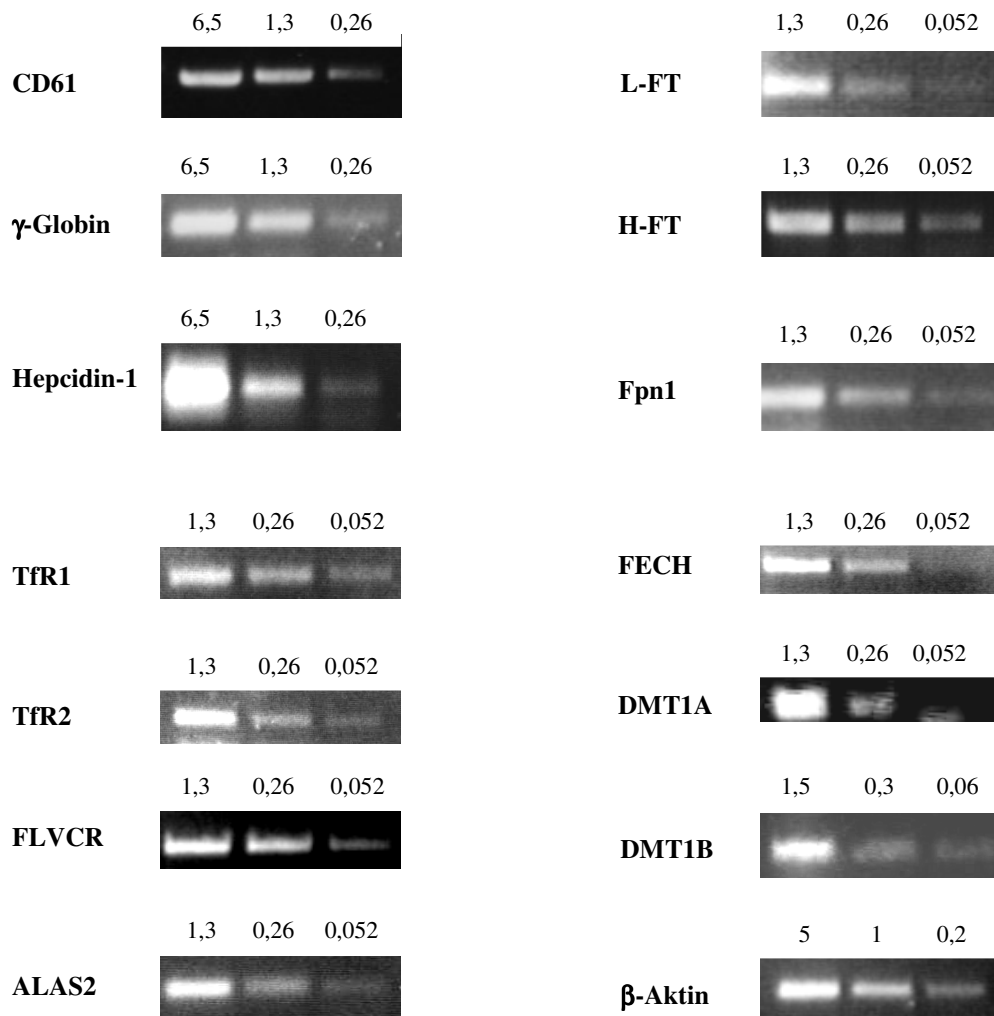


# 4 Ergebnisse

## 4.1 Methodische Ergebnisse

### 4.1.1 RT-PCR-Semiquantifizierungen

Für jede RNA-Art wurden die Bedingungen der semiquantitativen RT-PCR einzeln optimiert. Es wurde für jedes Zieltranskript eine PCR-Zyklenzahl festgelegt bei der die Menge des Amplifikates nicht im exponentiellen Bereich, sondern im linearen Bereich lag. Das war die Voraussetzung dafür, dass die Menge des gebildeten Amplifikates die Menge der vorhandenen mRNA in der Probe proportional widerspiegelte. Für die überwiegende Mehrheit der RNAs lag diese Zahl bei 25 Zyklen. Im Fall von  $\beta$ -Aktin und L-Ferritin erreichten die Amplifikatmengen bereits nach 15 Zyklen den linearen Bereich der Amplifikationsreaktion. Während der RT-PCR der DMT1A- und DMT1B-mRNA wurden bei 25 Zyklen unzureichende Mengen der Amplifikate detektiert, die keine Semiquantifizierung zuließen. Erst die Erhöhung der Zyklenzahl auf 30 ermöglichte die Semiquantifizierung dieser PCR-Produkte in der linearen Phase der Amplifikationsreaktion. Die cDNAs wurden ausgehend von verschiedenen RNA-Mengen synthetisiert. Zur Feststellung der optimalen RNA-Konzentration für die semiquantitative RT-PCR wurden für jede RNA-Art drei Ansätze vorbereitet, die entsprechend die 25-, 5- und 1-fache RNA-Konzentration beinhalteten. Je nach Zieltranskript wurden 6,5 / 1,3 / 0,26  $\mu\text{g}$ , 5 / 1 / 0,2  $\mu\text{g}$ , 1,5 / 0,3 / 0,06  $\mu\text{g}$  oder 1,3 / 0,26 / 0,052  $\mu\text{g}$  RNA pro RT-PCR-Ansatz verwendet (Abb. 4.1). Die endgültigen RT-PCR-Bedingungen für die semiquantitative RT-PCR sind in der Tab. 4.1 dargestellt.



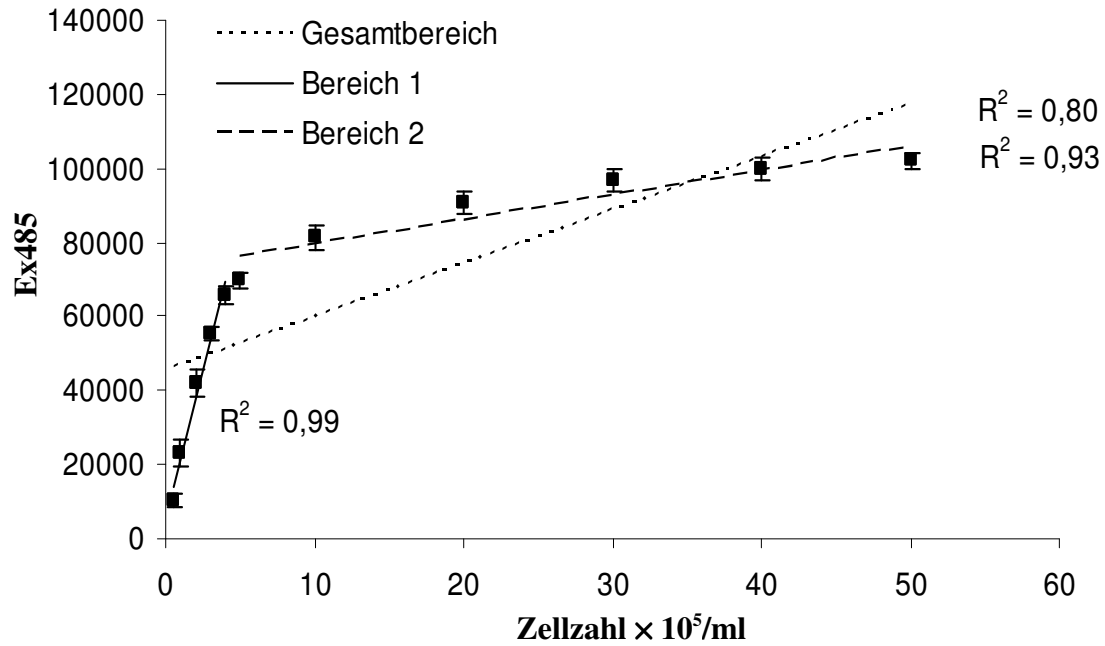
**Abb. 4.1:** Semiquantitative RT-PCR; verschiedene RNA-Mengen (0,26–6,5  $\mu$ g) der im Eisenstoffwechsel involvierten Proteine sowie CD61-,  $\gamma$ -Globin- und  $\beta$ -Aktin-Transkripte wurden in die jeweiligen cDNAs umgeschrieben (Reverse Transkription). Als Proben für die 1–2 %ige Agarosegelelektrophorese wurden 10  $\mu$ l aus 50  $\mu$ l RT-PCR Ansatz verwendet. Die Daten wurden mindestens aus zwei unabhängigen Ergebnissen ermittelt.

**Tab. 4.1:** Bedingungen für die semiquantitative RT-PCR; RNA-Mengen für die Reverse Transkription und PCR-Zyklenzahl.

mRNA	RNA-Mengen für die semi-quantitative RT-PCR (µg)	Zyklenzahl
<b>CD61</b>	1,3	25
<b>γ-globin</b>	1,3	25
<b>β-Aktin</b>	2,0	15
<b>TfR1</b>	0,26	25
<b>TfR2</b>	0,26	25
<b>L-Ferritin</b>	0,26	15
<b>H-Ferritin</b>	0,26	25
<b>Fpn1</b>	0,39	25
<b>FLVCR</b>	0,26	25
<b>ALAS2</b>	0,26	25
<b>FECH</b>	0,26	25
<b>DMT1A</b>	0,3	30
<b>DMT1B</b>	0,3	30
<b>Hepcidin-1</b>	1,3	25

#### 4.1.2 Bestimmung der Vitalität der Zellen (Fluoresceindiacetat (FDA)-Assay)

Um die Vitalität der Zellen mit der höchsten Sensitivität zu messen, wurde zuerst geprüft, in wie weit zwischen der Zellzahl in der Probe und dem gemessenen Fluoreszenzsignal ein linearer Zusammenhang besteht. Im Gesamtbereich ( $10^5$ – $10^7$  Zellen/ml) erreichte das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  für die ermittelte Regressionsgerade nur den Wert von 0,80 (Abb. 4.2). Im Bereich 1 ( $1$ – $8 \times 10^5$  Zellen pro ml Ansatz) lag das  $R^2$  bei 0,99, während beim Einsatz von  $10^6$ – $10^8$  Zellen/ml (Bereich 2) eine Regressionsgerade mit  $R^2 = 0,93$  ermittelt wurde. Aus diesem Grund wurde für weitere Untersuchungen zum Nachweis der Vitalität der Zellen eine Zellzahl von  $2,5 \times 10^5$ /ml Ansatz eingesetzt.



**Abb. 4.2:** FDA-Assay; eine Kalibrierungskurve mit  $5 \times 10^4$ ,  $10^5$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$  und  $5 \times 10^6$  K562-Zellen pro ml. Als Ergebnisse wurden die Ex<sub>485</sub>-Werte in den Proben nach dem Abzug von Blank-Werten in zellfreien Ansätzen aufgetragen. Diese Daten wurden aus Doppelwerten in vier unabhängigen Experimenten ermittelt; die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen der Mittelwerte (S.E.M).

### 4.1.3 Eisenbestimmung mittels Ferrozin-Assay

Zur Quantifizierung der Eisenkonzentration in Proben wurde parallel zu jedem Experiment eine Standardkurve mit 0–400  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_2$  mitgeführt. Die Abb. 4.3 zeigt eine typische Kalibrierungskurve zur Eisenbestimmung mittels der Ferrozin-Methode. In den zu analysierenden Proben wurde danach die Zellzahl variiert. Einerseits wurde dadurch bestätigt, dass eine entsprechende Proportionalität zwischen der Zunahme der Eisenkonzentration in den Proben der Zelllysate und der gemessenen Absorption bei 562 nm besteht. Andererseits wurde das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  ermittelt um eine sensitive Messung im linearen Bereich zu gewährleisten. Im ganzen Bereich lag das Bestimmtheitsmaß bei 0,97 (Abb. 4.4). Anhand dieser Experimente wurden Proben mit  $2,5 \times 10^7$  Zellen/ml für weitere Versuche zur Messung der Eisenkonzentrationen in Lysaten der K562-Zellen benutzt.

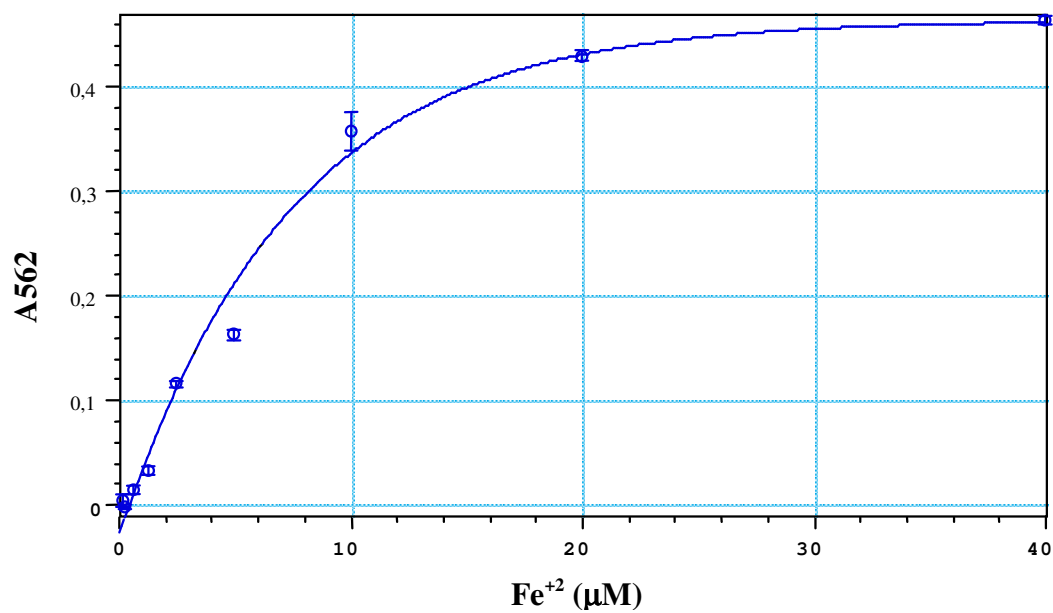


Abb. 4.3: Eisenbestimmung mittels Ferrozin-Methode; eine typische Standardkurve mit 0–400 µM FeCl<sub>2</sub>.

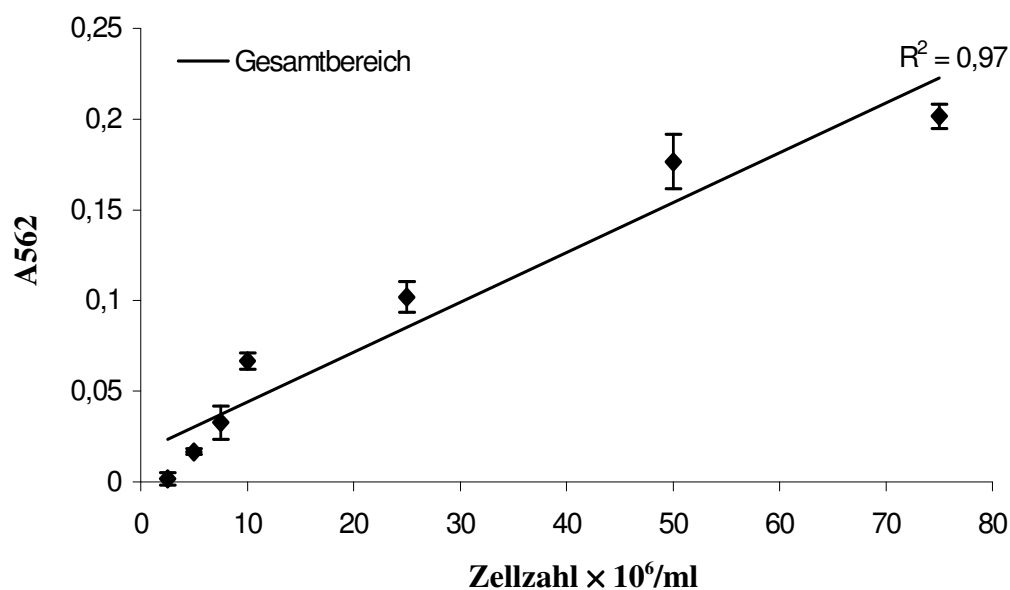
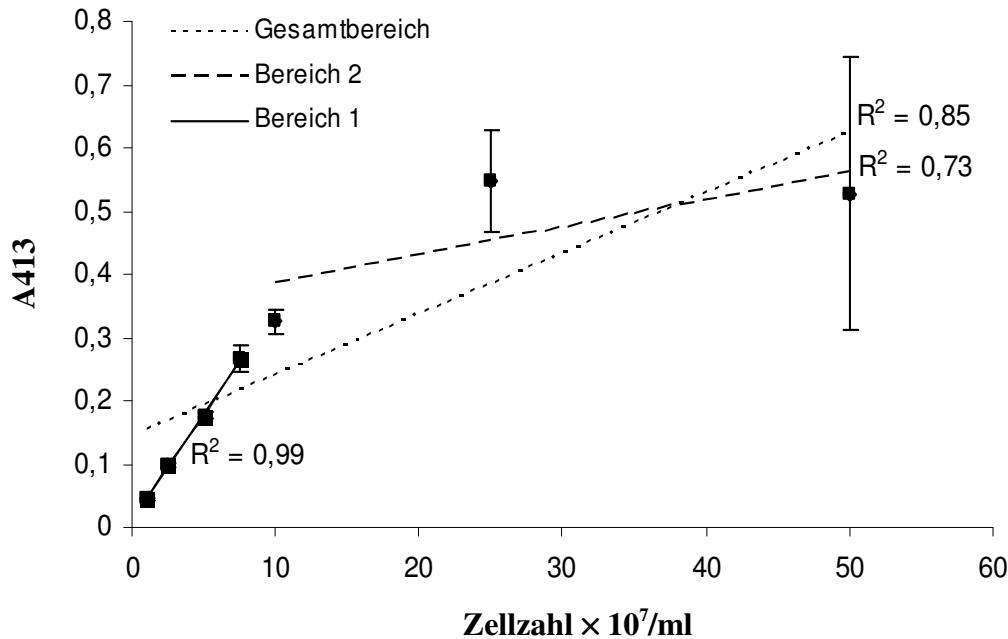


Abb. 4.4: Ferrozin-Assay; Eine Standardkurve mit  $2,5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $7,5 \times 10^6$ ,  $10^7$ ,  $2,5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$  und  $7,5 \times 10^7$  Zellen/ml. Diese Daten wurden aus Doppelwerten in drei unabhängigen Experimenten ermittelt; die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen der Mittelwerte (S.E.M).

