

1 Einführung

1.1 Eisenmetabolismus

1.1.1 Die Rolle von Eisen in biologischen Systemen

Eisen gehört zu den lebensnotwendigen Spurenelementen. Von 4–5 g Gesamtkörpereisen beansprucht der Sauerstofftransport fast zwei Drittel – über 60 % sind an Hämoglobin gebunden und Myoglobin enthält 4,5 %. Nur ein geringer Teil des im Organismus befindlichen Eisens (0,2 %) ist in anderen Hämproteinen wie Cytochromen, Peroxidasen, Katalasen oder NO-Synthase enthalten. In diesen Enzymen, gebunden an ein Porphyringerüst und wechselnd zwischen den Oxidationsstufen +2 und +3, nimmt Eisen an Reaktionen mit Ein-Elektronen-Übergängen teil. Weitere 10 % des im Körper enthaltenen Eisens liegt in prostetischen Gruppen solcher Enzyme vor, wo Eisen in Form von Eisen-Schwefel-Clustern direkt an die Peptidkette gebunden ist, wie z. B. IRP1 (cytosolische Aconitase), Ferrochelatase, NADH-Q-Oxidoreduktase, Succinat-Q-Oxidoreduktase und Q-Cytochrom c-Reduktase. In Oxidationsstufe +3 ist es im Blut und im extrazellulären Raum vorhanden, wobei nur 0,2 % des Gesamtkörpereisens an das Eisentransportprotein Transferrin gebunden wird. In dieser Oxidationsstufe wird Eisen auch intrazellulär als Ferritin oder Hämosiderin gespeichert (18,8 % des im Organismus enthaltenen Eisens). In der Oxidationsstufe +2 liegen Eisenionen dagegen im Cytoplasma frei vor und sind als *labile iron pool* (LIP) nicht an Proteine gebunden. Wegen der Beteiligung an Redoxreaktionen sind freie Fe^{2+} -Ionen potentiell für die Zelle toxisch, deshalb wird deren Konzentration streng reguliert. Auch die Konzentration der Fe^{3+} -Ionen im Blut unterliegt aus diesem Grund einer systemischen Regulation. Störungen der Eisenhomeostase haben bei hämatologischen Krankheiten negative Folgen für den ganzen Organismus. Ein Mangel an Eisen verursacht eine megaloblastische Anämie, während Eisenüberschuss zur Hämochromatose (angeborene Form) oder Hämosiderose (iatrogene Form) führen kann (Löffler und Pterides, 1997, Karlson *et al.*, 1994).

1.1.2 Zellulärer Eisenstoffwechsel

Um einerseits genügend Eisen für essentielle zelluläre Prozesse zur Verfügung zu stellen und andererseits eine eisenbedingte Zellschädigung durch oxidativen Stress zu vermeiden, haben Zellen im Laufe der Evolution zahlreiche Mechanismen entwickelt, die die Aufnahme, Speicherung und Freisetzung von Eisen koordinieren und an den zellulären Bedarf anpassen.

1.1.2.1 Transferrinabhängige Eisenaufnahme

Der wohl meist verbreitete und am besten untersuchte Mechanismus der Eisenaufnahme in Säugerzellen stellt die Aufnahme von Transferrineisen über den Transferrinrezeptor-1 (TfR1) dar, die bereits in vielen Zelltypen nachgewiesen wurde. Es ist der Hauptweg für die Eisenaufnahme in Retikulozyten und Hepatozyten (Nunes *et al.*, 1984, Kohno und Tokunaga, 1985, Morgan und Baker, 1988). Im Blut wird Eisen an das Trägerprotein Transferrin gebunden, ein β -Globulin mit molekularer Masse von 88 kDa, das von Hepatozyten synthetisiert wird und zwei dreiwertige Eisenionen bindet. Jedoch nicht alle Transferrinbindungstellen werden von Fe^{3+} besetzt. Die physiologische Eisentransferrin-Sättigung liegt bei 25–30 %, und dem Mechanismus der Eisenaufnahme über TfR1 liegen Unterschiede in der Bindung von Apotransferrin und eisenhaltigem Transferrin am TfR1 zugrunde. Das zweifach mit Eisen beladene Transferrin eines Kaninchens ($K_A: 1,1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) bindet an den TfR1 mit der 25mal stärkeren Affinität als das Apotransferrin ($K_A: 4,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) und 6–7mal stärker als das einfach beladene Transferrin, das eine K_A von $2,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ besitzt (Young *et al.*, 1984). In Abb. 1.1 wird der Mechanismus der Eisenaufnahme über den TfR1 dargestellt. Wird das aufgenommene Eisen nicht im zellulären Metabolismus verbraucht (z. B. für die Hämsynthese in erythroiden Zellen), so kann es im Ferritin gespeichert oder über Eisenexporterproteine extrazellulär freigesetzt werden.

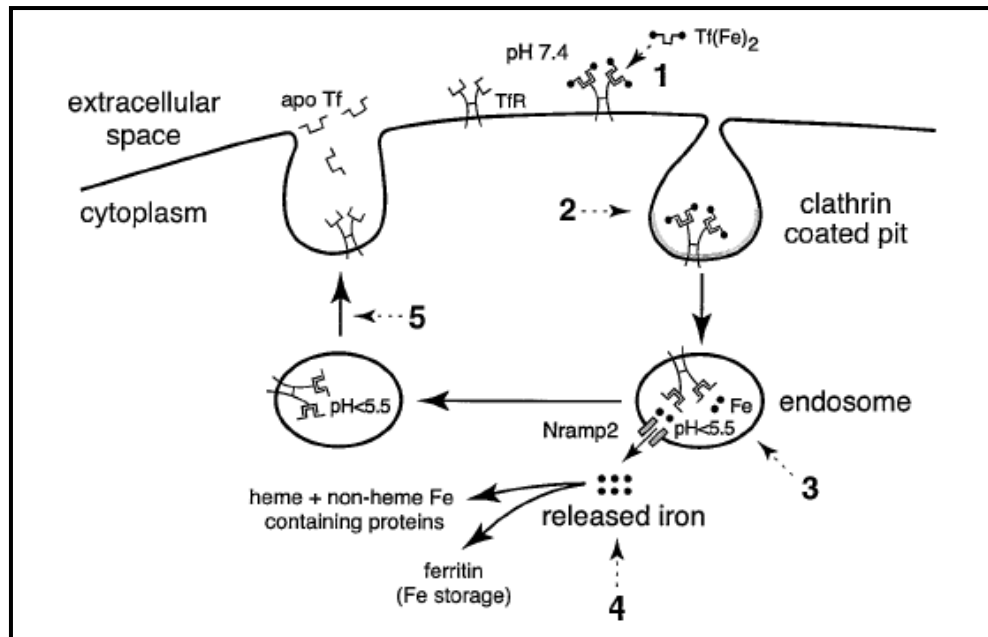


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der transferrinabhängigen Eisenaufnahme nach Ponka *et al.*, 2002. In den ersten Schritten werden zwei Moleküle des eisenbeladenen Transferrins (Ferritransferrin) von den Zellen an den Transferrinrezeptor-1 gebunden (1), in den sog. *coated pits* gesammelt (2) und über den Mechanismus der rezeptorvermittelten Endozytose aufgenommen. Die Internalisierung erfolgt mit Hilfe des Strukturproteins Clathrin, das zusammen mit anderen Proteinen, wie z. B. Dynamin, ein Netz um die *coated pits* ausbildet und bei deren Ablösung aus der Membran behilflich ist. Die so ausgebildeten umhüllten Vesikel verlieren schnell ihre Hülle und fusionieren mit den „sauren“ Endosomen. In diesem Milieu (pH < 5,5) wird das Fe^{3+} vom Transferrin abgelöst (3) und nach der Reduktion zu Fe^{2+} durch eine NADH-abhängige Ferricyanid-Oxidoreduktase mit Hilfe des *divalent metal transporter-1* (DMT1, NRAMP2) über die Vesikelmembran ins Cytoplasma transferiert (Gunshin *et al.*, 1997) (4). Nach der Rückkehr der so ausgebildeten Recyclingendosomen mit den eisenfreien Transferrin-Transferrinrezeptor-Komplexen an die Zellmembran (5), wird bei pH 7,4 das Apotransferrin wieder ins Blut abgegeben, während der Transferrinrezeptor-1 in der Zellmembran für den nächsten Zyklus der Transferrin-TfR-Endozytose zur Verfügung steht. © 2002 *Biochemical Society*.

1.1.2.1.1 Transferrinrezeptor-1 und -2 (TfR1 und -2)

Die Expression von Transferrinrezeptor-1 (TfR1), die in allen proliferierenden Zellen festgestellt wurde, wird infolge der mitogenen Stimulation verstärkt, was eine Antwort auf den erhöhten zellulären Eisenbedarf darstellt (Neckers, 1991). Zellen, die nicht proliferieren oder keinen Kern besitzen, wie z. B. Erythrozyten oder Thrombozyten, besitzen auch keinen TfR1 (van Bockxmeer und Morgan, 1979, Hannuxela *et al.*, 2003). Der humane Transferrinrezeptor-1, ein Dimer aus identischen Untereinheiten mit jeweils 760 Aminosäuren (95 kDa), besitzt in seiner cytoplasmatischen Domäne (Aminosäuren 1–67) eine Phosphorylierungsstelle für Proteinkinase C (PKC) am Ser 24 (Davis *et al.*, 1986a), das Internalisierungsmotiv YTRF (Collawn *et al.*, 1990 und 1993) und zwei Palmitoylierungsstellen in unmittelbarer

Nähe der Transmembrandomäne (Alvarez *et al.*, 1990). Innerhalb der *Stalk*-Region wird TfR1 durch Sheddingproteasen gespalten (Shih *et al.*, 1990, Kaup *et al.*, 2002a). Die durch Trypsin freigesetzte globuläre Domäne (Aminosäuren 122–760) mit einer O-Glykosylierungsstelle sowie drei N-Glykosylierungsstellen wurde von Borhani und Harrison kristallisiert (Borhani und Harrison, 1991) und Lawrence *et al.* haben seine Struktur aufgeklärt (Lawrence *et al.*, 1999). Dieses Fragment besteht aus einer proteaseähnlichen, einer apikalen und einer helikalen Domäne, wobei die helikale Domäne (Aminosäuren 607–760) für die Dimerisierung des TfR1 verantwortlich ist. Der im Blut nachgewiesene lösliche Transferrinreceptor (sTfR) ist ebenfalls ein Produkt der Spaltung innerhalb der *Stalk*-Region (zwischen Arg 100 und Leu 101) und besitzt eine molekulare Masse von 80 kDa (Shih *et al.*, 1990). Nur wenige Aminosäuren davon entfernt liegen Schnittstellen für die leukozytären Proteasen Neutrophile Elastase und Cathepsin G, die entsprechend an Val 108 / Arg 109 und Lys 95 / Thr 96 schneiden und für das Auftreten des sog. alternativen sTfR (a.sTfR) sorgen (Kaup *et al.*, 2002b). Etwa 80 % des sTfR im Blut stammt aus den Vorläuferzellen der Erythrozyten (vor allem Retikulozyten), die den Transferrinrezeptor durch Shedding aus der Zellmembran verlieren (R'zik *et al.*, 2001). Dieser Prozess sowie die Bildung von Exosomen (Kap. 1.4), sorgen dafür, dass Erythrozyten keinen TfR1 mehr auf der Zellmembran besitzen. Im Serum wird die erythropoietische Aktivität und die Verfügbarkeit von Eisen für die Erythropoese durch den vorliegenden sTfR widerspiegelt. Die Bestimmung von dessen Konzentration im Serum (4,1–5,6 mg/l bei gesunden Erwachsenen) ermöglicht zusammen mit anderen Parametern der Erythropoese die klinische Unterscheidung zwischen Eisenmangelanämie (erhöhte sTfR Konzentrationen) und Anämien, die chronische Erkrankungen begleiten (Flowers *et al.*, 1989).

