
**Untersuchungen zur enzymatischen Reduktion und
extrazellulären Freisetzung chelatisierbarer Eisenionen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

— Dr. rer. nat. —

im Fachbereich Chemie

der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Katja Pamp

aus Berlin

2008

Referent: Prof. Dr. Dr. H. de Groot

Korreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. R. Sustmann

Tag der mündlichen Prüfung: 06.08.2008

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2004 bis Februar 2008 am Institut für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

In erster Linie danke ich

Herrn Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot,

dem leitenden Direktor des Institutes für Physiologische Chemie am Universitätsklinikum Essen, für die Bereitstellung einer wissenschaftlichen Arbeitsstelle und die Überlassung des interessanten Themas sowie die vielen wertvollen Ratschläge und Anregungen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die Übernahme des Korreferats danke ich

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Reiner Sustmann

vom Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen.

Besonderer Dank gebührt dem Betreuer meiner Promotion,

Herrn Priv.-Doz. Dr. Frank Petrat,

für sein aufopferungsvolles Engagement während der wissenschaftlichen Begleitung dieser Arbeit, die guten Ideen sowie die fortwährende Geduld und stete Diskussionsbereitschaft.

Danken möchte ich zudem

Frau Dr. rer. nat. Uta Kerkweg,

die mir bei Fragen zum mechanischen Muskeltrauma jederzeit mit Anregungen und Ideen hilfreich zur Seite stand.

Herrn Dr. rer. nat. Hans-Gert Korth

vom Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen danke ich für die Ausführung der ESR-Messungen und die wertvollen Ratschläge.

Ganz besonders danke ich allen Mitarbeitern des Institutes für Physiologische Chemie, die mich während dieser Zeit kollegial in ihrer Mitte aufgenommen haben und mir stets hilfreich zur Seite standen.

Danken möchte ich zudem meiner Familie, die mir diesen beruflichen Weg ermöglicht hat und jederzeit ein offenes Ohr für meine Belange findet.

„Hiermit bestätige ich, die vorliegende Arbeit nur mit den angegebenen Hilfsmitteln und ohne fremde Hilfe angefertigt zu haben.“

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	1
1.1. DER CHELATISIERBARE EISENPOOL	1
1.2. DAS ZYTOTOXISCHE POTENTIAL DES CHELATISIERBAREN EISENPOOLS	3
1.3. DIE (RE-)REDUKTION DES CHELATISIERBAREN EISENS	5
1.3.1. Die (Re-)Reduktion des chelatisierbaren Eisens durch niedermolekulare Reduktionsmittel	6
1.3.2. Die enzymatische (Re-)Reduktion des chelatisierbaren Eisens bei Prokaryonten	7
1.3.3. Die enzymatische (Re-)Reduktion des chelatisierbaren Eisens bei Eukaryonten	8
1.4. DIE PATHOBIOCHEMISCHE BEDEUTUNG DES EXTRA-ZELLULÄREN CHELATISIERBAREN EISENS	10
1.4.1. Das mechanische Trauma der Skelettmuskulatur	11
1.5. PROBLEMSTELLUNG	12
2. ERGEBNISSE.....	14
2.1. REDUKTION CHELATISIERBARER FE(III)-IONEN DURCH ISOLIERTE ZELLORGANELLEN DER RATTENLEBER	14
2.1.1. Reinheit der isolierten Zellfraktionen	14
2.1.2. Reduktion von Fe(III) durch die isolierten Zellorganellen in Ab- und Anwesenheit von NAD(P)H	16
2.1.3. Einfluss der Mitochondrien und Mikrosomen auf das Elektronenspinresonanz-Signal (ESR-Signal) des Fe(III)-ATP-Komplexes	18
2.1.4. Fe(III)-Reduktionskapazität der einzelnen Leberorganellen unter Berücksichtigung ihrer intrazellulären Verhältnisse	20
2.2. CHARAKTERISIERUNG DES NADH-ABHÄNGIGEN FE(III)-REDUKTASESYSTEMS DER LEBERMITOCHONDRIEN	24
2.2.1. Einfluss von niedermolekularen Reduktionsmitteln auf die mitochondriale, NADH-abhängige Fe(III)-Reduktion	24
2.2.2. Einfluss von 4,5-Dihydroxyanthrachinon (Rhein) auf die mitochondriale, NADH-abhängige Fe(III)-Reduktion	25
2.2.3. Untersuchungen zur mitochondrialen Oxidation von NADH und NADPH	26
2.2.4. Kinetische Eigenschaften und Vergleich der mitochondrialen NADH- und NADPH-abhängigen Fe(III)-Reduktion	29
2.2.5. Lokalisation des enzymatischen Fe(III)-Reduktasesystems der Mitochondrien	31
2.2.5.1. Funktionelle Integrität der isolierten Mitochondrien	31
2.2.5.2. Beteiligung von Enzymen der mitochondrialen Atmungskette an der NADH-abhängigen Reduktion von Fe(III)	32
2.2.5.3. Reduktion von Fe(III) durch die submitochondrialen Fraktionen	34
2.2.6. Intramitochondriale Aufnahme von Fe(II) während der mitochondrialen Fe(III)-Reduktion	37