#### 4.1.4 Spektrophotometrische Hämoglobinbestimmung (Hb-Assay)

Zur Feststellung, bei welcher Zellzahl der in 1 ml H<sub>2</sub>O lysierten Zellen eine sensitive Messung der zellulären Hämoglobinkonzentration gewährleistet ist, wurde in den Überständen der Lysate von 1–50 × 10<sup>7</sup> K562-Zellen/ml H<sub>2</sub>O die Absorption bei 413 nm auf-

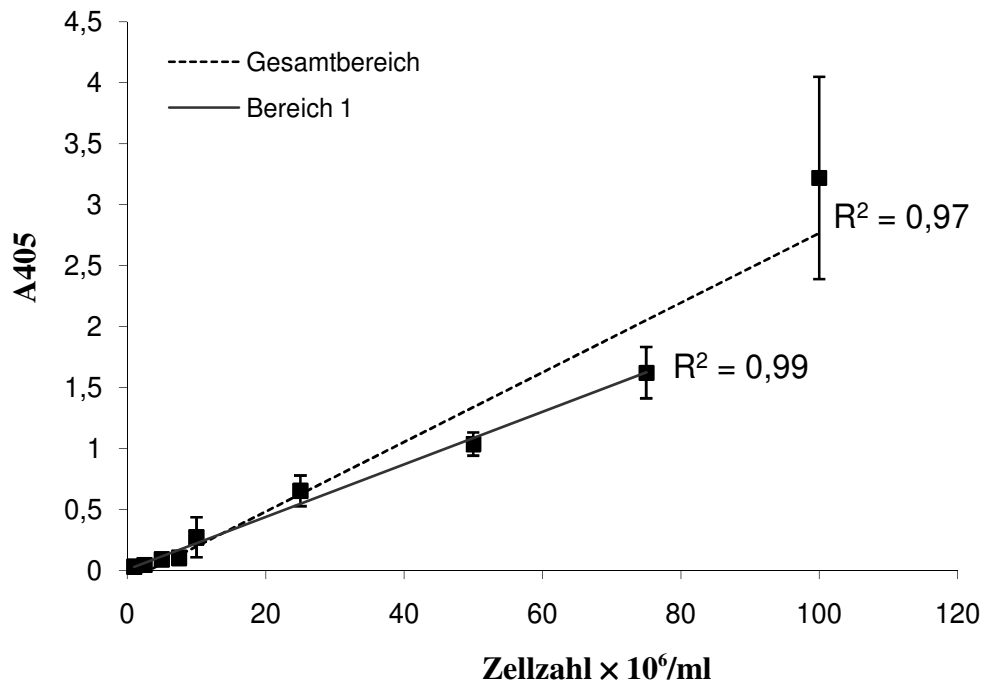
genommen (Abb. 4.5). Für den Gesamtbereich wurde  $R^2$  gleich 0,85 berechnet. Im Bereich mit hoher Zellzahl im Ansatz ( $0-50 \times 10^7$  Zellen/ml) erreichte das Bestimmtheitsmaß nur noch einen geringeren Wert von 0,73. Im Unterschied dazu wurde bei einer niedrigeren Zellzahl im Ansatz ( $1-7,5 \times 10^7$  Zellen/ml) eine Linearität von  $R^2 = 0,99$  festgestellt. Deshalb wurde die Zelldichte von  $2,5 \times 10^7$  Zellen/ml in weiteren Versuchen zur Bestimmung des Hämoglobingehalts in K562-Zellen verwendet.



**Abb. 4.5:** Optimierung des Hb-Assays; die Absorption bei 413 in den Überständen der Lysate von K562-Zellen mit  $10^7$ ,  $2,5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^7$ ,  $10^8$ ,  $2,5 \times 10^8$  und  $5 \times 10^8$  Zellen/ml  $H_2O$  im Ansatz. Die Daten zeigen einen Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmungen; die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen der Mittelwerte (S.E.M).

#### 4.1.5 Spektrophotometrische Bestimmung der Acetylcholinesteraseaktivität (AChE-Assay)

Die Bestimmung der Linearität zwischen der Zellzahl in der Probe und der gemessenen Absorption bei 405 nm ergab für den ganzen Bereich ( $10^6-10^8$  Zellen/ml) das Bestimmtheitsmaß von 0,97 (Abb. 4.6). Wegen des großen Fehlers bei der Messung mit  $10^8$  Zellen/ml, wurde auch die Linearität im Bereich  $1 \times 10^6-7,5 \times 10^7$  Zellen/ml bestimmt, in dem das Quadrat des Korrelationskoeffizienten den Wert von 0,99 erreichte. Schließlich wurde die Zelldichte von  $5 \times 10^7$  Zellen/ml als optimal zur Durchführung der Messungen der AChE-Aktivität der K562-Zellen gewählt.

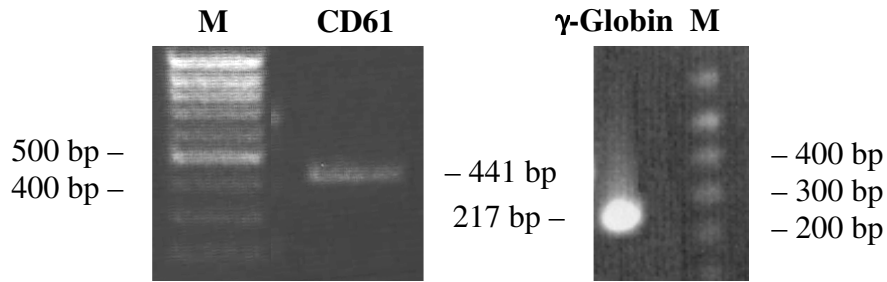


**Abb. 4.6:** AChE-Assay-Standardkurve mit  $10^6$ ,  $2,5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $7,5 \times 10^6$ ,  $10^7$ ,  $2,5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^7$  und  $10^8$  Zellen/ml im Ansatz. Die Daten wurden aus Doppelwerten von vier unabhängigen Experimenten ermittelt; die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen der Mittelwerte (S.E.M).

## 4.2 Charakterisierung der K562-Zellen

### 4.2.1 Expression der megakaryozytären und erythroiden Marker

Ein Vergleich der mRNA-Expression des megakaryozytären Markers CD61 und des erythroiden Markers  $\gamma$ -Globin in der semiquantitativen RT-PCR zeigte, dass unter den gleichen Versuchsbedingungen die Expression der  $\gamma$ -Globin-Transkripte viel stärker ausgeprägt war als die der CD61-mRNA (Abb. 4.7). Dies bestätigte frühere Untersuchungen zum Phänotyp der K562-Zelllinie, die belegten, dass die erythroiden den megakaryozytären Eigenschaften überlegen sind (Melemed *et al.*, 1997).

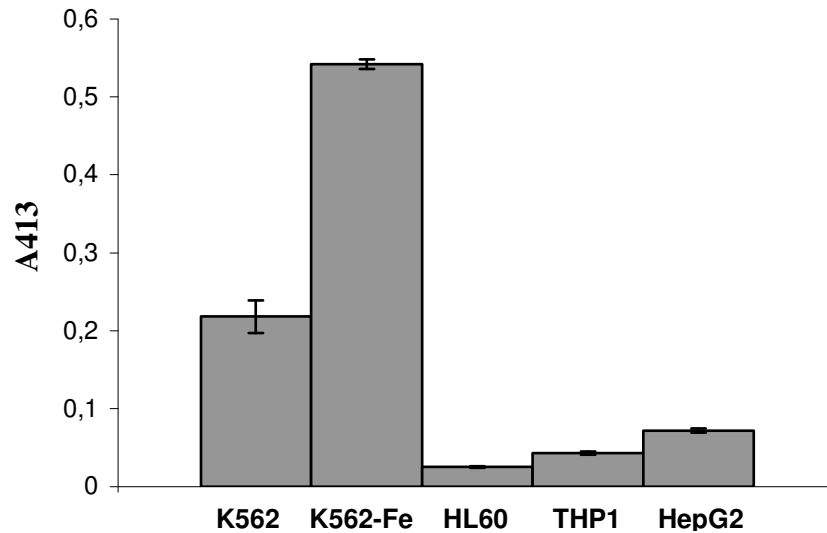


**Abb. 4.7:** Expression der megakaryozytären und erythroiden Marker in K562-Zellen (semiquantitative RT-PCR). Die Reverse Transkription wurde mit 1,3 µg RNA durchgeführt, die Semiquantifizierung der CD61- und γ-Globin-Amplifikate erfolgte nach 25 PCR-Zyklen; 1 %ige Agarosegelelektrophorese. Als Proben wurden 10 µl aus 50 µl RT-PCR Ansatz verwendet; M – Marker.

#### 4.2.2 Hämoglobinkonzentration

Im Vergleich zu anderen leukozytären Zelllinien wie HL60 oder THP1 weisen K562-Zellen viel höhere Absorptionswerte bei 413 nm auf, was auf hohe Konzentrationen des im Protoporphyrin-IX-komplexierten Eisens hinweist (Abb. 4.8). Diese Werte sind auf die hohe Hämoglobinkonzentration in dieser Zelllinie zurückzuführen. Verschiedene Klone unterscheiden sich sowohl im Ausmaß der Hb-Synthese, als auch in der Stärke der Expression der einzelnen Hämoglobinketten (Testa *et al.*, 1982). Nach 48 Stunden langer Vorbeladung der K562-Zellen mit 100 µM FAC nahm die Hb-Konzentration deutlich zu. Das ist ein Hinweis dafür, dass das anorganische Eisen für die Hb-Synthese verwendet wurde. HepG2-Zellen, die etwas höhere A413-Werte als die HL60- und THP1-Zellen besitzen, sind eine Zelllinie, die den metabolisch sehr aktiven Hepatozyten entspricht. In Leberzellen ist eine hohe Aktivität des Cytochroms P450 nachzuweisen, das ähnlich wie Hämoglobin das Häm b enthält.

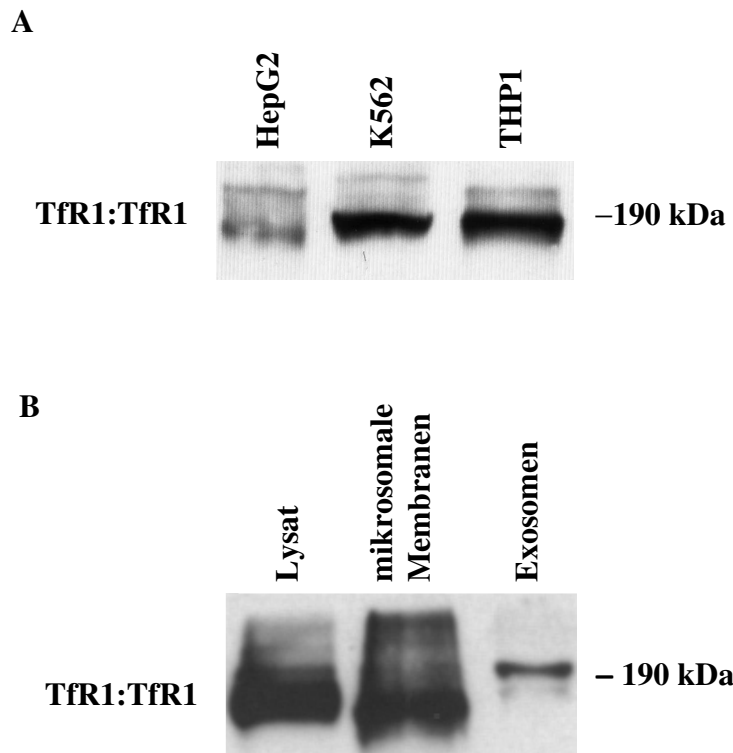




**Abb. 4.8:** Absorption bei 413 nm in Lysaten von K562-, HL60-, THP1- und HepG2-Zellen ( $2,5 \times 10^7$  Zellen pro ml); K562-Fe – K562-Zellen, die 48 h mit 100  $\mu$ M FAC behandelt wurden. In Überständen der Zellysate wurde die Absorption bei 413 nm gemessen. Die Daten wurden aus Doppelwerten von zwei unabhängigen Experimenten ermittelt; die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen der Mittelwerte (S.E.M).

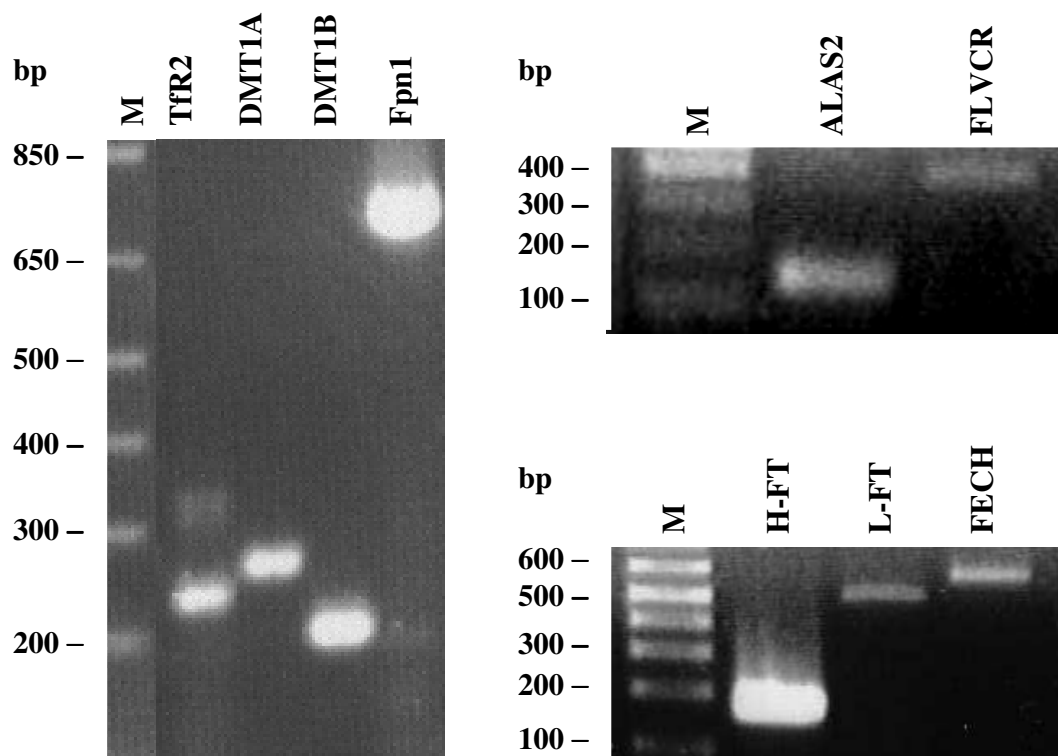
#### 4.2.3 Expression der im zellulären Eisenstoffwechsel involvierten Proteine

Für weitere Untersuchungen zum Eisenstoffwechsel während der Proliferation und der megakaryozytären Differenzierung wurden zuerst die Expressionen der Proteine untersucht, die in die Regulation der intrazellulären Eisenkonzentration und Hämsynthese involviert sind. Abbildung 4.9A zeigt die Expression des TfR1 in den leukozytären Zelllinien K562 und THP1 sowie in der Hepatokarzinomzelllinie HepG2. Weil auf die Expression des TfR1 solche Prozesse wie Shedding oder Bildung von Exosomen Einfluss nehmen, wurde auch die Expression dieses Proteins in mikrosomalen Membranen und Exosomen der K562-Zellen untersucht (Abb. 4.9B). Der TfR1 wird in die Exosomen der K562-Zellen einsortiert (Savina *et al.*, 2002), aber diese Vesikel besitzen viel weniger Transferrinrezeptoren als die mikrosomalen Membranen dieser Zellen (Abb. 4.9B).



