so gering, dass die auf der Graphik nicht zu erkennen sind.

Wie aus Abbildung 27 abzulesen, nehmen differenzierte P19-Myokardzellen bei der Inkubation mit dem Eisen(III)-Zitrat-Komplex bei einem molaren Verhältnis von Eisen zu Zitrat von 1:1,5 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen Eisen auf. Bei den Verhältnissen von 1:4, 1:10, 1:20 und 1:50 ist kein solcher Effekt zu beobachten.

4. Ergebnisse und Diskussion

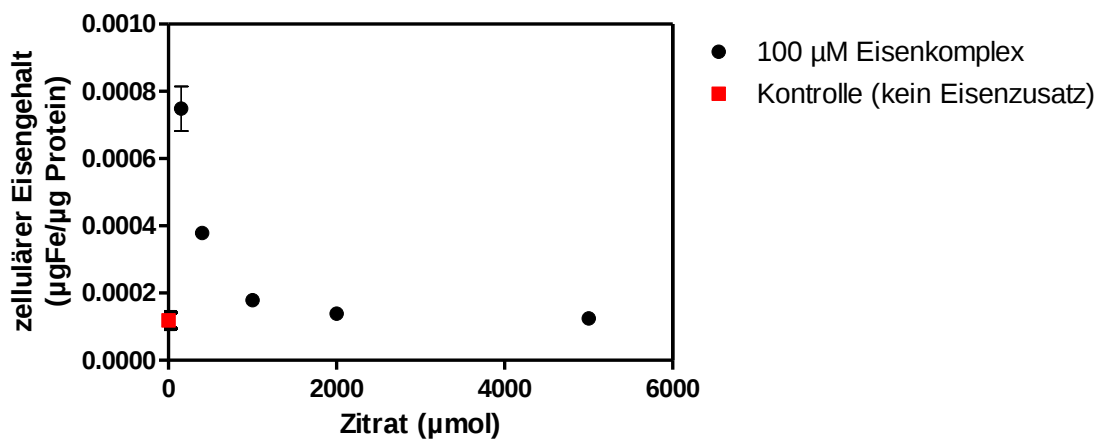


Abbildung 28: Abhängigkeit des zellulären Eisengehaltes von der Zitratkonzentration bei Inkubation von neuronalen P19-Zellen mit Eisen(III)-Zitrat-Komplexen

Differenzierte neuronale P19-Zellen wurden in komplettiertem Nährmedium (7,5% CS; 2,5% FCS; 1% Glutamin; 1% non essential amino acids; 0,1% Gentamycin) mit Eisen(III)-Zitrat-Komplexen der Konzentration von 100 µM Eisen in den molaren Verhältnissen Eisen zu Zitrat von 1:1,5, 1:4, 1:10, 1:20 und 1:50 bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre für 24 Stunden inkubiert. Weitere Legende siehe Abbildung 27. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM, die in drei voneinander unabhängigen Versuchen erhoben wurden. Die Standardabweichungen der Proben, welche mit Eisen(III)-Zitrat-Komplexen in den molaren Verhältnissen von 1:4, 1:10, 1:20 und 1:50 inkubiert wurden, sind so gering, dass die auf der Graphik nicht zu erkennen sind.

Bei neuronalen P19-Zellen ergibt sich ein ähnliches Bild zu dem der Myokardzellen. Die zelluläre Eisenaufnahme ist bei Inkubation mit dem Eisen(III)-Zitrat-Komplex bei einem molaren Verhältnis von Eisen zu Zitrat von 1:1,5 (dies entspricht 150 µM Zitrat) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen am stärksten zu beobachten, auch bei einem Verhältnis von Eisen zu Zitrat von 1:4 und 1:10 sind Neuronen noch in der Lage, Eisen aufzunehmen. Bei den molaren Verhältnissen von 1:20 und 1:50 ist keine Eisenaufnahme zu beobachten.

Dies wird vermutlich durch die starke Chelatierung des Eisens durch Zitrat bedingt, wodurch es für die zelluläre Aufnahme nicht mehr zur Verfügung steht.

4.3.3. Bestimmung von redox-aktivem Eisen in den jeweiligen Inkubationsmedien

Da beobachtet wurde, dass die toxische Wirkung von Eisen(III)-Zitrat-Komplexen in höheren molaren Verhältnissen von Eisen zu Zitrat auf Myokardzellen sowie auf Neuronen unerwarteterweise zunimmt, obwohl sich der zelluläre Eisengehalt bei Inkubation nur bei niedrigen molaren Verhältnissen erhöht, wurde der Gehalt an redox-aktivem Eisen in den Inkubationsmedien untersucht, da die einzelnen Komplexe theoretisch unterschiedliche Mengen an redox-aktivem Eisen enthalten können.

Die Messung erfolgte mit 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCDHF).

4. Ergebnisse und Diskussion

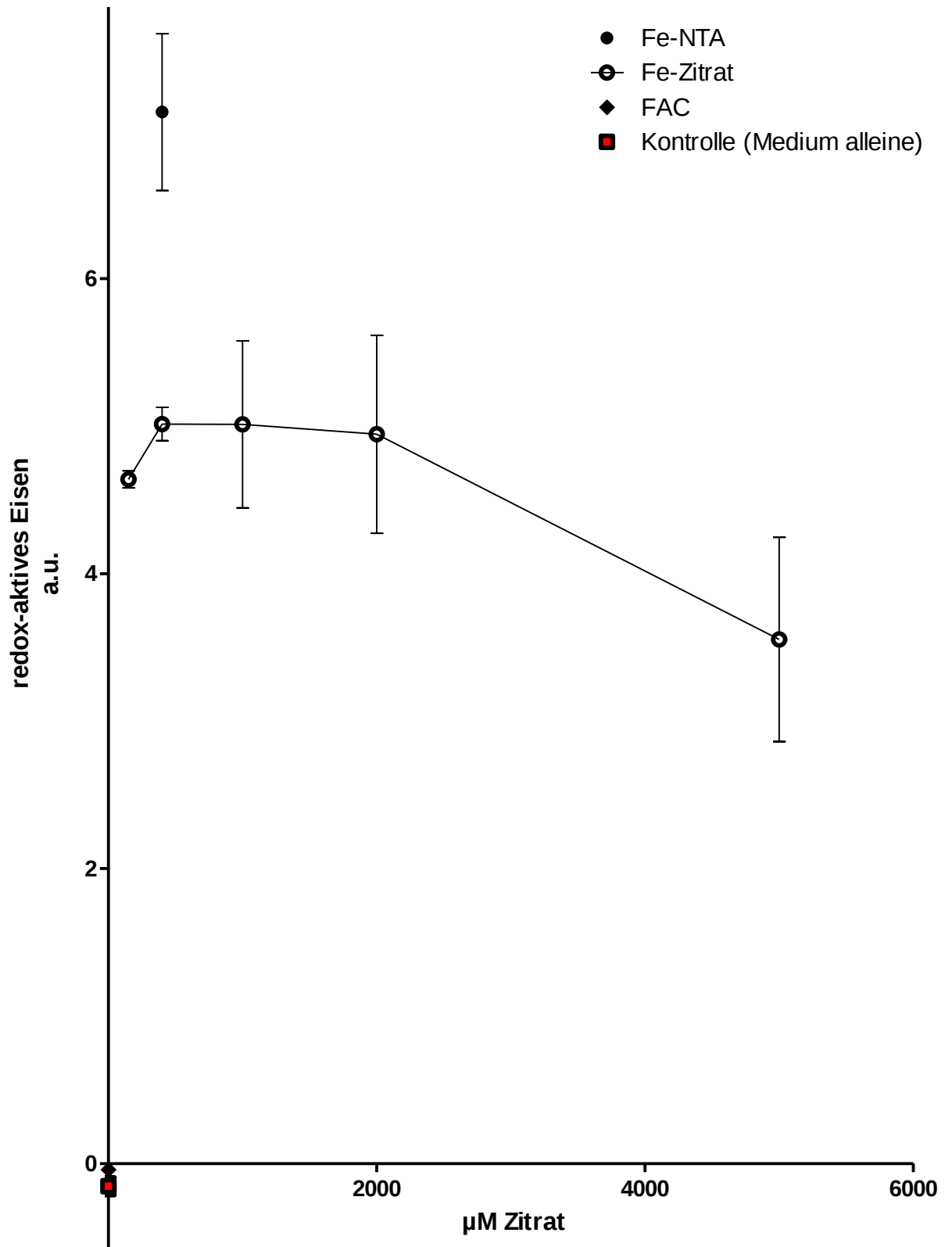


Abbildung 29: Bestimmung von redox-aktivem Eisen in den jeweiligen Inkubationsmedien durch die Messung mit 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCDHF)

4. Ergebnisse und Diskussion

Komplettiertem Nährmedium (7,5% CS; 2,5% FCS; 1% Glutamin; 1% non essential amino acids; 0,1% Gentamycin) wurden Eisen(III)-Zitrat-Komplexe in den molaren Verhältnissen Eisen zu Zitrat von 1:1.5, 1:4, 1:10, 1:20 und 1:50 in den Konzentrationen von 100 μ M Eisen (Komplexe wurden aus den sterilen Stammlösungen Tri-Natriumzitrat-Dihydrat (100 mM) und Eisen(III)-Chlorid (100 mM) hergestellt), Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure im molaren Verhältnis 1:4 in einer Konzentration von 100 μ M Eisen (Komplex wurde aus den sterilen Stammlösungen Eisen(III)-Chlorid (100 mM) und Nitrilotriessigsäure (Tritriplex I) (100 mM) gebildet) und Ammoniumeisen(III)-Zitrat in einer Konzentration von 100 μ M Eisen zugesetzt. Die Messung erfolgte mit 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein wie im Teil „Material und Methoden“ im Kapitel 3.15. beschrieben. Gezeigt sind Mittelwerte $\pm$ SEM von zwei unabhängigen Versuchen, welche im Doppelansatz durchgeführt wurden.