2.3. REDUKTION CHELATISIERBARER FE(III)-IONEN DURCH ISOLIERTE MITOCHONDRIEN AUS DER SKELETTMUSKULATUR DER RATTE	38
2.4. FREISETZUNG VON CHELATISIERBAREM EISEN NACH MECHANISCHEM MUSKELTRAUMA	40
2.4.1. Detektion chelatisierbaren Eisens im Muskelhomogenat	40
2.4.2. Gesamteisengehalt im Muskelgewebe	43
2.4.3. Bindung chelatisierbaren Eisens an physiologische Liganden des Muskelgewebes	44
2.4.4. Detektierbarkeit von Häm-Eisen des Myoglobins und von Ferritin-Eisen mittels Phen Green SK	46
2.4.5. Bildung Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen (TBARS) im Muskelhomogenat	48
2.4.6. Einfluss von Apo- und Holotransferrin auf die detektierbare Konzentration chelatisierbaren Eisens	49
3. DISKUSSION.....	51
3.1. DIE KAPAZITÄT DER ZELORGANELLEN ZUR REDUKTION CHELATISIERBARER FE(III)-IONEN	51
3.2. DER MECHANISMUS DER NADH-ABHÄNGIGEN REDUKTION CHELATISIERBARER FE(III)-IONEN DURCH DIE MITOCHONDRIEN	53
3.2.1. Fe(III)-Reduktion: Ein ausschließlich enzymatischer Prozess oder sind niedermolekulare Reduktionsmittel beteiligt?	53
3.2.2. Beteiligung der Atmungskettenenzyme an der mitochondrialen Reduktion chelatisierbarer Fe(III)-Ionen	55
3.2.3. Identifizierung des an der mitochondrialen Fe(III)-Reduktion beteiligten Enzymsystems	57
3.3. DIE (PATHO-)PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER MITOCHONDRIALEN REDUKTION CHELATISIERBARER FE(III)-IONEN	59
3.4. DIE EXTRAZELLULÄRE FREISETZUNG CHELATISIERBARER EISENIONEN INFOLGE EINES MECHANISCHEN MUSKELTRAUMAS	62
3.4.1. Freigesetzte, chelatisierbare Eisenionen im Muskelhomogenat	62
3.4.2. Das toxische Potential des freigesetzten, chelatisierbaren Eisens	64
3.4.3. Die potentiell pathophysiologische Bedeutung des infolge eines mechanischen Muskeltraumas ins Blutgefäßsystem freigesetzten chelatisierbaren Eisens	66
4. ZUSAMMENFASSUNG.....	67
5. MATERIAL UND METHODEN.....	69
5.1. MATERIAL	69
5.1.1. Chemikalien	69
5.1.2. Materialien & Geräte	70
5.1.3. Versuchstiere	71