Neben dem TfR1 existiert auch der TfR2 (Kawabata *et al.*, 1999), der 45 % Homologie zum TfR1 aufweist und dessen zwei Isoformen als Spleißvarianten zelltypspezifisch exprimiert werden. Die α -Form ist, ebenso wie der TfR1, ein Typ-II-Membranprotein, das vermutlich auch als Homodimer mit der 25–30mal geringeren Affinität als TfR1 an Ferritransferrin bindet. Da dieses Protein auch ein Internalisierungsmotiv besitzt, ist es vermutlich neben dem TfR1 an der transferrinabhängigen Eisenaufnahme beteiligt. Der TfR2 wird vor allem in der Leber, aber auch in erythroiden und myelotischen Zellen exprimiert. Gewebe wie Milz, Lunge, Muskel oder Prostata sowie periphere Makrophagen weisen nur sehr geringe Mengen an TfR2-mRNA auf. Im hämatopoietischen System wurde die TfR2-Protein-Expression lediglich in Erythroblasten und Megakaryozyten nachgewiesen. Die β -Isoform, der die

cytoplasmatische und die Transmembrandomäne fehlt, ist in allen Geweben nachweisbar (Trinder und Baker, 2003, *review*). TfR1 und TfR2 werden durch zwei verschiedene Genloci – 3q26 und 7q22 kodiert (McClelland *et al.*, 1984, Evans und Kemp, 1997, Glockner *et al.*, 1998), wobei Mutationen im TfR2-Gen mit Typ-3-Hämochromatose assoziiert sind (Roetto *et al.*, 2001, Gasparini und Camaschella, 2001). Im Unterschied zum TfR1 besitzt die TfR-2-mRNA keine *iron responsive elements* (IREs) und wird deshalb nicht posttranskriptional durch Eisen und *iron regulatory proteins* (IRPs) reguliert. Die Expression des TfR2 ist dagegen vom Zellzyklus abhängig. Während die Expression der TfR1-Transkripte in der späten G1 Phase und der G2 / M Phase ihr Maximum erreicht, ist die TfR2-mRNA-Expression in der späten G1 Phase am stärksten (Trinder und Baker, 2003, *review*). Die Funktion der löslichen β -Isoform des TfR2 ist bisher nicht bekannt.

1.1.2.1.2 Hämochromatoseprotein (HFE)

Hämochromatose ist mit einer geschätzten Frequenz von 1:200 bis 1:400 die häufigste Erbkrankheit in der kaukasischen Bevölkerung. Die am meisten verbreitete Form dieser Eisenspeicherkrankheit, die hereditäre Typ-1-Hämochromatose, wird autosomal rezessiv vererbt. Verursacht wird sie durch Mutationen im HFE-Gen, das sich auf dem Chromosom 6p21.3 befindet und das 348 Aminosäuren große HFE-Protein kodiert. HFE wird in fast allen Geweben, mit Ausnahme des Gehirns, exprimiert. Es wird postuliert, dass seine Funktion in der Modulation der von Transferrin abhängigen Eisenaufnahme liegt, obwohl seine Primärstruktur eine Zuordnung zu den Antigen-präsentierenden Proteinen der HLA-Familie zulässt (Feder *et al.*, 1996). Circa 85 % der Patienten mit Typ-1-Hämochromatose tragen im Exon 4 die Mutation C282Y in homozygoter Ausprägung (Merryweather-Clarke *et al.*, 1997), was die Bindung von HFE an β 2-Mikroglobulin und deren Präsenz auf der Zelloberfläche verhindert (Feder *et al.*, 1998, Lebron *et al.*, 1998). Weitere 5 % der heterozygoten Träger besitzen als „*compound*“-Heterozygoten eine weitere Mutation H63D, die eine korrekte Bindung an TfR1 verhindert (Beutler, 1997, Feder *et al.*, 1997). Die oben beschriebenen Mutationen sowie andere, die in allen 6 proteinkodierenden Exonen gefunden wurden (*Human Gene Mutation Database, Cardiff University, UK*), führen einerseits zur gesteigerten Eisenaufnahme im Dünndarm, und andererseits zur Eisenüberladung der Zellen. Die zellschädigenden Eisenablagerungen in Organen wie Leber, Herz, Gelenken oder endokrinen Drüsen führen im Laufe der Zeit zu deren funktionellen Insuffizienz. Interessanterweise bleiben sowohl Makrophagen, die physiologisch eine Eisenspeicherfunktion besitzen, als auch Kryptzellen im Dünndarm, wo die Resorption von Eisen stattfindet, in dieser Krankheit eisen-

arm (Pietroangelo, 2002). Im Einklang damit hat die Überexpression von HFE in der monozytären Zelllinie THP1 die Akkumulierung des Eisens zu Folge, welches durch Inhibition des Eisenexportes verursacht wird (Drakesmith *et al.*, 2002). Im Unterschied zur Rolle des HFE bei der Regulation der transferrinabhängigen Eisenaufnahme, die in zahlreichen Untersuchungen weitgehend aufgeklärt wurde, bleiben die molekularen Mechanismen der durch HFE-bedingten Inhibition der Eisenfreisetzung jedoch unklar. In Bindungs- und Internalisierungsstudien wurde gezeigt, dass HFE nicht nur die Bindung von Tf an den TfR1 blockiert (Gianetti und Björkman, 2004), sondern auch die Internalisierung des TfR1 verhindert (Salter-Cid *et al.*, 1999). Folglich sind Zellen von Hämochromatose-Patienten, die ein funktionsunfähiges HFE exprimieren, nicht in der Lage, den Eisenimport via TfR1 negativ zu regulieren. Dies führt zur permanenten Eisenüberladung der Zellen und schließlich zum Ausbruch der Krankheit. Neueste Untersuchungen haben gezeigt, dass HFE nicht nur an den TfR1, sondern auch an den TfR2 bindet, so dass auch die transferrinabhängige Eisenaufnahme via TfR2 durch HFE moduliert wird (Goswami und Andrews, 2006).

1.1.2.2 Transferrinunabhängige Eisenaufnahme (*non-Tf iron uptake*)

1.1.2.2.1 Eisenaufnahme über den *divalent metal transporter-1* (DMT1, NRAMP2, SLC11A2)

Fast in allen Zellen und Geweben des Organismus werden Eisenionen bevorzugt auf dem transferrinabhängigen Weg als Protein-Eisen-Komplexe aufgenommen. Eine Ausnahme stellen die Kryptzellen des Dünndarms dar, wo die in der Nahrung enthaltene Eisenionen aus dem Lumen des Duodenums und Jejunums durch den DMT1-Transporter resorbiert werden. Als Protonensymporter besitzt DMT1 eine breite Spezifität, so dass neben Fe^{2+} Ionen auch andere zweiwertige Ione wie Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} und Pb^{2+} transportiert werden (Gunshin *et al.*, 1997, Tallkvist *et al.*, 2003, Canonne-Hergaux *et al.*, 1999, Canonne-Hergaux und Gros, 2002). Dieser Transporter kommt in vier Spleißvarianten vor, die sich durch die Anwesenheit der 5'-Exons (1A und 1B) oder 3'-Exons (IRE und non-IRE) voneinander unterscheiden. Isoformen, die das Exon-1B tragen, sind breit exprimiert, weshalb man vermutet, dass sie am Transport von Eisen aus den Endosomen in der TfR-abhängigen Eisenaufnahme beteiligt sind. Die Varianten mit dem Exon-1A sind dagegen stark im Dünndarm und der Niere exprimiert, was deren Rolle bei der Aufnahme des Eisens aus dem Lumen des Darms und bei der Resorption der divalenten Metallione aus dem Primärharn der Niere impliziert (Fleming *et al.*, 1998, Tabuchi *et al.*, 2000, Hubert und Hentze, 2002). Bevor das in der Nahrung bevorzugt vorkommende Fe^{3+} durch DMT1 aufgenommen wird, muss es zuerst durch die Reduktase DCYTB (duodenales Cytochrom b) reduziert werden (McKie *et al.*,

2001). Die Eisenaufnahme im Darm wird auch durch Cystein und Glutathion beeinflusst, die ebenfalls in der Lage sind, Fe^{3+} zu Fe^{2+} zu reduzieren (van Campen, 1972, Simpson *et al.*, 1998). Störungen des Eisentransports in SLC11A2-*knock-out*-Mäusen führten zur Reduktion der Eisenaufnahme im Darm und zur hypochromen, mikrozytären Anämie (Gunshin *et al.*, 2005). Die Rolle der Eisenaufnahme via DMT1 in erythroiden Zellen ist jedoch im Vergleich zur transferrinabhängigen Eisenaufnahme zweiträngig, was die Untersuchungen an Mäusen mit genetisch bedingtem Defekt der Tf-TfR-Endozytose gezeigt haben (Zhang *et al.*, 2006).