In Abbildung 29 ist klar zu erkennen, dass der Anteil an redox-aktivem Eisen in den Inkubationsmedien, welchen Eisen(III)-Zitrat zugesetzt wurde, mit dem steigenden molaren Verhältnis von Eisen zu Zitrat sinkt. Eine Erklärung hierfür bietet die Chelatierung von Eisen mittels Zitrat, wodurch es nicht mehr redox-aktiv agieren kann.

Obwohl, wie aus den Abbildungen 23 und 24 hervorgeht, die Viabilität sowohl von Myokardzellen als auch von Neuronen bei der Inkubation mit Eisen(III)-Zitrat bei einem molaren Verhältnis Eisen zu Zitrat von 1:50 am geringsten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ist, scheint dies mit dem Gehalt an redox-aktivem Eisen des Inkubationsmediums nicht in Zusammenhang zu stehen.

Das Inkubationsmedium, welchem Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure zugesetzt wurde, weist den höchsten Anteil an redox-aktivem Eisen auf.

Der Anteil an redox-aktivem Eisen im Inkubationsmedium, welchem Ammoniumeisen(III)-Zitrat zugesetzt wurde, befindet sich im negativen Bereich. Eine Erklärung hierfür ist, dass durch die Anwendung von verschiedenen Methoden der Chelatierung, jeweils mit spezifischen Radikalfängern und Blockern, das Resultat einer Messung verändert sein kann, da diese jeweils ihre eigenen, chemischen Eigenschaften aufweisen. [BREUER, HERSHKO et al., 2000]

Somit könnte Ammoniumeisen(III)-Zitrat mit der angewandten Methode nicht erfasst worden sein.

4.3.5. Bestimmung der Abhängigkeit der Viabilität von der Zitratkonzentration

4.3.5.1. Bestimmung der Abhängigkeit der Viabilität von der Zitratkonzentration

bei Inkubation von Myokardzellen und Neuronen mit Eisen(III)-Zitrat

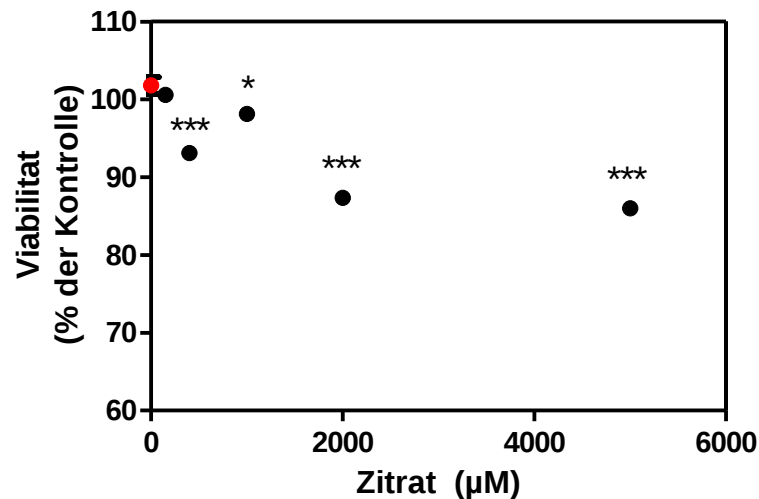


Abbildung 30: Bestimmung der Abhängigkeit der Viabilität von der Zitratkonzentration bei Inkubation von Myokardzellen mit 100 µM Eisen(III)-Zitrat

Legende siehe Abbildung 23. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM, die in drei voneinander unabhängigen Versuchen erhoben wurden. ($n=9-18$). Die Standardabweichungen der Mittelwerte sind so gering, dass sie in der Graphik nicht zu erkennen sind.

In Abbildung 30 ist zu erkennen, dass die Viabilität von differenzierten Myokardzellen, welche mit 100 µM Eisen(III)-Zitrat-Komplexen in unterschiedlichen molaren Verhältnissen von Eisen zu Zitrat inkubiert wurden, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen mit steigendem Anteil am Zitrat abnimmt. Somit ist der stärkste Effekt bei der höchsten Zitratkonzentration zu erkennen.

Bei den höchsten molaren Verhältnissen Eisen zu Zitrat von 1:20 und 1:50 liegt die Viabilität im Mittel 15% unter der der Kontrolle.

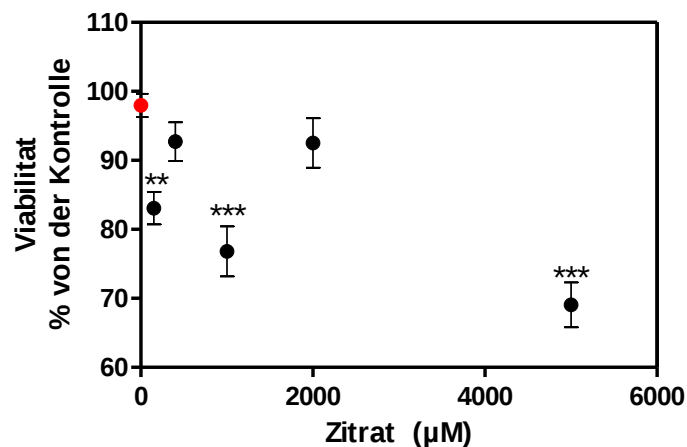


Abbildung 31: Bestimmung der Abhängigkeit der Viabilität von der Zitratkonzentration bei Inkubation von Neuronen mit 100 µM Eisen(III)-Zitrat

Legende siehe Abbildung 24. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM, die in drei voneinander unabhängigen Versuchen erhoben wurden. (n=8-16).

Bei differenzierten neuronalen P19-Zellen ist der gleiche Trend entsprechend dem der myokardialen Zellen zu erkennen: mit steigendem Anteil an Zitrat in den Eisen(III)-Zitrat-Komplexen sinkt die Viabilität im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen.

Der höchste Effekt ist wiederum beim molaren Verhältnis von 1:50 von Eisen zu Zitrat erkennbar, durchschnittlich sinkt die Viabilität hier um 30% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dies entspricht einem Wert, der doppelt so hoch ist, wie beim analogen Versuch mit myokardialen Zellen. (siehe Abbildung 30) Daraus kann somit geschlossen werden, dass Neuronen auf die Inkubation mit 100 µM Eisen(III)-Zitrat im Vergleich zu Myokardzellen auf hohe Zitratkonzentrationen im Komplex empfindlicher reagieren.

4.3.5.2. Bestimmung der Abhängigkeit der Viabilität von der Zitratkonzentration bei Inkubation von Myokardzellen und Neuronen mit Zitrat

Die regionale Verabreichung von Zitrat zur Antikoagulation während Hämodialysen bringt einen sehr guten antithrombotischen Effekt mit sich, welcher auf den extrakorporalen Kreislauf beschränkt ist. [MORITA et al., 1961]

Bei Standardtherapien mit Verwendung von Tri-Natrium-Zitrat als Antikoagulans werden 4% (0,136 mol/L) in die Arterie als Infusion verabreicht. Am Ende einer verabreichten Infusion liegt die Zitratkonzentration im Serum bei etwa 400 $\mu\text{mol/L}$. [BUTUROVIC et al., 2008]

Die physiologische Zitratkonzentration im Blut liegt bei etwa 135 μM , aufgrund der Abgabe von Zitrat aus den Astrozyten ist die Konzentration an Zitrat in der zerebrospinalen Flüssigkeit mit etwa 400 μM höher als die des Blutes. [WESTERGAARD et al., 1994]

Um den Effekt einer Inkubation von Myokardzellen und Neuronen mit Zitrat alleine in unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zur Inkubation mit 100 μM Eisen(III)-Zitrat-Komplexen mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen von Eisen zu Zitrat zu ermitteln, wurde der folgende Versuch durchgeführt: Differenzierte Myokardzellen und Neuronen wurden mit Kulturmedium, welchem unterschiedliche Konzentrationen an Zitrat zugesetzt wurden, 24 Stunden inkubiert. Die pH-Werte der Inkubationsmedien lagen zwischen 7,2 und 7,3.

Im Anschluss wurde ein MTT-Test durchgeführt.

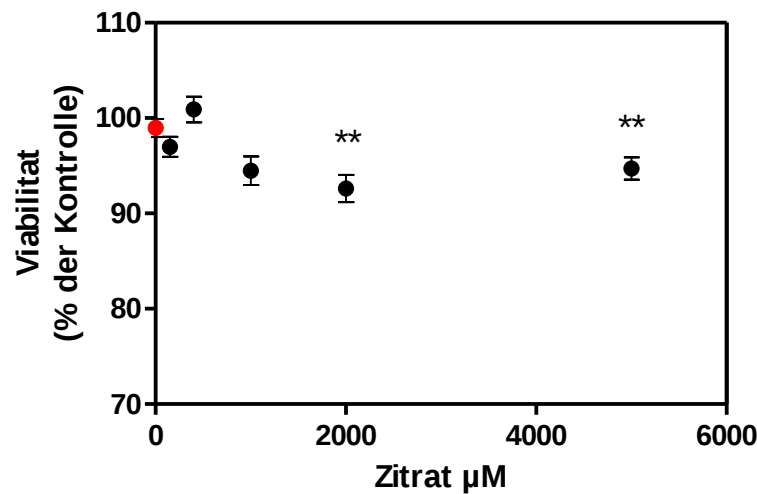


Abbildung 32: Bestimmung der Abhängigkeit der Viabilität von Myokardzellen von der Zitratkonzentration

Die in 96-Well-Platten ausgesetzten, vollständig differenzierten Myokardzellen wurden in komplettiertem Nährmedium (7,5% CS; 2,5% FCS; 1% Glutamin; 1% non essential amino acids; 0,1% Gentamycin) mit 150 μM , 400 μM , 1000 μM , 2000 μM und 5000 μM Zitrat bei 37°C und 5%iger CO_2 -Atmosphäre 24 Stunden inkubiert. Die Herstellung des Inkubationsmediums erfolgte mit der sterilen Stammlösung Tri-Natriumzitrat-Dihydrat (100 mM). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde ein MTT-Test durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM, die in drei voneinander unabhängigen Versuchen erhoben wurden. (n=13-19).

