

5 Diskussion

5.1 Eisenmetabolismus in proliferierenden K562-Zellen

5.1.1 Regulation der Expression von TfR1-, H- und L-Ferritin- sowie Ferroportin-Transkripten durch Eisen

Im Unterschied zur mRNA-Expression von TfR1, H-Ferritin und Ferroportin, die nach der Kultivierung der K562-Zellen mit FAC im Zellkulturmedium im Sinne des posttranskriptionalen Feedback-Mechanismus durch Eisen reguliert wurden, blieb die L-Ferritin-mRNA-Expression unverändert. Auch eine 120-stündige Beladung der K562-Zellen mit 4 mg/ml Ferritransferrin verursachte keine Expressionsveränderungen von L-Ferritin-Transkripten. Dies impliziert, dass in proliferierenden K562-Zellen in der Regulation der Eisenspeicherkapazität im Ferritinmolekül vor allem schwere Ferritinketten involviert sind, deren mRNA-Expression unter den Bedingungen der erhöhten Eisenverfügbarkeit steigt (Abb. 4.12). Dies steht im Einklang mit bisherigen Erkenntnissen, die auf die Rolle dieser Ketten im schnellen Einbau des freien cytosolischen Eisens in das Ferritinmolekül hinweisen (Picard *et al.*, 1996). Eine stärkere Zunahme der H-Ferritin-mRNA-Expression in den mit FAC beladenen K562-Zellen als in den mit Ferritransferrin kultivierten Zellen spricht für eine höhere Konzentration des freien cytosolischen Eisens (LIP) in K562-Zellen, die in der Anwesenheit von FAC im Zellkulturmedium proliferierten. Obwohl sowohl nach FAC- als auch nach Ferri-Tf-Beladung eine Abnahme der TfR1-mRNA-Expression beobachtet wurde, ermöglichte die Eisenaufnahme via TfR1 eine bessere Kontrolle der intrazellulären Eisenkonzentration als die transferrinunabhängige Aufnahme von Eisen, was auf die eisenabhängige Regulation der TfR1-mRNA-Stabilität durch das IRP / IRE-System zurückzuführen ist.

Frühere Untersuchungen von Cianetti *et al.* zur Regulation der Ferroportin-Transkripte durch Eisen ergaben, dass nach der 24 Stunden langen Beladung der K562-Zellen mit 100 μ M FAC oder 200 μ M FeNTA keine Expressionsveränderungen des Ferroportins auf RNA- oder Proteinebene stattfinden. Diese „Abweichung“ in der Eisenregulierbarkeit der Ferroportin-mRNA-Expression wurde durch bisher nicht bekannte Regulationsmechanismen der Ex-

pression der IRE-tragenden Transkripte dieses Eisenexporters in erythroiden Zellen erklärt (Cianetti *et al.*, 2005). Diese Autoren haben aber eindeutig in Reporterassays die Regulierbarkeit der IREs in Ferroportin-mRNA durch Eisen nachgewiesen. In Übereinstimmung damit führte die Verlängerung der Inkubationszeit der proliferierenden K562-Zellen im Zellkultur-medium mit 100 μ M FAC auf 48 Stunden zum eindeutigen Nachweis der Eisenregulation der Ferroportin-mRNA-Expression mittels RT-PCR (Abb. 4.12 und 4.33). Die Beobachtung einer fehlenden Ferroportin-mRNA-Expressionszunahme nach Ferri-Tf-Überladung scheint dafür zu sprechen, dass die eisenabhängige, posttranskriptionale Regulation der Ferroportin-mRNA-Expression erst durch hohe intrazelluläre Eisenkonzentrationen hervorgerufen wird, wie das nach FAC-Überladung der Fall ist. Die Vitalität der mit FAC behandelten K562-Zellen war gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen nicht herabgesetzt (Abb. 4.17). Diese experimentellen Bedingungen der FAC-Überladung der K562-Zellen ermöglichten also den Nachweis der Regulation der mRNAs von TfR1, Ferroportin und H-Ferritin durch den posttranskriptionalen Feedback-Mechanismus während der Proliferation der K562-Zellen. Sie wurden deshalb zur Beurteilung der Funktionalität des IRP / IRE-Systems in der Regulation des Eisenmetabolismus während der megakaryozytären Differenzierung dieser Zellen verwendet.

Auf welchem Weg die Internalisierung von FAC stattfindet, wurde in bisherigen Untersuchungen nicht endgültig geklärt. Neben der Aufnahme durch Membranproteine wie DMT1, β 3-Integrin (CD61), Zip14 oder L-Typ-Calciumkanäle (Conrad *et al.*, 2000, Zhang *et al.*, 2006, Liuzzi *et al.*, 2006, Donovan *et al.*, 2006, *review*) ist auch ein direkter Transport über die Plasmamembran postuliert (Cairo und Pietroangelo 1994, Testa *et al.*, 1991, Chan *et al.*, 1994, Schranzhofer *et al.*, 2006). Eine eisenabhängige Feedback-Regulation der Expression der Proteine, die bei der Aufnahme von Eisen im Integrin β 3-Mobilferrin-Weg beteiligt sind, wurde bisher weder auf der transkriptionalen noch auf der posttranskriptionalen Ebene beschrieben. Die Eisenabhängigkeit der Integrin β 3 (CD61)-mRNA-Expression wurde auch in dieser Arbeit verneint (Abb. 4.33). Ein Nachweis der direkten Regulierbarkeit der IREs in Transkripten des DMT1-Transporters durch IRPs fehlt ebenfalls bis heute. Die Regulation der Expression von DMT1-mRNA und -Protein in Dünndarm durch die Eisenkonzentrationsveränderungen im Blut (Cannon-Hergaux *et al.*, 1999) erlaubt keine eindeutige Aussage über die Expressionsregulation der DMT1-mRNA durch die intrazelluläre Eisenkonzentration in Zellen des Dünndarms. Die Tatsache, dass nicht in Kryptzellen, sondern in Villuszellen, in denen die Aufnahme des Eisens aus der Nahrung stattfindet und deshalb hohe intrazelluläre

Eisenkonzentrationen herrschen müssen, auch die höchste Expression des DMT1-Proteins nachgewiesen wurde (Canonne-Hergaux *et al.*, 1999, Rolfs *et al.*, 2002) spricht eher gegen die DMT1-mRNA-Expressionsregulation durch den eisenabhängigen Feedback-Mechanismus. In dieser Arbeit wurde eine direkte Beurteilung der Funktionalität der IREs in IRE⁺-Transkripten von DMT1 nicht möglich, weil in den Experimenten nach der Expression der Exon 1A / 1B-Isoformen und nicht nach IRE⁺ / IRE⁻-Spleißvarianten in K562-Zellen unterschieden wurde (Abb. 4.11). Die Expression der DMT1A-Isoform in nichtpolarisierten K562-Zellen ist jedoch ein Hinweis, dass die Eisenaufnahme durch diesen Transporter einen alternativen Weg zur Aufnahme von Tf-Eisen in erythroiden Zellen darstellt.

5.1.2 Die Rolle von Hepcidin in der Regulation des Eisenmetabolismus in proliferierenden K562-Zellen

Im bisherigen Model zur Rolle von Hepcidin in der Regulation des systemischen Eisenstoffwechsels wurde nur ein einziger Synthesort dieses kleinen, kationischen Peptids in Betracht gezogen – die Leber (Abb. 1.5). Die Abbildung 4.11 zeigt jedoch, dass Präprohepcidin-mRNA nicht nur in der von Hepatozyten stammenden Zelllinie HepG2-, sondern auch in der K562-Zelllinie exprimiert wird. In anderen Zelllinien wie THP1 oder U937, die sich von hämatopoietischen Zellen mit den monozytär-makrophagischen Eigenschaften ableiten, wurde dagegen keine Präprohepcidin-mRNA-Expression in RT-PCR nachgewiesen. Die Aktivität des LEAP-1-Gens und die Expression der Transkripte des Peptidvorläufers dieses Proteins der akuten Phase mit der antimikrobiellen Aktivität (Krause *et al.*, 2000, Park *et al.*, 2001a) in der erythroiden Zelllinie K562 stehen deshalb eher nicht in Zusammenhang mit monozytär-makrophagischen Eigenschaften, sondern mit ausgeprägten erythroiden Eigenschaften dieser Zellen. Im Einklang damit wird die Reduktion der erythroiden Eigenschaften während der PMA-induzierten megakaryozytären Differenzierung der K562-Zellen durch eine drastische Expressionsabnahme der Präprohepcidin-Transkripte begleitet (Abb. 4.36). Physiologisch ist der Eisenmetabolismus der Zellen des Erythrons sowohl der zellulären als auch der systemischen Regulation unterworfen, was die Hepcidinvorläufer-mRNA-Expression in K562-Zellen erklären könnte. Während die Expression von Hepcidin in der Leber und dessen Freisetzung ins Blut durch Eisen, bakterielle Lipopolysaccharide oder Il-6 stimuliert wird (Pigeon *et al.*, 2001, Nemeth *et al.*, 2003), es wurde keine Induktion der Präprohepcidin-mRNA-Expression durch FAC in K562-Zellen beobachtet (Abb. 4.13). Dieses Ergebnis impliziert, dass die Synthese von Hepcidin in erythroiden Zellen, im Unterschied zur

deren Synthese in der Leber, nicht durch Eisenkonzentrationsveränderungen im Blut reguliert wird und deshalb auch keine Bedeutung für die Regulation des systemischen Eisenstoffwechsels besitzt. Aus diesem Grund wurde nach der physiologischen Rolle des Heparidins in der Regulation des zellulären Eisenstoffwechsels in erythroiden Zellen gesucht. Die in diesem Zusammenhang gestellte Frage, inwieweit die Überexpression des Präproheparidins in K562-Zellen den zellulären Eisenmetabolismus dieser Zellen beeinflusst, wurde in den im Kap. 4.3.3.1.3 vorgestellten Experimenten geklärt. Die Überexpression von Präproheparidin-cDNA in K562-Zellen hatte keinen Einfluss auf die Expression der TfR-, H-Ferritin- und L-Ferritin-sowie Ferroportin-Transkripte in diesen Zellen (Abb. 4.16), was ein Hinweis dafür ist, dass Heparidin auch keinen Einfluss auf den Eisenmetabolismus in jenen Zellen hat, in denen es selbst synthetisiert wird. Inwieweit diese Ergebnisse in Übereinstimmung mit den Untersuchungen stehen, die belegt haben, dass unter Bedingungen niedriger Eisenkonzentrationen im extrazellulären Raum hohe Heparidinkonzentrationen nicht in der Lage waren, der Eisenarmut in erythroiden Zellen entgegenzuwirken (Nicolas *et al.*, 2002a), muss noch geklärt werden. Die Überexpression von Präproheparidin hatte jedoch die Expressionsreduktion des endogenen, durch genomische DNA-synthetisierten Heparidins zu Folge (Abb. 4.16). Diese Tatsachen implizieren also eine besondere Regulation des Heparidins in erythroiden Zellen, in denen dessen Expression unter dem Einfluss des selbst synthetisierten oder systemischen, durch Hepatozyten synthetisierten Heparidins steht. In künftigen Untersuchungen muss die Synthese von Heparidin in K562-Zellen auch auf Protein-Ebene bestätigt werden.