**Abb. 4.9:** (A) Expression des TfR1-Dimers in Lysaten der Zelllinien HepG2, K562 und THP1; (B) Expression des TfR1-Dimers in Lysaten, mikrosomalen Membranen und Exosomen der K562-Zellen; TfR1:TfR1 – Transferrinrezeptordimere; Proben mit 50 µg Protein wurden nach der SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen im Immunoblot mit dem OKT9- Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des TfR1 nachgewiesen. Diese Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

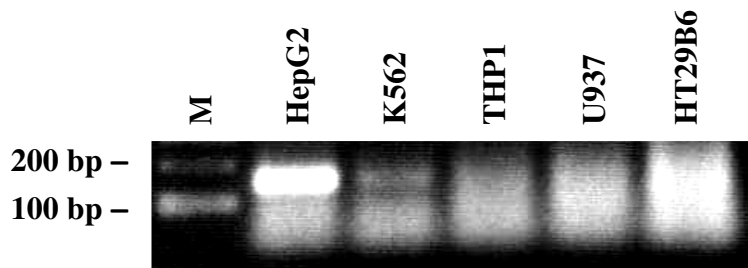
Neben TfR1 wurde auch die Expression des HFE-Proteins in K562-Zellen nachgewiesen (Abb. 4.25 auf Seite 87). Die Expressionen der anderen Proteine des Eisenstoffwechsels in K562-Zellen wurden mittels RT-PCR untersucht. Von besonderer Bedeutung war die Detektion der IRE-tragenden Transkripte von TfR1, H-Ferritin, L-Ferritin und Ferroportin, weil in weiteren Versuchen deren Semiquantifizierung mittels RT-PCR erfolgen sollte. Während die Expression von TfR2 (transferrinabhängige Eisenaufnahme) und DMT1B-Isoform (Eisentransport aus den Endosomen ins Cytoplasma) in der K562-Zelllinie und erythroiden Zellen bereits nachgewiesen wurde (Kawabata *et al.*, 1999 und 2001, Hubert und Hentze, 2002), ist die Expression der DMT1A-Isoform in K562-Zellen bisher nicht untersucht worden. Die Abb. 4.11 zeigt, dass die DMT1A-Isoform nicht nur in polarisierten Zellen des Duodenums und der Niere exprimiert ist, sondern auch in erythroiden K562-Zellen. Die Expression des Eisenexporters Ferroportin (Fpn1), des Hämexporters FLVCR, des Ferritins (schwere und leichte Kette) sowie der zwei wichtigsten regulativen Enzyme der Hämsynthese – der erythroiden  $\delta$ -Aminolävulinatsynthase (ALAS2) und Ferrochelatase (FECH) wurde auf RNA-Ebene durch RT-PCR in dieser Zelllinie bestätigt (Abb. 4.10).



**Abb. 4.10:** Expression der mRNAs von Proteinen des Eisenstoffwechsels in K562-Zellen (semiquantitative RT-PCR); 1 %ige Agarosegelelektrophorese. Als Proben wurden 10  $\mu$ l aus 50  $\mu$ l RT-PCR Ansatz verwendet; die Größen der entsprechenden Amplifikate sind in Kap. 3.3.3.1 (Tab. 3.8) eingeführt; M – Marker.

#### 4.2.4 Expression von Präprohepcidin

Untersuchungen zur Expression der Proteine des Eisenstoffwechsels in verschiedenen Zelllinien, die auf RNA-Ebene mit Hilfe von RT-PCR durchgeführt wurden, ergaben, dass Hepcidin nicht nur in HepG2-, sondern auch in der K562-Zelllinie exprimiert wurde (Abb. 4.11). Das Ausmaß der Präprohepcidin-mRNA-Expression in K562-Zellen ist jedoch viel schwächer als in der HepG2-Zelllinie, was in Übereinstimmung damit steht, dass die Leberzelle der Hauptsyntheseort von Hepcidin ist (Park *et al.*, 2001a). Diese Ergebnisse konnten nicht auf Proteinebene bestätigt werden, weil die Firma Biogenes, die zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen Hepcidin beauftragt wurde, keinen funktionsfähigen Antikörper geliefert hat und dieser auch kommerziell nicht erhältlich war. Die Rolle des Hepcidins im Eisenstoffwechsel der K562-Zellen wird im Kap. 4.3.2 untersucht.

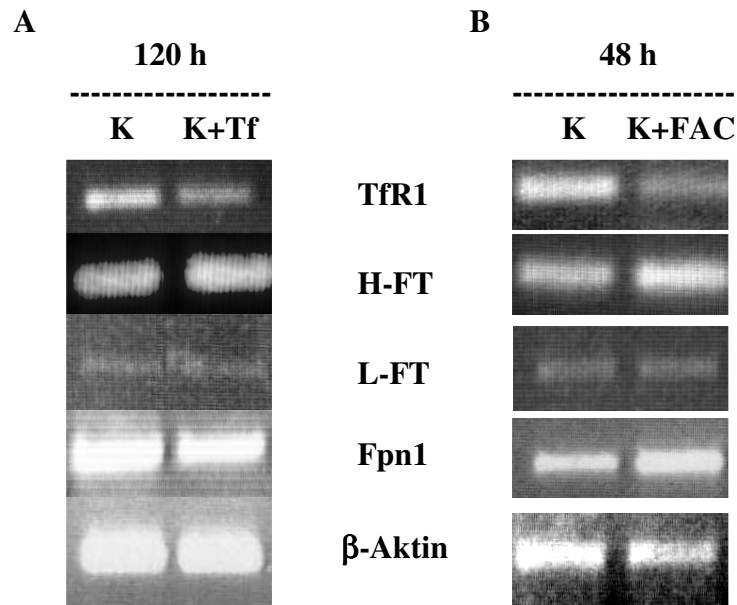


**Abb. 4.11:** Expression von Präprohepcidin in verschiedenen Zelllinien (RT-PCR). Für die Reverse Transkription mit sequenzspezifischen Primern (Kap. 3.3.3.3.1) wurden 1,3 µg Gesamt-RNA verwendet; 1 %ige Agarosegelelektrophorese. Als Proben wurden 10 µl aus 50 µl RT-PCR-Ansatz eingesetzt.

## 4.3 Regulation des Eisenstoffwechsels in proliferierenden K562-Zellen

### 4.3.1 Posttranskriptionale Expressionsregulation von TfR1-, H- und L-Ferritin- sowie Ferroportin-Transkripten durch IRP / IRE-Wechselwirkungen

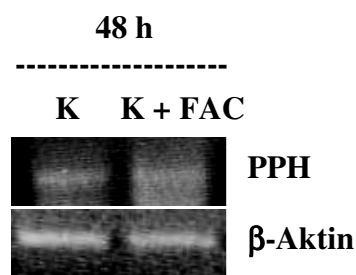
Das Ziel der Untersuchungen zur posttranskriptionalen Expressionsregulation von TfR1-, H-Ferritin-, L-Ferritin- und Ferroportin-Transkripten durch den eisenabhängigen Feedback-Mechanismus in K562-Zellen war festzustellen, unter welchen Bedingungen die Überladung der K562-Zellen mit FAC die Expressionsregulation von IRE-tragenden RNAs von TfR1, Ferritin und Ferroportin hervorruft. Es wurde die Herabregulation der TfR1-mRNA und die Heraufregulation der H-Ferritin- und Ferroportin-mRNA festgestellt. Die Beladung der K562-Zellen mit 100 µM FAC hat also nach 48 Stunden solche Expressionsveränderungen dieser mRNAs bewirkt, die nach dem bekannten Mechanismus der posttranskriptionalen Eisenregulation durch IRP/IRE-Wechselwirkungen zu erwarten waren. Die angegebene Konzentration von FAC und die Dauer des Experiments ermöglichen also die Überprüfung der Regulierbarkeit dieser mRNAs durch Eisen in K562-Zellen während der Proliferation. Zum Vergleich wurden K562-Zellen für fünf Tage mit 4 mg/ml Ferritransferrin beladen und nach der RNA-Isolierung wurde die Expression der Zieltranskripte mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert (Abb. 4.12). Auffällig ist, dass im Unterschied zur Eisenstoffwechselregulation nach FAC-Überladung kein Anstieg der Ferroportin-mRNA-Expression stattfand. Interessanterweise blieb die Expression von L-Ferritin in beiden Experimenten unverändert.



**Abb. 4.12:** Posttranskriptionale Regulation des zellulären Eisenstoffwechsels; Veränderungen der Expression der IRE-tragenden mRNAs von TfR1, Ferritin (H-FT, L-FT) und Ferroportin (Fpn1) nach Beladung der K562-Zellen mit Ferritransferrin (A) oder FAC (B) wurden mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht; K + Tf – K562-Zellen nach 120 h Beladung mit Ferri-Tf; K + FAC – K562-Zellen, die 48 h mit FAC beladen wurden; K – Kontrollzellen (K562), die entweder 120 h ohne Zusatz von Ferri-Tf (A) oder 48 h ohne Zusatz von FAC (B) kultiviert wurden; 1 %ige Agarosegelelektrophorese. Als Proben wurden 10 µl aus 50 µl RT-PCR-Ansatz verwendet. Die Daten wurden in zwei gleichermaßen verlaufenen Experimenten ermittelt.

### 4.3.2 Expressionsregulation der Präprohepcidin-mRNA durch Eisen

Die gleichen experimentellen Bedingungen, die zum Nachweis der eisenabhängigen Regulation der Expression der IRE-tragenden Transkripte von Proteinen des Eisenstoffwechsels benutzt wurden (48-stündige Beladung mit 100 µM FAC, Kap. 4.3.1), wurden auch in den Untersuchungen zur Expressionsregulation der Präprohepcidin-mRNA durch Eisen in K562-Zellen eingesetzt. Diese Experimente ergaben, dass im Unterschied zu Leberzellen, in denen die Hepcidin-Expression einer Regulation durch Eisen unterliegt, die Präprohepcidin-mRNA-Expression in K562-Zellen von Eisen unabhängig ist (Abb. 4.13).



**Abb. 4.13:** Expressionsregulation der Präprohepcidin-mRNA durch Eisen; semiquantitative RT-PCR. K562-Zellen wurden entweder 48 h mit 100 µM FAC beladen (K + FAC) oder unbehandelt kultiviert (K – Kontrollzellen); PPH – Präprohepcidin-mRNA („Hepcidin-1“). Die β-Aktin-Transkripte dienten als Beladungskontrolle. Als Proben für die 1 %ige Agarosegelelektrophorese wurden in zwei unabhängigen Experimenten 10 µl aus 50 µl RT-PCR-Ansätzen verwendet.

### 4.3.3 Einfluss der Präprohepcidin-cDNA-Überexpression in K562-Zellen auf die Regulation des zellulären Eisenstoffwechsels

#### 4.3.3.1 Klonierung von Präprohepcidin-cDNA

Um festzustellen, ob Heparin eine autokrine Wirkung auf die Regulation des zellulären Eisenstoffwechsels in K562 aufweist, wurde Präprohepcidin-cDNA in einen eukaryontischen Expressionvektor (pcDNA3) einkloniert und nach der Transfektion in K562-Zellen stabil überexprimiert.

##### 4.3.3.1.1 RT-PCR von Präprohepcidin-cDNA

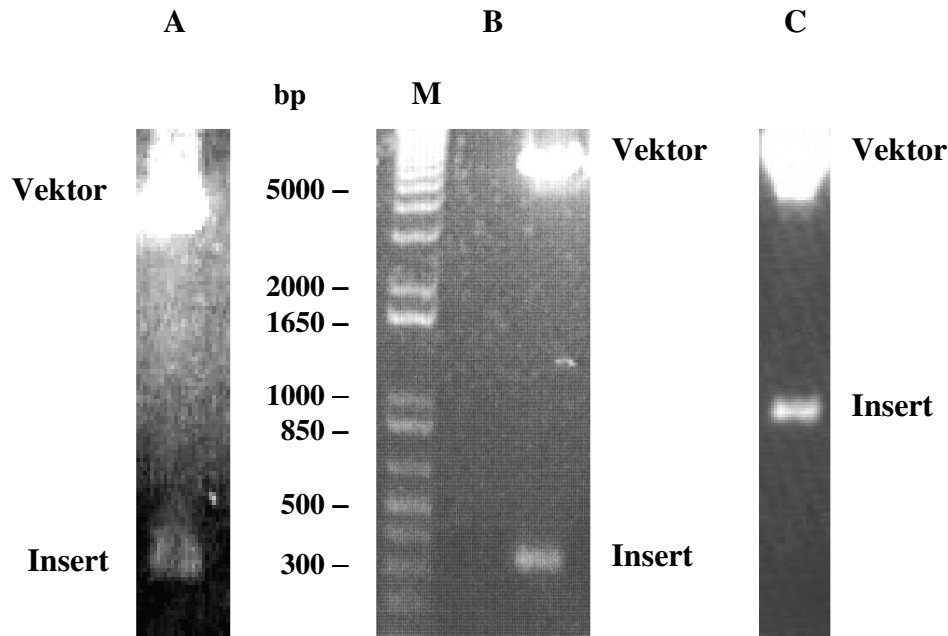
Nach der Expressionskontrolle von Präprohepcidin-mRNA in HepG2-Zellen über RT-PCR (siehe Abb. 4.14) wurde die 306 bp lange Präprohepcidin-cDNA (bp 51–357) aus der RNA der HepG2-Zellen durch RT-PCR mit sequenzspezifischen Primern synthetisiert (Kap. 3.3.3.3.2). Um Präprohepcidin-cDNA *blunt end* in den pCR-Blunt II-TOPO-Vektor einklonieren zu können, wurde das mit der im *OneStep RT-PCR Kit* enthaltenen *HotStarTaq DNA Polymerase* amplifizierte Produkt mittels Pwo-Polymerase reamplifiziert (Abb. 4.14).



**Abb. 4.14:** RT-PCR von Präprohepcidin-cDNA – Amplifizierung und Reamplifizierung der Präprohepcidin-cDNA („Heparin-2-Amplifikat“). 1 %ige Agarosegelelektrophorese; als Proben wurden 10 µl aus 50 µl RT-PCR- bzw. PCR-Ansatz verwendet; M – Marker; A – Präprohepcidin-cDNA-Amplifikat; R – Präprohepcidin-cDNA-Reamplifikat.

##### 4.3.3.1.2 Klonierung von Präprohepcidin-cDNA in den pCR-Blunt II-TOPO-Vektor und Umklonierung in den pcDNA3-Vektor

Das Präprohepcidin-cDNA-Reamplifikat wurde *blunt end* in den pCR-Blunt II-TOPO-Vektor einkloniert. Die Abbildung 4.15 zeigt die Kontrolle der Anwesenheit des Präprohepcidin-cDNA-Inserts in Hybridplasmiden durch den Restriktionsverdau mit Eco RI-Endonuklease und die Kontrolle von dessen Orientierung im Präprohepcidin-cDNA-pcDNA3-Hybridplasmid durch den Verdau mit dem Bgl II-Restriktionsenzym. Durch die Sequenzierung der Präprohepcidin-cDNA-pcDNA3-Hybridplasmide wurde die 5'→3'-Orientierung der Inserts, deren *In-frame*-Einklonierung und die Fehlerfreiheit der Sequenzen bestätigt.