Auf Abbildung 32 ist zu erkennen, dass die Viabilität von Myokardzellen, die mit Zitrat in den Konzentrationen 2000 μM und 5000 μM inkubiert wurden, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen signifikant sinkt.

Es handelt sich hierbei um eine durchschnittliche Senkung von etwa 7% im Vergleich zur Kontrolle.

Vergleicht man nun dieses Ergebnis mit dem der Inkubation von Myokardzellen mit 100 μM Eisen(III)-Zitrat-Komplexen in unterschiedlichen molaren Verhältnissen von Eisen zu Zitrat, ist die Viabilität bei Inkubation mit Zitrat alleine weniger gesunken als bei Inkubation mit Eisen(III)-Zitrat mit den entsprechenden Zitratkonzentrationen. (Viabilitätssenkung hier durchschnittlich 15%) (Vergleich Abbildung 30).

Somit scheint die Kombination aus Eisen mit Zitrat die Toxizität des Zitrats zu erhöhen.

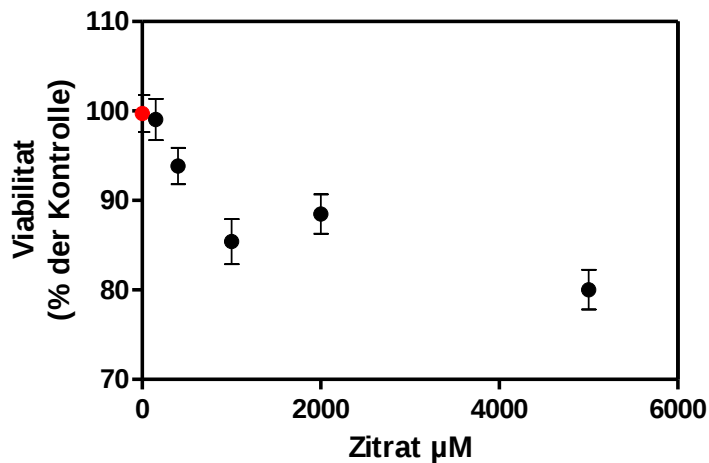


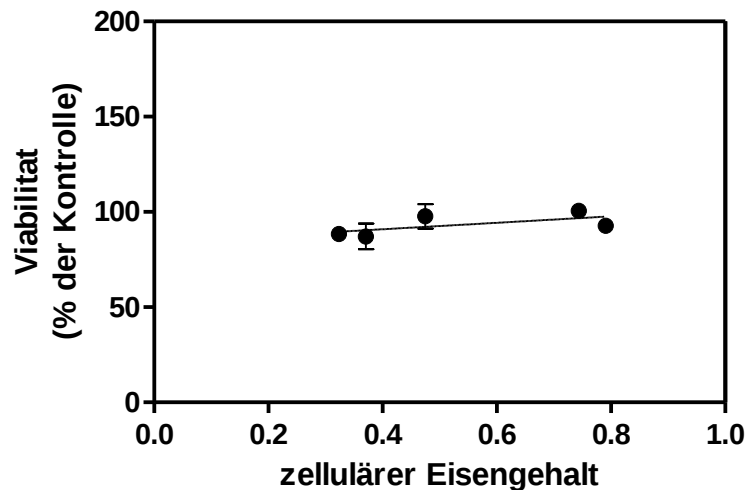
Abbildung 33: Bestimmung der Abhängigkeit der Viabilität von der Zitratkonzentration bei Inkubation von Neuronen mit Zitrat

Die in 96-Well-Platten ausgesetzten, vollständig zu Neuronen differenzierten P19-Zellen wurden in komplettiertem Nährmedium (7,5% CS; 2,5% FCS; 1% Glutamin; 1% non essential amino acids; 0,1% Gentamycin) mit Zitrat in unterschiedlichen Konzentrationen (150 μM , 400 μM , 1000 μM , 2000 μM und 5000 μM) bei 37°C und 5%iger CO_2 -Atmosphäre für 24 Stunden inkubiert. Weitere Legende siehe Abbildung 32. Gezeigt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM, die in drei voneinander unabhängigen Versuchen erhoben wurden. (n=10-16).

Abbildung 33 zeigt, dass Neuronen schon bei niedrigen Konzentrationen an Zitrat signifikante Erniedrigungen der Viabilität aufweisen. Auch hier – wie bei myokardialen Zellen – ist der stärkste Effekt bei einer Zitratkonzentration von 5000 μM zu beobachten, die Viabilität sinkt hier im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um 20%. Im Vergleich zu den Myokardzellen reagieren Neuronen auf die Inkubation mit Zitrat deutlich empfindlicher.

Wird nun wiederum ein Vergleich mit dem Ergebnis der Inkubation mit 100 μM Eisen(III)-Zitrat-Komplexen bei unterschiedlichen molaren Verhältnissen von Eisen zu Zitrat angestellt, ist die Viabilität bei Inkubation mit Zitrat alleine – entsprechend dem Ergebnis der Inkubation von Myokardzellen - weniger gesunken als bei Inkubation mit 100 μM Eisen(III)-Zitrat mit den entsprechenden Zitratkonzentrationen. (Viabilitätssenkung hier um 30%) (Vergleich Abbildung 31). Auch bei neuronalen Zellen scheint der Komplex aus Eisen(III)-Zitrat die Toxizität des Zitrats zu erhöhen.

4.3.5. Bestimmung der Korrelation der Viabilität mit dem zellulären Eisengehalt bei Inkubation von Myokardzellen und Neuronen mit Eisen(III)-Zitrat



$$r^2=0,15$$

Abbildung 34: Bestimmung der Korrelation der Viabilität mit dem zellulären Eisengehalt bei Inkubation von Myokardzellen mit Eisen(III)-Zitrat

Legende siehe Abbildung 23 und Abbildung 27.

Wie Abbildung 34 zu entnehmen, besteht zwischen dem zellulären Eisengehalt und der mittleren Viabilität von Myokardzellen, welche mit Eisen(III)-Zitrat mit unterschiedlichen Konzentrationen an Zitrat und gleichbleibender Konzentration an Eisen inkubiert wurden, keine Korrelation. Die Toxizität der Eisen(III)-Zitrat-Komplexe – wie aus Abbildung 23 zu entnehmen – ist somit auf den Komplex des Eisens mit Zitrat zurückzuführen.

4. Ergebnisse und Diskussion

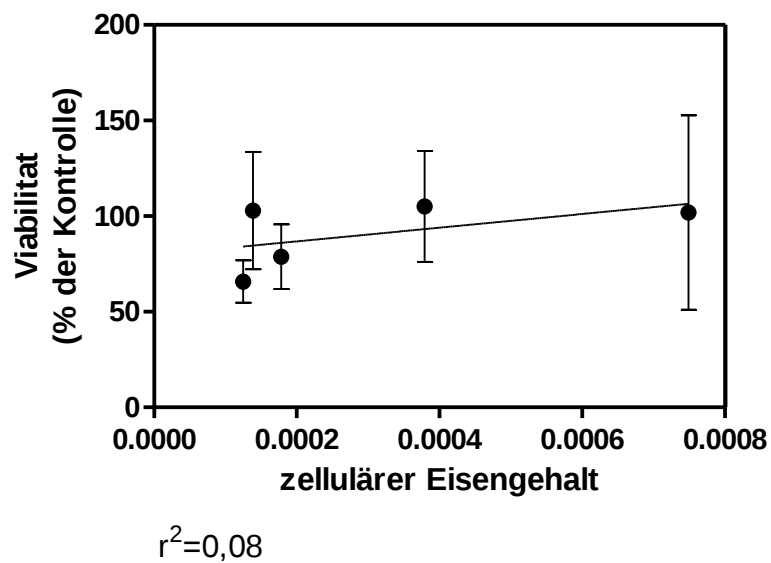


Abbildung 35: Bestimmung der Korrelation der Viabilität mit dem zellulären Eisengehalt bei Inkubation von Neuronen mit Eisen(III)-Zitrat

Legende siehe Abb. 24 und Abb. 28.

Wie auf Abbildung 35 zu erkennen, besteht auch bei neuronalen Zellen, welche mit 100 μM Eisen(III)-Zitrat mit unterschiedlichen Konzentrationen an Zitrat und gleichbleibender Konzentration an Eisen inkubiert wurden, zwischen dem zellulären Eisengehalt und der mittleren Viabilität keine Korrelation.

Die Toxizität der Eisen(III)-Zitrat-Komplexe - wie aus Abbildung 24 zu entnehmen - ist somit auf den Komplex des Eisens mit Zitrat zurückzuführen.

