

**Untersuchungen zum
Eisenmetabolismus während der megakaryozytären
Differenzierung und Proliferation der K562-Zellen**

Dissertation
von
Krzysztof Wandzik

Zur Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

Berlin, 2008

Die praktischen Arbeiten wurden am Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin (Leiter: Prof. Dr. R. Tauber), in der Arbeitsgruppe von PD Dr. H. Fuchs angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. H. Fuchs
Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Saenger
Institut für Chemie – Kristallographie
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
Freie Universität Berlin

Tag der Disputation: 03. Juli 2008

Die in dieser Arbeit verwendeten geschützten Warenzeichen sind innerhalb des laufenden Textes nicht immer als solche gekennzeichnet. Aus dem Fehlen der Kennzeichnung kann also nicht geschlossen werden, dass der entsprechende Produktname frei von Rechten Dritter ist.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Nomenklatur	X
<u>1</u> <u>Einführung</u>	<u>1</u>
1.1 Eisenmetabolismus	1
1.1.1 Die Rolle von Eisen in biologischen Systemen	1
1.1.2 Zellulärer Eisenstoffwechsel	2
1.1.2.1 Transferrinabhängige Eisenaufnahme	2
1.1.2.1.1 Transferrinrezeptor-1 und -2 (TfR1 und -2)	3
1.1.2.1.2 Hämochromatoseprotein (HFE)	5
1.1.2.2 Transferrinunabhängige Eisenaufnahme (<i>non-Tf iron uptake</i>)	6
1.1.2.2.1 Eisenaufnahme über den <i>divalent metal transporter-1</i> (DMT1, NRAMP2, SLC11A2)	6
1.1.2.2.2 Eisenaufnahme über den Integrin-Mobilferrin-Weg (<i>IMP pathway</i>)	7
1.1.2.3 Eisenspeicherung	8
1.1.2.4 Eisenfreisetzung	9
1.1.2.5 Regulation des intrazellulären Eisenmetabolismus	9
1.1.3 Systemischer Eisenstoffwechsel	12
1.1.4 Eisenmetabolismus in erythroiden Zellen	14
1.2 Die K562-Zelllinie als Modellsystem für megakaryozytäre und erythroide Differenzierung	17
1.3 Megakaryozytäre Differenzierung	18
1.4 Erythroide Differenzierung	22
1.5 Stand der Forschung und Ziele der vorliegenden Arbeit	24

<u>2</u>	<u>Material</u>	<u>26</u>
2.1	Geräte	26
2.1.1	Zellkultur	26
2.1.2	Zentrifugen	26
2.1.3	Proteinelektrophorese und Westernblot	26
2.1.4	Photometer	26
2.1.5	PCR und Agarosegelelektrophorese	27
2.1.6	Sonstige Geräte	27
2.2	Chemikalien	27
2.3	Verbrauchsmaterialien	28
2.4	Zellkultur	29
2.5	Kits	29
2.6	Puffer, Medien und Marker	30
2.7	Antikörper	30
2.7.1	Primärantikörper	30
2.7.2	Sekundärantikörper	31
2.8	Enzyme und weitere Proteine	31
2.9	Vektoren	31
2.10	Oligonukleotide	32
2.11	Bakterienstämme	32
2.12	Zelllinien	32
<u>3</u>	<u>Methoden</u>	<u>33</u>
3.1	Zellbiologische Methoden	33
3.1.1	Zellkultur	33
3.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	34
3.1.3	Stabile Transfektion von K562-Zellen mittels Nukleofektion	34
3.1.4	Kultivierung von Transfektanten und Kontrollzellen	35