5.2 Megakaryozytäre Differenzierung der K562-Zellen

5.2.1 Differenzierungsprozess und dessen Marker

Anhand von Proliferationsstudien konnte festgestellt werden, dass die *In-vitro*-Megakaryopoese der K562-Zellen in der Zeit zwischen 6 und 24 Stunden nach der Zugabe von PMA begonnen hat (Abb. 4.19A). Die eingesetzte Konzentration des PKC-Inhibitors GF 109203X (1 μ M), die als gängige Konzentration zur Inhibition der megakaryozytären Differenzierung in früheren Studien verwendet wurde (Jacquel *et al.*, 2006, Liu *et al.*, 2004a), ermöglichte eine starke und selektive Inhibition von PKC. GF 109203X hat einen vollständigen Block in der Ausprägung der morphologischen Eigenschaften der Megakaryopoese verursacht (Abb. 4.20C), was

impliziert, dass diese nur durch die Aktivierung der PKC-abhängigen Signalwege hervorgerufen sind. Im Unterschied dazu hat dieser PKC-Inhibitor den Wachstumsstopp der differenzierenden K562-Zellen und die differenzierungsbedingte CD61-mRNA-Expressionszunahme nur zum Teil aufgehoben (Abb. 4.32). Das ist ein Hinweis dafür, dass an der Inhibition der Proliferation und der Zunahme der Expression des megakaryozytären Markers CD61 auch PKC-unabhängige Signalübertragungswege beteiligt sind.

Alle Merkmale der megakaryozytären Differenzierung sind dagegen allein auf die PMA Wirkung zurückzuführen. DMSO, auch in einer über 10-fach höheren Konzentration als jene, die während der Stimulation der K562-Zellen mit 100 nM PMA verwendet wurde, war nicht in der Lage einen Wachstumsstopp in K562-Zellen zu initiieren (Abb. 4.19C). Das beweist, dass DMSO keinen Einfluss auf den Differenzierungsstatus der K562-Zellen besaß und dass der Differenzierungsprozess ausschließlich durch die PMA-Wirkung verursacht wurde. In früheren Untersuchungen zum Einfluss der PMA-Konzentrationen auf das Wachstum der K562-Zellen wurde die Abhängigkeit der Proliferationsinhibition von den PMA-Konzentrationen im Bereich von 0,01 nM bis 100 nM nachgewiesen (Belhacene *et al.*, 1998). In diesen Studien wurde die halbmaximale Inhibition des Wachstums der K562-Zellen nach acht Tagen Inkubation mit PMA im Zellkulturmedium bei einer PMA-Konzentration von 0,3–1 nM und eine maximale bei 10 nM festgestellt. Die in Abb. 4.19B dargestellten Ergebnisse belegen, dass nach drei Tagen PMA-Behandlung bereits eine Konzentration von 5 nM ausreichte, um das Wachstum der K562-Zellen vollständig zu inhibieren. Höhere PMA-Konzentrationen im Zellkulturmedium führten also zur keiner Aktivierung der Apoptose; die Zellzahl entsprach nach 72 Stunden der Stimulation mit PMA der Zahl der Zellen zum Beginn des Experimentes ($5 \times 10^5/\text{ml}$). Im Einklang damit hat der Nachweis der PARP-Spaltungsprodukte im Westernblot keine Aktivierung der Apoptose während der 72 Stunden langen megakaryozytären Differenzierung mit 100 nM PMA belegt (Abb. 4.18). Auch im FDA-Assay wurde keine Abnahme der Vitalität der differenzierenden Zellen im Vergleich zu K562-Zellen nach 72 Stunden der Proliferation festgestellt. Im Gegenteil, PMA-behandelte Zellen wiesen sogar signifikante Aktivitätserhöhung der cytosolischen Esterasen auf, was auf die Vergrößerung des cytoplasmatischen Kompartments zurückgeführt werden könnte (Abb. 4.17).

Wenn man K562-Zellen anhand solcher Merkmale wie Zellmorphologie, Hämoglobinkonzentration, Expression von γ -Globin oder CD61 analysiert, wird deutlich, dass sie einen ausgeprägten erythroiden Phänotyp aufweisen (Kap. 4.2.1 und 4.2.2). Ein Vergleich der

Expression der erythroiden und megakaryozytären Marker zeigte nach 72-stündiger PMA-Behandlung, dass auf RNA-Ebene die Expressionsabnahme von γ -Globin deutlich später eingetreten ist und viel schwächer als die Expressionszunahme von CD61-mRNA ausgeprägt war (Abb. 4.21A, C, D). Das impliziert, dass das Ausmaß der Abnahme der erythroiden Eigenschaften der Zunahme der megakaryozytären Eigenschaften während der Megakaryopoese folgt und dieser unterlegen ist.

Eine starke und signifikante Zunahme der Aktivität der Acetylcholinesterase während der *In-vitro*-Megakaryopoese der K562-Zellen (Abb. 4.22) spricht dafür, dass die AChE-Aktivität nicht nur ein Marker der megakaryozytären Differenzierung der hämatopoietischen Zellen der Maus (Ishida *et al.*, 1993, Ishibashi *et al.*, 1990, Matsumura-Takeda *et al.*, 2007), sondern auch der humanen Zellen ist. Die megakaryozytäre Differenzierung von MEL-Zellen (*Friend murine erythroleukemia cells*) mit PMA führte zur stärkeren AChE-Aktivitätszunahme in Zellen, die mit niedrigen FCS Konzentrationen inkubiert waren. Während der erythroiden Differenzierung mit HMBA korrelierte die Steigerung der AChE-Aktivität ebenfalls mit den abnehmenden FCS-Konzentrationen im Zellkulturmedium und wurde immer durch die Zunahme des Hämoglobingehaltes in diesen Zellen begleitet. Diese Tatsache impliziert, dass während der *In-vitro*-Erythropoese mit HMBA unter der niedrigen FCS-Konzentration im Zellkulturmedium ein Programm zur Differenzierung in Richtung Megakaryopoese induziert wurde (Paoletti *et al.*, 1995). Andere Autoren fanden die Verstärkung der Acetylcholinesteraseaktivität auch während der erythroiden Differenzierung der K562-Zellen (Garrrt *et al.*, 1984, Bartha *et al.*, 1987). Es ist anzumerken, dass auch hier die AChE-Aktivitätszunahme die Steigerung der Hämoglobinsynthese begleitet. Eine verstärkte Hämoglobinsynthese wurde auch während der 72 Stunden dauernden megakaryozytären Differenzierung beobachtet (Kap. 5.2.2.5). Deshalb sollte die AChE-Aktivität als ein Vorgang betrachtet werden, der eher mit der Steigerung der Hämoglobinsynthese, als mit dem Prozess der erythroiden oder megakaryozytären Differenzierung assoziiert ist.

5.2.2 Eisenmetabolismus

5.2.2.1 Die zelluläre Eisenkonzentration

Eine 72-stündige Differenzierung der K562-Zellen mit PMA war durch die Akkumulation des intrazellulären Eisens begleitet (Abb. 4.23A). Die Analyse der Expressionskinetik von Ferroportin auf RNA-Ebene ergab eine viel schnellere Expressionsabnahme der Ferroportin-Transkripte (nach einer Stunde PMA-Behandlung, Abb. 4.30) als die TfR1-mRNA-Ex-

pressionsreduktion, die 15 h nach dem Anfang der Stimulation der K562-Zellen mit PMA beobachtet wird (Schonhorn *et al.*, 1995). Die Abnahme der TfR1-Proteinexpression wurde in diesem Prozess nach 24 h beobachtet (Abb. 4.25). Diese Ergebnisse belegen, dass die Eisensfreisetzung während der megakaryozytären Differenzierung viel schneller als die Aufnahme reduziert wird. Die Tatsache, dass K562-Zellen während der PMA-Behandlung in einem eisenarmen Zellkulturmedium (ohne FCS) kultiviert wurden, spricht ebenfalls dafür, dass der Effekt der Eisenakkumulation in erster Linie auf die Reduktion der Eisensfreisetzung zurückzuführen ist. Diese These wurde in den Experimenten zur Erhöhung der Eisenverfügbarkeit während der Differenzierung oder Proliferation der K562-Zellen bestätigt. Eine 2-tägige Kultivierung der K562-Zellen in Anwesenheit von 100 μ M FAC mit anschließender 72-stündiger megakaryozytärer Differenzierung führte zur Erhöhung des Verhältnisses des totalen zellulären Eisengehalts in differenzierenden und proliferierenden Zellen, was darauf hinweist, dass in differenzierenden Zellen eine Blockierung der Eisensfreisetzung zur Akkumulation des zellulären Eisens führte (Abb. 4.23A und 4.24A, Kap. 4.4.6.1). Da nach 72 Stunden Stimulation der K562-Zellen mit PMA die mRNA-Expression des Hämexporters FLVCR praktisch konstant blieb (Abb. 4.36), scheint diese Blockierung der Eisensfreisetzung auf die Herunterregulation der Ferroportin-Expression zurückzuführen sein, was durch die Ergebnisse auf der RNA-Ebene untermauert wird (Abb. 4.30 und 4.31). In früheren Untersuchungen von Galli *et al.* wurde nachgewiesen, dass die Reduktion der Ferroportin-mRNA-Expression infolge von RNA-Interferenz zur Steigerung des intrazellulären Eisengehalts führt (Galli *et al.*, 2004).