1.1.2.2.2 Eisenaufnahme über den Integrin-Mobilferrin Weg (*IMP pathway*)

In intestinalen und erythroiden Zellen wurde ein zusätzlicher Eisentransportweg beschrieben, bei dem Integrine und Mobilferrin beteiligt sind (Conrad, 1993, Conrad, 1994, Conrad und Umbreit, 2000). Fe^{3+} -Ionen werden nach der Bindung an das Zelladhäsionsprotein $\beta 3$ -Integrin direkt ins Cytosol transportiert. Dort findet in einem Proteinkomplex aus $\beta 3$ -Integrin, Flavinmonooxygenase und Mobilferrin, das die Aktivität der NADPH-abhängigen Reduktase aufweist, eine Reduktion zu Fe^{2+} statt (Umbreit *et al.*, 1996). Es wird postuliert, dass das zu den calretikulinähnlichen Chaperonen gehörende Mobilferrin, das auf dem Tf-abhängigen und -unabhängigen Weg aufgenommene Eisen bei seinem Transport in die Mitochondrien unterstützt, wo Fe^{2+} in das Protoporphyrin-IX-Molekül eingebaut wird (Conrad *et al.*, 1996). Wahrscheinlich ist dieser Weg auch am Transport der Eisen-Citrat-Komplexe beteiligt, die pathologisch bei Störungen des Eisenstoffwechsels im Blut nachgewiesen wurden (Grootveld *et al.*, 1989). Auch die Aufnahme anderer anorganischer Eisenkomplexe wie Eisenammoniumcitrat (FAC) oder Eisen(III)-nitrilotriacetat (FeNTA) sollte auf diesem Weg erfolgen. Die Eisenaufnahme von Eisen-Citrat-Komplexen in Hepatozyten konnte durch eisenhaltiges Transferrin und durch Apotransferrin inhibiert werden, was auf die Konkurrenz zwischen dem Tf-TfR-abhängigen und dem Integrin-Mobilferrin-Weg hinweist (Graham *et al.*, 1998; Gutierrez *et al.*, 1998; Scheiber-Mojdehkar *et al.*, 1999). Andere Autoren vertreten die Meinung, dass die Internalisierung des anorganisch komplexierten Eisens ohne Beteiligung der spezifischen Transportwege stattfindet, so dass z. B. FAC auf dem Weg ins Zellinnere direkt die Plasmamembran passiert (Cairo und Pietroangelo, 1994, Testa *et al.*, 1991, Chan *et al.*, 1994).

1.1.2.3 Eisenspeicherung

Die Evolution hat solche Lebewesen bevorzugt, die in der Lage waren, die zelluläre Toxizität des Eisens herabzusetzen. Mit der Ausnahme weniger Archaeobakterien besitzen alle Organismen Ferritin oder ferritinähnliche Proteine in ihren Zellen (Harrison *et al.*, 1998). Ferritin ist ein cytoplasmatisches, heterooligomeres Protein, das eine molekulare Masse von 440 kDa besitzt. In seiner Hülle mit einem Durchmesser von 12 nm können bis zu 4000 Eisenatome in einer wasserlöslichen und nicht toxischen Form als Eisen(III)-Hydroxyphosphat-Micellen gespeichert werden (Theil, 2003, Chasteen und Harrison, 1999, Crichton, 2001). In verschiedenen Zelltypen synthetisierte Ferritine weisen eine Mikroheterogenität auf. 24 Untereinheiten dieses Eisenspeicherproteins werden aus einer unterschiedlicher Anzahl der Ketten des L-Ferritin (*ferritin light subunit*) und H-Ferritin (*ferritin heavy subunit*) gebildet, so dass das Verhältnis von H-Ferritin zu L-Ferritin zelltypspezifisch ist (Arosio *et al.*, 1978). Die Aminosäuresequenzen des humanen H-Ferritins (22 kDa) und L-Ferritins (20 kDa) sind zu 54 % identisch und evolutionär stark konserviert (Crichton, 2001). Dank der Ferroxidaseaktivität der H-Ferritin-Ketten werden Fe^{2+} -Ionen zu Fe^{3+} -Ionen oxidiert, was einen schnellen Einbau ins Ferritinmolekül ermöglicht (Bauminger *et al.*, 1993; Treffry *et al.*, 1995; Torti und Torti, 2002). Interessanterweise gibt es auch ein mitochondriales Ferritin, das nur aus H-Untereinheiten besteht und ebenfalls die Fähigkeit besitzt, Eisen zu speichern (Corsi *et al.*, 2002, Torti und Tori, 2002). L-Ferritin, das eine degenerierte Ferroxidase-Stelle besitzt und deshalb nicht in der Lage ist, zweiwertiges Eisen zu oxidieren, wird bei Vertebraten durch ein Genlocus kodiert, der als Folge einer Genduplikation entstanden ist. Für ein funktionsfähiges Ferritin ist sowohl H-Ferritin notwendig, das Fe^{2+} oxidiert und Fe^{3+} eher kurzfristig speichert, als auch L-Ferritin, das für die langfristige Eisenspeicherung sorgt (Picard *et al.*, 1996).

Wenn die Eisenspeicherkapazität des Ferritins erreicht wird (ca. 25 % (w/w)), führt eine weitere Speicherung (bis zu 35 % (w/w)) zur Ausbildung von Hämosiderin, das als das „zweite Eisenspeicherprotein“ bezeichnet wird. Man geht davon aus, dass Hämosiderin durch die intralysosomale Aggregation und Degradation von Ferritin und Ansammlung von Lipiden und Nucleotiden entsteht (Löffler und Petrides, 1997). Es ist in membranähnlichen Strukturen, den so genannten Siderosomen, eingelagert, die wahrscheinlich von Lysosomen abstammen und sich histologisch in der „Berliner Blau-Reaktion“ mit Kalium-hexacyanoferrat(II) anfärben lassen (Shoden *et al.*, 1953, Richter, 1978). Die Mobilisierung von Eisen aus Hämosiderin, welche vor allem nach Blutverlusten stattfindet, erfolgt aber viel schwieriger

als die aus Ferritin. Ferritinmoleküle werden sowohl in Lysosomen als auch im Cytosol (Proteasom) abgebaut (De Domenico *et al.*, 2006).

1.1.2.4 Eisensfreisetzung

Das bisher einzige in Säugern bekannte Protein, das anorganisches Eisen aus den Zellen freisetzt, ist Ferroportin (Fpn1). Dieses Protein besitzt eine molekulare Masse von ca. 62 kDa und besteht aus zwölf Transmembran-Domänen (Abboud und Haile, 2000, Donovan *et al.*, 2000, McKie *et al.*, 2000). Mutationen des Fpn1-Genes verursachen die Eisenüberladung und Typ-4-Hämochromatose (Pietroangelo, 2004, De Domenico *et al.*, 2005). Es wurden Isoformen des Ferroportins beschrieben, die durch alternatives Spleißen entstehen und deren Transkripte sich durch Vorhandensein der IRE-tragenden Exons und die Regulierbarkeit durch Eisen voneinander unterscheiden (Cianetti *et al.*, 2005). Die Präsenz dieses Proteins auf der basolateralen Membran von Enterozyten und Nierenzellen oder auf der Membran von Makrophagen ermöglicht die Regulation des systemischen Eisenstoffwechsels (Abboud und Haile, 2000, Le und Richardson, 2002). Die Expression von Ferroportin wurde aber in verschiedenen anderen Zelltypen wie erythroiden Zellen, Endothellzellen oder Zellen des Nervensystems nachgewiesen (Cianetti *et al.*, 2005, Wu *et al.*, 2004). Das in den extrazellulären Raum freigesetzte zweiwertige Eisen wird durch Proteine mit Ferroxidaseaktivität wie Ceruloplasmin oder Hephaestin zu Fe^{3+} oxidiert. Ceruloplasmin wird von Hepatozyten ins Blut sezerniert (Yang *et al.*, 1986) und seine membranverankerte Form tritt in Astrozyten des zentralen Nervensystems auf (Jeong und David, 2003). Sein membranverankertes Homolog Hephaestin ist im Darmepithel an der Oxidation des Fe^{2+} zu Fe^{3+} beteiligt, nachdem das aufgenommene Eisen als Fe^{2+} aus diesen Zellen durch Ferroportin freigesetzt wird (Harris *et al.*, 1999, Frazer *et al.*, 2001).

Neben Ferroportin, das anorganisches Eisen transportiert, existieren auch Hämexporter-Proteine wie z. B. FLVCR (*feline leukemia virus receptor subtype C*), das neben anderen Molekülen auch das komplexierte Eisen als Bestandteil des Eisen-Protoporphyrin-IX-Moleküls aus erythroiden Zellen freisetzt (Quigley *et al.*, 2004).

1.1.2.5 Regulation des intrazellulären Eisenmetabolismus

Wegen der Toxizität des Eisens ist die Regulation seiner intrazellulären Konzentration zwingend notwendig. Diese Regulation kommt in proliferierenden Zellen durch posttranskriptionale Kontrolle der Translation der für Eisenstoffwechsel schlüssigen Proteine zustande. Sie

erfolgt durch die Interaktionen der sogenannten *iron responsive elements* (IREs) in Transkripten der in den zellulären Eisenstoffwechsel involvierten Proteine mit den sog. *iron regulatory proteins* (IRPs). IREs sind konservierte Sequenzen von ca. 30 Nukleotiden, die Haarnadelstrukturen im 3'- oder 5'-untranslatierten Bereich (UTR) der mRNAs ausbilden (Owen und Kuhn, 1987, Aziz und Munro, 1987, Ke und Theil, 2002, Cianetti *et al.*, 2005). Die Affinität der IRPs zu IREs ist eisenabhängig (Pantopoulos, 2004). Bei der verringerten intrazellulären Verfügbarkeit von Eisenionen binden IRPs verstärkt an IREs in der 5'-UTR der mRNAs von leichten und schweren Ferritinketten, so dass sich der 43S-Präinitiationskomplex nicht an die mRNA anlagern kann. Folglich wird die Translation von Ferritin supprimiert und die Speicherkapazität für Eisen herabgesetzt. Eine verstärkte Bindung von IRPs an IREs in der 3'-UTR von TfR1-Transkripten schützt dagegen diese RNAs vor RNasen, so dass das TfR1-Protein verstärkt synthetisiert wird, was die Eisenaufnahme durch die Zelle steigert und die verringerte Eisenkonzentration ausgleicht (Eisenstein, 2000, Hentze *et al.*, 2004, Pantopoulos, 2004, *reviews*). Bei hoher Eisenkonzentration findet zwischen IRPs und IREs keine Interaktion statt und die o. g. reziproke Regulation von TfR1- und Ferritin-Transkripten erfolgt in die entgegengesetzte Richtung. mRNAs der schweren und leichten Ferritinketten werden verstärkt transkribiert, während die Stabilität der TfR1-Transkripte herabgesetzt wird. In der 5'-UTR der Ferroportin-mRNA wurde ebenfalls ein funktionsfähiges IRE gefunden, das die posttranskriptionale Regulation durch Eisen ermöglicht (Abboud und Heile, 2000, Cianetti *et al.*, 2005).