3.1.5	Differenzierung der K562-Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	35
3.1.5.1	Experimente zum Einfluss verschiedener PMA- und DMSO-Konzentrationen auf die Proliferation der K562-Zellen und die HFE-Proteinexpression	36
3.1.5.2	Experimente mit Beladung der proliferierenden oder differenzierenden K562-Zellen mit FAC, FeNTA oder Ferri-Tf	37
3.1.6	Lyse von Zellen	38
3.1.7	Vitalitätsassay mit Fluoresceindiacetat (FDA)	38
3.1.8	Zellorganellenfraktionierung	39
3.1.8.1	Homogenisation von Zellen	39
3.1.8.2	Differentielle Zentrifugation und Membranpräparation	39
3.1.9	Isolierung der Exosomen aus dem Zellkulturmedium der K562-Zellen	39
3.1.10	Bestimmung der Hämoglobinkonzentration	40
3.1.11	Bestimmung der Masse der K562-Zellen	41
3.1.12	Kolorimetrische Eisenbestimmung	41
3.1.13	Bestimmung der Acetylcholinesteraseaktivität (AChE-Assay)	41
3.1.14	Färbung der Zellen nach Pappenheim	42
3.2	Proteinchemische Methoden	43
3.2.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	43
3.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
3.2.3	Coomassiefärbung und Trocknen von Gelen	44
3.2.4	Westernblot	45
3.2.4.1	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran	45
3.2.4.2	Immunoblot	45
3.2.5	Transferrin-Sepharose-Affinitätschromatographie und semiquantitative sTfR-Bestimmung	46
3.3	Molekularbiologische Methoden	47
3.3.1	Gesamt-RNA-Isolierung aus Zellkulturzellen	47
3.3.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	47
3.3.3	RT-PCR	48
3.3.3.1	Primerauswahl	50
3.3.3.2	Semiquantitative RT-PCR	51

3.3.3.3	RT-PCR und semiquantitative RT-PCR für Präprohepcidin	53
3.3.3.3.1	Semiquantitative RT-PCR für „Hepcidin-1“	53
3.3.3.3.2	RT-PCR von Präprohepcidin-cDNA („Hepcidin-2-Amplifikat“)	54
3.3.3.3.3	RT-PCR für „Hepcidin-3“	55
3.3.4	Ligation von DNA mittels <i>pCR[®]-Blunt II-TOPO Cloning Kit</i>	56
3.3.5	Ligation von DNA mit T4 DNA-Ligase	57
3.3.6	Transformation und Vermehrung von Bakterien	58
3.3.7	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	58
3.3.8	Restriktionsverdau	59
3.3.9	Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren	59
3.3.10	Sequenzierung von DNA	60
3.3.11	Präparation von Plasmid-DNA	61
3.4	Statistische Analyse	61
4	<u>Ergebnisse</u>	62
4.1	Methodische Ergebnisse	62
4.1.1	RT-PCR-Semiquantifizierungen	62
4.1.2	Bestimmung der Vitalität der Zellen (Fluoresceindiacetat (FDA)-Assay)	64
4.1.3	Eisenbestimmung mittels Ferrozin-Assay	65
4.1.4	Spektrophotometrische Hämoglobinbestimmung (Hb-Assay)	66
4.1.5	Spektrophotometrische Bestimmung der Acetylcholinesteraseaktivität (AChE-Assay)	67
4.2	Charakterisierung der K562-Zellen	68
4.2.1	Expression der megakaryozytären und erythroiden Marker	68
4.2.2	Hämoglobinkonzentration	69
4.2.3	Expression der im zellulären Eisenstoffwechsel involvierten Proteine	70
4.2.4	Expression von Präprohepcidin	72
4.3	Regulation des Eisenstoffwechsels in proliferierenden K562-Zellen	73
4.3.1	Posttranskriptionale Expressionsregulation von TfR1-, H- und L-Ferritin- sowie Ferroportin-Transkripten durch IRP / IRE-Wechselwirkungen	73