5. Schlussbetrachtung

Nicht-Transferrin gebundenes Eisen ist generell eine pathologische Manifestation und kommt in gesunden Individuen nicht vor. Durch jeden Zustand oder jede Behandlung jedoch, in der über kürzere oder längere Zeit ein Überschuss an Eisen besteht, kann es im Grunde zur Entstehung von NTBI kommen. Dieses kann fortschreitend über lange Zeiträume als Ergebnis von wiederholten Transfusionen (hämolytische Anämie) oder Hyperabsorption aus der Nahrung (Hämochromatose) akkumulieren. [BREUER et al., 2000] Empfindlich gegenüber nicht-Transferrin gebundenem Eisen (non-transferrin bound iron, NTBI) sind im Besonderen myokardiale und neuronale Gewebe. [OUDIT et al., 2003]

Durch die Bindung des Eisens an Transferrin, wie Eisen unter physiologisch normalen Umständen im Körper vorkommt, wird eine Beteiligung an Redoxreaktionen, bei denen es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies kommen kann, verhindert. [MCKIE et al., 2000], [CRICHTON et al., 2008]

Durch die Anwesenheit von NTBI wird die Bildung von freien Hydroxylradikalen gefördert und die Peroxidation von Membranlipiden beschleunigt, was somit zu oxidativen Schäden führt. [GUTTERIDGE et al., 1985]

Möglicherweise könnte ein Übermaß an Eisen in Form von NTBI in Zellen aufgenommen und in Lysosomen mobilisiert werden und dadurch schlussendlich eine zelluläre Eisenüberladung bedingen. Daher könnte NTBI – obwohl es bisher nicht direkt als Gesundheitsrisiko erkannt wurde – toxisches Potential haben, weshalb das Auftreten von NTBI im Plasma nicht ignoriert werden darf. [BREUER et al., 2000]

Trotz der wichtigen Rolle des Eisens in pathophysiologischen Zuständen wie Eisenüberladung ist wenig über den chemischen Aufbau von NTBI bekannt, das in schneller und weniger schnell chelatierbaren Formen im Plasma zu bestehen scheint. [BREUER et al., 2000]

5. Schlussbetrachtung

Die heterogene Natur des NTBI macht es schwierig, die chemische Reaktivität vorherzusagen. Es muss beachtet werden, dass die Aufnahme von NTBI in Zellen, im Gegensatz zur rezeptorvermittelten Aufnahme von Transferrin-gebundenem Eisen, kein Feedback regulierter Prozess ist. [KAPLAN et al., 1991], [KLAUSNER et al., 1993]

Über die chemische Natur des NTBI wird spekuliert, dass es aus einer heterogenen Mischung von Komplexen besteht, deren Zusammensetzung mit dem Grad und dem Typus der Eisenüberladung variiert. Die Löslichkeit des Eisenions Fe^{3+} in physiologischen Salzlösungen ist extrem gering; sofern also nicht Liganden vorhanden sind, die in der Lage sind, multiple Bindungsstellen für eine stabile Bindung zu bilden, werden unlösliche, polynukleäre Aggregate mit Chloriden und Oxiden gebildet. [GROOTVELD et al., 1989]

Eine Reihe an solch potentiellen Liganden, die Eisen binden können, sind im Plasma verfügbar, einer dieser Liganden ist Zitrat in Konzentrationen zwischen 60 und 140 μM . [LENTNER, 1984]

Aus der Literatur ist bekannt, dass bei molaren Verhältnissen von Eisen zu Zitrat zwischen 1:10 und 1:1000 bei einem pH-Wert von 7,4 die entstehenden Komplexe stabil sind und keine Präzipitationen beobachtet werden können.

Einzig bei einem molaren Verhältnis von Eisen zu Zitrat von 1:1 konnten Präzipitate festgestellt werden. [EVANS et al., 2008]

In dieser Arbeit wurde aus diesen Gründen der Effekt von Eisen(III)-Zitrat-Komplexen mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen von Eisen zu Zitrat (1:1,5; 1:4; 1:10; 1:20 und 1:50) auf ein Modell von myokardialen und neuronalen Zellen getestet. Dafür wurden murine, embryonale P19-Karzinomstammzellen verwendet, die mittels Dimethylsulfoxid zu Myokardzellen und mit Retinsäure zu Neuronen differenziert wurden.

Die Ergebnisse der Experimente zeigten, dass die Viabilität beider Zellarten in Gegenwart von Eisen(III)-Zitrat-Komplexen mit hohen Zitratkonzentrationen abnimmt

5. Schlussbetrachtung

und dass neuronale Zellen empfindlicher als myokardiale Zellen reagieren. Diese Beobachtung war von der Eisenaufnahme oder der Anwesenheit von redox-aktivem Eisen in den Komplexen unabhängig.

Auch die Inkubation der Zellen mit Zitrat alleine reduzierte deren Viabilität, jedoch in einem geringeren Ausmaß.

6. Zusammenfassung

Empfindlich gegenüber nicht-Transferrin gebundenem Eisen (non-transferrin bound iron, NTBI) sind im Besonderen myokardiale und neuronale Gewebe. [OUDIT et al., 2003] Die chemische Natur des NTBI ist bislang nicht geklärt, spekuliert wird seine Existenz als heterogene Gruppe bestehend aus Eisenkomplexen mit dem potentiellen Liganden Ziträt [LENTNER, 1984], jedoch ist das chemische Verhältnis von Eisen zu Ziträt noch unbekannt.

Das Ziel dieser *in vitro* Studie war es, den Effekt von chemisch definierten Eisen(III)-Ziträt-Komplexen auf myokardiale und neuronale Zellen zu erforschen.

Dafür wurden murine, embryonale P19-Karzinomstammzellen mit Hilfe von Dimethylsulfoxid bzw. Retinsäure zu Myokardzellen und zu Neuronen differenziert und mit Eisen(III)-Ziträt-Komplexen in den molaren Verhältnissen Eisen zu Ziträt von 1:1.5, 1:4, 1:10, 1:20 und 1:50 für 24 Stunden inkubiert. Die Viabilität der Zellen wurde mittels MTT-Assay ermittelt, der zelluläre Eisengehalt wurde mit Hilfe einer auf Ferrozin basierenden Methode quantifiziert und zum gemessenen Proteingehalt normalisiert. Redox-aktives Eisen in den Inkubationsmedien wurde mittels Dichlorodihydrofluorescein gemessen und die Oxidation der Proben durch einen Überschuss eines Eisenchelators (L1) korrigiert.

Nach der Inkubation mit verschiedenen Eisen(III)-Ziträt-Komplexen für 24 Stunden war die Viabilität der myokardialen Zellen und in einem höheren Ausmaß auch die der Neuronen signifikant mit steigenden Zitratkonzentrationen vermindert. Die Myokardzellen waren nur beim molaren Verhältnis Eisen zu Ziträt von 1:1,5 imstande, Eisen aufzunehmen, die Eisenaufnahme der Neuronen erfolgte bei den molaren Verhältnissen 1:1.5, 1:4 und 1:10. Die Inkubation mit Ziträt alleine reduzierte ebenso die Viabilität beider Zellarten, jedoch in einem geringeren Ausmaß. Zwischen dem zellulären Eisengehalt und der Zellviabilität nach Inkubation mit den Eisen(III)-Ziträt-Komplexen konnte keine Korrelation festgestellt werden. Der Gehalt an redox-aktivem Eisen in den Inkubationsmedien war bei geringen molaren Verhältnissen von Eisen zu

Zitrat höher und es kann somit ausgeschlossen werden, dass redox-aktives Eisen für den beobachteten toxischen Effekt von Eisen(III)-Zitrat-Komplexen, welche mit hohen Zitratkonzentrationen gebildet wurden, verantwortlich ist.

Mit den Ergebnissen der Studie konnte gezeigt werden, dass neuronale Zellen gegenüber Eisen(III)-Zitrat-Komplexen mit hohen Zitratkonzentrationen empfindlicher reagieren als myokardiale Zellen und dass dies von der Eisenaufnahme oder der Anwesenheit von redox-aktivem Eisen in den Komplexen unabhängig ist.

7. Summary

Cardiac and neuronal tissues are particularly sensitive to non-transferrin bound iron (NTBI). [OUDIT et al., 2003] The chemical nature of NTBI is unknown, speculated is its existence as a heterogenic group of iron complexes with a potential ligand being citrate, [LENTNER, 1984] but of undefined chemical ratio.

The aim of this *in vitro* study was to investigate the effect of chemically defined ferric-citrate complexes on myocardial and neuronal cells.

Therefore P19 mouse embryo carcinoma stem cells were differentiated with dimethylsulfoxide respectively retinoic acid into myocardial and neuronal cells and incubated with ferric-citrate complexes at molar ratios of iron to citrate of 1:1.5, 1:4, 1:10, 1:20 and 1:50 for 24 hours. The viability of the cells was assayed by MTT-assay; the cellular iron content was quantified by a Ferrozin based method and normalized to the protein content. Redox-active iron in the incubation media was detected with an assay using dichlorodihydrofluorescein and corrected for oxidation of the probe in the presence of a surplus of an iron chelator (L1).

Following incubation with various complexes of ferric-citrate for 24 hours, viability of myocardial and to a higher extent of neuronal cells was significantly decreased at higher concentrations of citrate in the complex. Myocardial cells were able to incorporate iron only at a molar ratio of iron to citrate of 1:1.5, neurons incorporated iron at ratios of 1:1.5, 1:4 and 1:10; Incubation with citrate alone reduced viability of both cell types as well, but to a lower extent.

No correlation was found between cellular iron content and cell viability following incubation with any ferric-citrate complex. Redox-active iron in the incubation media was higher at lower molar ratios of iron to citrate and it can therefore be excluded to be responsible for the toxic effects observed with ferric-citrate complexes formed with high citrate concentrations.

The findings of the study demonstrate that neuronal cells are more sensitive to ferric-citrate complexes with higher citrate content than myocardial cells and that it is independent from iron loading of the cells or the presence of redox-active iron in the complexes.