Die differenzierungsbedingte Vergrößerung der K562-Zellen (Abb. 4.20) setzte nicht nur qualitative Veränderungen der Genaktivität voraus, sondern auch eine quantitative Zunahme der Gesamtrate der Transkription und der Proteinsynthese während der Megakaryopoese. Die Abnahme des Kern: Cytoplasma-Verhältnisses, ein typisches Merkmal der megakaryozytären Differenzierung, das durch die Volumenzunahme der Zellen und die Volumenabnahme des Kerns zustande kam, zog die Vergrößerung des cytoplasmatischen Kompartments nach sich. Obwohl also die absolute Menge des intrazellulären Eisens infolge der Blockierung der Eisensfreisetzung zugenommen hat (Abb. 4.23A), wurde keine Zunahme des relativen Eisengehalts in diesem Prozess beobachtet. Wenn die Differenzierung in einem eisenarmen Medium durchgeführt wurde, konnte zwar keine signifikante Abnahme des relativen Eisengehalts festgestellt werden (Abb. 4.23B), aber erst unter den Bedingungen einer hohen Konzentrationen von Ferri-Tf im Zellkulturmedium wurde eine signifikante Reduktion des relativen Eisengehalts in differenzierenden Zellen gemessen (Abb. 4.29B). Dieses Ergebnis

impliziert, dass unter physiologischen Bedingungen (Ferri-Tf im Blut) die megakaryozytäre Differenzierung durch die Abnahme des relativen Eisengehalts begleitet wird.

In Bezug auf die Regulation der zellulären Eisenhomeostase scheinen also die megakaryozytäre und erythroide Differenzierung zwei entgegen gesetzte Prozesse zu sein. Es gibt starke Indizien, dass während der Erythropoese infolge der Reduktion des Zellvolumens und der Steigerung der Hämoglobinisierung die Zunahme des zellulären Eisengehalts stattfindet (Schranzhofer *et al.*, 2006). Die Erhöhung der zellulären Eisenverfügbarkeit ist die Folge der transkriptionalen Heraufregulation der TfR-Expression (Schranzhofer *et al.*, 2006, Sposi *et al.*, 2000). Im Unterschied zur erythroiden Reifung, bei der die Steigerung des Bedarfs an Eisen durch die Ankurbelung der Hämoglobinsynthese hervorgerufen wird (Kawasaki *et al.*, 1995, Schranzhofer *et al.*, 2006), wird die Zunahme des Eisenbedarfs während der Megakaryopoese durch die Vergrößerung der Zellen verursacht (Abb. 4.20A, B, C).

Wegen der Reduktion der TfR1-Proteinexpression und der transferrinabhängigen Eisenaufnahme während der megakaryozytären Differenzierung (Abb. 4.29) konnte diese Zunahme des Eisenbedarfs durch die Steigerung der Verfügbarkeit von Ferri-Tf-Eisen nicht ausgeglichen werden. Für diese These spricht das Phänomen, dass die megakaryozytäre Differenzierung mit PMA zur Zunahme des absoluten Eisengehalts in K562-Zellen führte (Abb. 4.23), während der relative Eisengehalt sich nicht signifikant verändert hat. Nach der Kultivierung der K562-Zellen in der Anwesenheit von Ferri-Tf im Zellkulturmedium während der 72 Stunden langen megakaryozytären Differenzierung oder Proliferation konnte eine signifikante Abnahme des relativen Eisengehalts festgestellt werden (Abb. 4.29B). Dies kam dadurch zustande, dass unter diesen Bedingungen proliferierende Zellen in der Lage waren, Ferri-Tf verstärkt zu internalisieren, was in den differenzierenden Zellen nach 24 h der megakaryozytären Differenzierung wegen der massiven Reduktion der TfR1-Proteinexpression nicht möglich war (Kap. 4.4.6.1 und 4.4.6.2.5). Wenn dagegen während der megakaryozytären Differenzierung oder Proliferation der K562-Zellen infolge der Anwesenheit von FAC im Zellkulturmedium die Verfügbarkeit des anorganischen Eisens (FAC) erhöht wurde, konnte kein signifikanter Unterschied im relativen Eisengehalt zwischen den proliferierenden und differenzierenden Zellen festgestellt werden (Abb. 4.24B). Nach der *In-vitro*-Megakaryopoese der K562-Zellen, deren intrazelluläre Eisenkonzentration zuvor künstlich erhöht wurde (48 h Vorbeladung mit FAC), wurde ebenso eine Kompensation der reduzierten relativen Eisenkonzentration beobachtet (Abb. 4.24B). Diese Ergebnisse implizieren also die

Diskrepanz zwischen dem erhöhten Eisenbedarf und der erniedrigten Eisenverfügbarkeit in differenzierenden Zellen.

Die Akkumulation des Eisens und die daraus resultierende Zunahme des absoluten Eisengehalts in PMA-behandelten Zellen kann als ein Ausdruck der Bestrebungen der Zellen dieser Diskrepanz entgegenzuwirken, angesehen werden. Der ausbleibende Anstieg des relativen Eisengehalts (Abb. 4.23B) wurde dagegen durch die Vergrößerung der Zellen verursacht, die 48 Stunden nach Anfang der megakaryozytären Differenzierung begann (Abb. 4.20B).

5.2.2.2 Die Rolle des Eisens in der Expressionsregulation von TfR1-, H-Ferritin-, L-Ferritin- sowie Ferroportin-Transkripten

Die Experimente zur *In-vitro*-Megakaryopoese in der Anwesenheit des PKC-Inhibitors GF 109203X oder FAC im Zellkulturmedium der K562-Zellen (Abb. 4.32 und 4.33) ergaben, dass nur die H-Ferritin-mRNA-Expression in diesem Prozess durch Eisen reguliert war, während die Expression der TfR1-, L-Ferritin- und Ferroportin-Transkripte eisenunabhängig blieb. Ob diese eisenabhängige Expressionsregulation der H-Ferritin-Transkripte durch den posttranskriptionalen Mechanismus verursacht wurde oder auf der transkriptionalen Ebene stattfand, konnte in dieser Arbeit nicht endgültig geklärt werden. Für den posttranskriptionalen Feedback-Mechanismus spricht die Tatsache, dass unter den gleichen Bedingungen der FAC-Überladung die H-Ferritin-mRNA-Expressionszunahme in proliferierenden K562-Zellen beobachtet wurde (Abb. 4.12B und 4.33), in denen Eisen bekanntlicherweise positiv die Stabilität der Ferritin-mRNAs beeinflusst. Die Verwendung eines Inhibitors der Transkription z. B. Actinomycin D zur Blockierung der transkriptionalen Regulation würde gleichzeitig den Prozess der megakaryozytären Differenzierung verhindern. Auch der Einsatz von Hämin zur Klärung der Rolle des Häm-Eisens in der Regulation auf Transkriptionsebene würde den Prozess der megakaryozytären Differenzierung behindern, weil Hämin die *In-vitro*-Erythropoese der K562-Zellen hervorruft. In diesem Prozess wurde nachgewiesen, dass Eisen als Bestandteil des Hämmoleküls durch das *antioxidant-responsive element* im H-Ferritin-Gen-Promotor die Expression des H-Ferritin-Genes in K562-Zellen beeinflusst (Iwasaki *et al.*, 2006). Unabhängig davon, ob die Regulation der H-Ferritin-mRNA-Expression auf der transkriptionalen oder posttranskriptionalen Ebene stattfindet, spiegelt die Expressionsabnahme dieser Transkripte und deren Eisenregulierbarkeit die Reduktion des LIPs während der megakaryozytären Differenzierung wider. Nur diese freien cytosolischen Eisenionen (*labile iron pool*) beteiligen sich nämlich an der posttranskriptionalen Feedback-Regulation durch das IRP / IRE-System oder werden z. B. für die Hämsynthese verwendet. Über die

Regulation der Häm- und Hämoglobinsynthese während der megakaryozytären Differenzierung wird im Kapitel 5.2.2.5 diskutiert. Aus der Expressionsanalyse der H-Ferritin-mRNA ging hervor, dass LIP erst 24 Stunden nach Anfang der PMA-Stimulation abzunehmen begann und weitere 48 Stunden auf dem gleichen, niedrigeren Niveau blieb. Diese Dynamik der Veränderungen des freien cytosolischen Eisens korrelierte mit der Kinetik der Expressionsabnahme des TfR1-Proteins (Abb. 4.25) und zum Teil mit der Kinetik der Steigerung der Zellmasse der differenzierenden K562-Zellen (Abb. 4.20B). Das impliziert, dass diese beiden Prozesse für die Reduktion des LIPs während der Megakaryopoese verantwortlich sind.

Die Analyse der Expression von TfR1, H-Ferritin, L-Ferritin und Ferroportin ergab, dass nach 72 Stunden der megakaryozytären Differenzierung der K562-Zellen eine Korrelation im Sinne der posttranskriptionalen Feedback-Regulation durch das IRP / IRE-System zwischen der reduzierten Expression von Ferroportin-mRNA und der Abnahme der H-Ferritin-mRNA-Expression, die die Reduktion des LIPs widerspiegelt, besteht. Im Unterschied dazu korrelierte die Expressionsabnahme des TfR1-Proteins und die Expressionszunahme der L-Ferritin-mRNA nicht mit der Reduktion des LIPs in differenzierenden Zellen (Abb. 4.25 und 4.30).