4.3.2	Expressionsregulation der Präprohepcidin-mRNA durch Eisen	74
4.3.3	Einfluss der Präprohepcidin-cDNA-Überexpression in K562-Zellen auf die Regulation des zellulären Eisenstoffwechsels	75
4.3.3.1	Klonierung von Präprohepcidin-cDNA	75
4.3.3.1.1	RT-PCR von Präprohepcidin-cDNA	75
4.3.3.1.2	Klonierung von Präprohepcidin-cDNA in den pCR-Blunt II-TOPO-Vektor und Umklonierung in den pcDNA3-Vektor	75
4.3.3.1.3	Einfluss der Präprohepcidin-cDNA-Überexpression in K562-Zellen auf die Expression der TfR1-, Ferritin- und Ferroportin-mRNA oder die Expression der endogenen Präprohepcidin-Transkripte	76
4.4	Megakaryozytäre Differenzierung der K562-Zellen	77
4.4.1	Vitalität der K562-Zellen nach 72-stündiger PMA-Stimulation	77
4.4.2	Aktivierung der Apoptose	78
4.4.3	Differenzierungsbedingter Wachstumsstopp	79
4.4.4	Morphologische Veränderungen	81
4.4.5	Megakaryozytäre und erythroide Marker	82
4.4.6	Eisenstoffwechsel	84
4.4.6.1	Die zelluläre Eisenkonzentration	84
4.4.6.2	Eisenaufnahme	86
4.4.6.2.1	Expression von TfR1- und HFE-Protein	86
4.4.6.2.2	Regulation der HFE-Proteinexpression durch Eisen und PMA	87
4.4.6.2.3	Shedding des TfR1	88
4.4.6.2.4	Bildung von Exosomen	88
4.4.6.2.5	Transferrinabhängige Eisenaufnahme	89
4.4.6.3	Eisenspeicherung und -freisetzung	90
4.4.6.4	Regulation des Eisenmetabolismus in differenzierenden K562-Zellen	91
4.4.6.4.1	Die Rolle der Proteinkinase C	92
4.4.6.4.2	Die Rolle des Eisens	92
4.4.6.5	Regulation der Hämoglobinsynthese	93
4.4.6.6	Expression weiterer Proteine des Eisenstoffwechsels	96
<u>5</u>	<u>Diskussion</u>	<u>98</u>
5.1	Eisenmetabolismus in proliferierenden K562-Zellen	98

5.1.1	Regulation der Expression von TfR1-, H- und L-Ferritin- sowie Ferroportin-Transkripten durch Eisen	98
5.1.2	Die Rolle von Hepcidin in der Regulation des Eisenmetabolismus in proliferierenden K562-Zellen	100
5.2	Megakaryozytäre Differenzierung der K562-Zellen	101
5.2.1	Differenzierungsprozess und dessen Marker	101
5.2.2	Eisenmetabolismus	103
5.2.2.1	Die zelluläre Eisenkonzentration	103
5.2.2.2	Die Rolle des Eisens in der Expressionsregulation von TfR1-, H-Ferritin-, L-Ferritin- sowie Ferroportin-Transkripten	106
5.2.2.3	Eisenaufnahme	108
5.2.2.4	Eisenspeicherung und -freisetzung	113
5.2.2.5	Hämoglobinsynthese	115
5.2.2.6	Einfluss des Eisens auf die Ausprägung der erythroiden und megakaryozytären Eigenschaften	118
5.2.2.7	Modell zur Reorganisation des Eisenmetabolismus während der PMA-abhängigen megakaryozytären Differenzierung	119
5.3	Ausblick	121
<u>6</u>	<u>Zusammenfassung</u>	<u>123</u>
<u>7</u>	<u>Summary</u>	<u>125</u>
<u>8</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>127</u>
<u>9</u>	<u>Anhang</u>	<u>147</u>
9.1	Allgemeines	147
9.2	Veröffentlichungen	151
9.3	Lebenslauf	153
9.4	Danksagung	154