Im Unterschied zu TfR1, Ferritin und Ferroportin wurde die Funktionsfähigkeit der IREs in der 3'-UTR der DMT1-mRNA bisher nicht nachgewiesen (Lee *et al.*, 1998, McKie *et al.*, 2000). Aufgrund der Tatsache, dass im Duodenum von Tieren mit Eisendefizienz nur diese DMT1 Isoformen hochreguliert werden, die IREs besitzen, vermutet man, dass diese IREs eine solche eisenabhängige Regulation der Stabilität der mRNA ermöglichen, wie sie schon seit langem für die TfR1-mRNA beschrieben worden ist (Gunschin *et al.*, 1997, Canonne-Hergaux *et al.*, 1999, Hubert und Hentze, 2002, Casey *et al.*, 1988, Müllner und Kuhn, 1988). Interessanterweise besitzt auch die mRNA der erythroiden δ -Aminolävulinsäuresynthase (ALAS2, eALAS), die an der Regulation der Hämsynthese in erythroiden Zellen beteiligt ist, funktionsfähige IREs in deren 5'-UTRs, was eine Anpassung der Hämsynthese an die zelluläre Eisenverfügbarkeit erlaubt (Bhasker *et al.*, 1993, Melefors *et al.*, 1993). IREs wurden auch in 5'-UTRs der Enzyme des Citratzyklus – der mitochondrialen Aconitase und der Succinatdehydrogenase (Kim *et al.*, 1996, Kohler *et al.*, 1995), sowie in mRNAs solcher Proteine wie

MRCK α (Cmejla *et al.*, 2006), oder CDC14A (Sanchez *et al.*, 2006), die in die Regulation des Zellzyklus involviert sind, gefunden. Deren Funktionalität ist jedoch nicht endgültig geklärt. In Abb. 1.2 ist die Regulation der Stabilität der IRE-tragenden mRNAs durch Eisen (und IRPs) schematisch dargestellt.

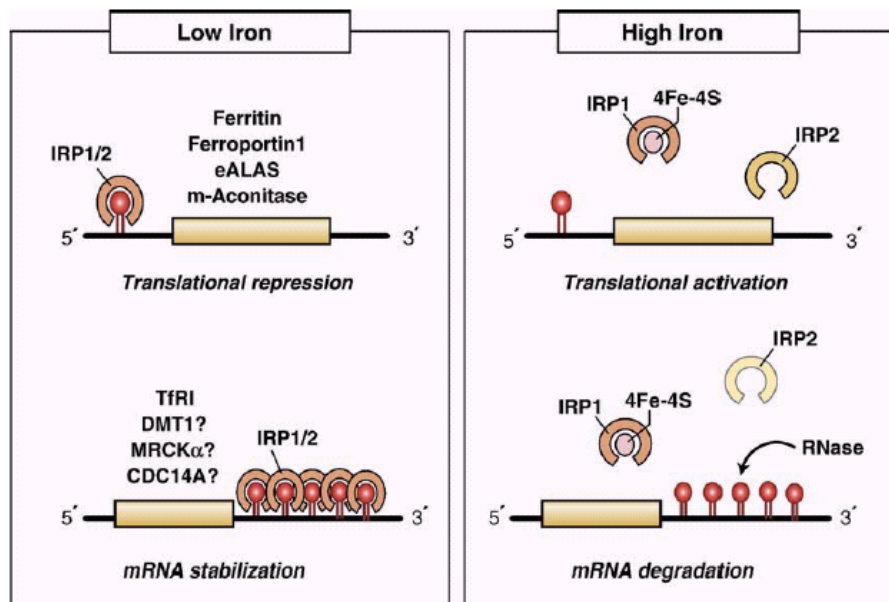


Abb. 1.2: Die Regulation der Stabilität der verschiedenen *target*-mRNAs durch IRPs (nach Wallander *et al.*, © 2006 Elsevier B.V.); andere Erklärungen im Text.

Es gibt zwei verwandte IRPs: IRP1 und IRP2, die zur Familie der Aconitase-Proteine gehören, die jedoch auf unterschiedliche Weise als zelluläre Eisensensoren agieren. IRP1 ist ein monomeres cytoplasmatisches Protein mit einer molekularen Masse von 98 kDa (Rouault *et al.*, 1988), deren Holoform einen 4Fe-4S-Komplex besitzt und enzymatisch als cytosolische Aconitase aktiv ist. Dagegen besitzt die Apofom keinen 4Fe-4S-Komplex, sie kann aber an IREs in *target*-mRNAs binden und deren Translation oder Stabilität beeinflussen (Heile *et al.*, 1992, Beinert *et al.*, 1996, Eisenstein, 2000). Die Ausbildung des 4Fe-4S-Komplexes wird durch die Eisenverfügbarkeit reguliert, so dass IRP1 als ein zellulärer Sensor des Eisengehalts fungieren kann. Das humane IRP2 besitzt mit einer molekularen Masse von 105 kDa und 64 % Homologie zu IRP1 (Frishman und Hentze, 1996, Gruer *et al.*, 1997) keine Aconitaseaktivität (Guo und Leibold, 1994) und tritt im Unterschied zur ubiquitären Expression von IRP1 vor allem im Darm und Gehirn auf (Henderson *et al.*, 1993, Samaniego *et al.*, 1994). Seine Funktion als Sensor für zelluläres Eisen verdankt es seiner zusätzlichen Domäne, die aus 73 Aminosäuren besteht und in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration oxidiert wird (Iwai *et al.*, 1995), was den proteasomalen Abbau des ganzen Moleküls verursacht (Guo *et al.*, 1995). Die Oxidierbarkeit von IRP2 ermöglicht zusätzlich die Anpassung des zellulären

Eisenmetabolismus an die Redoxprozesse in der Zelle (Pantopoulos *et al.*, 1996, Hanson *et al.*, 1999), die die IRP / IRE-Interaktionen beeinflussen. In Abb. 1.3 wird die Rolle des IRP / IRE-Systems in der Regulation des zellulären Eisenmetabolismus dargestellt.

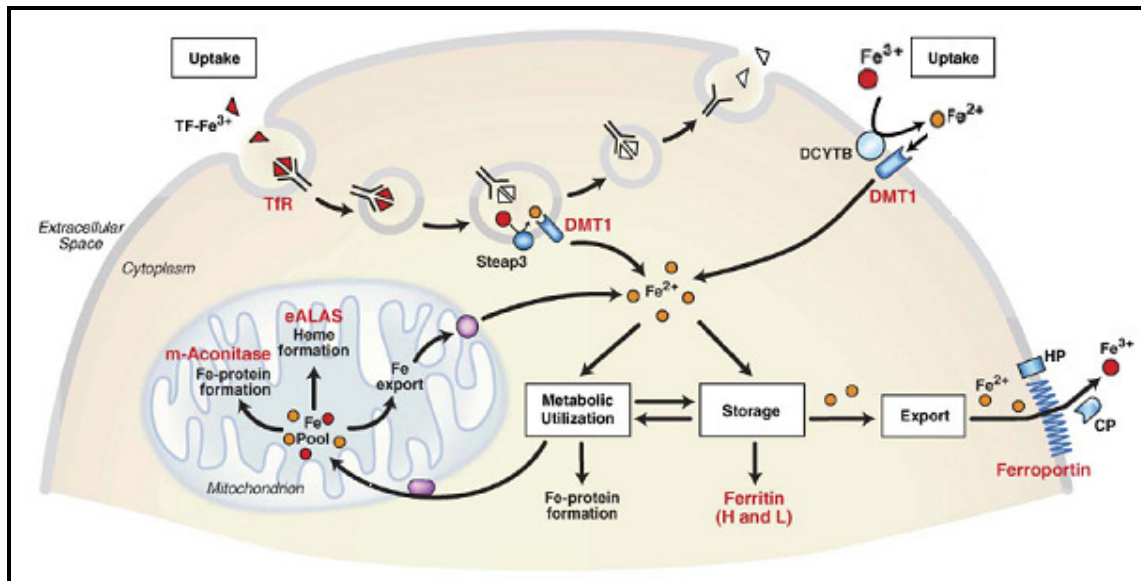


Abb. 1.3: Eine schematische Darstellung der eisenabhängigen, posttranskriptionalen Regulation des zellulären Eisenmetabolismus durch IRP / IRE Interaktionen (nach Wallander *et al.*, © 2006 Elsevier B.V.). TF-Fe³⁺ – Ferritransferrin, eALAS – erythroide δ -Aminolävulinsäuresynthase (ALAS2), m-Aconitase – mitochondriale Aconitase, DCYTB – duodenale Cytochrom b Reduktase, HP – Hephaestin, CP – Ceruloplasmin; weitere Erläuterungen im Text.

1.1.3 Systemischer Eisenstoffwechsel

Mechanismen, die die Eisenregulation auf der systemischen Ebene beeinflussen sind nur zum Teil verstanden. Eine Besonderheit des Eisenstoffwechsels in höheren Organismen ist, dass Eisen in nur äußerst kleinen Mengen physiologisch ausgeschieden wird. Dieser Verlust, der hauptsächlich auf die Menstruation bei Frauen und Desquamation der Epithelzellen zurückzuführen ist, muss über lange Zeit nicht durch eine Steigerung der Eisenaufnahme ausgeglichen werden, weil bei Bedarf ausreichende Mengen an Eisen aus dessen Speicherorten wie Leber und Makrophagen des retikuloendothelialen Systems freigesetzt werden können. Normalerweise wird ein physiologischer Verlust von 1–2 mg Eisen täglich problemlos durch die Zufuhr mit der Nahrung ausgeglichen. Im Vergleich dazu beträgt der Eisenumsatz im Körper pro Tag ca. 25 mg, wobei 80 % im Knochenmark für Hämoglobinabbau und -aufbau verbraucht wird. Bis heute sind die Mechanismen, die die Eisenfreisetzung aus den Makrophagen oder die Eisenaufnahme in Kryptzellen des Dünndarms an den physiologischen Bedarf anpassen, nur teilweise bekannt. Die Rolle des systemischen Regulators des

et al., 2004). Dadurch wird die Freisetzung des aus Kryptzellen aufgenommenen Eisens oder die Freisetzung des aus Makrophagen gespeicherten Eisens gehemmt, so dass die Eisenhomeostase gewährleistet ist. Während des Vorliegens von Entzündungsreaktionen führt eine hohe Hepcidinkonzentration zu einer niedrigen Eisenkonzentration im Blut, wodurch es zu einer Eisenarmut der erythroiden Vorläuferzellen und dem Auftreten einer chronischen Anämie kommt (Nicolas *et al.*, 2002b).

Es wird postuliert, dass neben Hepcidin auch sTfR ein Regulator des systemischen Eisenstoffwechsels sein kann (Cazzola *et al.*, 1999). Allerdings fehlt bis heute ein Beweis für seine regulierende Wirkung in der Eisenhomeostase. In Abb. 1.5 wird die Rolle von Hepcidin in der Regulation der systemischen Eisenhomeostase dargestellt.