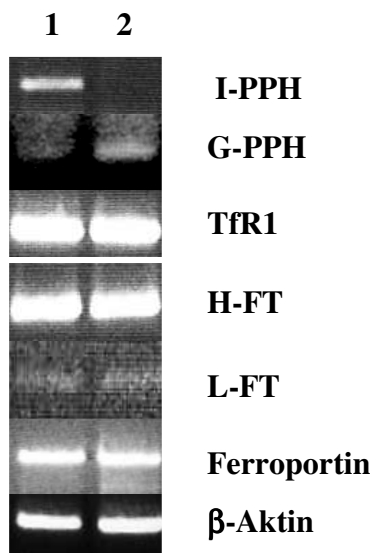


**Abb. 4.15:** Klonierung von Präprohepcidin-cDNA in den pCR-Blunt II-TOPO-Vektor und Umklonierung in den pcDNA3-Vektor; (A) Restriktionsverdau des Präprohepcidin-cDNA-pCR-Blunt II-TOPO-Hybridplasmids mit dem Eco RI-Restriktionsenzym führt zur Bildung des Restriktionsverdaufragments (322 bp), das das Präprohepcidin-cDNA-Insert (307 bp) beinhaltet; (B) Restriktionsverdau des Präprohepcidin-cDNA-pcDNA3-Hybridplasmids mit dem Eco RI-Restriktionsenzym führt zur Bildung des Restriktionsverdaufragments (322 bp), das das Präprohepcidin-cDNA-Insert (307 bp) beinhaltet; (C) Restriktionsverdau des Präprohepcidin-cDNA-pcDNA3-Hybridplasmids mit dem Bgl II-Restriktionsenzym führt zur Bildung des Bgl II-Restriktionsverdaufragments, dessen Größe (993 bp) der 5'→3' Orientierung des Inserts im Präprohepcidin-cDNA-pcDNA3-Hybridplamid entspricht; M – Marker; 1 %ige Agarosegelelektrophorese. Als Proben wurden 10 µl aus 20 µl Restriktionsverdau der rekombinanten Plasmide verwendet.

#### 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

Nach der Transfektion der K562-Zellen mit den rekombinanten Präprohepcidin-cDNA-pcDNA3-Plasmiden oder alleine mit dem pcDNA3-Plasmid (als Kontrolle), Selektion der Transfektanten (Kap. 3.1.3), 72-stündiger Kultivierung (Kap. 3.1.4) und RNA-Isolierung (Kap. 3.3.1), erfolgte zuerst die Kontrolle der Transfektion mit Hilfe der RT-PCR. K562-Zellen, die mit den rekombinanten Plasmiden transfiziert wurden, exprimierten im Unterschied zu den Kontrollzellen (pcDNA3-Transfektanten) eine Präprohepcidin-mRNA, die aus der DNA des Hybridplasmids transkribiert wurde. Diese „Insert“-Transkripte („Hepcidin-3-Amplifikate“, Kap. 3.3.3.3) besitzen in ihrer 5'-UTR statt einer aus der genomischen DNA-

kodierten Sequenz eine plasmidspezifische Sequenz (Folge der Klonierung über die Eco RI-Schnittstelle). Durch den Einsatz eines zu dieser Sequenz komplementären Forward Primers und eines zur Präprohepcidin-mRNA spezifischen Reverse Primers konnte man in der RT-PCR die Anwesenheit dieser rekombinanten Präprohepcidin-mRNA feststellen. Ein Nachweis der endogenen Präprohepcidin-Transkripte, die in der genomischen DNA kodiert sind, wurde dadurch ermöglicht, dass diese Präprohepcidin-mRNAs die genomische 5'-UTR besitzen (Kap. 3.3.3.3.1). Die Überexpression der Präprohepcidin-cDNA beeinflusste die Expression der IRE-tragenden mRNAs von TfR1, H- und L-Ferritin, sowie Ferroportin-mRNA kaum (Abb. 4.16). Die Expression der endogenen, aus dem Genom kodierten Präprohepcidin-Transkripte war jedoch in diesen Zellen erniedrigt.



**Abb. 4.16:** Stabile Überexpression von Präprohepcidin-cDNA in K562-Zellen; semiquantitative RT-PCR; (1) Präprohepcidin-pcDNA3-Transfektanten; (2) pcDNA-3-Transfektanten (Kontrollen). I-PPH – Insert-Präprohepcidin („Hepcidin-3“); G-PPH – endogenes, genomisches Präprohepcidin („Hepcidin-1“) und die Expression der IRE-tragenden mRNAs von TfR1, H- Ferritin und L-Ferritin oder Ferroportin. Die Amplifikate wurden mittels 1 %iger Agarosegelelektrophorese detektiert. Als Proben wurden 10 µl aus 50 µl RT-PCR-Ansatz eingesetzt. Die Daten wurden aus zwei unabhängigen Experimenten ermittelt.

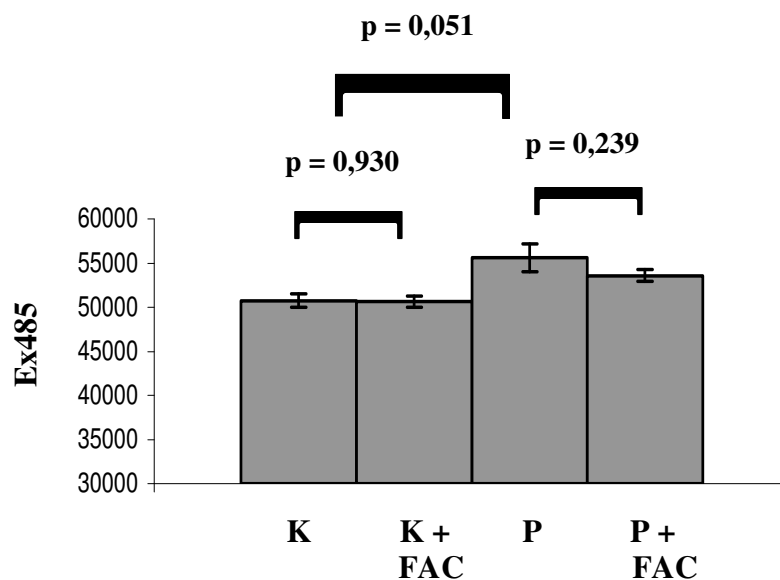
## 4.4 Megakaryozytäre Differenzierung der K562-Zellen

### 4.4.1 Vitalität der K562-Zellen nach 72-stündiger PMA-Stimulation

Nach drei Tagen Stimulation der K562-Zellen mit 100 nM PMA ergab die Prüfung ihrer Vitalität mit Hilfe des FDA-Assays (Kap. 3.1.7) keine Herabsetzung der differenzierten Zellen im Vergleich zu den proliferierenden Kontrollzellen (Abb. 4.17). In den mit PMA behandelten Zellen wurde sogar eine geringfügig erhöhte Aktivität der cytosolischen Esterasen festgestellt, die den Wert von 110 % des Wertes, der in Kontrollzellen gemessen wurde, erreichte. Wegen der zellulären Toxizität des anorganischen Eisens (Papanicolaou und Pantopoulos, 2005, *review*), wurde die Aktivität der cytosolischen Esterasen auch in den-



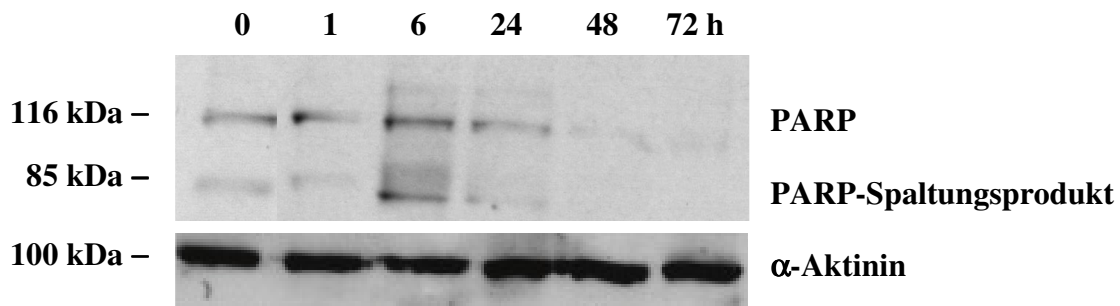
jenigen K562-Zellen gemessen, die während der Proliferation oder Differenzierung mit 100  $\mu$ M FAC beladenen wurden (Kap. 4.3.1). Es wurde festgestellt, dass die Vitalität der K562-Zellen nach 72 Stunden der Proliferation unter hoher Eisenkonzentration im Zellkulturmedium sich nicht wesentlich von der Vitalität der Kontrollzellen unterscheidet, die unter niedriger Eisenkonzentration im Zellkulturmedium kultiviert wurden ( $p = 0,93$ ). Die Aktivität cytosolischer Esterasen in differenzierenden K562-Zellen war in Gegenwart hoher Eisenkonzentrationen gegenüber proliferierenden Zellen um 5,8 % erhöht ( $p = 0,051$ ), während sie gegenüber differenzierenden Zellen bei niedriger Eisenkonzentration nicht signifikant verändert war (3,7 % verringert,  $p = 0,293$ ).



**Abb. 4.17:** (A) Fluoresceindiacetat (FDA)-Assay: Aktivität der cytosolischen Esterasen nach 72 h Stimulation mit 100 nM PMA; K – Kontrollzellen (K562); K + FAC – K562-Zellen, die während der 72 h Proliferation mit 100  $\mu$ M FAC beladen wurden; P – K562-Zellen, die 72 h mit 100 nM PMA differenziert wurden; P + FAC – K562-Zellen, die 72 h mit 100 nM PMA differenziert wurden und gleichzeitig mit 100  $\mu$ M FAC beladen wurden. Die Daten wurden in Doppelwerten in vier unabhängigen Experimenten ermittelt; die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen der Mittelwerte (S.E.M).

#### 4.4.2 Aktivierung der Apoptose

Obwohl K562-Zellen zu den Zelllinien gehören, die eine erhöhte Resistenz gegen apoptotische Signale aufweisen (Horita et al., 2000), wurde geprüft, ob die Behandlung dieser Zelllinie mit 100 nM Phorbol ester eine Aktivierung jener Signalwege zu Folge hat, die zum programmierten Zelltod führen. Die Expressionsanalyse des PARP-Proteins (116 kDa) und der PARP-Spaltungsprodukte (85 kDa) im Westernblot (Abb. 4.18) zeigte keine Aktivierung der Apoptose nach 72 Stunden der PMA-abhängigen megakaryozytären Differenzierung.



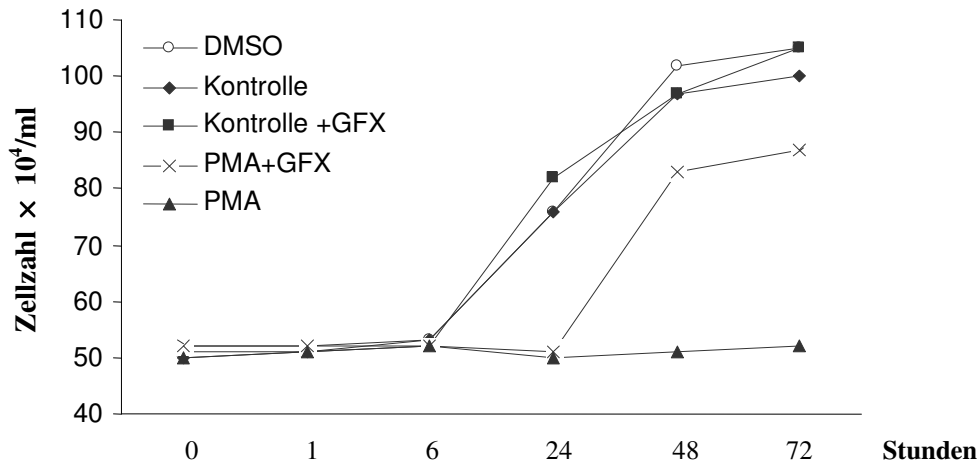
**Abb. 4.18:** Die Spaltung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) im Verlauf von drei Tagen der megakaryozytären Differenzierung; Immunoblot. Die Expression von  $\alpha$ -Aktinin diene als Beladungskontrolle; als Proben wurden Lysate der K562-Zellen mit 50  $\mu$ g Protein verwendet.

#### 4.4.3 Differenzierungsbedingter Wachstumsstopp

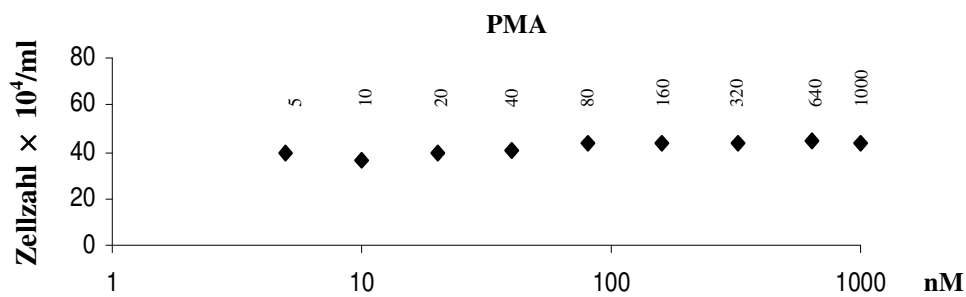
Eine Zugabe von 100 nM PMA zur Kultur der K562-Zellen hat eine vollständige Inhibition der Proliferation dieser Zellen hervorgerufen. Dieser Wachstumsstopp wurde 24 Stunden nach Beginn der Differenzierung beobachtet und hat insgesamt 72 Stunden andauert. GF 109203X, ein PKC-Inhibitor, der zusammen mit PMA zum Zellkulturmedium der K562-Zellen zugegeben wurde, zeigte seine Wirkung erst nach 48 Stunden und hob den PMA-abhängigen Wachstumsstopp nur zum Teil auf (Abbildung 4.19A). DMSO, das als Lösungsmittel für PMA und GF 109203X in diesen Experimenten eingesetzt wurde, gehört selbst zu den Differenzierungsagenzien und ruft z. B. in einer Konzentration von 210 mM eine Differenzierung von MEL Zellen hervor (Tsiftoglou *et al.*, 2003, *review*). Um auszuschließen, dass DMSO Einfluss auf den beobachteten Wachstumsstopp nimmt, wurden K562-Zellen 72 Stunden mit 0,7 mM DMSO kultiviert. Diese Konzentration entspricht der Konzentration von DMSO in der Zellkultur nach der Zugabe von 100 nM PMA in DMSO. Es wurde kein Unterschied zwischen der Proliferation der unbehandelten Zellen und der mit DMSO behandelten Zellen festgestellt. Weitere Versuche zum Wachstumsstopp während der megakaryozytären Differenzierung wurden mit einem breiten Spektrum an PMA-Konzentrationen durchgeführt (5 bis 1000 nM), um deren Einfluss auf das Wachstumsverhalten der K562-Zellen zu untersuchen. Die in Abb. 4.19B dargestellten Ergebnisse zeigten, dass die Inhibition der Proliferation der K562-Zellen von der eingesetzten PMA-Konzentration im Zellkulturmedium unabhängig ist. Eine Kultivierung der K562-Zellen mit DMSO-Konzentrationen von 35  $\mu$ M bis 7 mM, die den Konzentrationen an DMSO im Zellkulturmedium

während der Behandlung der Zellen mit 5 bis 1000 nM PMA entsprachen, hatte auch keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der K562-Zellen (Abb. 4.19C).