8. Literaturverzeichnis

- ANDERSON, G. J.; FRAZER, D. M.; MCLAREN, G. D. Iron absorption and metabolism. *Curr Opin Gastroenterol*. 2009; 25: 129–135
- ANDREWS, N. C. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med*. 1999; 341: 1986–1995
- AROSIO, P.; ADELMAN, T. G.; DRYSDALE, J. W. On ferritin heterogeneity. Further evidence for heteropolymers. *J Biol Chem*. 1978; 253: 4451–4458
- AROSIO, P.; INGRASSA, R.; CAVADINI, P. Ferritins: A family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1790: 589–599
- ARTYMIUK, P. J.; GREEN, J. The double life of aconitase. *Structure*. 2006; 14: 2–4.
- ARUOMA, O. I.; BOMFORD, A.; POLSON, R. J.; HALLIWELL, B. Nontransferrin-bound iron in plasma from hemochromatosis patients: effect of phlebotomy therapy. *Blood*. 1988; 72: 1416–1419
- BAKER, E.; BAKER, S. M.; MORGAN, E. H. Characterisation of non-transferrin-bound iron (ferric citrate) uptake by rat hepatocytes in culture. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 21–30
- BASILION, J. P.; KENNEDY, M. C.; BEINERT, H.; MASSINOPLE, C. M.; KLAUSNER, R. D.; ROUNAULT, T. A. Overexpression of iron-responsive element-binding protein and its analytical characterization as the RNA-binding form, devoid of an iron–sulfur cluster. *Arch Biochem Biophys*. 1994; 311:517–522
- BEINERT, H.; KENNEDY, M. C. Aconitase, a two-faced protein: Enzyme and iron regulatory factor. *FASEB J*. 1993; 7: 1442–1449
- BIANCHI, L.; TACCHINI, L.; CAIRO, G. HIF-1-mediated activation of transferrin receptor gene transcription by iron chelation. *Nucleic Acids Res*. 1999; 27: 4223–4227
- VON BONSDORFF, L.; LINDEBERG, E.; SAHLSTEDT, L.; LETHO, J.; PARKKINEN, J. Bleomycin-detectable iron assay for non-transferrin-bound iron in hematologic malignancies. *Clin Chem*. 2002; 48: 307–314
- BRADBURY, M. W. Transport of iron in the blood-brain-cerebrospinal fluid system. *J Neurochem*. 1997; 69: 443–454
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248–254
- BREUER, W.; CABANTCHIK, Z. I. A Fluorescence-based one-step assay for serum non-transferrin-bound iron. *Anal Biochem*. 2001; 299: 194–202.
- BREUER, W.; ERMERS, M. J. J.; POOTRAKUL, P.; ABRAMOV, A.; HERSHKO, C.; CABANTCHIK, Z. I. Desferrioxamine-chelatable iron (DCI), a component of serum non-

transferrin bound iron (NTBI) used for assessing chelation therapy. *Blood*. 2000; 97: 792-798

BREUER, W.; GREENBERG, E.; CABANTCHIK, Z. I. The role of newly delivered transferrin iron in oxidative cell injury. *FEBS Lett*. 1997; 403: 213-219

BREUER, W.; HERSHKO, C.; CABANTCHIK, Z. I. The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism. *Transfus Sci*. 2000; 23: 185–192

BREUER, W.; RONSON, A.; SLOTKI, I. N.; ABRAMOV, A.; HERSHKO, C.; CABANTCHIK, Z. I. The assessment of serum nontransferrin-bound iron in chelation therapy and iron supplementation. *Blood*. 2000; 95: 2975-82

BRUBACHER, J. L.; BOLS, N. C. Chemically de-acetylated 2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate as a probe of respiratory burst activity in mononuclear phagocytes. *J Immunol Methods*. 2001; 251: 81–91

BUSHNELL, G.R.; CAHILL, C.; CLARKE, F.M.; GIBSON, C.T.; MYHRA, S.; WATSON, G. S. Imaging and Force-Distance Analysis of Human Fibroblasts In Vitro by Atomic Force Microscopy. *Cytometry*, 1999; 36: 254–264

BUTUROVIC, J.; GUBENSEK, J.; CERNE, D.; PONIKVAR, R. Standard Citrate Versus Sequential Citrate/Anticoagulant-free Anticoagulation During Hemodialysis: A Randomized Trial. *Artif Organs*. 2008; 32: 77-81

CABANTCHIK, Z. I.; BREUER, W.; ZANNINELLI, G.; CIANCULLI, P. LPI-labile plasma iron in iron overload. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2005; 18: 277–87

CAMASCHELLA, C.; ROETTO, A.; CALI, A.; DEGOBBI, M.; GAROZZO, G.; CARELLA, M.; MAJORANO, N.; TOTARO, A.; GASPARINI, P. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet*. 2000; 25: 14-15

CAIRO, G.; PIETRANGELO, A. Iron regulatory proteins in pathobiology. *Biochem J*. 2000; 2: 241–250

CHRISTOVA, T.; TEMPLETON, D. M. Effect of hypoxia on the binding and subcellular distribution of iron regulatory proteins. *Mol Cell Biochem*. 2007; 301: 21–32

COFFMAN, L. G.; PARSONAGE, D.; D'AGOSTINO, R. Jr.; TORTI, F. M.; TORTI, S. V. Regulatory effects of ferritin on angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106: 570–575

CRICHTON, R. Solution Chemistry of iron in Biological Media. In: *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism: From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences*. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, 2001; 1-14

CRICHTON, R; DANIELSON B. G.; GEISSER, P. Iron Metabolism: Biologic and Molecular Aspects. In: *Iron Therapy With Special Emphasis on Intravenous Administration*. UNI-MED Verlag AG, Bremen, 2008; 14-23

- CROOKS, D. R.; GHOSH, M. C.; HALLER, R. G.; TONG, W. H.; ROUAULT, T. A. Post-translational stability of the heme biosynthetic enzyme ferrochelatase is dependent on iron availability and intact iron-sulfur cluster assembly machinery. *Blood*. 2010; 115: 860–869
- DE DOMENICO, I.; WARD, D. M.; DI PATTI, M. C. B.; JEONG, S. Y.; DAVID, S.; MUSCI, G.; KAPLAN, J. Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface Ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *EMBO J*. 2007; 26: 2823-2831
- DE DOMENICO, I.; WARD, D. M.; LANGELIER, C.; VAUGHN, M. B., NEMETH, E.; SUNDQUIST, W. I.; GANZ, T.; MUSCI, G.; KAPLAN, J. The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin downregulation. *Mol Biol Cell*. 2007; 18: 2569-2578
- DE DOMENICO, I.; WARD, D. M.; NEMETH, E.; VAUGHN, M. B.; MUSCI, G.; GANZ, T.; KAPLAN, J. The molecular basis of ferroportin-linked hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 8955–8960
- DELABY, C.; PILARD, N.; GONCALVES, A. S.; BEAUMONT, C.; CANONNE-HERGAUX, F. Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. *Blood*. 2005; 106: 3979-3984
- DE VALK, B.; MARX, J. J. Iron, atherosclerosis, and ischemic heart disease. *Arch Intern Med*. 1999; 159: 1542-8
- DONOVAN, A.; LIMA, C. A.; PINKUS, J. L.; PINKUS, G. S.; ZON, L. I.; ROBINE, S.; ANDREWA, N. C. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab*. 2005; 1: 191-200
- DRAKESMITH, H.; SCHIMANSKE, L. M.; ORMEROD, E.; MERRYWEATHER-CLARKE, A. T.; VIPRAKASIT, V.; EDWARDS, J. P.; SWEETLAND, E.; BASTIN, J. M.; COWLEY, D.; CHINTHAMMITR, Y.; ROBSON, K. J. H.; TOWNSEND, A. R. M. Resistance to hepcidin is conferred by hemochromatosis-associated mutations of ferroportin. *Blood*. 2005; 106: 1092-1097
- DUPUY, J.; VOLBEDA, A.; CARPENTIER, P.; DARNAULT, C.; MOULIS, J. M.; FONTECILLA-CAMPS, J. C. Crystal structure of human iron regulatory protein 1 as cytosolic aconitase. *Structure*. 2006; 14: 129–139
- DYCKE, C.; CHARBONNIER, P.; PANTOPOULOS, K.; MOULIS, J. M. A role for lysosomes in the turnover of human iron regulatory protein 2. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40: 2826–2832
- EISENSTEIN, R. S. Discovery of the ceruloplasmin homologue hephaestin: new insight into the copper/iron connection. *Nutr Rev*. 2000; 58: 22-6
- EVANS, R. W.; RAFIQUE, R.; ZAREA, A.; RAPISARDA, C.; CAMMACK, R.; EVANS, P. J.; PORTER, J. B.; HIDER, R. C. Nature of non-transferrin-bound iron: studies on iron citrate complexes and thalassemic sera. *J Biol Inorg Chem*. 2008; 13:57–74