Anders als H-Ferritin-Transkripte wurde die L-Ferritin-mRNA-Expression unabhängig von Eisen transkriptional heraufreguliert, was insgesamt zur reziproken Regulation der H- und L-Ferritin-mRNA-Expression während der megakaryozytären Differenzierung der K562-Zellen führte. Während der Erythropoese in Huhn und Maus wird die Transkription von H- und L-Ferritin stark unterdrückt (Mikulits *et al.*, 1999), wobei die Beladung mit FAC zur Wiederherstellung der Eisenregulierbarkeit der Ferritin-Transkripte in der Maus führt (Schranzhofer *et al.*, 2006). Auch die TfR1-mRNAs in Maus-Erythroblasten werden während dieses Prozesses auf der transkriptionalen Ebene (hoch)reguliert. Diese Regulation ist interessanterweise ähnlich wie die TfR1-mRNA-Regulation während der megakaryozytären Differenzierung der K562-Zellen von Eisen unabhängig. Die umgekehrt proportionale Korrelation der TfR1-Protein-Expression mit dem reduzierten LIP der Zellen sowie das Fehlen der Regulation der TfR1-mRNA-Expression durch Eisen sprechen dafür, dass während der megakaryozytären Differenzierung die TfR1-Expressionsregulation auf der transkriptionalen Ebene statt-findet. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den bisherigen Kenntnissen zur Rolle von PMA in der Regulation der TfR1-Expression in K562-Zellen, die belegten, dass die

PMA-bedingte TfR1-Expressionsabnahme durch die Suppression der TfR1-Gentranskription hervorgerufen wird (Schonhorn *et al.*, 1995).

Obwohl die Abnahme der Ferroportin-mRNA-Expression mit der Reduktion des *labile iron pool* während der megakaryozytären Differenzierung korreliert, was der Regulation im Sinne des eisenabhängigen, posttranskriptionalen Feedback-Mechanismus entsprechen könnte, sind die Veränderungen der Expression der mRNA dieses Eisentransporterproteins eher durch den transkriptionalen Mechanismus verursacht. Dafür spricht erstens, dass Eisen ähnlich wie im Falle der L-Ferritin- oder TfR1-mRNA keinen Einfluss auf die Expression der Ferroportin-Transkripte hatte und zweitens die Schnelligkeit und das Ausmaß der Ferroportin-mRNA-Herunterregulation. Die fast 4-fache Reduktion wurde bereits eine Stunde nach Beginn der Differenzierung mit PMA beobachtet (Abb. 4.30 und 4.31). Die Inhibition der PKC durch GF 109203X hatte im Unterschied zu TfR1, H-Ferritin und L-Ferritin nur einen geringfügigen Einfluss auf die Ferroportin-mRNA-Expression in den differenzierenden Zellen, was ein Hinweis dafür ist, dass die rapide Herunterregulation der Ferroportin-Transkripte infolge der PMA-bedingten Aktivierung der PKC-unabhängigen Signalwege zustande gekommen ist. Durch die Primerauswahl für die RT-PCR (Kap. 3.3.3.1) wurden alle Produkte des alternativen Spleißens der Ferroportin-mRNA, die sich durch die An- oder Abwesenheit der Exons in der 5'-UTR voneinander unterscheiden (Cianetti *et al.*, 2005), in einem RT-PCR Produkt erfasst, so dass die Beurteilung der Regulation der einzelnen Spleißvarianten nicht durchgeführt wurde. Aufgrund der Tatsache, dass die Expression aller Ferroportin-Transkripte sehr rapid und stark herunterreguliert wurde (Abb. 4.30 und 4.31), sind eventuelle Unterschiede in der Regulierbarkeit eines der Produkte des alternativen Spleißens für das Ausmaß der Gesamtexpression praktisch ohne Bedeutung. Während der erythroiden Differenzierung wird die Expression dieser Spleißvarianten unterschiedlich reguliert ist, aber ohne Einfluss auf die Ferroportin-Proteinexpression, die weitgehend konstant bleibt (Cianetti *et al.*, 2005).

5.2.2.3 Eisenaufnahme

Im Unterschied zu K562-Zellen während der Proliferation führte die Beladung der differenzierenden Zellen mit Ferritransferrin nur zur geringfügigen und nichtsignifikanten Steigerung der zellulären Eisenkonzentration, was zeigt, dass die megakaryozytäre Differenzierung zur massiven Reduktion der Eisenaufnahme via TfR (TfR1 und TfR2) führte (Kap. 4.4.6.2.5, Abb. 4.23 und 4.29). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der starken Expressionsreduktion von TfR1 und TfR2 infolge des Differenzierungsprozesses (Abb. 4.25 und 4.36). In Bezug auf die Expression des TfR und die transferrinabhängige Eisenaufnahme

ist die megakaryozytäre Differenzierung zur erythroiden Differenzierung entgegen gerichtet (Kawasaki *et al.*, 1995, Schranzhofer *et al.*, 2006). Die gesteigerte Expression des TfR während der Erythropoese ist ein notwendiger Schritt zur Erhöhung der zellulären Hämoglobinisierung und spiegelt zusammen mit der Expression der Globingene und Hämoglobinkonzentration die Ausprägung der erythroiden Eigenschaften wider. Während der Megakaryopoese findet ein Verlust dieser Eigenschaften statt. In beiden Prozessen erfolgt die Regulation der Expression des TfR1 auf der transkriptionalen Ebene und unabhängig vom Eisen (Abb. 4.33), was impliziert, dass dieser Regulation gemeinsame Mechanismen zugrunde liegen. PMA-Behandlung der anderen leukozytären Zelllinien – THP1, HL60 und U937 führt zur deren makrophagisch-monozytären Differenzierung und wird durch die Reduktion der Anzahl der Transferrinbindungsstellen auf der Plasmamembran begleitet (Scaccabarozzi *et al.*, 2000, Pelicci *et al.*, 1984). Dass die Abnahme der TfR1-Proteinexpression während der PMA-abhängigen megakaryozytären Differenzierung nicht ausschließlich einen PMA-abhängigen Effekt darstellt, sondern auch ein zur Megakaryopoese spezifischer Effekt ist, haben Experimente mit der Staurosporin-induzierten megakaryozytären Differenzierung der K562-Zellen belegt (nicht gezeigt). Während der 72 Stunden langen megakaryozytären Differenzierung mit 100 nM PMA oder 40 nM STA waren die Kinetiken und das Ausmaß der Reduktion der TfR1-Proteinexpression praktisch deckungsgleich. Erst nach 24 h der PMA-Behandlung (Abb. 4.25) war die Expressionsreduktion dieses Proteins zu detektieren. In früheren Untersuchungen wurde die Reduktion der TfR1-Transkriptionsrate bereits nach 15 h der PMA-Stimulation der K562-Zellen feststellbar. Bis zur dieser Zeit war ein verstärktes TfR1-*recycling* zwischen der Plasmamembran und den endosomalen Vesikeln nachweisbar (Schonhorn *et al.*, 1995). Dieser Prozess ist durch die PKC-abhängige Hyperphosphorylierung am Ser 24 in der cytoplasmatischen Domäne des TfR1 begleitet (May *et al.*, 1984) und beginnt bereits nach 45 min der PMA-Behandlung (Klausner *et al.*, 1984). Durch die Verwendung der Zellysate zur Expressionsanalyse des TfR1-Proteins im Westernblot konnte die verstärkte Internalisierung des TfR1 nicht detektiert werden.

Die modulierte Zunahme der HFE-Proteinexpression während der megakaryozytären Differenzierung spricht dafür, dass eher TfR1 (Salter-Cid *et al.*, 1999, Giannetti und Björkman, 2004) als Ferroportin (Drakesmith *et al.*, 2002) ein Partner für molekulare Wechselwirkungen mit dem Hämochromatoseprotein ist. Solange in ersten Stunden der PMA-Behandlung genug Transferrinrezeptoren zwischen der Plasmamembran und den endosomalen Vesikeln zirkulierten, nahm die HFE-Proteinexpression zu und erreichte ihr Maximum nach 24 Stunden. Erst nach dieser Zeit, nach der drastischen Abnahme der TfR1-

Proteinexpression, nahm sie in den darauf folgenden 48 Stunden ab (Abb. 4.25). Diese Expressionskinetik des HFE-Proteins ist ein starker Hinweis dafür, dass HFE sich an der beobachteten Reduktion der transferrinabhängigen Eisenaufnahme via TfR1 beteiligte. Molekulare Wechselwirkungen wurden auch zwischen HFE und TfR2 nachgewiesen (Goswami und Andrews, 2006). Die Expression des TfR2 unterlag einer drastischen Reduktion nach 72 h der PMA-Behandlung (Abb. 4.36), was auch eine starke Reduktion der transferrinabhängigen Eisenaufnahme via TfR2 impliziert. Bisherige Tier- oder Zellkultur-experimente haben die Frage der Eisenregulierbarkeit der HFE-Expression nicht eindeutig beantwortet. Eisenüberladung in der Maus hat einerseits die HFE-mRNA-Expressionszunahme in der Leber hervorgerufen, aber andererseits führte sie nur zu geringfügigen HFE-Expressionsveränderungen in Zellen des Dünndarms. Ebenso keine Klarheit haben die Versuche mit der Eisenüberladung der Zellkulturzellen gebracht (Fleming und Britton, 2006, *review*). In der hier vorliegenden Arbeit wurde keine Regulation der HFE-Proteinexpression durch Eisen in K562-Zellen während der Proliferation festgestellt (Abb. 4.26A). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem Fehlen der IREs in HFE-mRNA und der *metal response elements* (MREs) im HFE-Genpromoter (Mura *et al.*, 2004, Sanchez *et al.*, 1998). Das Fehlen spricht eher dagegen, dass die beobachtete modulierte Zunahme der HFE-Proteinexpression während der megakaryozytären Differenzierung einen eisenabhängigen Vorgang darstellt. Diese Expressionsveränderungen sind also durch PMA-abhängige transkriptionale Effekte hervorgerufen, wobei die Unterschiede in der PMA-Konzentration im Zellkulturmedium der K562-Zellen keinen Einfluss auf das Ausmaß dieser Veränderungen hatten (Abb. 4.26B).