5.2. METHODEN	72
5.2.1. Isolation der Zellorganellen aus der Rattenleber	72
5.2.1.1. Isolation der Mitochondrien	72
5.2.1.2. Subfraktionierung der Mitochondrien	73
5.2.1.3. Isolation der Mikrosomen und des Cytosols	73
5.2.1.4. Isolation der Zellkerne	74
5.2.2. Isolation der Mitochondrien aus dem <i>Musculus gastrocnemius</i> der Ratte	74
5.2.3. Bestimmung des Proteingehaltes der isolierten Zellfraktionen	75
5.2.4. Bestimmung der Reinheit der isolierten Zellfraktionen	75
5.2.4.1. Bestimmung der Aktivität von Glutamat-Dehydrogenase und Fumarase als Markerenzyme der Mitochondrien	76
5.2.4.2. Bestimmung der Aktivität von NADH-Cytochrom- <i>c</i> -Reduktase als Markerenzym der äußeren Mitochondrienmembran	77
5.2.4.3. Bestimmung der Aktivität von Glucose-6-Phosphatase als Markerenzym für die Mikrosomen	77
5.2.4.4. Bestimmung der Aktivität von Lactat-Dehydrogenase als Markerenzym für das Cytosol	78
5.2.4.5. Detektion der Zellkerne mittels Laser-Scanning-Mikroskopie	78
5.2.5. Funktionelle Integrität und Lyse der isolierten Lebermitochondrien	78
5.2.5.1. Bestimmung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs	78
5.2.5.2. Lyse der Lebermitochondrien	79
5.2.6. Nachweis der durch die isolierten Zellfraktionen vermittelten Fe(III)-Reduktion	79
5.2.6.1. Herstellung des Fe(III)-ATP-Komplexes	79
5.2.6.2. Bestimmung der durch die Organellen bzw. die submitochondrialen Fraktionen vermittelten Fe(III)-Reduktion und NAD(P)H-Oxidation mittels Spektrophotometrie	79
5.2.6.3. Bestimmung der durch die Mitochondrien und Mikrosomen der Leber vermittelten Fe(III)-Reduktion mittels Elektronenspinresonanz-Spektrometrie (ESR-Spektrometrie)	81
5.2.7. Bestimmung der mitochondrialen Fe(II)-Aufnahme	82
5.2.8. Freisetzung von chelatisierbarem Eisen aus mechanisch zerstörtem Muskelgewebe	83
5.2.8.1. Herstellung des Muskelhomogenats	83
5.2.8.2. Bestimmung des chelatisierbaren Eisens im Muskelhomogenat mittels Laser- Scanning-Mikroskopie	83
5.2.8.3. Bestimmung des Gesamteisens mittels Atomabsorptionsspektrometrie (ASS)	85
5.2.8.4. Nachweis Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen	85
5.2.9. Statistik	86
 6. LITERATURVERZEICHNIS.....	 87
 7. ANHANG.....	 102
7.1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	102
7.2. VERÖFFENTLICHUNGEN IM RAHMEN DIESER ARBEIT	103
7.3. WEITERE VERÖFFENTLICHUNGEN	103
7.4. LEBENS LAUF	105

1. EINLEITUNG

1.1. DER CHELATISIERBARE EISENPOOL

Eisen ist nach Aluminium das zweithäufigste Metall der Erdkruste und wird von nahezu allen lebenden Organismen (mit Ausnahme von *Lactobacillus* und einigen Stämmen von *Bacillus*) als essentielles Spurenelement benötigt. Die Funktion zahlreicher Proteine und Enzyme ist an die intramolekulare Präsenz von Eisenionen geknüpft. Schlüsselreaktionen im Energiestoffwechsel werden von einer Vielzahl eisenhaltiger Proteine katalysiert. Unter anderem spielen Eisenionen eine wichtige Rolle im Transport, der Speicherung und Aktivierung von molekularem Sauerstoff, beim Abbau von Peroxiden, während der DNA-Synthese sowie als Überträger von Elektronen.