- EVANS, R. W.; SHARMA, M.; OGWANG, W.; PATEL, K. J.; BARTLETT, A. N.; KONTOGHIORGHER, G. J. The effect of alpha-ketohydroxypyridine chelators on transferrin saturation in vitro and in vivo. *Drugs Today*. 1992; 28: 19-23
- FALLER, B.; NICK, H. P. Kinetics and Mechanism of Iron(III) Removal from Citrate by Desferrioxamine B and 3-Hydroxy-1,2-Dimethyl-4-Pyridone. *J Am Chem Soc*. 1994; 116: 3860–3865
- FEDER, J. N. The hereditary hemochromatosis gene (HFE): a MHC class I-like gene that functions in the regulation of iron homeostasis. *Immunol Res*. 1999; 20: 175-185
- FINCH, C. Regulators of iron balance in humans. *Blood*. 1994; 84: 1697-1702
- FLEMING, M. D. The Regulation of Hepcidin and Its Effects on Systemic and Cellular Iron Metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008; 151-158
- FUNK, F.; LENDERS, J. P.; CRICHTON, R. R.; SCHNEIDER, W. Reductive mobilisation of ferritin iron. *Eur J Biochem*. 1985; 152: 167-72
- GALY, B.; FERRING-APPEL, D.; KADEN, S.; GRONE, H. J.; HENTZE, M. W. Iron regulatory proteins are essential for intestinal function and control key iron absorption molecules in the duodenum. *Cell Metab*. 2008; 7: 79–85
- GAUTIER-LUNEAU, I.; MERLE, C.; PHANON, D.; LEBRUM, C.; BIASO, F.; SERRATRICE, G.; PIERRE, J. L. New Trends in the Chemistry of Iron(III) Citrate Complexes: Correlations between X-ray Structures and Solution Species Probed by Electrospray Mass Spectrometry and Kinetics of Iron Uptake from Citrate by Iron Chelators. *Chem Eur J*. 2005; 11: 2207–2219
- GIARDINA, P.J.; GRADY, R.W. Chelation therapy in beta-thalassemia: an optimistic update. *Semin Hematol*. 2001; 38: 360–366
- GIARDINI, C.; LUCARELLI, G. Bone marrow transplantation in the treatment of thalassemia. *Curr Opin Hematol*. 1994; 1: 170–176
- GOFORTH, J. B.; ANDERSON, S. A.; NIZZI, C. P.; EISENSTEIN, R. S. Multiple determinants within iron-responsive elements dictate iron regulatory protein binding and regulatory hierarchy. *RNA*. 2010; 16: 154–169
- GOSRIWATANA, I.; LOREAL, O.; LU, S.; BRISSOT, P.; PORTER, J.; HIDER, R. C. Quantification of non-transferrin-bound iron in the presence of unsaturated transferrin. *Anal Biochem*. 1999; 273: 212-20.
- GRADY, R.; BARDOUKAS, V. A.; GIARDINA, P. J. Iron chelation: combined therapy could be a better approach. *Blood*. 1998; 92, 16b
- GRAHAM, R. M.; MORGAN, E. H.; BAKER, E. Characterisation of citrate and iron citrate uptake by cultured rat hepatocytes. *J Hepatol*. 1998; 29: 691-613

- GRAHAM, R. M.; REUTENS, G. M.; HERBISON, C. E.; DELIMA, R. D.; CHUA, A. C. G.; OLYNYK, J. K.; TRINDER, D. Transferrin receptor 2 mediates uptake of transferrin-bound and non-transferrin-bound iron. *J Hepatol.* 2008; 48: 327-334
- GROOTVELD, M.; BELL, J. D.; HALLIWELL, B.; ARUOMA, O. I.; BOMFORD, A.; SADLER, P. J. Non-transferrin bound iron in plasma or serum from patients with idiopathic hemochromatosis. *J Biol Chem.* 1989; 264: 4417-22
- GUO, B.; PHILLIPS, J. D.; YU, Y.; LEIBOLD E. A. Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. *J Biol Chem.* 1995; 270: 21645–21651
- GUO, B.; YU, Y.; LEIBOLD, E. A. Iron regulates cytoplasmic levels of a novel iron-responsive element-binding protein. *J Biol Chem.* 1994; 269: 24252-24260
- GUTTERIDGE, J. M. C.; ROWLEY, D. A.; GRIFFITHS E.; HALLIWELL, B. Low molecularweight iron complexes and oxygen radical reactions in idiopathic haemochromatosis. *Clin Sci.* 1985; 68: 463–467
- HARRIS, Z. L.; DURLEY, A. P.; MAN, T. K.; GITLIN, J. D. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron e.ux. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 6: 10812-10817
- HASINOFF, B. B.; HERMAN, E. H. Dexrazoxane: How it works in cardiac and tumor cells. Is it a prodrug or is it a drug? *Cardiovasc Toxicol.* 2007; 7: 140–144
- HEINECKE, J. W. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis. implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis.* 1998; 141: 1-15
- HENDERSON, B. R.; MENOTTI, E.; BONNARD, C.; KÜHN, L. C. Optimal sequence and structure of iron-responsive elements: selection of RNA stem-loops with high affinity for iron regulatory factor. *J Biol Chem.* 1994; 269: 17481-17489
- HENTZE, M. W.; KÜHN, L. C. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 8175–8182
- HERSHKO, H.; GRAHAM, G.; BATES, G. W.; RACHMILEWITZ, E. Nonspecific serum iron in thalassaemia: an abnormal serum iron fraction of potential toxicity. *Brit J Haematol.* 1978; 40: 255-63
- HERSHKO, C.; LINK, G.; CABANTCHIK, I. Pathophysiology of iron-overload. *Ann NY Acad Sci.* 1998; 850: 191-201
- HIDER, R. C. Nature of non-transferrin-bound iron. *Eur J Clin Invest.* 2002; 32: 50–54

- HIRLING, H.; HENDERSON, B. R.; KÜHN, L. C. Mutational analysis of the [4Fe-4S]-cluster converting iron regulatory factor from its RNA-binding form to cytoplasmic aconitase. *EMBO J.* 1994; 13: 453–461
- HOWER; V.; MENDES, P.; TORTI, F. M.; LAUBENBACHER, R.; AKMAN, S.; SHULAEV, V.; TORTI, S. V. A general map of iron metabolism and tissue-specific subnetworks. *Mol Biosyst.* 2009; 5: 422–443
- IANCU, T. C.; DEUGNIER, Y.; HALLIDAY, J.W.; POWELL, L.W.; BRISSOT, P. Ultrastructural sequences during liver iron overload in genetic hemochromatosis. *J Hepatol.* 1997; 27: 628-38
- JACOBS, E. M.; HENDRIKS, J. C.; VAN TITS, B. L.; EVANS, P. J.; BREUER, W.; LIU, D. Y.; JANSEN, E. H.; JAUHAINEN, K.; STURM, B.; PORTER, J. B.; SCHEIBER-MOJDEHKAR, B.; VON BONSDORFF, L.; CABANTCHIK, Z. I.; HIDER, R. C.; SWINKELS, D. W. Results of an international round robin for the quantification of serum non-transferrin-bound iron: Need for defining standardization and a clinically relevant isoform. *Anal Biochem.* 2005; 341: 241-50
- JENSEN, P. D.; JENSEN, F. T.; CHRISTENSEN, T.; EISKJAER, H.; BAANDRUP, U.; NIELSEN, J. L. Evaluation of myocardial iron by magnetic resonance imaging during iron chelation therapy with deferrioxamine: indication of close relation between myocardial iron content and chelatable iron pool. *Blood.* 2003; 101: 4632–4639
- JONES-VILLENEUVE, E. M. V.; MCBURNEY, M. W.; ROGERS, K. A.; KALNINS, V. I. Retinoic Acid Induces Embryonal Carcinoma Cells to Differentiate into Neurons and Glial Cells. *J Cell Biol.* 1982; 94: 253-262
- KAPLAN, J.; JORDAN, I.; STURROCK, A. Regulation of the transferrin-independent iron transport system in cultured cells. *J Biol Chem.* 1991; 266: 2997-3004
- KAWABATA, H.; GERMAIN, R. S.; VUONG, P. T.; NAKAMAKI, T.; SAID, J. W.; KOEFFLER, H. P. Transferrin receptor “-a supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and in Vivo. *J Biol Chem.* 2000; 275: 16618-16625
- KE, Y.; WU, J.; LEIBOLD, E. A.; WALDEN, W. E.; THEIL, E. C. Loops and bulge/loops in iron-responsive element isoforms influence iron regulatory protein binding. *J Biol Chem.* 1998; 273: 23637-23640
- KENNEDY, M. C.; MENDE-MUELLER, L.; BLONDIN, G. A.; BEINERT, H. Purification and characterization of cytosolic Aconitase from beef liver and its relationship to the iron-responsive element binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89: 11730–11734
- KERENYI, M. A.; GREBIEN, F.; GEHART, H.; SCHIFRER, M.; ARTAKER, M.; KOVACIC, B.; BEUG, H.; MORIGGL, R.; MULLNER, E. W. Stat5 regulates cellular iron uptake of erythroid cells via IRP-2 and TfR-1. *Blood.* 2008; 112: 3878–3888

- KHAN, M. A.; WALDEN, W. E.; GOSS, D. J.; THEIL, E. C. Direct Fe^{2+} sensing by iron responsive messenger RNA-repressor complexes weakens binding. *J Biol Chem.* 2009; 284: 30122–30128
- KEEL, S. B.; DOTY, R. T.; YANG, Z.; QUIGLEY, J. G.; CHEN, J.; KNOBLAUGH, S.; KINGSLEY, P. D.; DE DOMENICO, I.; VAUGHN, M. B.; KAPLAN, J.; PALIS, J.; ABKOWITZ, J. L. A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science.* 2008; 319: 825–828
- KLAUSNER, R. D.; ROUAULT, T. A.; HARFORD, J. B. Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell.* 1993; 72: 19-28
- KONTOGHIORGHES, G. J. New concepts of iron and aluminium chelation therapy with oral L1 (deferiprone) and other chelators. *Analyst.* 1995; 120: 845-51
- KOREN, A.; FINK, D.; ADMONO, O.; TENNENBAUM-RAKOVER, Y.; LEVIN, C. Non-transferrin bound labile plasma iron and iron overload in Sickel Cell Disease: a comparative study between Sickel Cell Disease and β thalassemic patients. *Eur J Haematol.* 2010; 84: 72–78
- LAFTAH, A. H.; RAMESH, B.; SIMPSON, R. J.; SOLANKY, N.; BAHRAM, S.; SCHÜMANN, K.; DEBNAM, E. S.; SRAI, S. K. S. Effect of Hecpidin on intestinal iron absorption in mice. *Blood.* 2004; 103: 3940-3944
- LATUNDE-DADA, G. O.; TAKEUCHI, K.; SIMPSON, R. J.; MCKIE, A.T. Haem carrier protein 1 (HCP1): Expression and functional studies in cultured cells. *FEBS Lett.* 2006; 580: 6865–6870
- LEIPUVIENE, R.; THEIL, E. C. The family of iron responsive RNA structures regulated by changes in cellular iron and oxygen. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64: 2945-2955
- LENTNER, C. (ed.) Geigy scientific tables, vol 3: Physical Chemistry, Composition of Blood, Hematology, Somatometric Data. Ciba-Geigy, Basle, 89-111
- LEVI, S.; AROSIO, P. Mitochondrial ferritin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36: 1887–1889
- LIU, Y. L.; ANG, S. O.; WEIGENT, D. A.; PRCHAL, J. T.; BLOOMER, JR. Regulation of ferrochelatase gene expression by hypoxia. *Life Sci.* 2004; 75: 2035–2043
- LIU, X. B.; HILL, P.; HAILE, D. J. Role of the ferroportin ironresponsive element in iron and nitric oxide dependent gene regulation. *Blood Cells Mol Dis.* 2002; 29: 315–326
- LIU, W.; SHIMOMURA, S.; IMANISHI, H.; IWAMOTO, Y.; IKEDA, N.; SAITO, M.; OHNO, M.; HARA, N.; YAMAMOTO, T.; NAKAMURA, H.; HADA, T. Hemochromatosis with mutation of the Ferroportin 1 (IREG1) gene. *Intern Med.* 2005; 44: 285–289
- LOVSTAD, R. A. Interaction of serum albumin with the FE (III)-citrate complex. *Int J Biochem.* 1993; 25: 1015-7