Mit der beobachteten Abnahme der transferrinabhängigen Eisenaufnahme und den Expressionsveränderungen der daran beteiligten Proteine (TfR1 und TfR2, HFE) korreliert die Reduktion der DMT1B-mRNA-Expression (Abb. 4.36), die für ein Protein kodiert, das das Eisen nach dessen Aufnahme via TfR aus endosomalen Vesikeln ins Cytoplasma transportiert (Hubert und Hentze, 2002). Zusammenfassend kann man feststellen, dass während der *In-vitro*-Megakaryopoese der K562-Zellen solche Expressionsveränderungen der Proteine des Eisenstoffwechsels stattfinden, die dem Zweck dienen, die transferrinabhängige Eisenaufnahme zu reduzieren.

Eine verstärkte Reduktion der Membranpräsenz des TfR1 infolge der TfR1-Spaltung (Shedding) oder der TfR1-Einsortierung in den Weg der exosomalen Vesikel wurden während der megakaryozytären Differenzierung der K562-Zellen nicht festgestellt (Abb. 4.27 und 4.28). Stimulierung der K562-Zellen mit PMA und die daraus resultierende Aktivierung

der PKC hatte nicht zur Aktivierung des TfR1-Sheddings geführt, obwohl PMA die Induktion der Spaltung einer Reihe von anderen Membranproteinen wie L-Selektin, IL-6, proTGF α oder proEGF hervorruft (Peschon *et al.*, 1998, Dempsey *et al.*, 1997). Dieses Ergebnis steht auch im Einklang mit früheren Untersuchungen von Kaup *et al.*, die gezeigt haben, dass in den leukozytären Zelllinien wie HL60 und Jurkat keine Aktivierung des TfR1-Sheddings durch PMA stattfindet (Kaup *et al.*, 2002a). Die reduzierten sTfR-Mengen im Zellkulturmedium der mit PMA-differenzierten K562-Zellen entsprachen der Expressionsabnahme des Substrates dieses Sheddingvorganges, dem TfR1-Protein. Das beweist, dass während der *In-vitro*-Megakaryopoese der K562-Zellen die Abspaltung der extrazellulären Domäne des TfR1-Proteins konstitutiv und nicht induziert abläuft. Die differenzierungsbedingte Aktivierung der Proteinkinase C hatte auch keinen Einfluss auf das Ausmaß der Präsenz des TfR1-Proteins in Exosomen der K562-Zellen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Reduktion der transferrinabhängigen Eisenaufnahme ausschließlich auf die Expressionsregulation von TfR1, TfR2 und HFE zurückzuführen ist. Prozesse wie TfR1-Shedding oder Sortierung des TfR1 in die Exosomen geschehen während der Differenzierung der K562-Zellen zum gleichen Ausmaß wie in proliferierenden Zellen.

Nach 72 Stunden der PMA-Behandlung wurde auch eine starke Abnahme der Expression der DMT1-Isoform 1A beobachtet (Abb. 4.36), welcher Fe²⁺ aus dem extrazellulären Raum ins Zellinnere transportiert. Das spricht gegen die Beteiligung dieses Proteins an der transferrinunabhängigen Eisenaufnahme während der megakaryozytären Differenzierung. Die hier zum ersten Mal beschriebene Expression dieser Isoform in K562-Zellen impliziert, dass die Peptidsequenz, die durch Exon 1A kodiert wird und für den Transport von DMT1 in die apikale Membran der polarisierten Zellen verantwortlich ist (Hubert und Hentze, 2002), in nicht-polarisierten Zellen eine andere oder gar keine Funktion besitzt. Ein Nachweis der DMT1A-mRNA in proliferierenden K562-Zellen deutet aber darauf hin, dass in erythroiden Zellen neben dem Hauptweg der Eisenaufnahme über den TfR auch die transferrinunabhängige Eisenaufnahme via DMT1-Transporter stattfindet. Physiologisch kann jedoch die Aufnahme von Eisen über diesen Weg nicht den Ausfall der Hämoglobinsynthese infolge der defizienten Eisenaufnahme via TfR ersetzen (Zhang *et al.*, 2006).

Die Aufnahme von Eisen über den Integrin β 3-Mobilferrin-Weg stellt eine weitere Möglichkeit der transferrinunabhängigen Eisenaufnahme. Die starke Zunahme der Expression von Integrin β 3 (CD61) während der megakaryozytären Differenzierung (Abb. 4.22 A, B, C) könnte auf die Möglichkeit hinweisen, dass die Akkumulation des Eisens in differenzierenden

Zellen auf die Zunahme der transferrinunabhängigen Eisenaufnahme zurückzuführen ist. Dagegen sprechen jedoch zwei Tatsachen. Erstens, die Akkumulation des Eisens in differenzierenden K562-Zellen findet nicht nur unter FAC-Überladung, sondern auch unter Bedingungen der niedrigen Eisenkonzentration (ohne FCS im Zellkulturmedium) statt. Die prozentuale Zunahme der Eisenakkumulation in differenzierenden Zellen war im Vergleich zu den proliferierenden Zellen fast gleich, und zwar sowohl unter niedrigen als auch hohen Eisenkonzentration im Zellkulturmedium (Kap. 4.4.6.1). Zweitens, Zellen, die infolge der FAC-Vorbeladung am Anfang der Differenzierung den höheren Eisengehalt besaßen, akkumulierten stärker Eisen während der PMA-Stimulation als K562-Zellen, die eine niedrigere Eisenkonzentration aufwiesen. Die Eisenakkumulation war also die Folge des Blocks in der Eisenfreisetzung und wurde nicht durch die gesteigerte Eisenaufnahme verursacht. Im Allgemeinen ist eine eindeutige Klärung der Rolle der transferrinunabhängigen Eisenaufnahme während der megakaryozytären Differenzierung ohne zusätzlichen experimentellen Aufwand nicht möglich. Die Ursache dafür liegt in der entgegengesetzten Regulation der Expression von CD61 (starke Zunahme im Westernblot und in der RT-PCR) und DMT1A (starke Abnahme in der RT-PCR), die in unterschiedlichen Eisentransportwegen in der transferrinunabhängigen Eisenaufnahme involviert sind. Außerdem es ist nicht bekannt, welcher von diesen beiden Wegen der transferrinunabhängigen Eisenaufnahme in K562-Zellen während der Proliferation bevorzugt wird. In letzten Jahren wurde auch die Beteiligung solcher Proteine wie Zip14 und L-Typ-Calcium Kanäle in der Aufnahme des anorganischen Eisen postuliert (Liuzzi *et al.*, 2006, Donovan *et al.*, 2006, *review*), deren Expression in proliferierenden oder differenzierenden K562-Zellen in der hier vorliegenden Arbeit nicht überprüft wurde. Die Tatsache, dass trotz des unterschieden Ausmaßes der Expression von DMT1A und CD61 zwischen den proliferierenden und differenzierenden Zellen kein signifikanter Unterschied im relativen Eisengehalt der K562-Zellen, die unter hohen FAC-Konzentrationen im Zellkulturmedium proliferierten oder differenzierten, festgestellt wurde (Abb. 4.24B), spricht jedoch eher dafür, dass FAC ohne Beteiligung direkt die Plasma-membran passiert.

Frühere Untersuchungen zur transferrinunabhängigen Eisenaufnahme in K562-Zellen zeigten eine starke Zunahme der Eisenaufnahme von ^{55}Fe (pro Zellzahl) in K562-Zellen nach deren Stimulation mit PMA (Akompong *et al.*, 1995). Die Feststellung der Zunahme der Eisenaufnahme basierte auf der Messung der ^{55}Fe -Aktivität 16 h nach Zugabe von ^{55}Fe (als 5-min-Puls) und PMA zu den K562-Zellen. Die in dem Kap. 4.4.6 dargestellten Ergebnisse erlauben jedoch eine andere Interpretation dieser Ergebnisse von Akompong *et al.* Danach ist die Zu-

nahme der ^{55}Fe -Aktivität in stimulierten Zellen nicht auf die Zunahme der Eisenaufnahme, sondern auf die Abnahme der Eisenfreisetzung zurückzuführen, die durch eine rapide Herunterregulation der Ferroportin-Expression verursacht wurde. Das Ausmaß der ^{55}Fe -Aktivitätszunahme ist jedoch wegen der verwendeten Methodik zu bezweifeln. Experimente mit der Beladung von THP1 Zellen mit ^{55}Fe ergaben eine sehr starke und unspezifische Bindung von $^{55}\text{FeNTA}$ an die Zellmembranen, die die korrekte Messung der Eisenaufnahme ins Zellinnere unmöglich machten (nicht gezeigt).

5.2.2.4 Eisenspeicherung und -freisetzung

Die Eisenregulierbarkeit der H-Ferritin-Transkripte, die im Unterschied zu L-Ferritin in proliferierenden K562-Zellen beobachtet wurde (Abb. 4.12), blieb auch während der megakaryozytären Differenzierung erhalten. Das spricht dafür, dass die durch Eisen gesteuerte H-Ferritin-mRNA-Expressionsreduktion während der 72 Stunden langen PMA-Stimulation eine Reduktion der Eisenspeicherung im Ferritinmolekül widerspiegelt. Gleichzeitig wurde in diesem Prozess eine Zunahme der Expression der L-Ferritin-Transkripte beobachtet, was einen eisenunabhängigen Vorgang darstellt. Die daraus resultierende Verringerung des Verhältnisses der Expressionen von H- zu L-Ferritin auf der RNA-Ebene impliziert angesichts der relativ kurzen Halblebenszeit des Ferritin-Proteins ($t_{1/2} = 8 \text{ h}$, Konijn *et al.*, 1999) den Umbau des Ferritinmoleküls während der *In-vitro*-Megakaryopoese der K562-Zellen.

