

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Eisenmetabolismus der K562-Zellen während der mega-karyozytären Differenzierung und Proliferation charakterisiert. Untersuchungen zum Eisen-metabolismus in proliferierenden K562-Zellen ergaben, dass eine 48-stündige Beladung mit 100  $\mu\text{M}$  Eisenammoniumcitrat solche Expressionsveränderungen der Transferrinrezeptor-1 (TfR1)-, H-Ferritin (H-FT)- und Ferroportin (Fpn1)-mRNA hervorgerufen hat, die dem eisenabhängigen, posttranskriptionalen Feedback-Mechanismus der Regulation der *iron responsive element* (IRE)-tragenden Transkripte entsprachen. Das Fehlen der Eisenregulierbarkeit der L-Ferritin-mRNA unter diesen Bedingungen sowie nach 120 h Beladung mit Ferritransferrin impliziert, dass in K562-Zellen während der Proliferation die Speicherung des aufgenommenen Eisens in der vorzugsweise aus schweren Ferritin-Ketten aufgebauten Ferritinhohlkugel erfolgt. Die unveränderte Expression der Ferroportin-Transkripte nach 120-stündiger Beladung mit Ferritransferrin ist ein Hinweis dafür, dass erst höhere Konzentrationen des freien cytoplasmatischen Eisens (LIP) eine *iron responsive element / iron regulatory protein* (IRE / IRP)-abhängige Ferroportin-mRNA-Expressionsregulation ermöglichen. Hohe Eisenkonzentrationen hatten dagegen keinen Einfluss auf die Expression des Hämochromatoseproteins HFE. Die Überexpression der Präprohepcidin-cDNA in K562-Zellen beeinflusste den Eisenmetabolismus dieser Zellen kaum, was anhand der unveränderten Expression der TfR1-, H-FT-, L-FT- und Fpn1-Transkripte festgestellt wurde. Die Überexpression von Präprohepcidin-cDNA unterdrückte jedoch die endogene Präprohepcidin-mRNA-Expression, was für die Autoregulation der Heparinexpression in erythroiden Zellen spricht. Eine starke Reduktion der Präprohepcidinexpression fand nach 72 Stunden der Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)-abhängigen megakaryozytären Differenzierung der K562-Zellen statt.

Infolge dieses Differenzierungsprozesses, der durch die Zunahme der Expression des megakaryozytären Markers CD61, die Abnahme der Expression des erythroiden Markers  $\gamma$ -Globin und die Zunahme der Acetylcholinesteraseaktivität begleitet wurde, kam es zur umfangreichen Reorganisation des Eisenmetabolismus. Die Veränderungen im zellulären Hämoglobingehalt, die die Ausprägung der erythroiden Eigenschaften während der megakaryozytären Differenzierung widerspiegeln, waren durch Eisengehaltsveränderungen in differenzierenden Zellen begleitet. Die Ursache für den Anstieg des absoluten Eisengehalts lag in der

Reduktion der Eisenfreisetzung, mit der die eisenunabhängige, transkriptionale Ferroportin-mRNA-Herunterregulation korrelierte. Der Einbau der akkumulierten Eisenionen in Hämoglobinmoleküle resultierte in der Zunahme des absoluten Hämoglobingehalts nach 72 Stunden der Stimulation der K562-Zellen mit PMA. Dies wurde dadurch ermöglicht, dass Eisen nicht nur die Heraufregulation der supprimierten Globingene ( $\gamma$ ) hervorgerufen hat, sondern auch die durch die Differenzierung verursachte Expressionssteigerung der Ferrochelatase (FECH)-Transkripte zusätzlich positiv beeinflusste. Wegen der Zunahme der Proteinsynthese und der Vergrößerung des cytoplasmatischen Kompartments infolge des Differenzierungsprozesses wurde jedoch unter niedriger Eisenverfügbarkeit kein Anstieg des relativen Eisengehalts beobachtet. Unter Bedingungen der erhöhten Eisenverfügbarkeit (FAC im Zellkulturmedium) konnte der reduzierte Hämoglobingehalt in differenzierenden K562-Zellen kompensiert werden, was auf die Eisenabhängigkeit des Prozesses der Reduktion der erythroiden Eigenschaften während der *In-vitro*-Megakaryopoese der K562-Zellen hinweist. Weil in differenzierenden Zellen die Eisenregulierbarkeit der H-Ferritin-mRNA festgestellt wurde, spiegelt die festgestellte Suppression der Expression dieser Transkripte gleichzeitig die Abnahme des *labile iron pool* (LIP) wider. Die transkriptionale Heraufregulation der L-Ferritin-mRNA-Expression und die daraus resultierende Abnahme des Ferritin H / L-Verhältnisses auf RNA-Ebene implizieren den Ferritinmolekülbau während des Differenzierungsprozesses.

Die eisenunabhängige und transkriptionale Herunterregulation von TfR1, die transkriptionale Expressionssuppression von TfR2 (Transferrinrezeptor-2) und die modulierte Expressionszunahme von HFE verursachten eine starke Reduktion der transferrinabhängigen Eisenaufnahme. Diese wurde auch durch die Expressionsabnahme der Isoform 1B von *divalent metal transporter-1* (DMT1B) auf RNA-Ebene begleitet. Andere Prozesse, die die Membranpräsenz des TfR1 verändern konnten, wie dessen Shedding oder Einsortierung in die Exosomen, wurden im Zuge der Proteinkinase C (PKC)-Aktivierung während der PMA-abhängigen megakaryozytären Differenzierung nicht beeinflusst. Die Expressionsabnahme der Isoform 1 A von *divalent metal transporter-1* (DMT1A), die an der transferrinunabhängigen Aufnahme von Eisen beteiligt ist, korreliert mit der reduzierten Expression der anderen o. g. Eisentransportproteine, was auf Reduktion des Eisentransports zwischen den Megakaryozyten und deren extrazellulären Umgebung hinweist. Das impliziert weiter, dass das  $\text{Fe}^{3+}$  des Ferritins die wichtigste Quelle des Eisens für metabolische Prozesse in diesen Zellen darstellt.