- MACKENZIE, B.; GARRICK, M. D. Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005; 289: 981–986
- McBURNEY, M. W. P19 embryonal carcinoma cells. *Int J Dev Biol*. 1993; 37: 135-140
- MCKIE, A. T. The role of Dcytb in iron metabolism: An update. *Biochem Soc Trans*. 2008; 36: 1239–1241
- McKIE, A. T.; MARCIANI, P.; ROLFS, A.; BRENNAN, K.; WEHR, K.; BARROW, D.; MIRET, S.; BOMFORD, A.; PETERS, T. J.; FARZANEH, F.; HEDIGER, M. A.; HENTZT, M. W.; SIMPSON, R. J. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell*. 2000; 5: 299-309
- MEYERS, D. G. The iron hypothesis - does iron cause atherosclerosis. *Clin Cardiol*. 1996; 19: 925-929
- MILLEROT-SERRUOT, E.; BERTREND, N.; MOISSAT, C.; FAURE, P.; PRIGENT-TESSIER, A.; GARNIER, P.; BEJOT, Y.; GIROUD, M.; BELEY, A.; MARIE, C. Temporal changes in free iron levels after brain ischemia. Relevance to the timing of iron chelation therapy in stroke. *Neurochem Int*. 2008; 52: 1442-1448
- MOK, H.; JELINEK, J.; PAI, S.; CATTANACH, B. M.; PRCHAL, J. T.; YOUSSEOUFIAN, H.; SCHUMACHER, A. Disruption of ferroportin 1 regulation causes dynamic alterations in iron homeostasis and erythropoiesis in polycythaemia mice. *Development*. 2004; 131: 1859–1868
- MORITA, Y.; JOHNSON, R. W.; DORN, R. E.; HALL, D. S. Regional anticoagulation during hemodialysis using citrate. *Am J Med Sci*. 1961; 242: 32–43
- MOURA, E.; NOORDERMEER, M. A.; VERHOEVEN, N.; VERHEUL, A. F.; MARX, J. J. Iron release from human monocytes after erythrophagocytosis in vitro: an investigation in normal subjects and hereditary hemochromatosis patients. *Blood*. 1998; 92: 2511-9
- MUCKENTHALER, M. U.; GALY, B.; HENTZE, M. W. Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element=iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu Rev Nutr*. 2008; 28: 197–213
- MUTH, N. J.; VARADI, G.; SCHWARTZ, A. Use of transgenic mice to study voltage-dependent Ca^{2+} channels. *Trends Pharmacol Sci*. 2001; 22: 526-532
- NAPIER, I.; PONKA, P.; RICHARDSON, D. R. Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease. *Blood*. 2005; 105: 1867–1874
- NEMETH, E.; GANZ, T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu Rev Nutr*. 2006; 26: 323–342
- NEMETH, E.; GANZ, T. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematol*. 2009; 122: 78–86

- NEMETH, E.; TUTTLE, M. S.; POWELSON, J.; VAUGHN, M. D.; DONOVAN, A.; WARD, D. M.; GANZ, T.; KAPLAN, J. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004; 306: 2090-2093
- NICOLAS, G.; BENNOUN, M.; PORTE, A.; MATIVET, S.; BEAUMONT, C.; GRANDCHAMP, B.; SIRITO, M.; SAWADOGO, M.; KAHN, A.; VAULONT, S. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 4596-4601
- O'DONNELL, K. A.; YU, D.; ZELLER, K. I.; KIM, J. W.; RACKE, F.; THOMAS-TIKHONENKO, A.; DANG, C. V. Activation of transferrin receptor 1 by c-Myc enhances cellular proliferation and tumorigenesis. *Mol Cell Biol*. 2006; 26: 2373-2386
- OLIVIERI, N. F. The beta-thalassemias. *N Engl J Med*. 1999; 341: 99-109
- OLIVIERI, N. F.; NATHAN, D. G.; MACMILLAN, J. H.; WAYNE, A. S.; LIU, P. P.; MCGEE, A.; MARTIN, M.; KOREN, G.; COHEN, A. R. Survival in medically treated patients with homozygous beta-thalassemia. *N Engl J Med*. 1994; 331: 574-8
- ODUIT, G. Y.; SUN, H.; TRIVIERI, M. G.; KOCH, S. E.; DAWOOD, F.; ACKERLEY, C.; YAZDANPANAH, M.; WILSON, G. J.; SCHWARTZ, A.; LIU, P. P.; BACKX, P. H. L-type Ca^{2+} channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy. *Nat Med*. 2003; 9: 1187-1194
- PALMIERI, F. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflügers Arch*. 2004; 447: 689-709
- PANTOPOULOS, K. Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann NY Acad Sci*. 2004; 1012: 1-13
- PAPANIKOLAOU, G.; SAMUELS, M. E.; LUDWIG, E. H.; MACDONALDS, M. L. E.; FRANCHINI, P. L.; DUBÉ, M.-P.; ANDRES, L.; MACFARLANE, J.; SAKELLAROPOULOS, N.; POLITOU, M.; NEMETH, E.; THOMPSON, J.; RISLER, J. K.; ZABOROWSKA, C.; BABAKAIF, R.; RADOMSKI, C. C.; PAPE, T. D.; DAVIDAS, O.; CHRISTAKIS, J.; BRISSOT, P.; LOCKITCH, G.; GANZ, T.; HAYDEN, M. R.; GOLDBERG, Y. P. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*. 2004; 36: 77-82
- PARK, C.H.; VALORE, E. V.; WARING, A. J.; GANZ, T. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*. 2001; 276: 7806-7810
- PRAKASH, M. Role of non-transferrin-bound iron in chronic renal failure and other disease conditions. *Indian J Nephrol*. 2007; 14: 188-193
- PARKES, J. G.; RANDELL, E. W.; OLIVIERI, N. F.; TEMPLETON, D. M. Modulation by iron loading and chelation of the uptake of non-transferrin-bound iron by human liver cells. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1243: 373-380

- PATTON, S. M.; PINERO, D. J.; SURGULADZE, N.; BEARD, J.; CONNOR, J. R. Subcellular localization of iron regulatory proteins to Golgi and ER membranes. *J Cell Sci.* 2005; 118: 4365–4373
- PAQUIN, J.; DANALACHE, B. A.; JANKOWSKI, M.; McCANN, S. M.; GUTKOWSKA, J. Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99: 9550–955
- PENG, C.-T.; CHOW, K.-C.; CHEN, J.-H.; CHIANG, Y.-P.; LIN, T.-Y.; TSAI, C.-H. Safety monitoring of cardiac and hepatic systems in β -thalassemia patients with chelating treatment in Taiwan. *Eur J Haematol.* 2003; 70: 392-397
- PICCINELLI, P.; SAMULESSON, T. Evolution of the ironresponsive element. *RNA.* 2007; 13: 952–966
- PIERRE, J. L.; GAUTIER-LUNEAU, I. Iron and citric acid: A fuzzy chemistry of ubiquitous biological relevance. *BioMetals.* 2000; 13: 91–96
- PIETRANGELO, A. Hereditary hemochromatosis—A new look at an old disease. *N Engl J Med.* 2004; 350: 2383–2397
- PIGEON, C.; ILYIN, G.; COURSELAUD, B.; LEROYER, P.; TURLIN, B.; BRISSOT, P.; LORÉAL, O. A new mouse liverspecific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem.* 2001; 276: 7811-7819
- POLLACK, S.; AISEN, P.; LASKY, F. D.; VANDERHOFF, G. Chelate mediated transfer of iron from transferrin to desferrioxamine. *Br J Haematol.* 1976; 34: 231-235
- PONDARRÉ, C.; ANTICHOS, B. B.; CAMPAGNA, D. R.; CLARKE, S. L.; GREER, E. L.; DECK, K. M.; McDONALD, A.; HAN, A. P.; MEDLOCK, A.; KUTOK, J. L.; ANDERSON, S. A.; EISENSTEIN, R. S.; FLEMING, M. N. The mitochondrial ATP-binding cassette transporter Abcb7 is essential in mice and participates in cytosolic iron-sulfur cluster biogenesis. *Hum Mol Genet.* 2006; 15: 953–964
- POOTRAKUL, P.; JOSEPHSON, B.; HUEBERS, H. A.; FINCH, C. A. Quantitation of ferritin iron in plasma, an explanation for non-transferrin iron. *Blood.* 1988; 71: 1120-3
- RECALCATI, S.; INVERNIZZI, P.; AROSIO, P.; CAIRO, G. New functions for an iron storage protein: The role of ferritin in immunity and autoimmunity. *J Autoimmun.* 2008; 30: 84–89
- RECALCATI, S.; MINOTTI, G.; CAIRO, G. Iron Regulatory Proteins: From Molecular Mechanisms to Drug Development. *Antioxid Redox Signal.* 2010; 13: 1593–1616
- RIVERA, S.; LIU, L.; NEMETH, E.; GABAYAN, V.; SORENSEN, O. E.; GANZ, T. Hepcidin excess induces the sequestration of iron and exacerbates tumor-associated anemia. *Blood.* 2005; 104: 2388-2392