Es liegen dagegen keine Angaben zum Umbau des Ferritinmoleküls während der erythroiden Differenzierung vor. Das H / L-Verhältnis wird sowohl durch die Veränderungen der zellulären Eisenhomeostase als auch durch die zytokingesteuerte Aktivierung der intrazellulären Signalkaskaden beeinflusst (Konijn *et al.*, 1999, Miller *et al.*, 1991). Eine Überexpression der schweren Ferritin-Ketten in erythroiden Zellen hatte die Reduktion der Synthese der leichten Ketten zur Folge (Picard *et al.*, 1996). Nach der Überladung von Leberzellen mit FAC erfolgte die transkriptionale Heraufregulation der L-Ferritin-mRNA-Expression, wobei die Expression der H-Ferritin-Transkripte unverändert blieb (White und Munro, 1988). Die bevorzugte Heraufregulation von L-Ferritin gegenüber H-Ferritin während der Megakaryopoese kann ihren Grund in der Tatsache haben, dass die leichte Kette für die Stabilität des Ferritinmoleküls und die Langzeitspeicherung von Eisen verantwortlich ist (Picard *et al.*, 2006). Die reduzierte Aktivität der Gene, die Proteine kodieren, die für die Eisenaufnahme (TfR1, TfR2, DMT1A), den intrazellulären Eisentransport (DMT1B) und die Eisenfreisetzung (Fpn1) verantwortlich sind, (Kap. 5.2.2.1 und 5.2.2.3) implizieren eine allgemeine Reduktion des Eisentransports zwischen den Megakaryozyten und deren extrazellulären Umgebung und dass

Ferritin die einzige Quelle der Eisenionen für die metabolische Prozesse dieser Zellen ist. Dies steht im Einklang mit früheren Untersuchungen, die gezeigt haben, dass Ferritransferrin kein Einfluss auf die Proliferation der Megakaryozyten besitzt (Deliorman *et al.*, 2000). Außerdem kann man die Stabilisierung des Ferritinmoleküls infolge der L-Ferritin-Heraufregulation als eine Vorbereitung der K562-Zellen auf die Speicherung des Hämoglobineisens sehen (Während der ersten 72 Stunden der PMA-Behandlung der K562-Zellen wurde noch kein Hämoglobinabbau beobachtet (Kap. 5.2.2.5), obwohl dieses als Folge der megakaryozytären Entwicklung zu erwarten war).

Dank der Eisenregulierbarkeit der H-Ferritin-mRNA-Expression könnte die Eisenspeicherung an die durch den Hb-Abbau gesteigerte Eisenverfügbarkeit angepasst werden (mit der Hilfe der H-Ketten wird Fe^{2+} zur Fe^{3+} oxidiert, was erst die Eisenspeicherung im Ferritinmolekül ermöglicht). Man sollte auch berücksichtigen, dass ein stabiles Ferritinmolekül den LIP weniger beeinflussen würde. Dies ist von besonderer Bedeutung, weil das freie, cytosolische Eisen den relativen Hämoglobingehalt (und dadurch die Ausprägung der erythroiden Eigenschaften) während der megakaryozytären Differenzierung reguliert (Kap. 5.2.2.5 und 5.2.2.6). Abgesehen davon nimmt die Überexpression von L-Ferritin, im Unterschied zur H-Ferritin, keinen Einfluss auf den zellulären Eisenmetabolismus. Eine Mutation des L-Ferritings, die das IRE-Element im 5'-UTR der L-Ferritin-mRNA betrifft, führt während des *hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome* (HHCS) zur konstitutiven Heraufregulation der L-Ferritin-Untereinheit (Levi *et al.*, 1998, Beaumont *et al.*, 1995). Die L-Ferritin-Mengen in Blut und Zellen sind bei dieser Krankheit etwa 20-fach höher als im gesunden Organismus. Trotzdem bleibt der zelluläre Eisenmetabolismus mit der Ausnahme der Linse unverändert (Die Ablagerungen der L-Ferritin-Untereinheiten in der Linse führen wegen des spezifischen Metabolismus dieses Organs zu dessen Zerstörung und folglich zur Blindheit).

Im Unterschied zu L-Ferritin verursacht die Überexpression von H-Ferritin große Veränderungen des zellulären Eisenmetabolismus. In MEL-Zellen führt sie zur Abnahme der Synthese des endogenen L-Ferritins, zur Zunahme der RNA-Bindungsaktivität der IRPs, zur Expressionsverringerng der β -Globin-Transkripte, der Häm- und Hämoglobinsynthese (Picard *et al.*, 1996) sowie zur LIP-Reduktion (Epsztejn *et al.*, 1999). In Übereinstimmung damit hat die RNAi gegen H-Ferritin-Transkripte die Konzentrationserhöhung des freien cytoplasmatischen Eisens in K562-Zellen verursacht (Kakhlon *et al.*, 2001). Die Heraufregulation der H-Ferritin-Expression (statt der L-Ferritin-Expression) würde also nach den bisherigen Erkenntnissen den Eisenmetabolismus in erythroiden Zellen beeinflussen, was

gleichzeitig den Prozess der Reduktion der erythroiden Eigenschaften während der megakaryozytären Differenzierung stören würde (Kap. 5.2.2.6). Abgesehen davon würde diese Hochregulation dem Redoxstatus der Megakaryozyten nicht entsprechen. Die Expression der H-Untereinheit ist nämlich nicht nur im Speziellen dem Eisenstatus der Zellen angepasst, sondern auch im Allgemeinen dem Redoxstatus, was die Abwehr gegen radikalbedingte Oxidationsschäden ermöglicht (Cozzi *et al.*, 1990). Ein niedriger relativer Eisengehalt der differenzierten Zellen erfordert also eher niedrige als hohe Expression von H-Ferritin.

Interessanterweise hängt die Stabilität des Ferritinmoleküls auch von dem Ausmaß der Ferroportin-Expression ab. Die Überexpression von Ferroportin hatte den verstärkten Abbau von Ferritin im Cytosol zu Folge (De Domenico *et al.*, 2006), während Transfektion von humanen Monozyten mit Ferroportin-siRNAs die Eisenretention und die Zunahme der Ferritinsynthese verursachte (Galli *et al.*, 2004). Ähnlich führte die rapide Herunterregulation der Ferroportin-mRNA-Expression während der megakaryozytären Differenzierung der K562-Zellen zur Eisenakkumulation, wobei Eisen in die Hämoglobinmoleküle eingebaut wird. Die Expressionsabnahme der Ferroportin-Transkripte wurde durch die Präprohepcidin-mRNA-Expressionsreduktion begleitet (Abb. 4.30 und 4.36), was gut mit der regulatorischen Rolle von Hpcidin in der Membranpräsenz und im Abbau von Ferroportin korrespondiert (Nemeth *et al.*, 2004, De Domenico *et al.*, 2007). Während der erythroiden Differenzierung wird Ferroportin-Protein weitgehend konstant exprimiert (Cianetti *et al.*, 2005), wobei die Expression von FLVCR während dieses Prozesses abnimmt (Quigley *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass gleichzeitig die Eisenaufnahme via TfR erhöht wird und das Volumen der Zellen abnimmt, sprechen für die Zunahme des relativen Eisengehalts (und des LIPs) in diesem Prozess. Eisen wird jedoch vor allem für die Hämoglobinsynthese verwendet und nicht im Ferritinmolekül gespeichert, weil die H- und L-Ferritinexpression auf der transkriptionalen Ebene unterdrückt wird (Schranzhofer *et al.*, 2006).

5.2.2.5 Hämoglobinsynthese

Die Zunahme der Hämoglobinabbaurate, die im Zusammenhang mit der Reduktion der erythroiden Eigenschaften während der megakaryozytären Differenzierung zu erwarten war, wurde nach 72 h PMA-Behandlung der K562-Zellen nicht beobachtet. Im Gegenteil – es wurde die Steigerung der Hb-Syntheserate festgestellt. Untersuchungen zum Eisenmetabolismus während der Proliferation und megakaryozytären Differenzierung dieser Zellen haben gezeigt, dass die Zunahme des absoluten Eisengehalts in differenzierenden Zellen

durch eine ~ 36 %ige Steigerung des absoluten Hämoglobingehalts begleitet wurde (Abb. 4.34A). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das akkumulierte Eisen in differenzierenden Zellen für die Hämoglobinsynthese verbraucht wurde. Auch in proliferierenden Zellen, nach deren Kultivierung in der Anwesenheit von FAC im Zellkulturmedium, wurde die Steigerung der absoluten Hämoglobinkonzentration beobachtet (Abb. 4.8 und 4.34A). Das deutet darauf hin, dass das anorganische Eisen anstelle des Tf-Eisens für die Hämoglobinsynthese in erythroiden Zellen verwendet wird, was auch in neuesten Untersuchungen berichtet wurde (Zhang *et al.*, 2006).

Der Verbrauch des Eisens für die Hämoglobinsynthese während der Megakaryopoese wurde dadurch ermöglicht, das Eisen positiv sowohl die Expression der Globin-Transkripte (γ -Globin) als auch die Hämsynthese regulierte (Abb. 4.35). Eisen stimulierte die γ -Globin-mRNA-Expression sowohl während der Proliferation als auch während der Differenzierung der K562-Zellen. Für die Expressionsabnahme der γ -Globintranskripte während der Megakaryopoese sind sowohl die Regulation auf der transkriptionalen Ebene (3'-flankierende Region des A- γ -Globingenes) als auch auf der posttranskriptionalen Ebene (γ -Globin-mRNA-Stabilität) verantwortlich (Lumelsky und Forget, 1991). Bekanntlicherweise beeinflusst Eisen als Bestandteil des Hämmoleküls die Transkription der Globingene. Durch die Bindung des Häms an den Transkriptionsfaktor Bach1 wird die Transkriptionsrepression der α - und β -Globingene aufgehoben (Tahara *et al.*, 2004a, 2004b). Ein ähnlicher Mechanismus, der in Abb. 1.7 dargestellt ist, wird für die Expressionsregulation von γ -Globin postuliert – die Bindung von Häm an die *hemin-responsive elements* (HeREs) in der Promotorregion des G- γ -Globingenes verhindert die Anlagerung der Repressoren der Transkription dieses Genes (Tsiftoglou *et al.*, 2006, *review*). Das spricht dafür, dass die Eisenregulation der Expression der γ -Globintranskripte durch den transkriptionalen Mechanismus hervorgerufen wurde. Es wird auch postuliert, dass die Synthese des fetalen Hämoglobins ($\alpha_2\gamma_2$) im Zuge der erythroiden Differenzierung der K562-Zellen ein eisenabhängiges Vorgang darstellt. Eisen ist ein Bestandteil des Hämins (Chloroeisen(III)-Protoporphyrin-IX), eines Induktors der Hämoglobinsynthese und der erythroiden Differenzierung (Belhacene *et al.*, 1998, Kawasaki *et al.*, 1996). Andere Induktoren, wie Antrazykline Doxorubicin und Aclarubicin komplexieren Eisenionen, während Hydroxyharnstoff beeinflusst die Eisen-Tyrosin-Interaktionen (Delgado-Canedo *et al.*, 2005). Die Anwesenheit von IREs in UTRs der Globintranskripte, was die posttranskriptionale Regulation durch Eisen ermöglichen könnte, wurde bisher nicht nachgewiesen.