Auf Grund seiner essentiellen Bedeutung mussten die Organismen während ihrer Phylogenese geeignete Assimilationsverfahren für die Aufnahme von Eisen entwickeln. Während viele einzellige Lebewesen starke Fe^{3+} -Chelatoren (sogenannte Siderophoren) in das extrazelluläre Milieu freisetzen, um die unlöslichen Eisenoxide in Form von Ferrisiderophoren rezeptorvermittelt assimilieren zu können, müssen mehrzellige Organismen Eisen mit der Nahrung aufnehmen, resorbieren und zu den verschiedenen Zellen im Organismus transportieren. Als Transportprotein für Eisen im Serum dient Transferrin, das in seiner Apo-Form (Apotransferrin = eisenfreies Transferrin) pro Molekül zwei Atome dreiwertiges Eisen aufnehmen kann, wenn die gleichzeitige Bindung von zwei Bicarbonatmolekülen gewährleistet ist. Unter physiologischen Bedingungen liegt die Eisensättigung des Transferrins bei nur ca. 30%, so dass die resorbierten Eisenionen im Serum jederzeit an Transferrin gebunden werden können [1, 2]; vor der Ausschleusung des Eisens aus der Mukosazelle werden die Fe^{2+} -Ionen durch eine kupferabhängige Ferroxidase zu Fe^{3+} oxidiert, sodass kein „freies“ (ungebundenes) Fe^{2+} im Serum vorliegt.

Nach dem Transport in der Blutbahn bindet das mit Eisen beladene Transferrinmolekül an einen spezifischen Rezeptor auf der Oberfläche von Zellen und der dadurch entstandene Transferrin/Rezeptor-Komplex wird unter Ausbildung eines Endosoms in das Zellinnere entlassen (= rezeptorvermittelte Endozytose). Im Inneren des Endosoms kommt es, ausgelöst durch ATP-betriebene Protonenpumpen, zu einer Abnahme des pH-Wertes in den sauren Bereich (pH 5 – 6), wodurch die Affinität des Transferrins für Fe^{3+} stark abnimmt. Anschließend reduziert eine noch nicht näher identifizierte Ferrireduktase Fe^{3+} zu Fe^{2+} , das

mit Hilfe des divalenten Metalltransporters DMT-1 durch die endosomale Membran freigesetzt wird [3, 4]. Diese ins Cytosol entlassenen Eisenionen wie auch die intrazellulär aus Speicherproteinen freigesetzten Eisenionen repräsentieren einen sogenannten labilen Übergangspool, von dem aus die Metallionen rasch in eisenhaltige Funktionsproteine, wie z.B. die mitochondrialen Hämproteine (Häm-Eisen der Cytochrome) oder in das Eisenspeicherprotein Ferritin, eingebaut werden [4-6]. Somit ist der weitaus größte Anteil des zellulären Eisens fest in Proteinen gebunden, die über alle Kompartimente der Zelle verteilt sind.

Nur ein kleiner Teil des gesamtzellulären Eisens (0,2 – 3%) gehört zum Übergangspool [7-12], wobei dieses labile Eisen komplexgebunden an niedermolekulare, organische Chelatoren (= Liganden; L) mit einer geringen Affinität für Eisenionen wie Citrat, Aminosäuren, Kohlenhydrate, Ascorbinsäure, Adenosin-5'-diphosphat (ADP), Adenosin-5'-triphosphat (ATP) und anderen Nucleotiden oder locker assoziiert an Proteine oder (Membran-) Lipide vorliegt [5, 6, 9, 13-18]. Das labile Eisen wird aufgrund seiner Eigenschaften (siehe 1.2.) auch als redox-aktives bzw. katalytisch-aktives Eisen bezeichnet [9, 17, 19, 20]. In neueren Studien wird jedoch hauptsächlich der Terminus „chelatisierbar“ verwendet, da die Charakterisierung dieses Übergangspools am besten durch eisenchelatisierende Detektormoleküle realisiert werden kann [5, 9, 12]. Bisher wurden unter anderem 1,10-Phenanthrolin, Bleomycin, 2,2'-Dipyridyl (2,2'-DPD), Nitrioltriessigsäure (NTA) sowie einige fluoreszierende Eisenchelatoren wie Phen Green SK (PG SK), Calcein und an Desferrioxamin gekoppeltes Fluoreszein für die Detektion chelatisierbarer Eisenionen verwendet [5, 13, 14, 20-25]. Obwohl lange Zeit von einem ausschließlich cytosolischen Pool chelatisierbaren Eisens ausgegangen wurde, konnte in mehreren Studien dieses Eisen auch in anderen Zellkompartimenten nachgewiesen werden. Während im Cytosol von isolierten Leberzellen mit Hilfe des Fluoreszenzindikators PG SK $5,8 \pm 2,6 \mu\text{M}$ (in Hepatozyten) bzw. $7,3 \pm 2,6 \mu\text{M}$ (in Endothelzellen) chelatisierbares Eisen detektiert wurden, konnten auch in den Mitochondrien, den Zellkernen sowie in den Lysosomen/Endosomen chelatisierbare Eisenionen nachgewiesen werden [5, 26-28].