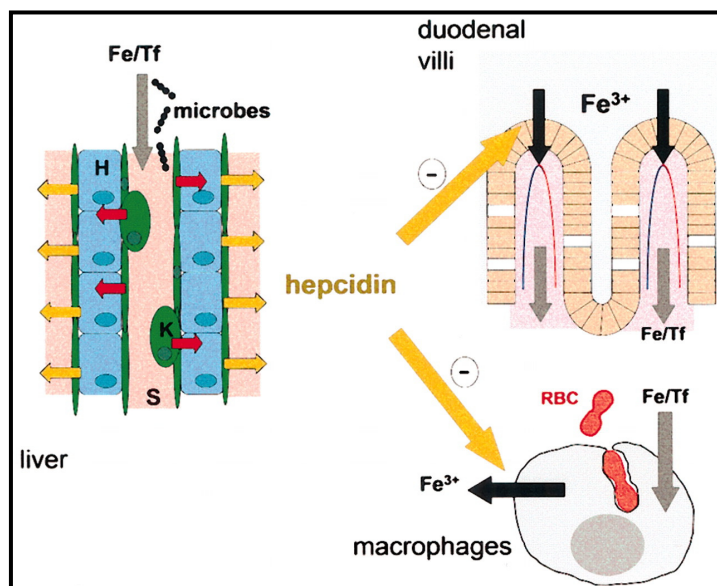


Abb. 1.5: Ein Modell der Regulation des systemischen Eisenstoffwechsels durch Hepcidin nach Ganz, 2003, © by The American Society of Hematology. Fe/Tf – Ferritransferrin; H – Hepatozyten, K – Kupferzellen, S – Sinusoidale Endothelzellen, RBC (red blood cells) – Erythrozyten. Durch die Wechselwirkung mit Ferroportin wird von Hepcidin die Hemmung der Freisetzung des aufgenommenen Eisens aus den Kryptzellen und des gespeicherten Eisens aus Makrophagen verursacht.

1.1.4 Eisenmetabolismus in erythroiden Zellen

Etwa 20 mg Eisen werden in den erythroiden Zellen des Knochenmarks und der Milz für den Hämoglobinmetabolismus pro Tag umgesetzt. Deshalb ist die Regulation des systemischen Eisenstoffwechsels für den Eisenmetabolismus der erythroiden Zellen von besonderer Bedeutung. Die Veränderungen des Eisenbedarfs im Organismus treten oft im Zusammenhang mit der erythropoietischen Aktivität im Knochenmark auf. Der erhöhte Eisenbedarf entsteht nach massiven Blutungen, nach der erfolglosen Hämoglobinsynthese bei Thalassämie-Erkrankungen oder bei Anämien. Als Folge kommt es zur Mobilisierung der Eisenreserven und zur Steigerung der Eisenaufnahme, was die Sättigung von Transferrin mit Eisen im Blut erhöht. Schließlich wird Ferritransferrin durch die erythroiden Vorläuferzellen verstärkt

aufgenommen, um das Eisen für die Hämsynthese zu verwenden und letztendlich ins Hämoglobinmolekül einzubauen. In Abb. 1.6 wird die zelluläre Hämsynthese dargestellt.

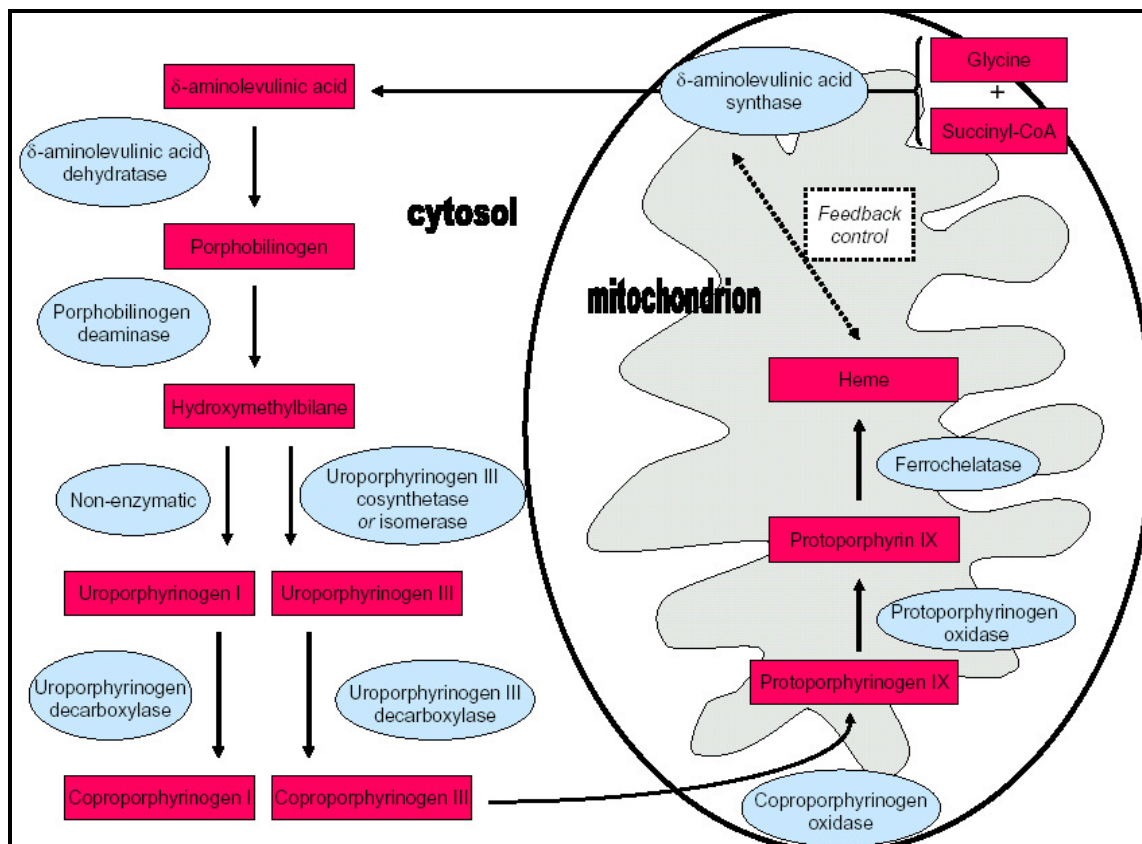


Abb. 1.6: Die zelluläre Hämsynthese (nach Tsiftoglou *et al.*, 2006, *review*); Erläuterungen im Text. © 2005 Elsevier. Inc.

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in dieser Reaktionskette ist die Synthese der δ -Aminolävulinäure (ALA) aus Glycin und Succinyl-CoA durch δ -Aminolävulinäure-synthase (ALAS) in den Mitochondrien. Es gibt zwei Isoformen dieses Enzyms. ALAS1 wird durch einen Locus auf dem Chromosom 3p21 kodiert und ist ubiquitär exprimiert, während ALAS2 durch den Locus Xp11-21 kodiert wird und nur in erythroiden Zellen vorkommt. Propeptide beider Enzyme besitzen das hämregulatorische Element Cys-Pro-X-Asp-His, welches im Cytoplasma Häm bindet, was die Hemmung des Transports dieser Proteine in die Mitochondrien zur Folge hat. Dadurch wird eine Feedback-Kontrolle der Hämsynthese gewährleistet (Ajioka *et al.*, 2006, *review*). ALAS2-mRNA besitzt im Unterschied zur ALAS1-mRNA IREs in ihrer 5'-UTR, was deren posttranskriptionale Regulation durch Eisen und die Kopplung der Hämsynthese an die Eisenverfügbarkeit in den erythroiden Zellen ermöglicht (Cox *et al.*, 1991, Bhasker *et al.*, 1993). Neben ALAS2, reguliert Eisen auch die Aktivität des letzten Enzyms in der Hämbiosynthese – der Ferrochelatase, die in den Mitochondrien ein zweiwertiges Eisenion ins Protoporphyrin-IX-Molekül einbaut und dadurch die

Hämsynthese zu Ende führt. Hier ist Fe^{2+} notwendig, um das aktive Zentrum, ein [2Fe-2S]-Cluster, zu formieren (Taketani *et al.*, 2000). Interessanterweise sind die Synthesen der Globine und des Häms miteinander gekoppelt. Häm bindet an zwei *heme-binding domains* im N-Terminus und in der Kinase-Insertionsdomäne der Häm-regulierten eIF2 Kinase (HRI) und verhindert dadurch deren Aktivierung durch Autophosphorylierung. HRI kann folglich sein Substrat, die α -Untereinheit des Initiationsfaktors eIF2, nicht mehr phosphorylieren. Die Hemmung der Proteinsynthese der Globine α und β wird dadurch aufgehoben (Rafie-Kolpin *et al.*, 2000, Han *et al.*, 2001). Auf diese Weise wird die Synthese der vier Hämoglobin Untereinheiten, die jeweils eine Hämgruppe besitzen, an die Verfügbarkeit von Häm gekoppelt. Häm beeinflusst auch die Transkription der α - und β -Globingene, die entsprechend zu den Familien der α - und β -artigen Globingene gehören und auf zwei unabhängigen genetischen Loci auf dem Chromosom 16 und 11 lokalisiert sind. Die α -Gruppe umfasst neben Pseudogenen ein Gen θ mit unbekannter Funktion, ein Gen ζ und zwei nicht-allele Kopien des α -Genes, während die β -Gruppe fünf funktionelle Gene ϵ , und je zwei γ , δ und β enthält. Während der embryonalen Entwicklung besitzen Hämoglobintetramere eine andere Zusammensetzung als bei einem Erwachsenen. Bis zur achten Woche der embryonalen Entwicklung werden $\zeta_2\epsilon_2$, $\zeta_2\gamma_2$ oder $\alpha_2\epsilon_2$ Tetramere gebildet, danach besitzt der Fötus das fetale Hämoglobin $\alpha_2\gamma_2$. Im erwachsenen Organismus besteht Hämoglobin zu 97 % aus $\alpha_2\beta_2$ Tetrameren. 2 % des Hämoglobins liegt in der $\alpha_2\delta_2$ Form vor und 1 % bildet das persistierende fetale Hämoglobin $\alpha_2\gamma_2$ (Lewin, 1991). Jeder Gruppe ist eine *locus control region* (LCR) mit *cis*-regulatorischen Elementen vorgeschaltet, die die koordinierte Regulation der Transkription der Globingene ermöglichen. Besonders die *leucine zipper proteins*, wie z. B. NF-E2 (p45), Nrf-1, Nrf-2, und Bach1, die Heterodimere mit den kleinen Proteinen der MafK-Familie ausbilden, und mit dem *Maf recognition element* (MARE) interagieren, spielen bei dieser Regulation eine wichtige Rolle (Tsiftoglou *et al.*, 2006, *review*). Häm setzt die Affinität des Häm-bindenden Transkriptionsfaktors Bach1 zur MARE-Sequenz herab, was die Repression der Transkription der α - und β -Globingene aufhebt (Oyake *et al.*, 1996, Ogawa *et al.*, 2002, Tahara *et al.*, 2004a, 2004b). Im Unterschied dazu sind die molekularen Mechanismen der Aktivierung der γ -Globingene durch Häm weniger entschlüsselt. In K562-Zellen aktiviert Hämin deren Expression durch die Bindung an *hemin-responsive elements* (HeREs) im Promoter des γ -Globingens, wodurch die Repressoren der Transkription entfernt werden (Tsiftoglou *et al.*, 2006, *review*). Zusammenfassend kann man feststellen, dass in erythroiden

Zellen Häm (und Eisen) sowohl die Transkription der Globingene (Abb. 1.7), als auch die Proteinsynthese der Hämoglobin-Untereinheiten reguliert.