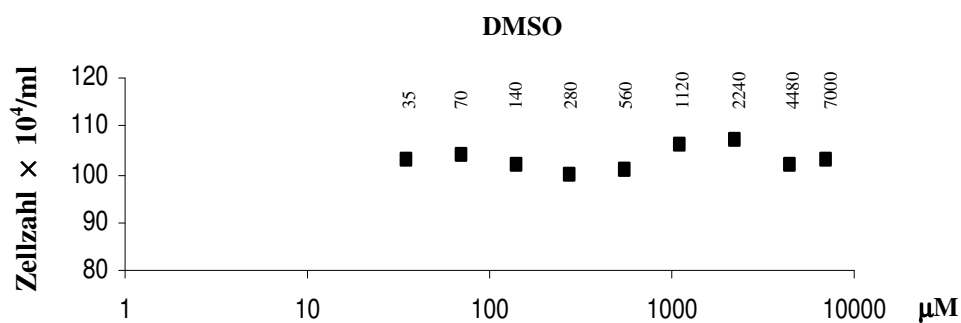
**A**



**B**



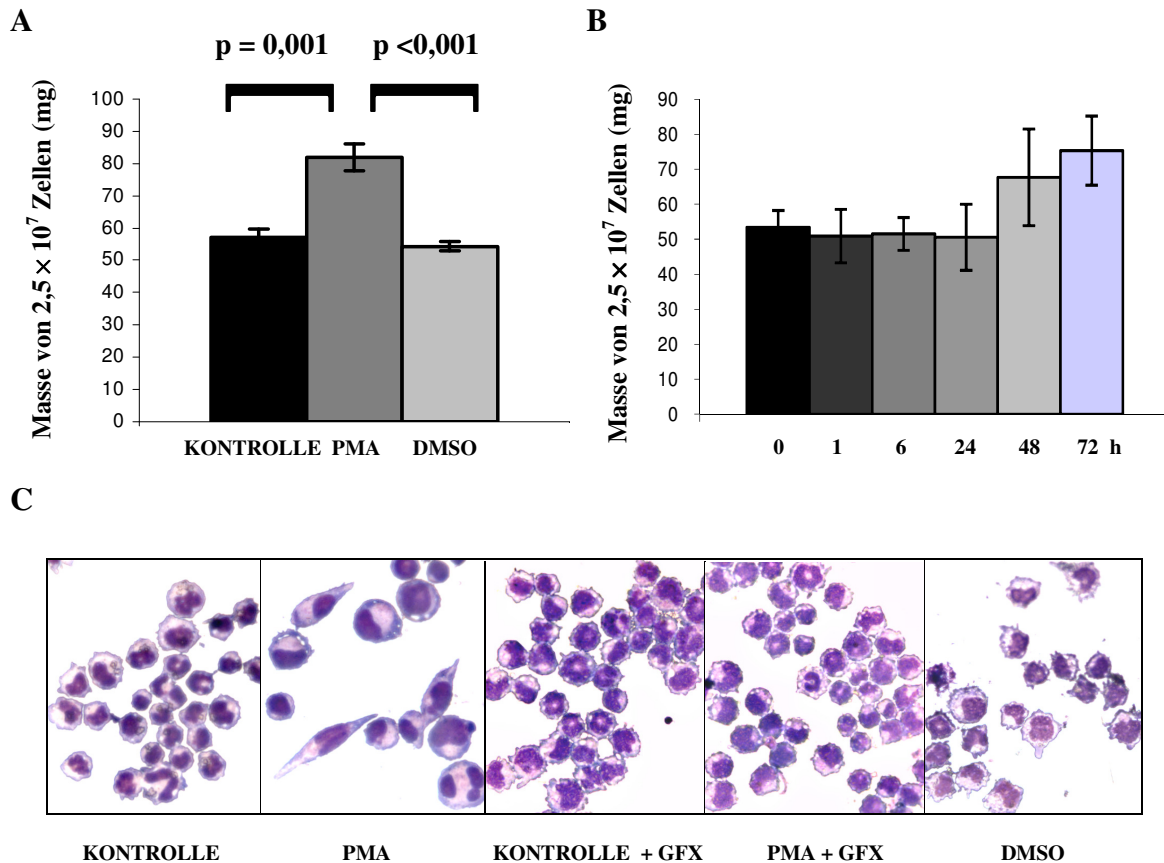
**C**



**Abb. 4.19:** (A) Ein PMA-abhängiger Wachstumsstopp während der megakaryozytären Differenzierung. K562-Zellen wurden entweder mit 100 nM PMA, 1 μM GF 109203X, 0,7 mM DMSO, oder 100 nM PMA + 1 μM GF 109203X 72 h inkubiert oder für 72 h unbehandelt kultiviert (Kontrollen). Die Daten entsprechen den Mittelwerten aus vier unabhängigen Experimenten; (B) Einfluss der steigenden Konzentrationen von PMA auf die Proliferation der K562-Zellen während der 72-stündigen Zellkultur; (C) Einfluss der steigenden Konzentrationen von DMSO auf die Proliferation der K562-Zellen während der 72-stündigen Zellkultur; die Zellen wurden in der Neubauer-Kammer gezählt. Die aufgetragenen Werte entsprechen den Mittelwerten aus zwei unabhängigen Experimenten.

#### 4.4.4 Morphologische Veränderungen

Die Veränderungen der Zellmorphologie während der *In-vitro*-Megakaryopoese wurden durch die Pappenheim-Färbung mit May-Grünwald- und Giemsa-Lösungen dokumentiert. Nach 72 Stunden bildeten unbehandelte Kontrollzellen und mit DMSO kultivierte Zellen eine relativ homogene Population von Zellen mit großen, runden Zellkernen, umgeben von einem schmalen Cytoplasma (Blasten). Zellen, die mit PMA behandelt wurden, wiesen dagegen eine für Megakaryozyten charakteristische Morphologie auf – eine Vergrößerung des Zellvolumens, einen im Vergleich zu den Kontrollzellen kleineren, lobulären Zellkern und ein azidophiles Cytoplasma. Diese Veränderungen führten zur Erniedrigung des Kern: Cytoplasma-Verhältnisses der differenzierten Zellen, was ein charakteristisches Merkmal der frühen Phase der megakaryozytären Entwicklung darstellt (Kap. 1.3). Etwa 10–15 % der Zellen waren polymorph, wuchsen adhärent und besaßen Pseudopodia. Die Ausbildung all dieser PMA-abhängigen morphologischen Veränderungen konnte durch die Zugabe von 1  $\mu$ M GF 109203X zum Zellkulturmedium der mit PMA behandelten Zellen vollständig verhindert werden, während Kontrollzellen, die nur mit dem PKC-Inhibitor behandelt wurden, unverändert blieben. Eine Quantifizierung der Masse der K562-Zellen ergab eine hochsignifikante Zunahme der Masse der differenzierten Zellen um ~ 43 % nach 72 Stunden der PMA Behandlung im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 4.20A). Im Unterschied zum Wachstumsstopp, der in der Zeit zwischen 6 und 24 h nach dem Beginn der PMA-Stimulation beobachtet wurde, trat die Vergrößerung der Zellen erst nach 48 h auf. In dieser Zeit erreichte die Masse der differenzierten Zellen ~ 127 % des Wertes, der zu Beginn des Experimentes gemessen wurde (Abb. 4.20B).

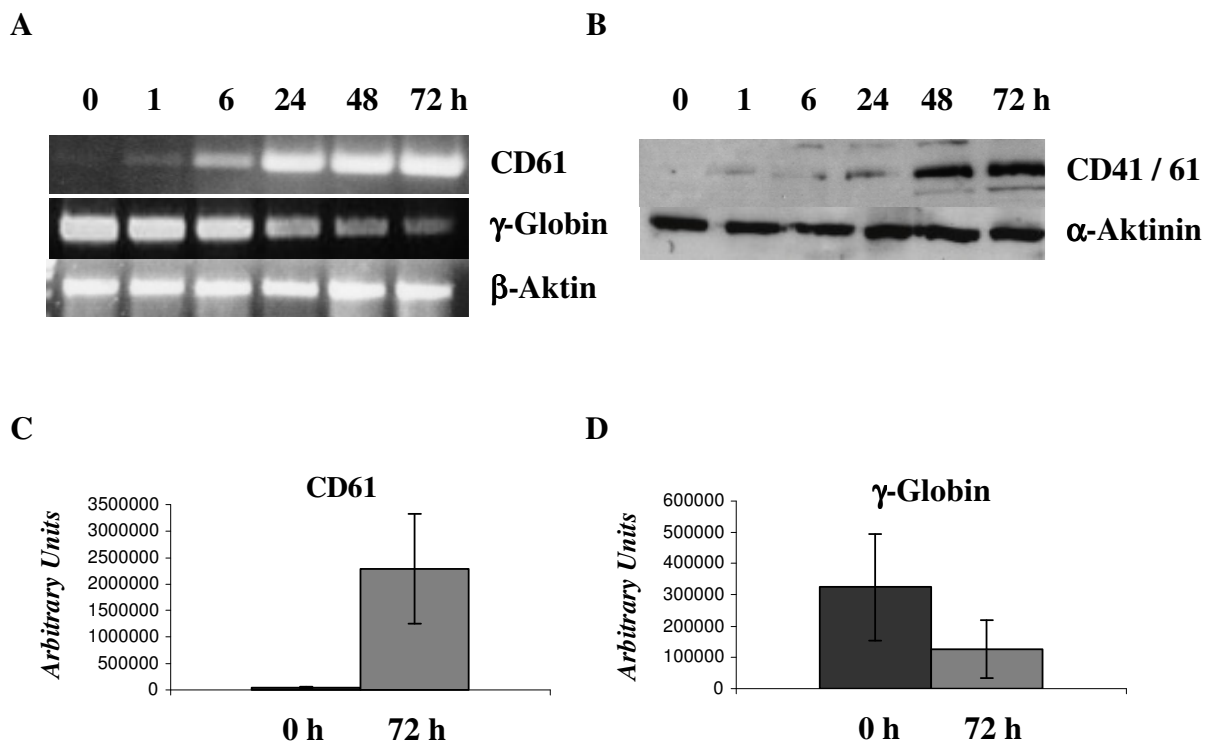


**Abb. 4.20:** Veränderung der Morphologie der K562-Zellen infolge der megakaryozytären Differenzierung. (A) Die Zunahme der Zellmasse nach 72 h der *In-vitro*-Megakaryopoese mit 100 nM PMA; K – Kontrollzellen (K562); PMA – K562-Zellen nach Stimulation mit 100 nM PMA; DMSO – K562-Zellen nach Inkubation mit 0,7 mM DMSO im Zellkulturmedium; n = 5, die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen der Mittelwerte (S.E.M). (B) Die Zunahme der Zellmasse der K562-Zellen während 72 h der megakaryozytären Differenzierung; n = 2, die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen der Mittelwerte (S.E.M). (C) May-Grünwald-Giemsa-Färbung der Zellen.

#### 4.4.5 Megakaryozytäre und erythroide Marker

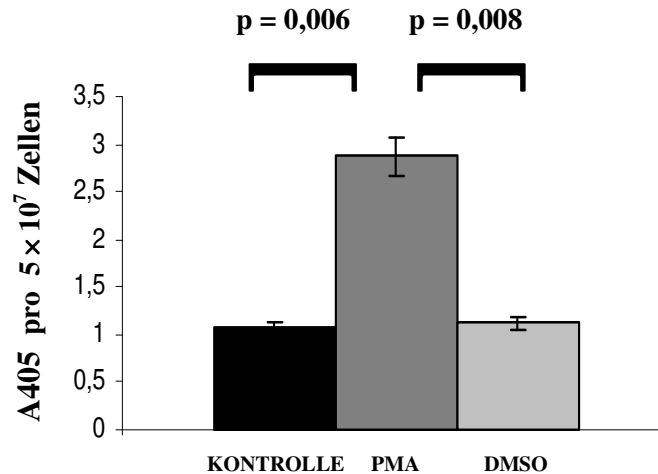
Der morphologische Wandel der K562-Zellen während der megakaryozytären Differenzierung wird durch die Expressionsveränderungen der megakaryozytären und erythroiden Markern begleitet. Die Expression des megakaryozytären Markers Integrin  $\alpha$ IIb /  $\beta$ 3 (CD41 / CD61) hat während 72-stündiger PMA-Stimulation drastisch zugenommen. Die verstärkte CD61-mRNA-Expression wurde bereits nach einer Stunde beobachtet (Abb. 4.21A), und nach 72 h erreichte sie ~ 5220 % des Wertes, der am Beginn des Experiments gemessen wurde (Abb. 4.21C). Im Unterschied zu einer rapiden CD61-mRNA-Expressionszunahme erfolgte eine entsprechend bedeutsame Zunahme der CD41 / CD61-Protein-Expression erst nach 48 Stunden (Abb. 4.21B). Die Expressionsabnahme des erythroiden Markers  $\gamma$ -Globin

wurde erst nach 24 Stunden auf RNA-Ebene festgestellt (Abb. 4.21A), und nach 72 Stunden erreichte sie ~ 47 % des Anfangwertes (Abb. 4.21D).



**Abb. 4.21:** Megakaryozytäre und erythroide Marker während megakaryozytären Differenzierung. **(A)** Semi-quantitative RT-PCR; die CD61- und  $\gamma$ -Globin-mRNA-Expression während der 72 Stunden langen Stimulation der K562-Zellen mit 100 nM PMA. Die Expression der  $\beta$ -Aktin-Transkripte diente als Beladungskontrolle. 1 %ige Agarosegelelektrophorese; als Proben wurden 10  $\mu$ l aus 50  $\mu$ l RT-PCR-Ansatz verwendet. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. **(B)** Immunoblot; die CD41 / 61-Proteinexpression während 72-stündiger Behandlung der K562-Zellen mit 100 nM PMA. Die Proteinexpression von  $\alpha$ -Aktinin diente als Beladungskontrolle; es wurden jeweils 50  $\mu$ g Protein von Zellysaten verwendet; n = 2. Eine densitometrische Analyse der Amplifikatenmengen von CD61 **(C)** und  $\gamma$ -Globin **(D)** nach RT-PCR und 1 %iger Agarosegelelektrophorese erfolgte mit Hilfe des FujiFilm LAS-1000 Systems; n = 3, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichungen der Mittelwerte (S.E.M).

Untersuchungen zur Aktivität der Acetylcholinesterase während der PMA-abhängigen *In-vitro*-Megakaryopoese der K562-Zellen ergaben im Vergleich zu den Kontrollzellen eine ~ 2,7-fache und signifikante Steigerung deren Aktivität in differenzierten Zellen (Abb. 4.22).



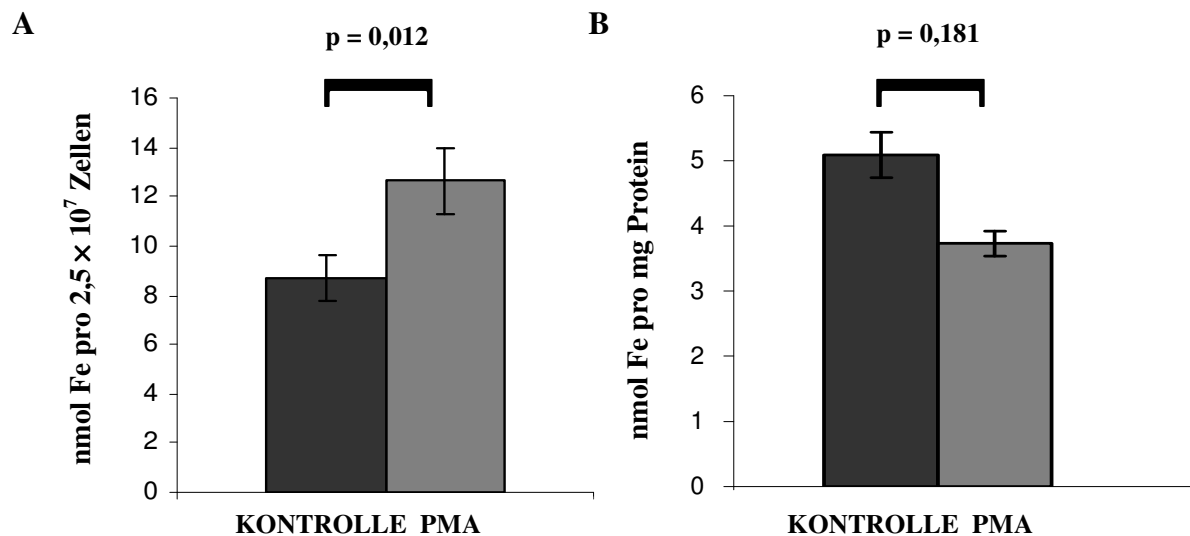
**Abb. 4.22:** AChE-Assay; die Absorption bei 405 nm in  $5 \times 10^7$  K562-Zellen nach deren 72-stündiger Behandlung mit 100 nM PMA oder 0,7 mM DMSO. Die Kontrollzellen wurden 72 h unbehandelt kultiviert. Die dargestellten Werte entsprechen dem arithmetischen Mittel von vier unabhängigen Experimenten ( $n = 4$ ), die jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden; die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen der Mittelwerte (S.E.M).