- RYBIN, V. O.; GRABHAM, P. W.; ELOUARDIGHI, H.; STEINBERG, S. F. Caveolae-associated proteins in cardiomyocytes: caveolin-2 expression and interactions with caveolin-3. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 285: 325–332
- ROBACH, P.; RECALCATI, S.; GIRELLI, D.; GELFI, C.; AACHMANN-ANDERSEN, N. J.; THOMSEN, J. J.; NORGAARD, A. M.; ALBERGHINI, A.; CAMPOSTRINI, N.; CASTAGNA, A.; VIGANO, A.; SANTAMBROGIO, P.; KEMPF, T.; WOLLERT, K. C.; MOUTEREAU, S.; LUNDBY, C.; CAIRO, G. Alterations of systemic and muscle iron metabolism in human subjects treated with low-dose recombinant erythropoietin. *Blood*. 2009; 113: 6707–6715
- ROBACH, P.; CAIRO, G.; GELFI, C.; BERNUZZI, F.; PILEGAARD, H.; VIGANO, A.; SANTAMBROGIO, P.; CERRETELLI, P.; CALBET, J.; MOUTEREAU, S.; LUNDBY, C. Strong iron demand during hypoxia-induced erythropoiesis is associated with down-regulation of iron-related proteins and myoglobin in human skeletal muscle. *Blood*. 2007; 109: 4724–4731
- ROETTO, A.; PAPANIKOLAOU, G.; POLITOU, M.; ALBERTI, F.; GIRELLI, D.; CHRISTAKIS, J.; LOUKOPOULOS, D.; CAMASCHELLA, C. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*. 2003; 33: 21–22
- ROETTO, A.; TOTARO, A.; CAZZOLA, M.; CICILANO, M.; BOSIO, S.; D'ASCOLA, G.; CARELLA, M.; ZELANTE, L.; KELLY, L.; COX, M.; GASPARINI, P.; CAMASCHELLA, C. Juvenile Hemochromatosis Locus Maps to Chromosome 1q. *Am J Hum Genet*. 1999; 64: 1388–1393
- SAMMARCO, M. C.; DITCH, S.; BANERJEE, A.; GRABCZYK, E. Ferritin L and H subunits are differentially regulated on a post-transcriptional level. *J Biol Chem*. 2008; 283: 4578–4587
- SANCHEZ, M.; GALY, B.; DANDEKAR, T.; BENGERT, P.; VAINSHTEIN, Y.; STOLTE, J.; MUCKENTHALER, M. U.; HENTZE, M. W. Iron regulation and the cell cycle: Identification of an iron-responsive element in the 3'-untranslated region of human cell division cycle 14A mRNA by a refined microarray-based screening strategy. *J Biol Chem*. 2006; 281: 22865–22874
- SÁNCHEZ, N. S.; KÖNIGSBERG, M. Using Yeast to Easily Determine Mitochondrial Functionality with 1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Assay. *Biochem Mol Biol Educ*. 2006; 34: 209–212
- SCHALINSKE, K. L.; CHEN, O. S.; EISENSTEIN, R. S. Iron differentially stimulates translation of mitochondrial aconitase and ferritin mRNAs in mammalian cells. Implications for iron regulatory proteins as regulators of mitochondrial citrate utilization. *J Biol Chem*. 1998; 273: 3740–3746
- SCHEIBER, B.; GOLDENBERG, H. The surface of rat hepatocytes can transfer iron from stable chelates to external acceptors. *Hepatology*. 1998; 27: 1075–80

- SCHEIBER-MOJDEHKAR, B.; ZIMMERMANN, I.; DRESOW, B.; GOLDENBERG, H. Differential response of non-transferrin bound iron uptake in rat liver cells on long-term and short-term treatment with iron. *J Hepatol.* 1999; 31: 61-70
- SCHUBERT, J.; DERR, S. K. Mixed ligand therapy for plutonium and cadmium poisoning. *Nature.* 1978; 275: 311-313
- SKERJANC, I. S. Cardiac and Skeletal Muscle Development in P19 Embryonal Carcinoma Cells. *TCM* 1999; 9:139-143
- SHVARTSMAN, M.; KIKKERI, R.; SHANZER, A.; CABANTCHIK, I. Non-transferrin-bound iron reaches mitochondria by a chelator-inaccessible mechanism: biological and clinical implications. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007; 293: 1383–1394
- TACCHINI, L.; GAMMELLA, E.; DE PONTI, C.; RECALCATI, S.; CAIRO, G. Role of HIF-1 and NF-kappaB transcription factors in the modulation of transferrin receptor by inflammatory and anti-inflammatory signals. *J Biol Chem.* 2008; 283: 20674–20686
- TORTI, F. M.; TORTI, S. V. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood.* 2002; 99: 3505-3516
- TRINDER, D.; MORGAN, E. Mechanism of ferric citrate uptake by human hepatoma cells. *Am J Physiol.* 1998; 275: 279-286
- VASHISHT, A. A.; ZUMBRENNEN, K. B.; HUANG, X.; POWERS, D. N.; DURAZO, A.; SUN, D.; BHASKARAN, N.; PERSSON, A.; UHLEN, M.; SANGFELT, O.; SPRUCK, C.; LLEIBOLD, E. A.; WOHLSCHEGEL, J. A. Control of iron homeostasis by an iron-regulated ubiquitin ligase. *Science.* 2009; 326: 718–721
- VIAATTE, L.; LESBORDES-BRION, J.-C.; LOU, D.-Q.; BENNOUN, M.; NICOLAS, G.; KAHN, A.; CANONNE-HERGAUY, F.; VAULONT, S. Deregulation of proteins involved in iron metabolism in hepcidin-deficient mice. *Blood.* 2005;105:4861-4864.
- VOLZ, K. The functional duality of iron regulatory protein 1. *Curr Opin Struct Biol.* 2008; 18: 106–111
- WALLANDER, M. L.; LEIBOLD, E. A.; EISENSTEIN, R. S. Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Act.* 2006; 1763: 668–689
- WALLANDER, M. L.; ZUMMBRENNEN, K. B.; RODANSKY, E. S.; ROMNEY, S. J.; LEIBOLD, E. A. Iron-independent phosphorylation of iron regulatory protein 2 regulates ferritin during the cell cycle. *J Biol Chem.* 2008; 283: 23589–23598
- WANG, W.; DI, X.; D'AGOSTINO, R. B. Jr.; TORTI, S. V.; TORTI, F. M. Excess capacity of the iron regulatory protein system. *J Biol Chem.* 2007; 282: 24650–24659
- WEATHERALL, D.J. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nat. Rev. Genet.* 2001; 2: 245–255

WEISS, G. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1790: 682–693

WESSLING–RESNICK, M. Iron imports. III. Transfer of iron from the mucosa into circulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006; 290: 1–6

WESTERGAARD, N.; SONNENWALD, U.; UNSGARD, G.; PENG, L.; HERTZ, L.; SCHOUSBOE, A. Uptake, release, and metabolism of citrate in neurons and astrocytes in primary cultures. *J Neurochem*. 1994; 62: 1727–1733

WOBUA, A. M.; ROHWEDEL, J.; MALTSEV, V.; HESCHELER, J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes or skeletal muscle cells is specifically modulated by retinoic acid. *Dev Genes Evol*. 1994; 204: 36–45

ZAHRINGER, J.; BALIGA, B. S.; MUNRO, H. N. Novel mechanism for translational control in regulation of ferritin synthesis by iron. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1976; 73: 857–861

ZUMBRENNEN, K. B.; WALLANDER, M. L.; ROMNEY, S. J.; LEIBOLD, E. A. Cysteine oxidation regulates the RNA-binding activity of iron regulatory protein 2. *Mol Cell Biol*. 2009; 29: 2219–2229

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Marlies Moshammer
Geburtsdatum	02. September 1988
Geburtsort	Wien
Staatsbürgerschaft	Österreich
Familienstand	ledig

Schulbildung

1994-1998	Besuch der Evangelischen Volksschule am Karlsplatz, 1040 Wien
1998-2006	Besuch des Gymnasiums Kundmanngasse, 1030 Wien
2006	Matura mit gutem Erfolg abgelegt

Ausbildung

2006-2011	Studium der Ernährungswissenschaften an der Universität Wien
Jänner 2010	Bakkalaurea der Naturwissenschaften

Studienbegleitende Tätigkeiten

August 2007	Praktikum in der Österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, tätig im Kompetenzzentrum für Tierarzneimittel und Hormone
Juli/August 2008	Praktikum im Gottfried von Preyer'schen Kinderspital
Februar 2010	Praktikum am Department für Ernährungswissenschaften
August/September 2010	Praktikum an der Veterinärmedizinischen Universität Wien, tätig am Institut für angewandte Botanik
Oktober 2010	Praktikum am Institut für medizinische Chemie
Mai/Juni 2011	Tätigkeit als Tutorin beim biochemischen Praktikum für Ernährungswissenschaftler am Institut für medizinische Chemie der Medizinischen Universität Wien