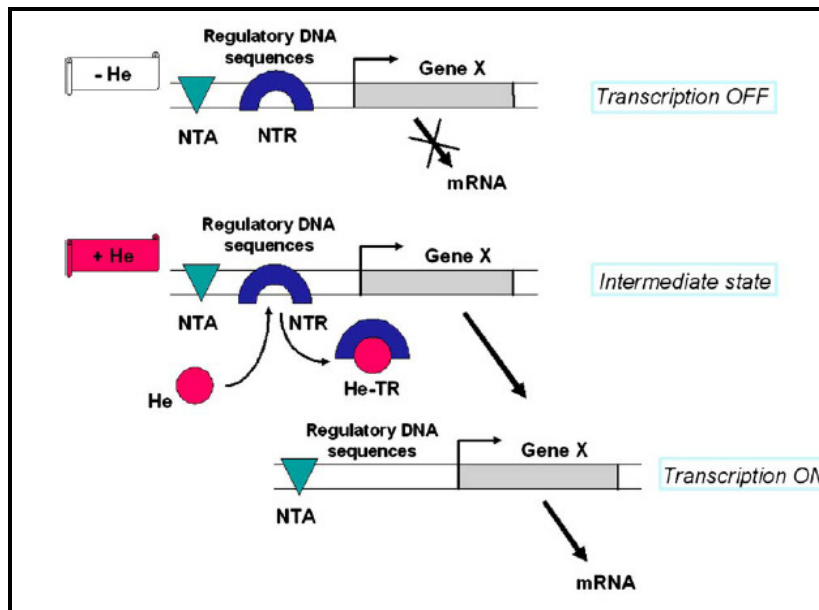


Abb. 1.7: Modell der Häm-abhängigen Transkriptionsregulation nach Tsiftoglou *et al.*, 2006, *review*; He – Häm, NTA – nuclear transacting activator, NTR – nuclear transacting repressor; Weitere Erläuterungen im Text. © 2005 Elsevier. Inc.

1.2 Die K562-Zelllinie als Modellsystem für megakaryozytäre und erythroide Differenzierung

Die K562-Zelllinie wurde durch Lozzio etabliert. Diese Zellen sind undifferenzierte pluripotente Blasten, die aus dem Pleuraerguss einer Patientin während einer Blastenkrise im Verlauf der chronisch myeloischen Leukämie isoliert wurden (Lozzio und Lozzio, 1975). Die erythroleukämische Zelllinie K562 besitzt die Fähigkeit, entlang der erythroiden, oder megakaryozytären Linie zu differenzieren (Rowley *et al.*, 1992, Huo *et al.*, 2006, Tsiftoglou *et al.*, 2003, *review*). Der Differenzierungsgrad dieser Zelllinie entspricht also dem der gemeinsamen megakaryozytär-erythroiden Vorläuferzellen im Knochenmark, die zur erythroiden oder megakaryozytären Differenzierung fähig sind (Kap. 1.3).

Der Karyotyp der K562-Zellen zeigt eine verkürzte Form des Chromosoms 22 – ein Philadelphia-Chromosom (Ph¹), das als Folge einer nicht-balancierten, reziproken Translokation t(9;22) (q34;q11) entsteht und eine Fusion des ABL-Gens von Chromosom 9 mit dem auf dem Chromosom 22 lokalisierten Gen BCR (*breakpoint cluster region*) zu Folge hat. Dieses Fusionsgen BCR-ABL kodiert für ein Fusionsprotein p210^{BCR-ABL}, das eine konstitutive Tyrosinkinaseaktivität besitzt (McWhirter und Wang, 1991). Durch die Wechselwirkung mit Grb2- und Sos-Proteinen, die im Ras-vermittelten Signalweg involviert sind, bewirkt es unregulierbare mitogene Signale, was zur ungebremsten Proliferation dieser Zellen führt

(Neshat *et al.*, 2000, Sillaber *et al.*, 2000). Charakteristisch für BCR-ABL-positive Zelllinien ist ihre erhöhte Resistenz gegen apoptotische Signale (Horita *et al.*, 2000, Martin *et al.*, 1990, McGahon *et al.*, 1994) sowie eine sehr niedrige Aktivität der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinase, MAPK), was die Differenzierung, vor allem in Richtung Megakaryopoese verhindert (Melemed *et al.*, 1997). Eine Aktivierung der MAP-Kinase z. B. durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) oder die konstitutive Aktivierung der MAP-Kinase-Kinase (MAPKK), die der MAPK in der Proteinkinase-Kaskade der MAP-Kinase-Wege vorgeschaltet ist, ermöglichen die megakaryozytäre Differenzierung dieser Zelllinie (Herrera *et al.*, 1998, Whalen *et al.*, 1997). Die Synthese des embryonalen und fetalen Hämoglobins (Testa *et al.*, 1982) sowie die Expression von Glykophorin (Jacquel *et al.*, 2006) spiegeln die ausgeprägten erythroiden Eigenschaften dieser Zellen wider, die während der erythroiden Differenzierung noch gesteigert werden.

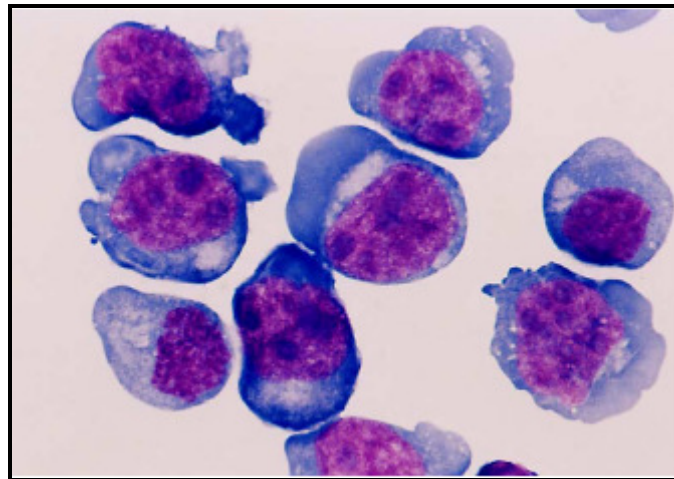


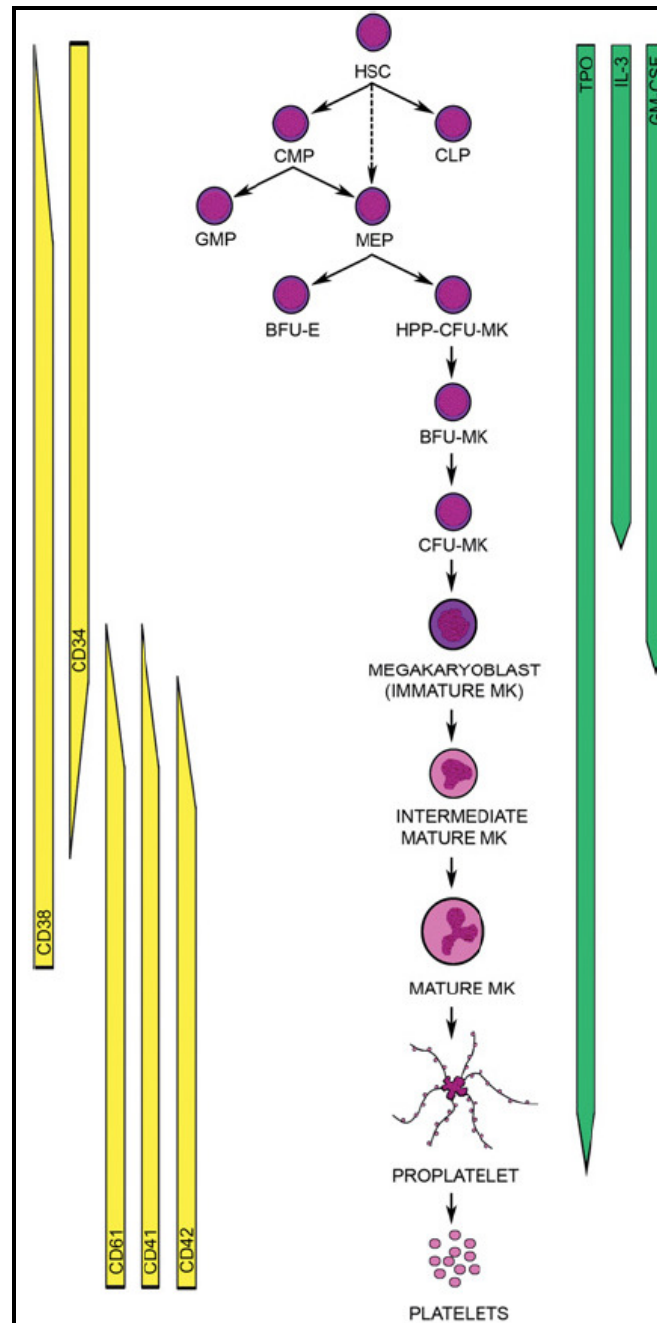
Abb. 1.8: K562-Zellen gefärbt mit May-Grünwald-Giemsa-Lösung (nach Drexler *et al.*, © 2004 Elsevier Ltd.).

1.3 Megakaryozytäre Differenzierung

Die Differenzierung der hämatopoietischen Vorläuferzellen (*hematopoietic stem cells*, HSCs) findet im Knochenmark statt und ist ein Prozess, der durch verschiedene Zytokine und Hormone gesteuert wird (Abb. 1.9). Während der frühen Phase der megakaryozytären Differenzierung, die nach der Ausbildung der Megakaryozyten endet, findet eine grundlegende Veränderung der morphologischen und biochemischen Eigenschaften der hämatopoietischen Vorläuferzellen statt. Nach dem Wachstumstop erfolgt die Vergrößerung der Zellen und die Verkleinerung des Zellkernes, in dem das Chromatin fragmentiert wird und die Endomitose zur Polyploidisierung der DNA führt (Deutsch und Tomer, 2006, *review*). Als Folge der Differenzierungsprozesse besitzen Megakaryozyten im Vergleich zu den Vorläufer-

zellen nicht nur ein niedrigeres Kern-Cytoplasma-Verhältnis, sondern sie exprimieren auch stark zahlreiche Proteine wie CD41 / 61 (Integrin $\alpha 2b / \beta 3$) oder CD42, die deshalb als Marker der Megakaryopoese definiert werden (Szalai *et al.*, 2006, *review*).