## 4.4.6 Eisenstoffwechsel

### 4.4.6.1 Die zelluläre Eisenkonzentration

Um die Veränderungen des Eisenmetabolismus während der megakaryozytären Differenzierung zu charakterisieren, wurde zuerst die Eisenkonzentration in den differenzierenden und proliferierenden K562-Zellen mittels Ferrozin-Methode bestimmt. Nach 72 Stunden langer Behandlung der K562-Zellen mit 100 nM PMA wurde die Eisenakkumulation beobachtet (Abb. 4.23A). Die totale Eisenkonzentration (pro Zelle) in differenzierenden Zellen erreichte  $\sim 145\%$  des Wertes, der in proliferierenden K562-Zellen gemessen wurde ( $p = 0,012$ ). Im Gegensatz dazu konnte für den relativen Eisengehalt (pro mg Protein) keine Zunahme festgestellt werden; der bestimmte Mittelwert lag sogar  $\sim 27\%$  unter dem der Kontrollzellen, jedoch war diese Abnahme nicht signifikant ( $p = 0,181$ , Abb. 4.23B). Eine signifikante Verminderung um  $\sim 40\%$  des relativen Eisengehalts in differenzierenden Zellen gegenüber den proliferierenden Zellen ( $p = 0,034$ ) wurde jedoch festgestellt, wenn diese Zellen 72 Stunden in Anwesenheit von Ferri-Tf im Zellkulturmedium wuchsen (Abb. 4.29B, Seite 90). Zur weiteren Klärung dieser differenzierungsabhängigen Veränderungen in der zellulären Eisenhomeostase der K562-Zellen, wurden diese Zellen entweder 48 Stunden vor oder 72 Stunden während der PMA-Behandlung in Anwesenheit von  $100 \mu\text{M}$  FAC im

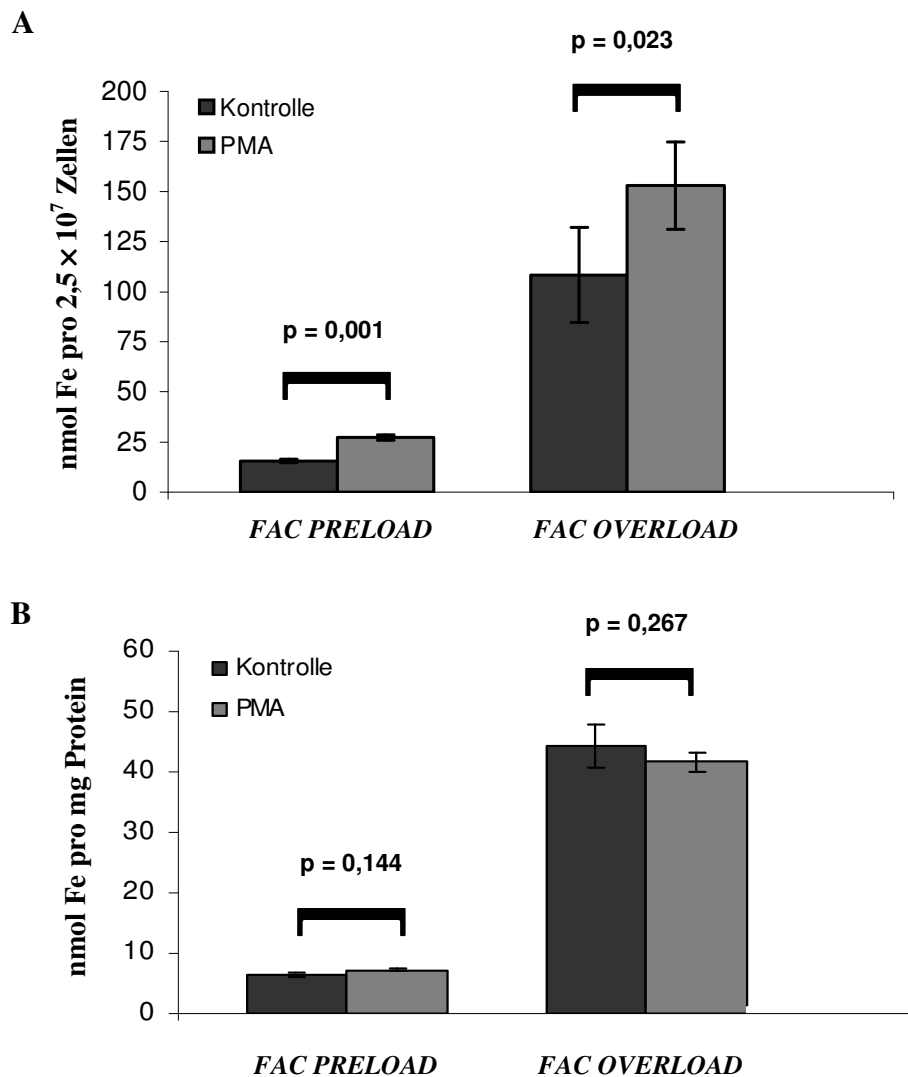
Zellkulturmedium kultiviert. Anschließend wurde die zelluläre Eisenkonzentration mittels Ferrozin-Methode bestimmt (Abb. 4.24).



**Abb. 4.23:** Der totale (A) und relative (B) Eisengehalt der K562-Zellen während deren megakaryozytärer Differenzierung (PMA) oder Proliferation (Kontrolle); Ferrozin-Methode. Bei der Ermittlung des relativen Eisengehalts wurden die Eisen(II)-Mengen (nmol) zur Proteinmenge (mg) in den Lysaten normiert. Die Daten wurden aus Doppelwerten von sechs unabhängigen Ergebnissen ermittelt. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen der Mittelwerte (S.E.M).

Nach 72 Stunden langer Überladung der K562-Zellen mit  $100 \mu\text{M}$  FAC erreichte die zelluläre Eisenkonzentration über 10mal höhere Werte als unter Bedingungen mit normaler (niedrigen) Eisenkonzentration im Zellkulturmedium. Wie in der Abb. 4.24 dargestellt, lag die totale Eisenkonzentration in differenzierenden Zellen um  $\sim 40\%$  höher als in proliferierenden Zellen ( $p = 0,023$ ), während der relative Eisengehalt eine geringfügige, nicht signifikante Abnahme von  $\sim 11\%$  aufwies ( $p = 0,267$ ). Die 48-stündige Vorbehandlung der K562-Zellen mit  $100 \mu\text{M}$  FAC verursachte eine  $\sim 2$ -fache Erhöhung der absoluten und relativen Eisenkonzentration in proliferierenden und differenzierenden K562-Zellen gegenüber den Zellen in eisenarmem Medium. Die totale Eisenkonzentration in differenzierenden Zellen lag um  $\sim 75\%$  höher als in proliferierenden Zellen ( $p = 0,001$ , Abb. 4.24A). Wie in Abb. 4.24B dargestellt, blieb dagegen der relative Eisengehalt in den differenzierenden Zellen nahezu konstant; der Anstieg betrug  $\sim 9\%$  gegenüber den Kontrollzellen und war nicht signifikant ( $p = 0,144$ ). Die Korrelation der Expression der Proteine, die für Eisenaufnahme, -speicherung oder -freisetzung verantwortlich sind, mit den Veränderungen der zellulären Eisenkonzentration wird in den folgenden Kapiteln beschrieben.





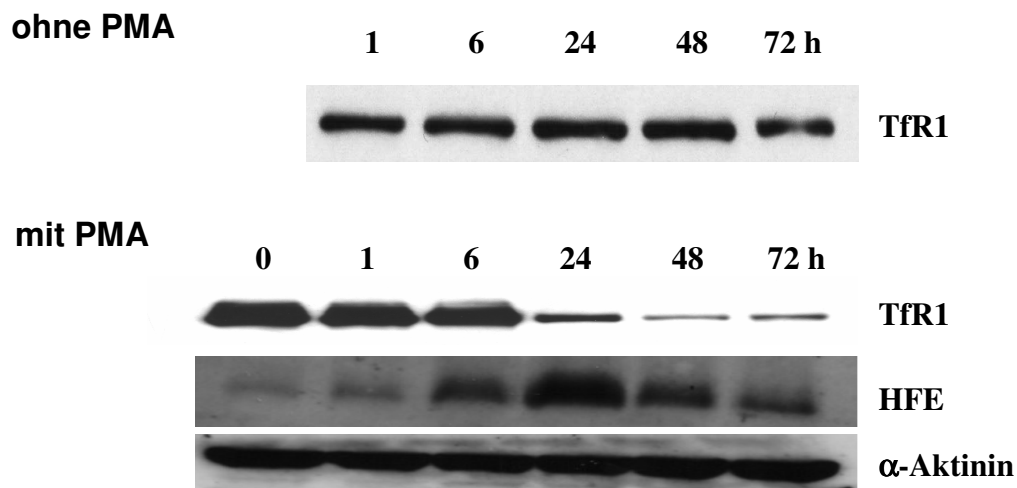
**Abb. 4.24:** Die zelluläre Eisenhomeostase nach 48 Stunden Vorbehandlung der Zellen mit 100  $\mu$ M FAC (*FAC preload*) oder nach 72 h megakaryozytärer Differenzierung mit gleichzeitiger Überladung der Zellen mit 100  $\mu$ M FAC (*FAC overload*). (A) Die absolute Eisenkonzentration (pro  $2,5 \times 10^7$  Zellen) in proliferierenden und differenzierenden K562-Zellen. (B) Der relative Eisengehalt (bezogen auf mg Protein) in proliferierenden und differenzierenden K562-Zellen. Die Eisen(II)-Bestimmung erfolgte mittels Ferrozin-Methode in Zelllysaten (Kap. 3.1.12); die Daten wurden aus Doppelwerten von vier unabhängigen Ergebnissen ermittelt; die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen der Mittelwerte (S.E.M).

#### 4.4.6.2 Eisenaufnahme

##### 4.4.6.2.1 Expression von TfR1- und HFE-Protein

Die Expressionsanalyse der Proteine TfR1 und HFE während der Behandlung von K562-Zellen mit PMA ergab eine starke Herabregulation der TfR1-Expression nach 24 Stunden der megakaryozytären Differenzierung. In proliferierenden Zellen blieb dagegen die Expression dieses Proteins 72 Stunden lang weitgehend konstant (Abb. 4.25). Die Abnahme der TfR1-

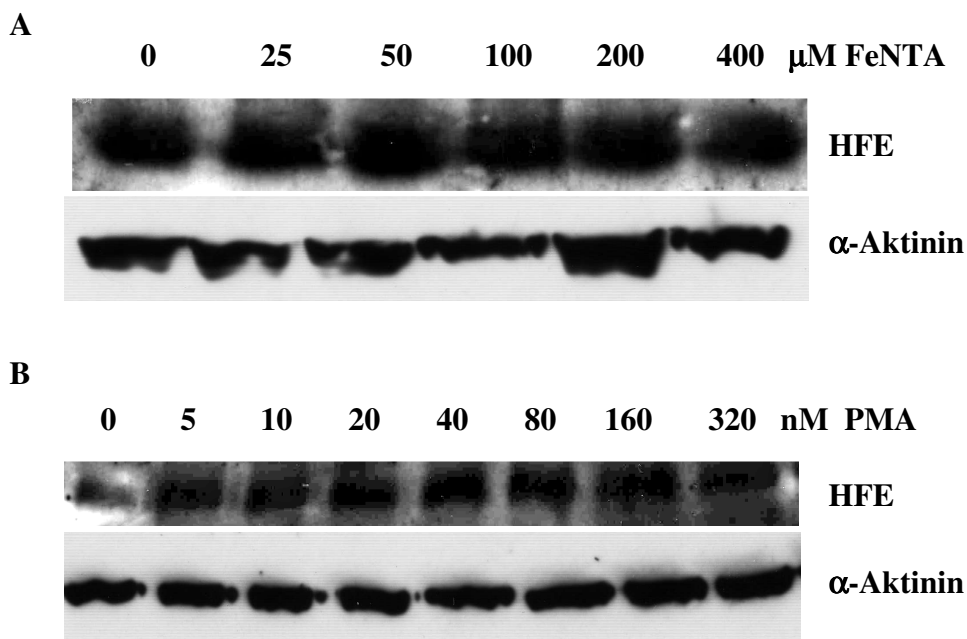
Proteinexpression war begleitet von der Expressionszunahme des HFE-Proteins, die ihren Höhepunkt nach 24 h nach Beginn der Differenzierung erreichte. Danach nahm die Expression dieses Proteins ab, wobei sie nach 72 h immer noch stärker war als am Anfang des Experiments (Abb. 4.25). Expressionskinetiken dieser Proteine sprechen für eine starke Abnahme der von Transferrin abhängigen Eisenaufnahme nach 24 Stunden Stimulation mit PMA.



**Abb. 4.25:** Tfr1-Proteinexpression während 72-stündiger Proliferation sowie Tfr1- und HFE-Proteinexpression während der 72 Stunden langen *In-vitro*-Megakaryopoese der K562-Zellen. Immunoblot mit dem Antikörper OKT9 gegen die extrazelluläre Domäne des Tfr oder mit dem Antikörper sc-18807 gegen HFE. Die Proteinexpression von  $\alpha$ -Aktinin diente als Beladungskontrolle; als Proben wurden Lysate der K562-Zellen mit 50  $\mu$ g Protein verwendet. Die Daten zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

#### 4.4.6.2.2 Regulation der HFE-Proteinexpression durch Eisen und PMA

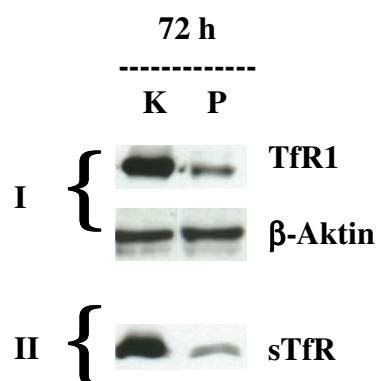
Eine der ungeklärten Fragen zur Regulation des zellulären Eisenstoffwechsels stellt die Expressionsregulation von HFE durch Eisen dar. Deshalb wurden K562-Zellen mit steigenden Konzentrationen von FeNTA (0–400  $\mu$ M) für 24 Stunden inkubiert und die HFE-Proteinexpression im Westernblot untersucht (Abb. 4.26A). Es wurden keine Expressionsveränderungen des HFE-Proteins in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration im Zellkulturmedium festgestellt, was ein Hinweis dafür ist, dass die Expressionsregulation von HFE in K562-Zellen eisenunabhängig abläuft. In differenzierenden Zellen blieb die Expressionszunahme dieses Proteins nach 24 Stunden langer Behandlung mit PMA unabhängig von der PMA-Konzentration (5–320 nM) im Zellkulturmedium (Abb. 4.26B).



**Abb. 4.26:** Expressionsregulation des HFE-Proteins durch Eisen (A) oder PMA (B); Immunoblots mit dem Antikörper sc-18807 gegen HFE. Die  $\alpha$ -Aktinin-Proteinexpression diente als Beladungskontrolle. Als Proben wurden Lysate der K562-Zellen mit 50  $\mu$ g Protein verwendet; gezeigt ist eins von zwei unabhängigen Experimenten.

#### 4.4.6.2.3 Shedding des TfR1

Nach einer 72 Stunden langen PMA-Behandlung der K562-Zellen wurde durch differenzierende K562-Zellen im Vergleich zur Kontrollzellen weniger sTfR gebildet. Die Abnahme der sTfR-Freisetzung korreliert mit der Herunterregulation der TfR1-Proteinexpression während der megakaryozytären Differenzierung (Abb. 4.27).