Abkürzungen und Nomenklatur

*	Peroxidase (aus Meerrettich)
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AChE	Acetylcholinesterase
<i>ad</i>	lat: bis
ALA	δ-Aminolävulinsäure
ALAS	δ-Aminolevulinsäuresynthase
<i>al.</i>	lat.: <i>alii</i> , andere
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
a.sTfR	alternativ gespaltener sTfR
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BCA	engl.: <i>bicinchonic acid</i> , 2-Bicinchoninsäure
BSA	engl.: <i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	engl.: <i>cluster of differentiation</i>
CDC14A	engl.: <i>cell division cycle 14 homolog A</i>
cDNA	engl.: <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> , die der <i>messenger-RNA</i> komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Da	Dalton ($1,660 \times 10^{-24}$ g)
Dab	engl.: <i>Drosophila disabled protein</i> , Dab-Protein
DCYTB	Duodenales Cytochrom B
DMEM	engl.: <i>dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT1	engl.: <i>dimetal transporter-1</i>
DNA	engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP(s)	Desoxyribonukleotid(e)
E64	(N-(N-(L-3-transcarboxyiran-2-carbonyl)-L-leucyl)-agmatin)
<i>E. coli</i>	lat.: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	engl.: <i>epidermal growth factor</i>
Em	Emission
engl.	Englisch
ERK	engl.: <i>extracellular signal-regulated protein kinase</i> , MAPK
Erythron	funktionelle Einheit bestehend aus Erythrozyten des Blutes und der Gesamtheit der im Knochenmark vorhandenen erythropoietischen Vorstufen
Ex	Extinktion
FAC	engl.: <i>ferric ammonium citrate</i> , Eisenammoniumcitrat
FECH	Ferrochelatase
FeNTA	Eisen(III)-Nitrilotriacetat
Ferri-Tf	Ferritransferrin, Holotransferrin
Fe-S	Eisen-Schwefel
FLVCR	engl.: <i>feline leukemia virus type C receptor</i>
Fpn1	Ferroportin
G1	engl.: <i>Gap1</i>
G2/M	engl.: <i>Gap2 / Mitose</i>

GFX	GF 109203X, Bisindolylmaleimid I
h	Stunde(n)
Hb	Hämoglobin
Hif-1	engl.: <i>hypoxia-inducible factor 1</i>
H-FT	engl.: <i>ferritin heavy chain</i> , schwere Ferritinkette
HFE	Hämochromatoseprotein
HMBA	Hexamethylen-bisacetamid
Holo-Tf	Holotransferrin, Ferritransferrin
HRP	engl.: <i>horseradish peroxidase</i>
Hrsg.	Herausgeber
Hsc	engl.: <i>heat shock cognate protein</i> , Hsc-Protein
IC ₅₀	diejenige Hemmstoffkonzentration, bei der die Hemmung des Enzyms, Rezeptors, Zelle (allgemein: <i>targets</i>) 50 % beträgt
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IL-2R	Interleukin-2-Rezeptor
IMP	engl.: <i>Integrin-Mobilferrin Pathway</i>
IRE(s)	engl.: <i>iron responsive element(s)</i>
IRP(s)	engl.: <i>iron regulatory protein(s)</i>
k	kilo
K _A	Gleichgewichtsbindungskonstante
kb	engl.: <i>kilobase</i>
kDa	engl.: <i>kilodalton</i>
Kap.	Kapitel
L-FT	engl.: <i>ferritin light chain</i> , leichte Ferritinkette
LB	Luria Bertani
LCR	engl.: <i>locus control region</i>
LEAP-1	engl.: <i>liver-expressed antimicrobial peptide 1</i>
LIP	engl.: <i>labile iron pool</i>
LPS	Lipopolysaccharide
M	mol/l
m	milli
M-MLV RT (H-)	engl.: <i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, RNase H Minus Point Mutant</i>
MAPK	engl.: <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKK	engl.: <i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MCS	engl.: <i>multiple cloning site</i>
MEL	engl.: <i>murine erythroleukemia</i>
min	Minute(n)
MRCK α	engl.: <i>myotonic dystrophy kinase-related CDC42-binding protein kinase α</i>
MRE(s)	engl.: <i>metal response element(s)</i>
mRNA	engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i> , Botenribonukleinsäure
MVBs	engl.: <i>multivesicular bodies</i>
n	Anzahl der Experimente
nM	nanomol/l
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NF-E2	engl.: <i>nuclear factor E2</i>
NP-40	Nonidet P-40
NRAMP2	engl.: <i>natural resistance-associated macrophage protein 2</i> , DMT1
Nrf	engl.: <i>NF-κB-repressing factor</i>
OD	optische Dichte
o. g.	oben genannte(n)
OKT9	Monoklonaler Antikörper (IgG1) gegen die extrazelluläre Domäne