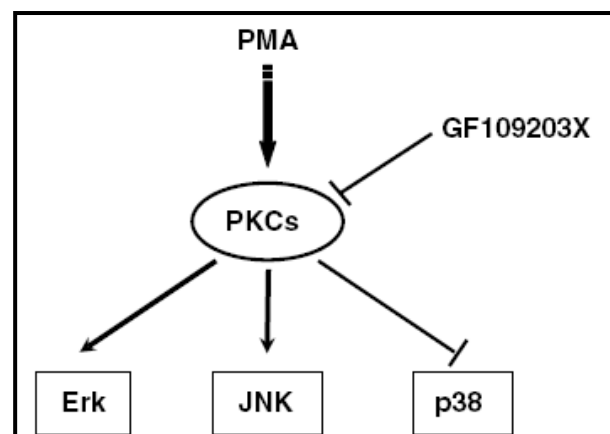
Abb. 1.9: Ein Überblick über die Megakaryopoese nach Szalai *et al.*, 2006, *review*. Hämatopoetische Vorläuferzellen (*hematopoietic stem cells*, HSC) differenzieren zu dem gemeinsamen Vorläufer der lymphoiden Zellen (*common lymphoid progenitor*, CLP) und zu dem gemeinsamen myeloiden Vorläufer (*common myeloid progenitor*, CMP), aus dem ein gemeinsamer granulozytärer-makrophagischer Vorläufer (*common granulocyte / macrophage progenitor*, GMP) und ein gemeinsamer megakaryozytärer-erythroider Vorläufer (*common megakaryocyte / erythroid progenitor*, MEP) entstehen. MEP kann der erythroiden oder megakaryozytären Differenzierung unterliegen, so dass daraus *burst-forming unit erythroid* (BFU-E) oder *high proliferative potential colony forming unit megakaryocyte* (HPP-CFU-MK) gebildet werden, die am Anfang der entsprechenden erythroiden oder megakaryozytären Reihe stehen. Während der megakaryozytären Differenzierung verläuft die weitere Entwicklung zum Megakaryozyten (MK) über BFU-MK (*burst-forming unit megakaryocyte*), CFU-MK (*colony-forming unit megakaryocyte*) und Megakaryoblasten (*immature megakaryocyte*). Nach der Fragmentierung des Cytoplasma der Megakaryozyten (*mature MK*)



ten. Entsprechende Stadien der Megakaryopoese werden durch TPO (*thrombopoietin*), G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*), IL-3 (*interleukine-3*) und GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) induziert. CD34 und CD38 sind Marker der frühen Stadien der Megakaryopoese, während CD41, CD61 und CD42 in den späten Phasen exprimiert werden (© Birkhäuser Verlag, Basel 2006).

Die frühen Stadien der megakaryozytären Reifung kann man auch *in vitro* studieren. Durch die Behandlung der entsprechenden erythroleukämischen Zellen wie K562, HEL, Dami oder TF₁ mit PMA kann man deren megakaryozytäre Differenzierung hervorrufen (Alitalo, 1990, Long *et al.*, 1990, Murate *et al.*, 1993). K562-Zellen, wie alle BCR-ABL-positive Zellen besitzen eine niedrige MAPK-Aktivität, was deren spontaner Differenzierung in die Richtung Megakaryopoese entgegensteht. Erst deren Aktivierung sowie die Inhibition der p38-MAP-Kinase und die moderate Aktivierung der JNK-Kinase infolge der PMA-Stimulation ermöglichen diese Differenzierung (Herrera *et al.*, 1998, Jacquel *et al.*, 2006). Durch den Einsatz des Inhibitors der Proteinkinase C – Bisindolyldmaleimid I (GF 109203X), der eine breite Spezifität zu den Isoformen der PKC besitzt, kann man die PMA-induzierte megakaryozytäre Differenzierung blockieren (Jacquel *et al.*, 2006), was schematisch in Abb. 1.10 gezeigt wird. Als kompetitiver Inhibitor von ATP bindet GF 109203X an die ATP-Bindungsstelle der PKC (IC₅₀ = 0,01 µM) und wirkt unabhängig von PMA (Toullec *et al.*, 1991).

Abb. 1.10: Crosstalk der Signalwege während der megakaryozytären Differenzierung ermöglicht, dass PKCs, die primär in die Signalübertragung durch Ser / Thr-spezifische Proteinkinasen involviert sind, die Aktivität der ERK-Kinase (extrazellulär-regulierte Kinase = Mitogen-aktivierte Proteinkinase, MAPK), JNK-Kinase (c-Jun-NH₂-terminale Kinase) und p38-Kinase beeinflussen. Diese Kinasen sind Bestandteile der Signalübertragung über die Rezeptor-Tyrosinkinasen in der Proteinkinase-Kaskade der MAP-Kinase-Wege. PMA aktiviert PKC, während GF 109203X als Inhibitor dieser Kinase wirkt (modifiziert nach Jacquel *et al.*, © Nature Publishing Group, 2006).



PMA verursacht nicht nur die Translokation der verschiedenen PKC-Subtypen zur Membran (Schaeffer *et al.*, 2001, Tanimura *et al.*, 2002, Jacquel *et al.*, 2006), sondern auch in den Nukleus (Murray *et al.*, 1993), wo durch die Wechselwirkungen mit Transkriptionsfaktoren wie PU.1, c-Jun, c-Fos, Erg-1 ein Differenzierungsprogramm in Richtung der Megakaryopoese induziert wird (Murphy und Norton, 1993, Carey *et al.*, 1996, Cheng *et al.*, 1994). Zahlreiche Gene, die für Marker der Megakaryopoese kodieren, wie z. B. CD41, CD61 oder CD10, werden infolge der PKC-Aktivierung heraufreguliert (Belhacene *et al.*, 1998, Herrera *et al.*, 1998, Dorsey *et al.*, 2002), während die Transkription der Gene, die für die Ausprägung der erythroiden Eigenschaften verantwortlich sind, z. B. γ -Globin (Lumelsky und Forget, 1991) und Glykophorin A (Jacquel *et al.*, 2006) supprimiert werden. Die Rolle der einzelnen

Isoformen der PKC in der Induktion der megakaryozytären Differenzierung ist noch nicht endgültig geklärt worden. Während Racke *et al.* die Kooperation der PKC- ϵ und des Transkriptionsfaktors GATA-1 bei der Aktivierung des CD41-Promotors nachgewiesen haben (Racke *et al.*, 2001), konnten Jacquel *et al.* keine Induktion oder Verstärkung der megakaryozytären Differenzierung beobachten, wenn die PKC-Isoformen α , β , ϵ und θ alleine in K562-Zellen überexprimiert wurden (Jacquel *et al.*, 2006). Diese Autoren haben eher die Involvierung der neuen PKC-Isoformen in dem Mechanismus der PMA-abhängigen megakaryozytären Differenzierung suggeriert, während Murray *et al.* berichteten, dass die Induktion mit PMA durch die Veränderungen der Expression der klassischen PKC-Isoformen α und β 11 begleitet wird (Murray *et al.*, 1993).

Manche Effekte der PMA-Wirkung sind auf die autokrine Regulation durch Cytokine zurückzuführen. In primären humanen Erythroblasten wurde megakaryozytäre Differenzierung induziert, indem man diese Zellen mit dem konditionierten Medium der mit PMA-behandelten HEL-Zellen (*human erythroleukemia cells*) inkubierte (Goldfarb *et al.*, 2001). Während der megakaryozytären Differenzierung mit PMA wird der *Platelet-derived growth factor* (PDGF) verstärkt exprimiert und aus den Zellen ins Zellkulturmedium sezerniert. Auf dem autokrinen Weg über die Signalübertragung durch Transmembranrezeptoren mit Tyrosin-spezifischer Proteinkinaseaktivität beeinflusst PDGF die Expression der Transkriptionsfaktoren NF-E2, GATA1 und c-Fos oder des Adapterproteins DAB-2 (Tseng *et al.*, 2005).

Die *in vivo* beobachtete Polyploidisierung der DNA tritt nicht nur während der PMA-abhängigen, sondern auch während der wenig untersuchten Staurosporin-abhängigen megakaryozytären Differenzierung *in vitro* auf (Chang *et al.*, 2001, Iancu-Rubin *et al.*, 2003). Die molekularen Mechanismen, die diesem Phänomen zugrunde liegen, sind nur zum Teil aufgeklärt. Bekannt ist nur die Rolle von Statmin, einem Protein, das für den Umbau (Depolymerisation) der Mikrotubulli während des Zellzyklus verantwortlich ist und dessen Überexpression den Übergang von der Mitose in die Endomitose verhindert. Statmin wird während der megakaryozytären Differenzierung herunterreguliert, was die Polyploidisierung der DNA zur Folge hat (Iancu-Rubin *et al.*, 2005).

Eine andere noch offene Frage in der Megakaryopoese ist die Aktivität der Acetylcholinesterase, die bereits Anfang der 70er Jahre als möglicher Marker der frühen Megakaryopoese diskutiert wurde (Jackson, 1973). Bis heute sind viele Publikationen erschienen, die eine Zunahme der AChE-Aktivität (oder Expression) während der murinen megakaryozytären Differenzierung dokumentieren (Vannucchi *et al.*, 1997, Ishida *et al.*, 1993, Ishibashi

et al., 1990, Burstein und Ishibashi, 1989). Aufgrund dieser Tatsache wird die AChE-Aktivität als Marker der Megakaryopoese bei Mäusen angesehen. Zusätzlich wird die Erhöhung der Aktivität der Acetylcholinesterase sowohl während der humanen erythroiden Differenzierung (Bartha *et al.*, 1987, Barr und Koekebakker, 1990, Schwenke *et al.*, 1995), als auch in der mit Hexamethylenbisacetamid (HMBA) induzierten Erythropoese der murinen Progenitorzellen (*Friend murine erythroleukemia cells*, MELCs) beobachtet (Paoletti *et al.*, 1995). Die Korrelation der AChE-Aktivität mit der humanen Megakaryopoese wurde bisher nicht näher untersucht.