Der chelatisierbare Eisenpool der Zelle ist nicht als statische Größe anzusehen, sondern befindet sich in einem streng regulierten, dynamischen Fließgleichgewicht [9]. Seine Konzentration wird zum einen durch die Eisenaufnahme über den Transferrin/Rezeptor-Komplex und zum anderen über den Eiseneinbau in das Eisenspeicherprotein Ferritin bzw. die Freisetzung aus diesen geregelt. Die Regulation erfolgt auf posttranskriptionaler Ebene, wobei die messenger-RNA (mRNA) Sequenzen enthält, sogenannte „iron responsive

elements" (= IREs), die sowohl für die Bildung des Transferrinrezeptors als auch für die Bildung von Ferritin kodieren [4, 6, 9]. Sowohl ein erhöhter Eisenverbrauch (infolge hoher Biosyntheseraten eisenhaltiger Proteine) als auch eine unzureichende Eisenaufnahme kann zu intrazellulärem Eisenmangel führen, der sich in der Abnahme des chelatisierbaren Eisenpools manifestiert. Die Verringerung dieses Pools wird von eisenregulierenden Proteinen, sogenannten „iron regulating proteins“ (= IRPs) oder neuerdings auch als „iron responsive element binding proteins“ (IRE-BPs) bezeichnet, erkannt, die daraufhin an die IREs der mRNA binden und die Expression des Transferrinrezeptorgens durch Stabilisierung der mRNA fördern [4, 6]. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Aufnahme Transferrin-gebundenen Eisens in die Zelle. Gleichzeitig wird durch die Bindung der IRE-BPs an die mRNA die Translation der Sequenz in das Protein Ferritin verhindert. Im Gegensatz zur Mangelsituation führt ein Eisenüberangebot zu einer Erhöhung des chelatisierbaren Eisenpools, wodurch die IRE-BPs nicht mehr an die mRNA-Sequenz binden können. Das stoppt die Transferrinrezeptorbildung und führt zu einer vermehrten Ferritinproduktion und dadurch zu einer Abnahme des chelatisierbaren Eisens im Cytosol.

Da der Eisen-Schwefel-Cluster der IRE-BPs auf die Verfügbarkeit von cytosolischem, chelatisierbarem Eisen reagiert, regulieren diese Proteine nicht nur die Konzentration des chelatisierbaren Eisenpools, sondern werden auch selbst durch dieses Eisen reguliert [5, 29]. Durch die strenge Regulation des intrazellulären, chelatisierbaren Eisenpools wird zum einen die Aufrechterhaltung der Biosynthese eisenhaltiger Funktionsproteine gewährleistet, aber andererseits auch einer potentiell gefährlichen Erhöhung der chelatisierbaren Eisenkonzentration, deren Auswirkungen im Nachfolgenden beschrieben werden, entgegengewirkt [9].

1.2. DAS ZYTOTOXISCHE POTENTIAL DES CHELATISIERBAREN EISEN-POOLS

Die biologische Bedeutung von Eisen ist vorwiegend seiner chemischen Eigenschaft als Übergangsmetall zuzuschreiben, d.h. Eisen kann verschiedene Oxidationsstufen (von -II bis +VI) annehmen, wobei Fe(II) und (vor allem) Fe(III) am häufigsten vorkommen [4, 30]. Das Standardredoxpotential des $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -Übergangs in Wasser beträgt +0,77 V [30]. In Abhängigkeit von den jeweiligen Bindungspartnern des $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -Paares können die Redoxpotentiale jedoch stark variieren und reichen von -1 V bis +1 V [30]. So kann Eisen leicht Ein-Elektronen-Redox-Reaktionen zwischen den beiden Wertigkeitsstufen II und III