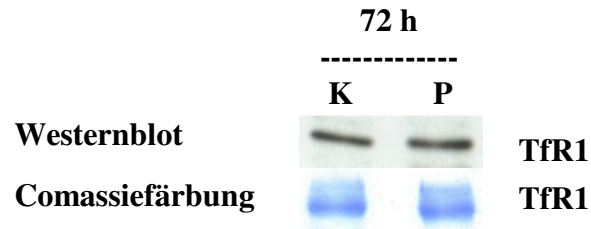


**Abb. 4.27:** TfR1-Shedding nach 72 Stunden *In-vitro*-Megakaryopoese der K562-Zellen. (I) TfR1-Proteinexpression in den Zelllysaten. Immunoblot mit dem Antikörper OKT9.  $\beta$ -Aktin-Proteinexpression diente als Beladungskontrolle. Als Proben wurden Zelllysate mit 50  $\mu$ g Protein verwendet. (II) sTfR-Nachweis in Zellkulturmedien der K562-Zellen (Kap. 3.2.5); Immunoblot mit dem Antikörper OKT9; K – Kontrollen, P – PMA-stimulierte Zellen. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

#### 4.4.6.2.4 Bildung von Exosomen

Ein anderer Weg, der zum Verlust der Transferrinrezeptoren aus der Zellmembran führt, ist die Bildung von Exosomen. Es wurden gleiche Mengen des TfR1-Proteins in den Exosomen

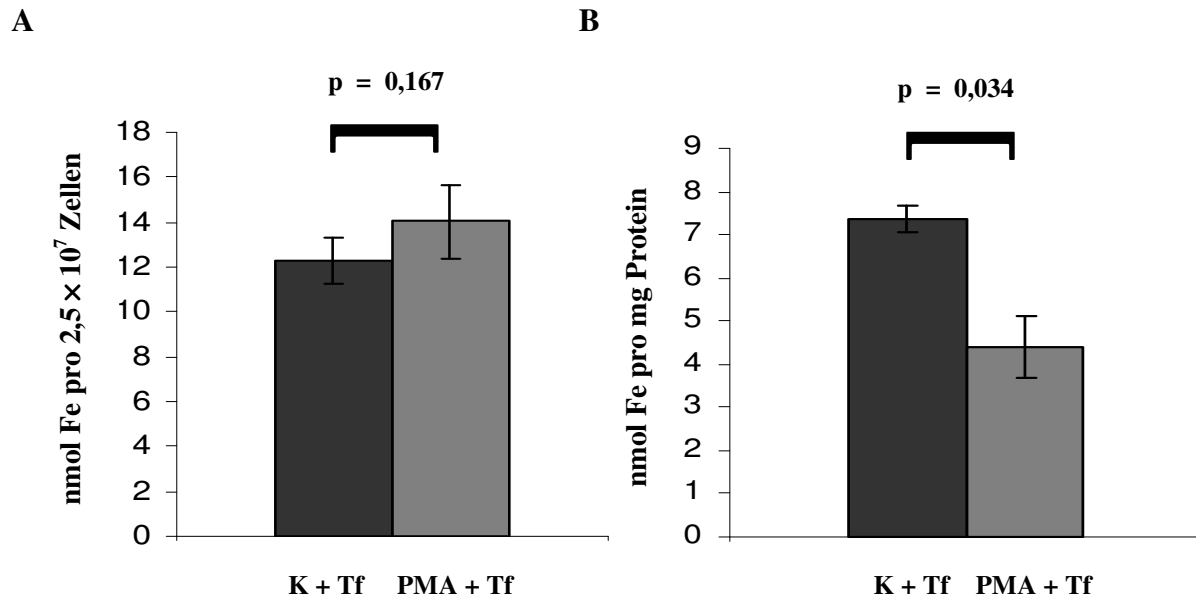
der PMA-stimulierten Zellen und der Kontrollzellen gefunden, was ein Hinweis darauf ist, dass während der megakaryozytären Differenzierung dieses Protein nicht bevorzugt in die Exosomen sortiert wird (Abb. 4.28).



**Abb. 4.28:** Exosomenbildung nach 72 Stunden der PMA-abhängigen megakaryozytären Differenzierung von K562-Zellen. Nach der Isolierung der Exosomen aus dem Medium der stimulierten K562-Zellen (PMA) und Kontrollzellen (K) und der anschließenden Proteinkonzentrationsbestimmung (Pierce) wurden die Exosomen (50 µg Protein) als Proben für eine Coomassie-Färbung der SDS-Gele oder einen Immunoblot mit dem Antikörper OKT9 verwendet.

#### 4.4.6.2.5 Transferrinabhängige Eisenaufnahme

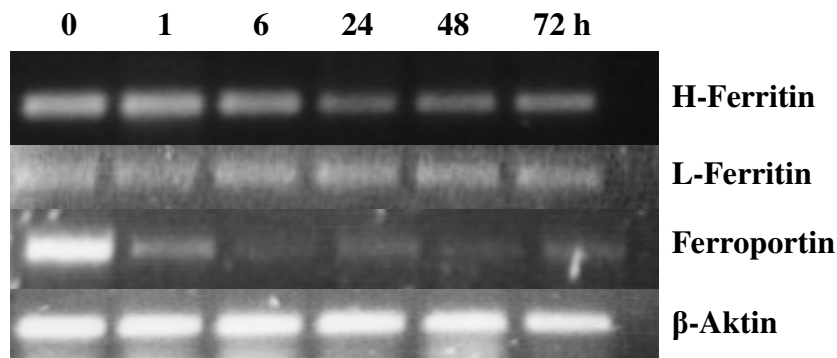
Sowohl die Expressionsabnahme des Tfr1 (und Tfr2, Abb. 4.36), als auch die modulierte Expressionszunahme von HFE, die auf Proteinebene beobachtet wurde (Abb. 4.25) implizieren eine massive Reduktion der transferrinabhängigen Eisenaufnahme während der megakaryozytären Differenzierung. Die Reduktion der Eisenaufnahme auf diesem Weg wurde in den Experimenten belegt, in denen PMA-behandelte Zellen und unbehandelte Kontrollzellen 72 Stunden lang in Anwesenheit von Ferri-Tf im Zellkulturmedium kultiviert wurden. Wie in Abb. 4.29A dargestellt, besaßen die differenzierenden Zellen unter diesen Bedingungen nur eine um ~ 14 % nicht signifikant höhere absolute Eisenkonzentration als die proliferierenden Zellen ( $p = 0,167$ ) und im Vergleich zu den PMA-behandelten Zellen, die ohne Ferri-Tf im Zellkulturmedium differenzierten (Abb. 4.23A), betrug der Anstieg der absoluten Eisenkonzentration nur ~ 11 %. Dagegen zeigten Kontrollzellen, die in Anwesenheit von Ferri-Tf proliferierten, einen um ~ 41 % signifikant höheren ( $p = 0,02$ ) absoluten, zellulären Eisengehalt im Vergleich zu K562-Zellen, die ohne Ferri-Tf wuchsen (Abb. 4.23A und 4.29A). Bei Anwesenheit von Ferri-Tf im Zellkulturmedium war der relative Eisengehalt in differenzierten Zellen gegenüber den proliferierenden Zellen um ~ 40 % signifikant vermindert ( $p = 0,034$ , Abb. 4.29B). Diese Ergebnisse belegten die Reduktion der Transferrineisenaufnahme im Prozess der *In-vitro*-Megakaryopoiese der K562-Zellen.



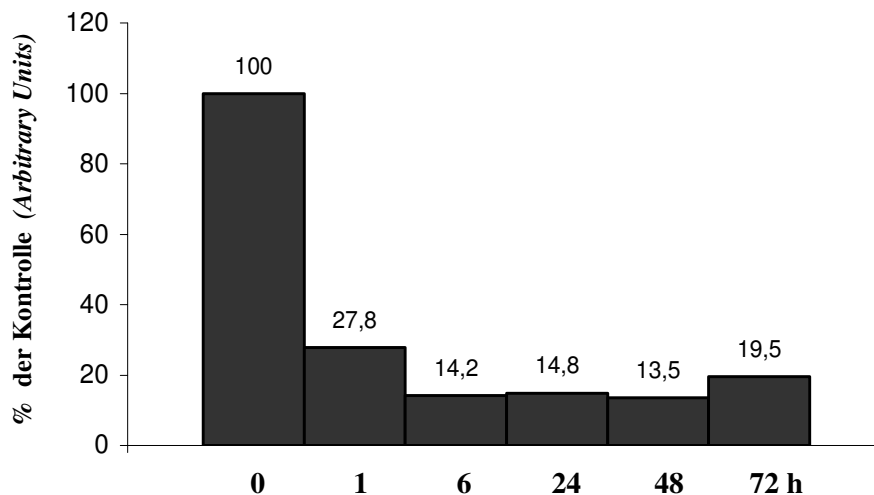
**Abb. 4.29:** Transferrinabhängige Eisenaufnahme während der megakaryozytären Differenzierung; K562-Zellen wurden mit humanem Ferri-Tf (4 mg/ml) im Kulturmedium während 72 h der Proliferation (Kontrolle + Tf) oder PMA-Behandlung (PMA + Tf) inkubiert. Die Bestimmung der Eisenkonzentration erfolgte mittels Ferrozin-Methode. Bei der Ermittlung des relativen Eisengehalts wurden die Eisen(II)-Mengen (nmol) zur Proteinmenge (mg) in den Lysaten normiert. Die Daten stammen aus Doppelwerten von vier unabhängigen Experimenten; die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen der Mittelwerte (S.E.M).

#### 4.4.6.3 Eisenspeicherung und -freisetzung

Die Expressionsanalyse der Transkripte, die für Proteine der Eisenspeicherung oder Eisenfreisetzung kodieren, ergab die Herabregulation der H-Ferritin- und Ferroportin-mRNA-Expression sowie die Zunahme der Expression der L-Ferritin-Transkripte nach 72 Stunden der megakaryozytären Differenzierung (Abb. 4.30). Bereits nach einer Stunde Stimulation mit PMA reduzierte sich die Expression der Fpn1-mRNA auf ~ 28 % des Anfangwertes (Abb. 4.31), was für eine starke Abnahme der Eisenfreisetzung während dieses Prozesses spricht. Die Expressionsabnahme der H-Ferritin-Transkripte begann dagegen erst 24 Stunden nach dem Beginn der Stimulation mit dem Phorbol ester. Im Unterschied zur Expression der Ferroportin- und H-Ferritin-mRNA wurde bei L-Ferritin eine Zunahme der Transkripte während dieses Prozesses beobachtet. Diese begann bereits sechs Stunden nach dem Beginn der PMA-Stimulation der K562-Zellen (Abb. 4.30). Die reziproke Regulation der H- und L-Ferritin-mRNA weist auf die Umbildung des Ferritinmoleküls infolge des Differenzierungsprozesses hin.



**Abb. 4.30:** Eisenspeicherung und -freisetzung während der PMA-abhängigen *In-vitro*-Megakaryopoese von K562-Zellen. Die Mengen der Transkripte von Ferritin (leichte und schwere Kette) und Ferroportin wurden mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht.  $\beta$ -Aktin-mRNA-Expression diente als Beladungskontrolle; Amplifikate wurden in einer 1 %iger Agarosegelelektrophorese analysiert; als Proben wurden 10  $\mu$ l aus 50  $\mu$ l RT-PCR-Ansatz eingesetzt. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.



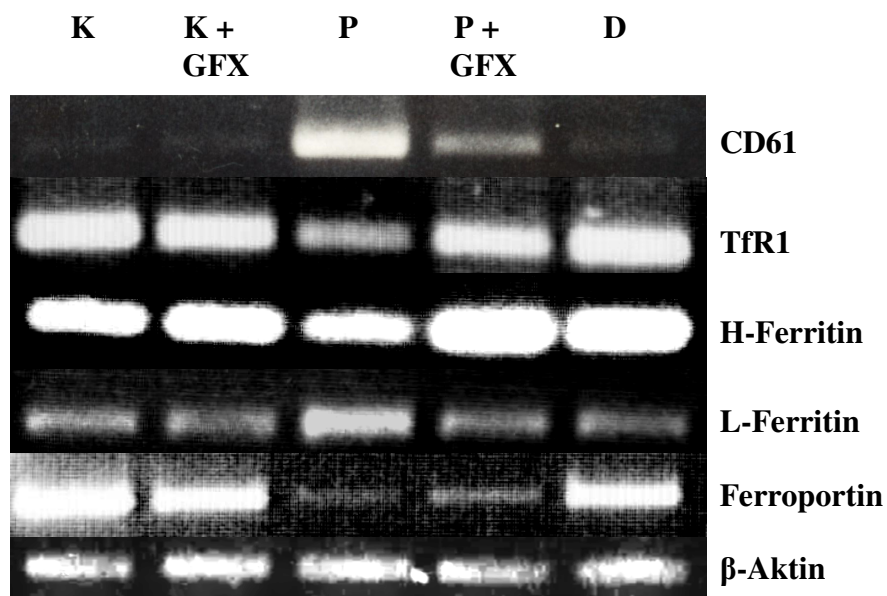
**Abb. 4.31:** Densitometrische Analyse der Ferroportin-mRNA-Expression während der 72 Stunden langen megakaryozytären Differenzierung der K562-Zellen. Die Semiquantifizierung der RT-PCR-Amplifikate von Ferroportin erfolgte mittels FujiFilm LAS-1000 System nach 1 %iger Agarosegelelektrophorese. Die dargestellten relativen Werte sind bezogen auf die Mengen der Ferroportin-Amplifikate, die der Expression der Ferroportin-Transkripte in K562-Zellen zum Anfang der PMA-Behandlung (0 h) entsprachen.

#### 4.4.6.4 Regulation des Eisenmetabolismus in differenzierenden K562-Zellen

Um zu klären, welche Expressionsveränderungen IRE-tragender Transkripte von Proteine des Eisenstoffwechsels primär durch die transkriptionale Regulation entstanden sind und welche sekundär auf die differenzierungsbedingten Veränderungen des zellulären, relativen Eisengehalts zurückzuführen sind, wurden Versuche durchgeführt, in denen K562-Zellen während der megakaryozytären Differenzierung entweder mit 1  $\mu$ M des PKC-Inhibitors GF 109203X oder 100  $\mu$ M FAC im Zellkulturmedium inkubiert wurden.

#### 4.4.6.4.1 Die Rolle der Proteinkinase C

Die Zugabe von GF 109203X zusammen mit dem Phorbol ester zur Kultur der K562-Zellen hat die PMA-abhängigen Expressionsveränderungen der mRNAs von TfR1-, H-Ferritin- und L-Ferritin vollständig unterbunden. Im Gegensatz dazu wurden die Expressionsveränderungen der CD61- und Ferroportin-Transkripte nur zum Teil aufgehoben. In proliferierenden Zellen beeinflusste GF 109203X die Expression der Zieltranskripte dagegen kaum (Abb. 4.32).

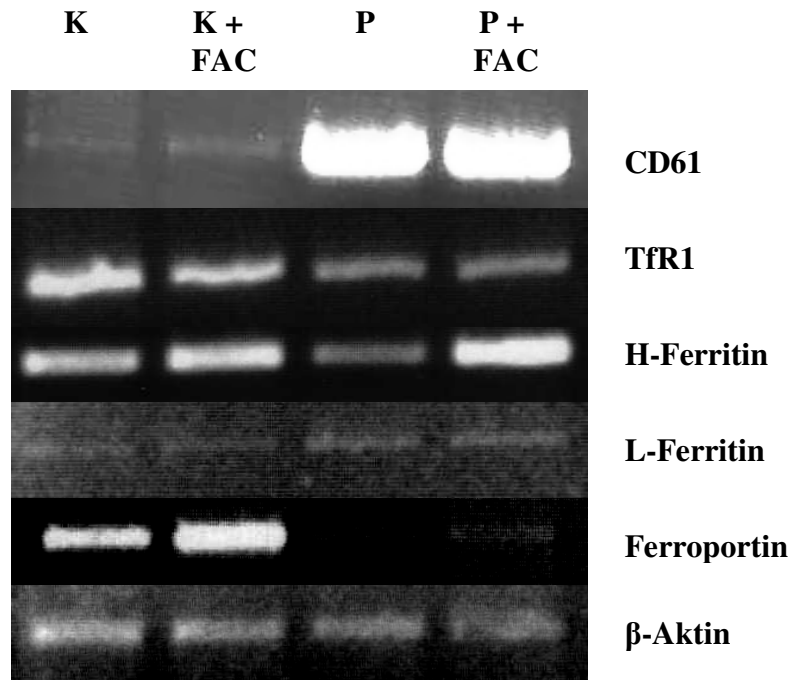


**Abb. 4.32:** Expressionsregulation von CD61-, TfR1-, H-Ferritin-, L-Ferritin- und Ferroportin-Transkripten durch PKC während der 72 Stunden langen Proliferation oder der PMA-abhängigen megakaryozytären Differenzierung (semiquantitative RT-PCR); K – Kontrollzellen (K562); K + GFX – K562-Zellen, die 72 h mit 1 µM GF 109203X behandelt wurden; P – K562-Zellen, die 72 h mit 100 nM PMA differenziert wurden; P + GFX – K562-Zellen, die 72 h sowohl mit 100 nM PMA als auch 1 µM GF 109203X behandelt wurden; D – K562-Zellen, die 72 h mit 0,7 mM DMSO (Lösungsmittel für PMA) inkubiert wurden; 1 %ige Agarosegelelektrophorese. Als Proben wurden 10 µl aus 50 µl RT-PCR-Ansatz eingesetzt. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

#### 4.4.6.4.2 Die Rolle des Eisens

Zur Klärung, inwieweit Eisen in die Regulation des Eisenmetabolismus während der megakaryozytären Differenzierung involviert ist, wurden Versuche durchgeführt, in denen K562-Zellen während der PMA-Behandlung mit FAC (100 µM) beladen wurden (Abb. 4.33). Zuvor wurde bewiesen, dass diese Bedingungen die Überprüfung der eisenabhängigen, posttranskriptionalen Regulierbarkeit der Transkripte von TfR1, Ferritin (H) und Ferroportin ermöglichen (Abb. 4.12B). Diese Versuche ergaben, dass nur H-Ferritin-Transkripte durch

Eisen reguliert werden. Die Expressionsveränderungen der TfR1-, L-Ferritin- und Ferroportin-mRNA sind also auf die eisenunabhängige, transkriptionale Regulation infolge der Aktivierung der PKC-abhängigen Signalwege zurückzuführen (Abb. 4.32). Die Expression der CD61-Transkripte blieb eisenunabhängig.