1.4 Erythroide Differenzierung

Weil megakaryozytäre und erythroide Differenzierung zwei Vorgänge sind, die von einer gemeinsamen Vorläuferzellen ausgehen (Kap. 1.2 und 1.3), kann man die frühe Phase der erythroiden Reifung, die durch die Bildung von Erythroblasten abgeschlossen wird, als einen Vorgang betrachten, der der Megakaryopoese in deren frühen Stadium entgegengerichtet ist. Die erythroide Differenzierung, die *in vitro* durch eine Vielzahl von Stimulanzen, wie z. B. Hämin, Hydroxyharnstoff oder Natriumbutyrat hervorgerufen werden kann (Tsiftoglou *et al.*, 2006, *review*), wird durch die Inhibition des ERK-Signalweges und die Aktivierung des p38 MAP-Kinase-Signalweges induziert (Park *et al.*, 2001b, Witt *et al.*, 2000). Dagegen führt die Aktivierung des ERK-Signalweges und die Inhibition des p38 MAP-Kinase-Signalweges zur megakaryozytären Differenzierung (Herrera *et al.*, 1998, Jacquet *et al.*, 2006). Megakaryozytäre und erythroide Reifung sind zwei entgegengerichtete Prozesse nicht nur im Bezug auf die Signaltransduktion, sondern vor allem in Bezug auf die Ausprägung der erythroiden Eigenschaften. Im Unterschied zur Megakaryopoese ist die Erythropoese durch die Zunahme der erythroiden Eigenschaften begleitet, die vor allem durch das Ausmaß der Hämoglobinisierung der Zellen widerspiegelt wird. Die gesteigerte Hämoglobinsynthese während der Erythropoese kommt infolge der Umstellung des Eisenmetabolismus zustande. Die transkriptionale Heraufregulation der TfR-Expression führt zur Steigerung der transferrin-abhängigen Eisenaufnahme, während die eisenabhängige, posttranskriptionale Regulation der ALAS2-Expression die Erhöhung der Hb-Syntheserate in differenzierenden Zellen ermöglicht (Kawasaki *et al.*, 1996, Schranzhofer *et al.*, 2006, Sposi *et al.*, 2000). Diese Erkenntnisse sowie die Tatsache, dass während dieser Differenzierung die Reduktion des Zellvolumens (Schranzhofer *et al.*, 2006), die konstante Expression des Eisenexporterproteins Ferroportin (Cianetti *et al.*, 2005) oder die Abnahme der Expression des Hämexporters FLVCR (Quigley *et al.*, 2004) stattfinden, sprechen eindeutig dafür, dass in diesem Prozess die Zunahme des

zellulären Eisengehalts erfolgt. In bisherigen Untersuchungen zur erythroiden Differenzierung wurde diese jedoch nicht gemessen. Ob die Steigerung der zellulären Gesamteisenkonzentration durch die Zunahme der Konzentration des freien, cytoplasmatischen Eisens (LIP) begleitet wird, ist auch unklar. Laut der „*kiss and run*“-Hypothese, die manche Autoren vertreten, wird das über den TfR1 aufgenommene Eisen direkt in endosomalen Vesikeln zur Mitochondrienmembran transportiert, ohne ins Cytoplasma freigesetzt zu werden (Schranzhofer *et al.*, 2006). Interessanterweise wird die posttranskriptionale eisenabhängige Expressionsregulation der Transkripte von H- und L-Ferritin weitgehend aufgehoben. Das führt dazu, dass Eisen verstärkt für die Hämoglobinsynthese verbraucht werden kann und nicht im Ferritinmolekül gespeichert wird. Gleichzeitig werden IRP1 und IRP2 nicht durch Eisen reguliert, was die Rolle der transkriptionellen Effekte für die Regulation des zellulären Eisenstoffwechsels in diesem Prozess verdeutlicht (Schranzhofer *et al.*, 2006).

Eine von noch vielen offenen Fragen zur Physiologie der Reifung der erythroiden Zellen ist die Rolle des Sheddings des TfR1 oder der Sortierung des TfR1 in die Exosomen zur Reduktion der Membranpräsenz des TfR1 in der späten Phase der erythroiden Differenzierung. In der terminalen Phase der Erythropoiese verlieren Retikulozyten massiv ihre Transferrinrezeptoren und andere obsolete Membranproteine, so dass Erythrozyten praktisch keine Expression des TfR1 aufweisen. Seit langem wird berichtet, dass dies infolge der Bildung von Exosomen stattfindet (Johnstone *et al.*, 1991, Harding *et al.*, 1983 und 1984). Exosomen sind kleine Membranvesikel (60–80 nm), die durch viele Zelltypen infolge der Fusion der *multivesicular bodies* (MVBs) mit der Plasmamembran in den extrazellulären Raum sekretiert werden (Johnstone, 1992). Für die Einsortierung dieser Proteine in MVBs werden die Proteine Hsc70 und Rab11 verantwortlich gemacht (Davis *et al.*, 1986b, They *et al.*, 1999, Savina *et al.*, 2002). Auch ein anderer Prozess, das Shedding des TfR1, ist eine weitere Ursache für die Reduktion der TfR-Präsenz auf der Plasmamembran der Retikulozyten (R'zik *et al.*, 2001). Exosomen, die durch antigenpräsentierende Zellen gebildet werden, wird eine immunoregulatorische Rolle zugesprochen. Durch die Bildung von Exosomen erfolgt auch die Freisetzung der obsoleten Proteine während der Aktivierung der Thrombozyten, die für den Prozess der Blutgerinnung unentbehrlich sind (Heijnen *et al.*, 1999, Denzer *et al.*, 2000). Obwohl die PKC-Aktivierung Sheddingprozesse vieler Membranproteine stimuliert (Peschon *et al.*, 1998, Althoff *et al.*, 2000, Lammich *et al.*, 1999), ist eine Rolle der PKC in der Induktion der Spaltung des TfR1 oder dessen Einsortierung in die Exosomen nicht bekannt.

1.5 Stand der Forschung und Ziele der vorliegenden Arbeit

Das Hauptziel dieser Arbeit ist, den Eisenmetabolismus während der PMA-abhängigen megakaryozytären Differenzierung der K562-Zellen ausführlich zu charakterisieren.

Eine umfassende Reorganisation der Genexpression, die die Differenzierungs- oder Regenerierungsprozesse begleitet, führt zur Aussetzung der koordinierten Expressionsregulation der IRE-tragenden Transkripte durch den posttranskriptionalen, eisenabhängigen Feedback-Mechanismus (Cairo *et al.*, 1998, Schranzhoffer *et al.*, 2006), der die Regulation der Eisenhomeostase in proliferierenden Zellen gewährleistet. Im Unterschied zu proliferierenden Zellen und zur Erythropoese sind die Veränderungen des Eisenmetabolismus während der Megakaryopoese weniger bekannt. Anders als in der Erythropoese werden TfR1 und TfR2 während der megakaryozytären Differenzierung transkriptional herunterreguliert (Sposi *et al.*, 2000), was die Reduktion der transferrinabhängigen Eisenaufnahme impliziert. Bisherige Untersuchungen haben ebenfalls gezeigt, dass Phorbolester die transferrinunabhängige Eisenaufnahme in K562-Zellen stimuliert (Akompong *et al.*, 1995). Der Einfluss dieser Veränderungen der Eisenaufnahme auf den zellulären Eisengehalt während der megakaryozytären Differenzierung wurde jedoch nicht untersucht. Deshalb sollen mögliche Unterschiede in der zellulären Eisenkonzentration der differenzierenden und proliferierenden K562-Zellen unter den Bedingungen niedriger und hoher Eisenverfügbarkeit mit Hilfe der kolorimetrischen Eisenbestimmung (Ferrozin-Methode) erfasst werden. Weiterhin sollen Proteine des zellulären Eisenstoffwechsels auf Protein- oder RNA-Ebene (Westernblot oder RT-PCR) analysiert werden und die Korrelation der Expression der IRE-tragenden Transkripte von TfR1, H- und L-Ferritin oder Ferroportin mit dem Eisengehalt (und LIP) nach dem Prinzip der eisenabhängigen, posttranskriptionalen Feedback-Regulation festgestellt werden. Durch Versuche zur megakaryozytären Differenzierung in Anwesenheit des PKC-Inhibitors Bisindolylmaleimid I oder Eisenammoniumcitrat (FAC) soll geklärt werden, welche Expressionsveränderungen dieser Zieltranskripte durch den transkriptionalen Mechanismus hervorgerufen werden und welche durch die Veränderungen des Eisengehalts (und LIPs) der differenzierenden Zellen verursacht werden.

Die Charakterisierung der transferrinabhängigen oder transferrinunabhängigen Eisenaufnahme während der megakaryozytären Differenzierung soll anhand von Versuchen geklärt werden, in denen K562-Zellen mit Ferritransferrin oder FAC beladen werden. Im Zusammen-

hang damit ist die Expression weiterer Proteine, die für die Eisenaufnahme verantwortlich sind, wie TfR2, DMT1A, DMT1B, HFE auf RNA- oder Proteinebene zu untersuchen. Dabei soll die Regulation der Proteinexpression von HFE in K562-Zellen durch Eisen und PMA überprüft werden. Auch die Rolle solcher Prozesse wie das Shedding des TfR1 oder die Einsortierung des TfR1 in die Exosomen, die die Membranpräsenz dieses Proteins beeinflussen, sollen während der megakaryozytären Differenzierung geklärt werden. Zur Analyse der Eisenfreisetzung ist neben der Expression von Ferroportin auch die Expression von FLVCR und Hepsidin nachzuweisen.

Einen weiteren Schwerpunkt der Versuche zur megakaryozytären Differenzierung bilden Untersuchungen zur Rolle des Eisens bei der Ausprägung von megakaryozytären- oder erythroiden Eigenschaften. Dazu soll der Einfluss der erhöhten Eisenverfügbarkeit auf die Expression von CD61 oder die Hämoglobinkonzentration untersucht werden. In Verbindung damit ist die Charakterisierung der Hämoglobinsynthese anhand der Expressionen von γ -Globin-, ALAS2- und FECH-mRNA vorgesehen. Im Zusammenhang mit der Ausprägung des megakaryozytären Phenotyps im Prozess der megakaryozytären Differenzierung soll neben der May-Grünwald-Giemsa-Färbung der Zellen, der Bestimmung der Zellmasse und den Proliferationsstudien auch die Aktivität der Acetylcholinesterase bestimmt werden, deren Korrelation mit der humanen Megakaryopoese noch nicht eindeutig festgestellt wurde.

Die zur Analyse des Eisenmetabolismus während der megakaryozytären Differenzierung erforderlichen Versuche zur Optimierung oder Etablierung von Methoden (wie z. B. Bedingungen der semiquantitativen RT-PCR, Erstellung der Kalibrierungskurven für zahlreiche Assays, Regulierbarkeit der IRE-tragenden Transkripte durch FAC und Ferri-Tf usw.) sollen zuerst an proliferierenden K562-Zellen durchgeführt werden. Da die Aufklärung der Rolle der Expression von Hepsidin in K562-Zellen ein Nebenziel dieser Arbeit darstellt, sind auch folgende Versuche an K562-Zellen während deren Proliferation vorgesehen:

- Regulation der Präprohepcidin-Expression durch Eisen (FAC) in K562-Zellen
- Klonierung der Präprohepcidin-cDNA in einen eukaryotischen Expressionsvektor (pcDNA3)
- Transfektion und Überexpression dieses Hybridplasmids in K562-Zellen
- Analyse der Expression von Präprohepcidin, TfR1, H- und L-Ferritin sowie Ferroportin in Präprohepcidin-cDNA-pcDNA3-Transfektanten (semiquantitative RT-PCR) und Kontrollzellen (pcDNA3-Transfektanten).