	des humanen Transferrinrezeptor gerichtet
ORF	engl.: <i>open reading frame</i> , offenes Leseraster; ein Raster auf der DNA, das ausschließlich aus Aminosäure-kodierenden Triplets besteht
p	Signifikanz
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	engl.: <i>Poly(ADP)-Ribose Polymerase</i>
PBS	engl.: <i>phosphate buffer saline</i> , Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PBSB _{0,2}	PBS mit 0,2 % (w/v) Brij 58
PBST	PBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDGF	engl.: <i>plateled derived growth factor</i>
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q	Koenzym Q, Ubiquinon
R	Korrelationskoeffizient, ein dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei intervallskalierten Merkmalen, kann die Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Bei R = 1 sind zwei Merkmale vollständig miteinander korreliert
R ²	Bestimmtheitsmaß (oder Determinationskoeffizient), entspricht bei einfachen Regressionen dem Quadrat des Korrelationskoeffizienten R und ermöglicht eine Abschätzung, inwieweit die Varianz einer Variablen die Varianz einer anderen Variablen determiniert. R ² kann die Werte zwischen 0 (kein linearer Zusammenhang) und 1 (exakter linearer Zusammenhang) annehmen.
Rab	Rab-Protein aus der Ras Familie der kleinen GTPasen
RAM	Antimausantikörper aus Kaninchen
Ras	Ras-Proteine, Familie der kleinen GTPasen (Ras, Rho, Arf, Rab, Ran)
RNA	engl.: <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RPMI	engl: <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
S	Svedberg (10 ⁻¹³ sec)
s.	siehe
SAR	Antikaninchenantikörper aus Schwein
S.D.	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	engl.: <i>second(s)</i> , Sekunde(n)
S.E.M	Fehler des Mittelwertes
siRNA	engl.: <i>small interferring rbonucleic acid</i>
sog.	sogenannte (r, s)
Sos	engl.: <i>son of sevenless</i>
STA	Staurosporin
sTfR	Serumtransferrinrezeptor
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tf	Transferrin
TfR	Transferrinrezeptor, auch Transferrinrezeptormonomer
TfR:TfR	Transferrinrezeptordimer

T _m	Schmelztemperatur des Oligonukleotides
TNF α	engl.: <i>tumor necrosis factor α</i>
Tris	Tris-Hydroxymethyl-aminomethan
Triton X-100	T-octylphenoxypolyethoxyethanol
TSR	engl.: <i>template supression reagent</i>
TST	Tris-Saline-Tween
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
USF	engl.: <i>upstream stimulatory factor</i>
usw.	und so weiter
UTR	engl.: <i>untranslated region</i> , untranslatierter Bereich
ÜN	über Nacht
ÜS	Überstand
V	Volt
v/v	Konzentrationsangabe in Volumenanteilen am Gesamtvolumen
w/v	Konzentrationsangabe in Gewichtsanteilen am Gesamtvolumen
% (v/v)	Prozentgehalt Volumen am Gesamtvolumen (ml/100 ml)
% (w/v)	Prozentgehalt Masse am Gesamtvolumen (g/100 ml)
% (w/w)	Gewichtsprozent
x \times g	x-faches der Erdbeschleunigung
z. B.	zum Beispiel
μ M	mikromol/l