eingehen, eine Voraussetzung für viele Eisen-vermittelte, physiologische Prozesse [4]. Auf der anderen Seite erklärt diese chemische Eigenschaft jedoch auch das hohe zytotoxische Potential des chelatisierbaren Eisens, denn im Unterschied zu dem fest in Speicher- und Funktionsproteinen eingebauten Eisen kann chelatisierbares Eisen mit einem Redoxpotential niedriger als +460 mV die Bildung von hochreaktiven Hydroxylradikalen ($\cdot\text{OH}$) aus Wasserstoffperoxid (H_2O_2) vermitteln (Gleichung 1; [17, 20, 30]).



Zusätzlich wird diskutiert, dass chelatisierbare Eisenionen auch die Bildung reaktiver Eisen-Sauerstoff-Komplexe (Ferryl-Spezies) initiieren können (Gleichung 2; [31, 32]).



Der Reaktionspartner H_2O_2 wird in biologischen Systemen vorwiegend durch die spontane oder enzymkatalysierte (durch Superoxid-Dismutase, SOD) Dismutation von Superoxid-anionradikalen ($\text{O}_2^{\cdot-}$), die vor allem als Nebenprodukte der mitochondrialen Respiration anfallen, gebildet. Verschiedene Oxidasen, wie z.B. die Xanthin-Oxidase, können jedoch auch auf direktem Weg Wasserstoffperoxid produzieren. Während H_2O_2 und $\text{O}_2^{\cdot-}$ kaum bzw. sehr langsam mit biologischen Molekülen reagieren, sind Hydroxylradikale und Eisen-Sauerstoff-Komplexe hochreaktive Spezies, die, in Abhängigkeit von den Konzentrationsverhältnissen der Reaktanten Fe^{2+} , H_2O_2 und O_2 , entweder aus H_2O_2 oder molekularem Sauerstoff hervorgehen [32]. Im Gegensatz zu den Ferryl-Spezies, deren genaue Charakterisierung bislang noch aussteht, ist das Hydroxylradikal vergleichsweise gut untersucht und auch weiterhin Gegenstand intensiver Forschung. Aufgrund seiner hohen Reaktivität kann es nahezu diffusionskontrolliert und deshalb in unmittelbarer Nähe seines Entstehungsortes mit praktisch jedem biologischen Molekül abreagieren (Ortsspezifität der Hydroxylradikalreaktion; [17, 33]). Durch diese oxidativen Vorgänge kommt es zu umfangreichen Schädigungen biologischer Strukturen, die zu kompletten Funktionsausfällen führen können. So ist bekannt, dass hochreaktive, eisenabhängig gebildete Sauerstoffspezies viele zellschädigenden Prozesse wie die Lipidperoxidation, Proteinoxidationen, DNA-Strangbrüche, Basenmodifikationen und apoptotische Vorgänge initiieren bzw. vermitteln, die letztlich zur Pathogenese zahlreicher Erkrankungen wie der Hämochromatose, Thalassämie, Leberzirrhose, Arteriosklerose, Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer sowie zur Bildung

von Tumoren beitragen [6, 17, 20, 31, 32, 34-37]. Aber auch unter vielen pathologischen Bedingungen, wie z.B. Hypoxie, Hypothermie, Ethanol-Intoxikation, Nahrungsmangel, Ischämie- und Reperfusion, wird oxidativer Stress durch die eisenabhängige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ausgelöst [11, 17, 37-41]. Unter oxidativem Stress wird in diesem Zusammenhang ein zellschädigender Prozess verstanden, der aus einer über das physiologische Maß hinausgehenden Konzentrationserhöhung an ROS resultiert, die die antioxidative Kapazität des Organismus übersteigt.