Die regulatorische Wirkung des Eisens als Bestandteil des Fe(II)-Protoporphyrin-IX-Moleküls ist nur unter der Voraussetzung möglich, dass Eisen zuerst den Einfluss auf die Häm-synthese während der Megakaryopoese nahm. Die in dem Kap. 4.4.6.5 präsentierten Ergebnisse haben gezeigt, dass in differenzierenden K562-Zellen die im Vergleich zu proliferierenden Zellen ohnehin bereits höhere Expression der Ferrochelatase-mRNA durch Eisen positiv beeinflusst wurde. Das Niveau der Expression, das in proliferierenden Zellen nach FAC-Beladung beobachtet wurde, konnte jedoch nicht erreicht werden, was zeigt, dass die eisenabhängige Regulation der FECH-mRNA-Expression durch transkriptionale Effekte teilweise aufgehoben wurde. Im Unterschied dazu wurde die Expressionsregulation der ALAS2-mRNA, die in proliferierenden Zellen durch den eisenabhängigen, postranskriptionalen Feedback-Mechanismus stattfindet, vollständig aufgehoben. Die FAC-Beladung während der PMA-Stimulation konnte die Expression dieser Transkripte im Unterschied zur proliferierenden K562-Zellen nicht erhöhen (Abb. 4.35). Die transkriptionalen Effekte beeinflussten im Unterschied zu FECH-Regulation das Ausmaß der Expression der ALAS2-Transkripte in differenzierenden Zellen kaum. Zusammengefasst ist die eisenabhängige Regulation der Häm-synthese während der megakaryozytären Differenzierung nicht auf die Regulierbarkeit von ALAS2-Transkripten zurückzuführen, was während der erythroiden Differenzierung der Fall ist (Schranzhofer *et al.*, 2006, Mikulits *et al.*, 1999), sondern auf die Regulation der FECH-mRNAs.

Dieser in der vorliegenden Arbeit auf der RNA-Ebene neu dokumentierte Mechanismus der Eisen-abhängigen FECH-Expressionsregulation in proliferierenden und differenzierenden K562-Zellen vervollständigt frühere Erkenntnisse zum Einfluss von Eisen auf die enzymatische Aktivität des FECH-Proteins, die auf der Stabilisierung der [2Fe-2S]-Cluster durch Fe²⁺ beruhen (Taketani *et al.*, 2000). Aufgrund der Tatsache, dass im 150 bp langen Minimalpromotor des FECH-Genes zwei funktionelle Hif-1 Bindungsmotive identifiziert wurden (Liu *et al.*, 2004b) und *hypoxia-inducible factor 1α* (Hif-1α) als *non-heme iron protein* fungiert (Srinivas *et al.*, 1998), besteht die Möglichkeit der Transkriptionsregulation des FECH-Genes durch Eisen. In früheren Untersuchungen zur Eisenregulierbarkeit der FECH-Transkripte wurden MEL-Zellen für 16 Stunden mit 50 µM FeCl₃ beladen, jedoch wurde unter diesen Bedingungen keine Regulation der FECH-mRNA-Expression durch Eisen festgestellt (Zoller *et al.*, 2002). Auffällig ist jedoch, dass Bedingungen dieser Experimente stark von dem Ablauf der Versuche, die in Kap. 3.1.5.2 und 4.4.6.5 beschrieben wurden, abwichen. Eine mehr als zweifach kürzere Inkubationszeit, eine zweifach niedrigere Eisen-konzentration im Zellkulturmedium und die Verwendung von FeCl₃, das schlechter als FAC durch Zellen auf-

genommen wird, sprechen dafür, dass das Fehlen der FECH-mRNA-Regulierbarkeit auf die Versuchsbedingungen zurückzuführen ist. Hier nicht gezeigte Experimente zur Aufnahme von $^{55}\text{FeCl}_3$ in THP1 Zellen haben belegt, dass Eisen(III)-Chlorid sehr schlecht internalisiert wird und massiv an der Zelloberfläche angelagert wird.

Die Tatsache, dass nach 72 Stunden der megakaryozytären Differenzierung der absolute Eisen- und Hämoglobingehalt pro Zelle gestiegen ist, schließt die Steigerung der Hämoglobinabbaurate als Ursache für die beobachtete Reduktion des relativen Hb-Gehalts in diesem Prozess aus. Die Abnahme des Hb: Protein-Verhältnisses nach 72-stündiger PMA-Stimulation der K562-Zellen hatte ihren Grund in der Steigerung der Gesamtproteinsyntheserate während der *In-vitro*-Megakaryopoese, so dass trotz des Anstiegs der Anzahl der Hämoglobinmoleküle infolge des Einbaus des akkumulierten Eisens ins Hämoglobin (was sich als die Zunahme der absoluten Menge an Hämoglobin widerspiegelte), nahm der relative Hämoglobingehalt ab. Diese Veränderungen im Hämoglobingehalt wurden durch Veränderungen des Eisengehalts während der Megakaryopoese begleitet (Kap. 5.2.2.1). In diesem Prozess wurde die Vergrößerung der Zellen erst 48 Stunden nach Anfang der PMA-Stimulation detektiert (Abb. 4.20B). Die Herabregulation der Ferroportin-Expression, die die Eisenakkumulation in diesem Prozess verursachte, war dagegen auf RNA-Ebene bereits nach einer Stunde feststellbar. Die Steigerung der absoluten Hämoglobinmengen in differenzierten Zellen erfolgte nach 24 Stunden der megakaryozytären Differenzierung (Ergebnisse wurden nicht gezeigt). Dies impliziert, dass in der Zeit zwischen 24 und 48 Stunden nach Beginn der Differenzierung das akkumulierte Eisen nicht nur die Erhöhung des absoluten, sondern auch relativen Eisengehalts verursachte und ins Hämoglobinmolekül eingebaut wurde. Erst danach erfolgte die Volumenzunahme der differenzierenden Zellen und fand die daraus resultierende Reduktion des relativen Eisen- und Hämoglobingehalts statt.

5.2.2.6 Einfluss des Eisens auf die Ausprägung der erythroiden und megakaryozytären Eigenschaften

Wegen der eisenabhängigen Regulation der Hämoglobinsynthese während der Megakaryopoese (Kap. 5.2.2.5), ist der Hämoglobingehalt (und deshalb erythroide Eigenschaften) der K562-Zellen von der zellulären Eisenhomeostase abhängig. Unter niedriger Eisenkonzentration war der Einfluss der differenzierungsbedingten Vergrößerung des cytoplasmatischen Kompartments auf den Hämoglobingehalt viel größer als die Zunahme der Hämoglobinsynthese infolge der Eisenakkumulation, so dass der relative Hämoglobingehalt (Hb: Protein-Verhältniss) nach 72 Stunden der megakaryozytären Differenzierung hochsignifikant ab-

genommen hat (Abb. 4.34B). Die Erhöhung der Eisenverfügbarkeit (eine 48-stündige Vorbeladung mit FAC) führte zur Kompensation des reduzierten relativen Hämoglobingehalts in differenzierten Zellen (Kap. 4.4.6.5).

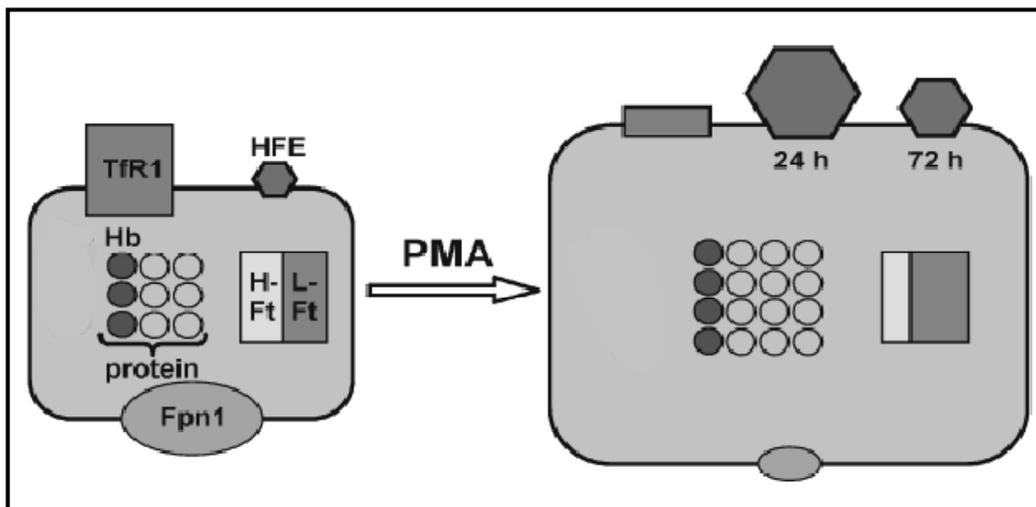
Experimente zur FAC-Überladung der K562-Zellen haben zusätzlich gezeigt, dass auf RNA-Ebene die Expression des Markers der megakaryozytären Differenzierung, CD61, von der Eisenkonzentration in proliferierenden und differenzierenden Zellen unabhängig war (Abb. 4.33). Trotz der starken Expressionssteigerung des CD61-Proteins (als CD41/CD61-Komplex nachgewiesen, Abb. 4.21B), das als Bestandteil des β 3-Integrin-Mobilferrin-Flavin-Monooxygenase-Komplexes in der transferrinunabhängigen Eisenaufnahme involviert ist (Conrad *et al.*, 1996), wurde keine Zunahme der Eisenaufnahme auf diesem Weg festgestellt. Im Gegenteil – die Eisenakkumulation während der megakaryozytären Differenzierung kam infolge der Abnahme der Eisenfreisetzung zustande.