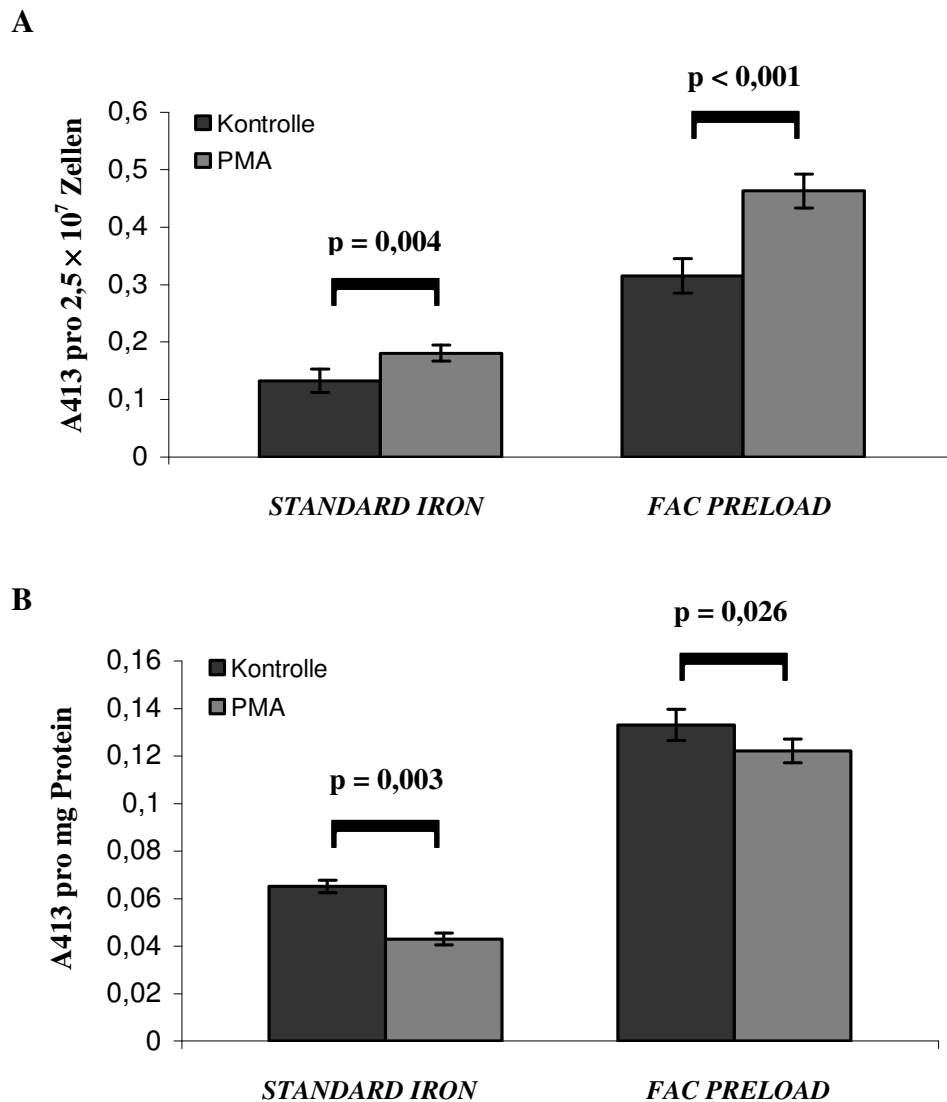
**Abb. 4.33:** Expressionsregulation von CD61-, TfR-, H-Ferritin-, L-Ferritin- und Ferroportin-mRNA durch Eisen während der megakaryozytären Differenzierung (semiquantitative RT-PCR); K – Kontrollzellen (K562); K + F AC – K562-Zellen, die 48 h mit 100  $\mu$ M FAC behandelt wurden; P – K562-Zellen, die 48 h mit 100 nM PMA differenziert wurden; P + FAC – K562-Zellen, die 48h sowohl mit 100 nM PMA, als auch mit 100  $\mu$ M FAC behandelt wurden; 1 %ige Agarosegelelektrophorese. Als Proben wurden 10  $\mu$ l aus 50  $\mu$ l RT-PCR-Ansatz eingesetzt. Die Daten wurden aus zwei unabhängigen Experimenten ermittelt.

#### 4.4.6.5 Regulation der Hämoglobinsynthese

Die letzte Frage, die während der Charakterisierung des Eisenmetabolismus in differenzierenden K562-Zellen beantwortet wurde, war die Rolle des Eisens in der Regulation der Hämoglobinsynthese. Deshalb wurde der totale und relative Hämoglobingehalt der K562-Zellen nach 72 Stunden PMA-Behandlung oder Proliferation spektrophotometrisch bestimmt und miteinander verglichen. Ähnlich wie bei dem Eisengehalt in differenzierenden Zellen, wurde eine hochsignifikante, ~ 36 %ige Zunahme des absoluten Hämoglobingehalts in differenzierenden Zellen beobachtet ( $p = 0,004$ , Abb. 4.34A). Gleichzeitig nahm der relative Hämoglobingehalt hochsignifikant um ~ 34 % ab ( $p = 0,003$ , Abb. 4.34B). In differenzierenden



Zellen, die 48 Stunden lang mit 100  $\mu$ M FAC vorbehandelt wurden, nahm die absolute Hämoglobinkonzentration hochsignifikant um  $\sim 46\%$  zu ( $p < 0,001$ ), während das Hb: Protein-Verhältnis  $\sim 92\%$  des Hämoglobingehaltes in den proliferierenden Kontrollzellen erreichte ( $p = 0,026$ ).

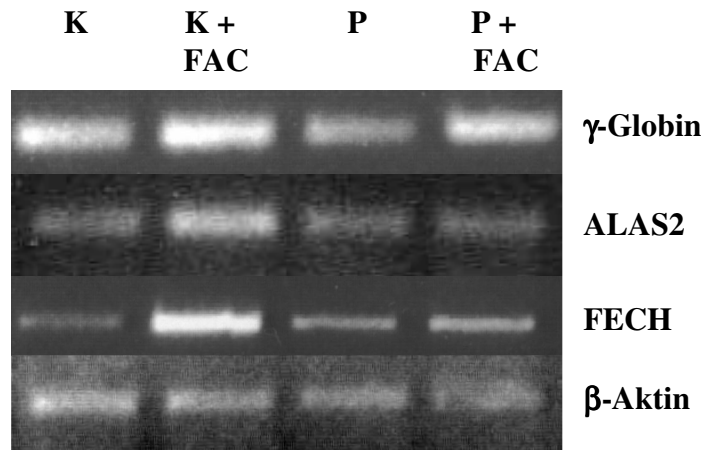


**Abb. 4.34:** Regulation der Hb-Synthese während der megakaryozytären Differenzierung. Der absolute (A) und relative (B) Hämoglobingehalt nach 72 h der PMA-Behandlung der K562-Zellen. Die Messung der Absorption bei 413 nm (A413) in Lysaten der K562-Zellen erfolgte entweder direkt nach 72 Stunden der Differenzierung oder Proliferation (*standard iron*) oder nach einer vorangegangenen 48-stündigen Überladung der K562-Zellen mit 100  $\mu$ M FAC mit anschließender 72-stündiger PMA-Stimulation (*FAC preload*). Bei der Ermittlung des „Hb: Protein-Verhältnisses“ wurde der A413 Wert zum Proteingehalt in den Lysaten normiert. Die Daten wurden aus Doppelwerten von vier unabhängigen Ergebnissen ermittelt; die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen der Mittelwerte (S.E.M).

Diese Experimente haben klar gezeigt, dass das akkumulierte Eisen während der megakaryozytären Differenzierung vor allem für die Hb-Synthese verbraucht wurde. Eine Vorbehandlung der K562-Zellen mit FAC resultierte nach 72 Stunden PMA-Stimulation in einer noch stärkeren Hb-Synthese im Vergleich zu den K562-Zellen, die unter niedriger Eisenkonzentration im Zellkulturmedium kultiviert wurden. Der Einbau von Eisen ins Hämoglobinmolekül impliziert weiter, dass Eisen die Hb-Synthese während der *In-vitro*-Megakaryopoese der K562-Zellen reguliert. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde der Einfluss der Erhöhung der Eisenverfügbarkeit (Beladung der K562-Zellen mit 100  $\mu$ M FAC) auf die Expression von  $\gamma$ -Globin-, ALAS2- und FECH-mRNA während 48 Stunden der PMA-Stimulation oder Proliferation geprüft. Unter diesen Bedingungen wurde die Expressionszunahme der  $\gamma$ -Globin-mRNA in proliferierenden K562-Zellen festgestellt. Während der megakaryozytären Differenzierung konnte Eisen die  $\gamma$ -Globin-mRNA-Expressionsabnahme vollständig rückgängig machen, so dass das Ausmaß der Expression dieses Transkripts in FAC-beladenen, proliferierenden und differenzierenden Zellen vergleichbar war (Abb. 4.35). Das beweist, dass Eisen nicht nur die Expression von  $\gamma$ -Globin-Transkripten während der Proliferation, sondern auch während der megakaryozytären Differenzierung reguliert. Diese Ergebnisse zeigten also zum ersten Mal die eisenabhängige Regulierbarkeit der  $\gamma$ -Globin-Transkripte während der Proliferation oder *In-vitro*-Megakaryopoese der K562-Zellen.

Diese regulatorische Wirkung kann Eisen entweder direkt (freie Fe(II)-Ionen) oder indirekt (als Fe(II)-Protoporphyrin-IX-Molekül) ausüben. Als integraler Bestandteil des Hämoleküls kann Eisen die regulatorische Wirkung auf die Globingentranskription oder die Stabilität der Globin-mRNAs nur dann ausüben, wenn gleichzeitig die Hämsynthese in differenzierenden K562-Zellen, ähnlich wie in den proliferierenden Zellen, durch Eisen positiv beeinflusst wird. Unsere Untersuchungen zur Expression von ALAS2- und Ferrochelatase-mRNA haben diese Frage bejaht. Die ALAS2-mRNA-Expression stieg erwartungsgemäß in proliferierenden K562-Zellen nach der Behandlung mit FAC an, während in differenzierenden Zellen kein Anstieg nach der Kultivierung in Anwesenheit von FAC stattfand. Außerdem blieb die Expression dieses Transkripts während der Proliferation und der megakaryozytären Differenzierung auf dem gleichen Niveau. Nach der 48 Stunden langen Behandlung der K562-Zellen mit PMA besaßen differenzierende Zellen im Vergleich zu den Zellen während der Proliferation erhöhte Mengen der FECH-Transkripte. Im Unterschied zur ALAS2-mRNA ließ sich durch die FAC-Überladung die FECH-mRNA-Expression sowohl in proliferierenden als auch in den differenzierenden Zellen steigern, obwohl diese Expressionszunahme während

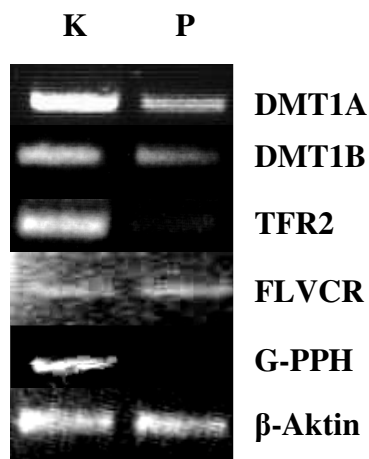
der Differenzierung nicht so stark ausgeprägt war wie in Kontrollzellen (Abb. 4.35). Diese Ergebnisse zeigen also, dass während der megakaryozytären Differenzierung Eisen durch die Heraufregulation der Ferrochelatase-mRNA-Expression einen positiven Einfluss auf die Hämsynthese besitzt und als Bestandteil des Fe(II)-Protoporphyrin-IX-Moleküls ebenfalls eine regulatorische Wirkung ausüben kann.



**Abb. 4.35:** Expressionsregulation von  $\gamma$ -Globin-, ALAS2- und FECH-mRNA durch Eisen während der Proliferation und megakaryozytären Differenzierung der K562-Zellen (semiquantitative RT-PCR); K – Kontrollzellen (K562); K + FAC – K562-Zellen, die 48 h mit 100  $\mu$ M FAC behandelt wurden; P – K562-Zellen, die 48 h mit 100 nM PMA differenziert wurden; P + FAC – K562-Zellen, die 48 h sowohl mit 100 nM PMA, als auch mit 100  $\mu$ M FAC behandelt wurden.  $\beta$ -Aktin-mRNA-Expression diente als Beladungskontrolle; 1 %ige Agarosegelelektrophorese. Als Proben wurden 10  $\mu$ l aus 50  $\mu$ l RT-PCR-Ansatz eingesetzt. Die Daten wurden aus zwei unabhängigen Experimenten ermittelt.

#### 4.4.6.6 Expression weiterer Proteine des Eisenstoffwechsels

Eine Expressionsanalyse weiterer Proteine, die im Eisenstoffwechsel involviert sind, wie TfR2, DMT1, FLVCR oder Hcpidin, wurde auf RNA-Ebene durchgeführt und ergab eine drastische Abnahme der Expression aller Transkripte mit der Ausnahme der FLVCR-mRNA, die nach 72 Stunden der megakaryozytären Differenzierung konstant blieb (Abb. 4.36).



**Abb. 4.36:** Expression von DMT1 (Isoformen A und B)-, Tfr2-, FLVCR- und Präprohepcidin-Transkripten (G-PPH, „Hepcidin-1“) nach 72 Stunden Differenzierung mit PMA (P) oder Proliferation (K); semiquantitative RT-PCR. Als Beladungskontrolle diente die  $\beta$ -Aktin-mRNA-Expression. Die Daten wurden aus zwei unabhängigen Experimenten ermittelt.

Die dargestellten Ergebnisse lassen folgende Schlussfolgerungen zu: dank der Etablierung zahlreicher zellbiologischer, proteinchemischer und molekularbiologischer Methoden wurden Experimente zum Einfluss der stabilen Überexpression von Präprohepcidin-cDNA in K562-Zellen auf den zellulären Eisenmetabolismus durchgeführt. Während der PMA-abhängigen megakaryozytären Differenzierung wurde nicht nur der zelluläre Eisengehalt, sondern auch die transferrinabhängige und -unabhängige Eisenaufnahme sowie die Eisenfreisetzung charakterisiert. Weiterhin wurden während dieses Prozesses der Hämoglobingehalt und die Acetylcholinesteraseaktivität bestimmt sowie die Expression und die Eisen-regulierbarkeit zahlreicher Proteine des Eisenstoffwechsels auf Protein- oder RNA-Ebene untersucht.