Während früher generell davon ausgegangen wurde, dass die eisenabhängige Bildung von ROS ausschließlich auf der Zunahme der O_2^-/H_2O_2 -Konzentration basiert, ist nach dem heutigen Wissensstand Konsens, dass auch die pathologische Konzentrationszunahme des chelatisierbaren Eisens eine entscheidende Rolle in der Entstehung zahlreicher oxidativer Prozesse spielt [11, 17, 37-43]. Für die unter pathophysiologischen Bedingungen beobachtete Erhöhung des chelatisierbaren Eisenpools werden in der Literatur mehrere Gründe diskutiert: Zum einen wird von einer erhöhten H_2O_2 -Konzentration ausgegangen, die zum Abbau von Häm-Proteinen und damit zur Freisetzung des Protoporphyrin-Eisens führt [17]. Zum anderen wird auf eine erhöhte O_2^- -Konzentration verwiesen, die durch reduktive Prozesse zur Mobilisierung von Eisen aus Ferritin führt [17, 35, 37]. In neueren Versuchen mit kultivierten Hepatozyten und Leberendothelzellen konnte zudem gezeigt werden, dass unter den Bedingungen der in der Transplantationsmedizin üblichen Organkonservierung durch Kaltlagerung (Hypothermie) Zellschädigungsprozesse auftreten, die auf eine messbare Erhöhung des intrazellulären, chelatisierbaren Eisenpools zurückzuführen sind, dem jedoch keine Zunahme der zellulären O_2^-/H_2O_2 -Konzentration vorausgeht [44, 45].

1.3. DIE (RE-)REDUKTION DES CHELATISIERBAREN EISENS

Intrazellulär muss ein gewisser Anteil des labilen Eisenpools in der reduzierten Form (Fe^{2+}) vorliegen, da diese die Basis für viele metabolische Prozesse, wie z.B. die mitochondriale Hämsynthese, darstellt (siehe 1.1.). Somit ist die Präsenz reduzierender Reaktionspartner (= Reduktionsmittel) für die chelatisierbaren Eisen(III)-Ionen in der Zelle unerlässlich. Das Vorkommen intrazellulärer Reduktionsmittel hat jedoch auch Auswirkungen auf die radikalgenerierenden Reaktionen, da diese ebenfalls durch zweiwertige Eisenionen vermittelt werden, wobei im Zuge der radikalischen Reaktion das Eisen wieder oxidiert und in seine dreiwertige Form überführt wird (siehe 1.2.; [5, 17, 46]). Die Toxizität des chelatisierbaren

Eisens ist daher erheblich davon abhängig, wie schnell es durch intrazelluläre Reduktionsmittel (re-)reduziert wird und somit vom „Redox-Cycling“, d.h. dem schnellen Wertigkeitswechsel zwischen Eisen(III) und Eisen(II) (Abb. 1). Eine Beschleunigung des „Redox-Cyclings“ reaktiver Eisenionen verstärkt deutlich die eisenvermittelten Schädigungen von Biomolekülen und Zellen, was in zahlreichen Studien gezeigt werden konnte [47-55]. Umso erstaunlicher ist es, dass über die in Frage kommenden intrazellulären Reduktionsmittel immer noch äußerst kontrovers diskutiert wird.

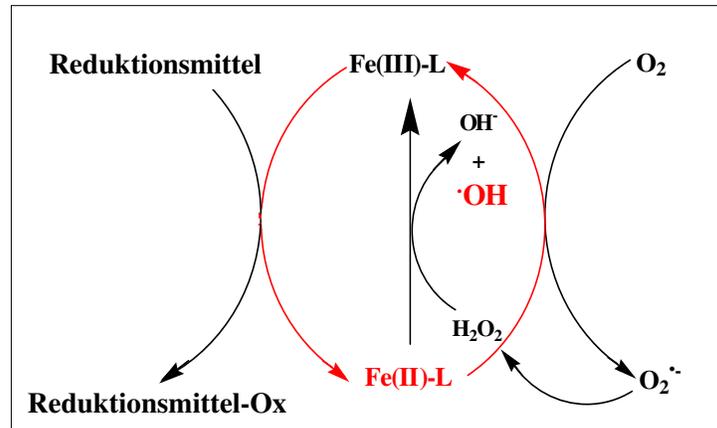


Abb. 1: Das „Redox-Cycling“ chelatisierbarer Eisenionen; L = Ligand, Reduktionsmittel-Ox. = oxidiertes Reduktionsmittel.