Die Tatsache, dass Mobilferrin an dem Transport des cytosolischen Eisens in Mitochondrien beteiligt ist, impliziert, dass eine hohe CD61-Expression den intrazellulären Transport des akkumulierten Eisens erleichtern könnte. In Mitochondrien finden die wichtigsten Schritte der Hämbiosynthese statt – der erste, die durch ALAS2 katalysierte δ -Aminolävulinsäuresynthese und der letzte, die unter dem Einfluss von FECH ablaufende Inkorporation des Fe^{2+} ins Protoporphyrin-IX-Molekül. Es wird postuliert, dass während der Erythropoese Eisen aus endosomalen Vesikeln nicht ins Cytosol, sondern direkt in die Mitochondrien transportiert wird, was durch den Kontakt zwischen den Membranen beider Organellen ermöglicht wird (Ponka *et al.*, 2002, Zhang *et al.*, 2005). Die starke Reduktion der transferrinabhängigen Eisenaufnahme spricht dafür, dass im Unterschied zur erythroiden Differenzierung während der Megakaryopoese extrem wenige eisenhaltige endosomale Vesikel in Kontakt mit der äußeren mitochondrialen Membran treten. Diese „*kiss and run*“-Hypothese des direkten Eisentransports aus Endosomen in die Mitochondrien ist also während der megakaryozytären Differenzierung unwahrscheinlich.

5.2.2.7 Modell zur Reorganisation des Eisenmetabolismus während der PMA-abhängigen megakaryozytären Differenzierung

Die Rearrangierung des Eisenmetabolismus während der *In-vitro*-Megakaryopoese der K562-Zellen wurde durch die transkriptionale Expressionsregulation der in die Eisenhomeostase involvierten Proteine und die Vergrößerung des cytoplasmatischen Kompartments hervorgerufen. Sie ist in dem in Abb. 5.1 dargestellten Modell gezeigt.

A



B

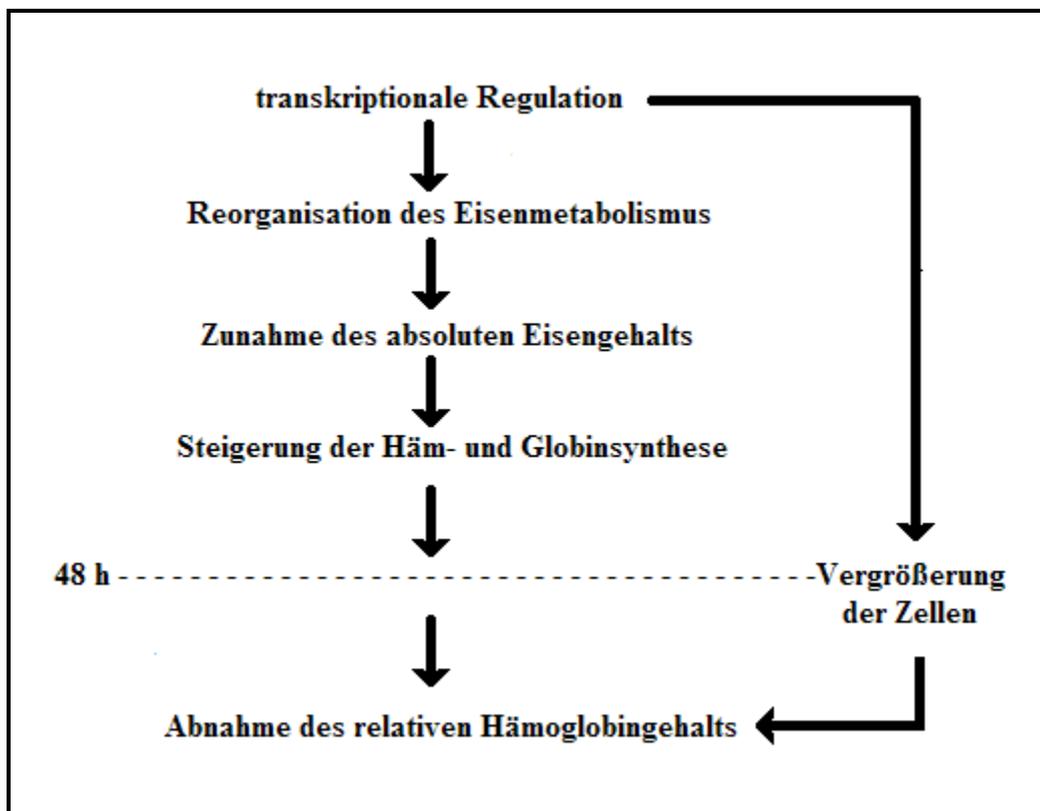


Abb. 5.1: (A) Eisenmetabolismus während 72 Stunden der megakaryozytären Differenzierung der K562-Zellen. Ein transkriptionaler und eisenunabhängiger Mechanismus verursacht die Abnahme der TfR1- und Fpn-1-Expression, die modulierte Zunahme der HFE-Proteinexpression und die L-Ft-Expressionszunahme; H-Ft unterliegt dagegen einer eisenabhängigen Herabregulation. (B) Die rapiden Expressionsveränderungen dieser Proteine führten zur Zunahme des absoluten und relativen Hämoglobingehalts. Erst nach der Steigerung der Protein-synthese und der Vergrößerung des cytosolischen Kompartments nach 48 h der PMA-Stimulation erfolgte die Reduktion des relativen Hämoglobingehalts.

5.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde der Eisenmetabolismus während der PMA-abhängigen megakaryozytären Differenzierung von K562-Zellen umfassend charakterisiert. Die Expression der wichtigsten Proteine, die in die Regulation der intrazellulären Eisenhomeostase involviert sind, wurden in RT-PCRs und Westernblots untersucht. Die Genprodukte, die ausschließlich durch RT-PCR nachgewiesen wurden, sollten nunmehr auch auf der Proteinebene überprüft werden. Besonders wichtig wäre, den Umbau des Ferritinmoleküls, der anhand der Abnahme des H/L-Verhältnisses auf RNA-Ebene während der megakaryozytären Differenzierung postuliert wurde, durch die Verwendung der zu H- und L-Ferritin spezifischen Antikörper auf Proteinebene endgültig zu bestätigen. Um ein Vergleich des Ausmaßes und der Kinetik dieser H- und L-Ferritin-mRNA-Expressionsveränderungen mit den Expressionen der schweren und leichten Ferritinketten (auch unter erhöhter Eisenverfügbarkeit) durchführen zu können, sollte die Quantifizierung dieser Transkripte in *real-time*-RT-PCR erfolgen. Ebenso wichtig wäre die Semiquantifizierung oder Quantifizierung aller Produkte des alternativen Spleißens von Ferroportin und DMT1.

Zur endgültigen Klärung der Rolle von Ferroportin im Prozess der Eisenakkumulation während der megakaryozytären Differenzierung sollte der Einfluss der Überexpression von Ferroportin in K562-Zellen auf den zellulären Eisengehalt in differenzierenden und proliferierenden Zellen untersucht werden.

Aufzuklären sind auch molekulare Mechanismen, die der neu entdeckten Eisenabhängigkeit der Expression von γ -Globin- und FECH-Transkripten in K562-Zellen zugrunde liegen. In Reporterassays könnte die Rolle der Hif-1-Bindungsmotive im Minimalpromotor des FECH-Genes in der eisenabhängigen FECH-Genaktivitätsregulation überprüft werden. Dazu sind neben dem Wildtyp-Minimalpromotor auch die in ortsgerichteter Mutagenese erstellten Hif-1-negativen Mutanten zu untersuchen. Außerdem sollen durch die Analyse der 5'-Mutanten des γ -Globinpromotors oder des LCR der β -Globinengruppe in Reporterassays die Anwesenheit der durch Eisen regulierbaren *cis*-Elemente in diesen Bereichen festgestellt werden.

Es sollen auch begonnene (aber in dieser Arbeit nicht präsentierte) Untersuchungen zur direkten Bestimmung des LIPs mit der Verwendung des Fluoreszeinderivats und Eisenchelators Calcein weitergeführt werden, weil die Konzentrationsveränderungen des freien cytoplasmatischen Eisens während der 72 Stunden langen PMA-Behandlung der K562-Zellen

nur indirekt abgeschätzt wurden. Ebenso sollen Experimente zum Eisenmetabolismus während der mit Staurosporin-induzierten *In-vitro*-Differenzierung der K562-Zellen fortgesetzt werden, um die allgemeine Gültigkeit des anhand des im PMA-abhängigen Prozesses erarbeiteten Modells der Reorganisation des Eisenmetabolismus während der Megakaryopoese (Kap. 5.2.2.7) zu belegen. Diesem Ziel könnten auch Versuche zum Eisenmetabolismus nach der Induktion der Megakaryopoese der primären humanen Erythroblasten gewidmet werden.

Zur Klärung der Rolle von Hepcidin in erythroiden Zellen sollte zunächst dessen Expression auf Proteinebene (Westernblot) bestätigt werden. Weiterhin sind Versuche mit Eisenüberladung durchzuführen, in denen K562- und HepG2-Zellen mit steigenden FAC- oder Ferri-Tf-Konzentrationen kultiviert werden, um die Unterschiede in der Expressionsregulation von Präprohepcidin zwischen den erythroiden Zellen und Hepatozyten festzustellen. In diesem Zusammenhang sollte auch die Eisenkonzentration in K562-Zellen, die Präprohepcidin überexprimieren untersucht werden. Schließlich könnte in Experimenten mit synthetischen Hepcidinpeptiden die Autoregulation der Hepcidinexpression in K562- und eventuell HepG2-Zellen analysiert werden.