1.3.1. Die (Re-)Reduktion des chelatisierbaren Eisens durch niedermolekulare Reduktionsmittel

In früheren Studien wurde angenommen, dass ausschließlich niedermolekulare, organische Moleküle für die Reduktion des dreiwertigen Eisens verantwortlich sind. Vor allem das Superoxidationradikal wird von vielen Autoren als das entscheidende Reduktionsmittel für Fe^{3+} -Ionen angesehen (Gleichung 3; [17, 20, 32, 36, 56-58]).

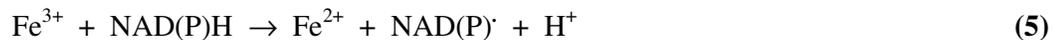


Auch die Beteiligung der zellulären Antioxidantien Glutathion und Ascorbinsäure (AscH^- ; Gleichung 4) am Eisen(III)-Reduktionsprozess wird mehrfach diskutiert [17, 50, 59].



AscH^{\cdot} = Ascorbyl-Radikal

Weitere Studien, durchgeführt mit *Escherichia coli*, kultivierten Zellen (L929-Mausfibroblasten) sowie in zellfreien Systemen, ergaben, dass die Pyridin-Nucleotide Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) und Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat (NADPH) als monovalente, niedermolekulare Reduktionsmittel für Fe(III)-Ionen fungieren können, indem sie ihre Elektronen sukzessiv auf dreiwertige Eisenionen übertragen (Gleichung 5 und 6; [17, 31, 36, 50, 57, 60]).



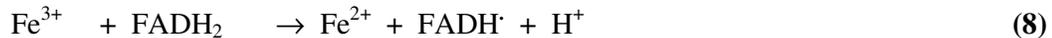
Zudem kommen einige Autoren zu dem Schluss, dass die Pyridin-Nucleotide auch auf indirektem Weg die Reduktion von Fe(III)-Ionen fördern können, indem sie den Redoxstatus von Ascorbinsäure und Glutathion aufrechterhalten [50, 61-63]. So ist beispielsweise NADPH ein Coenzym der Glutathion-Reduktase, die oxidiertes Glutathion (re-)reduzieren kann. Die reduzierte Form des Glutathions wiederum ist in der Lage, Ascorbinsäure durch Reduktion von Dehydroascorbinsäure zu regenerieren, womit beide zellulären Antioxidantien zur erneuten Reduktion von chelatisierbaren Eisen(III)-Ionen zur Verfügung stehen.

In weiteren Arbeiten wird allerdings angezweifelt, ob tatsächlich die „klassischen“ Reduktionsmittel wie Ascorbinsäure, Glutathion, O_2^- und NAD(P)H für die intrazelluläre (Re-)Reduktion des metabolisch und redox-aktiven Eisens verantwortlich sind [52, 64-66]. In diesem Zusammenhang konnte sowohl in Pro- als auch in Eukaryonten eine Beteiligung von zahlreichen Enzymen bzw. Enzymsystemen an dem Eisen(III)-Reduktionsprozess nachgewiesen werden.

1.3.2. Die enzymatische (Re-)Reduktion des chelatisierbaren Eisens bei Prokaryonten

Cox et al. demonstrierten in ihren Untersuchungen, dass im Cytoplasma von *Pseudomonas aeruginosa* zwei nicht näher identifizierte Ferrireduktasen die Reduktion von Fe(III)-Citrat und Ferrisiderophoren vermitteln, wobei NADH als primärer Elektronendonator fungiert [67]. In weiteren, an Bakterien durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass die Reduktion verschiedener physiologischer Eisenkomplexe durch lösliche Flavin-Reduktasen vermittelt wird [52, 68-70]. Diese sogenannten NAD(P)H-Flavin-Oxidoreduktasen katalysieren die NAD(P)H-abhängige Reduktion von freien Flavinen, Flavin-Mononucleotiden (FMN),

Flavin-Adenin-Dinucleotiden (FAD) und Riboflavinen, die als Produkte freigesetzt werden und anschließend Eisen(III)-Komplexe reduzieren können (Gleichung 7 und 8; [52, 68-70]).



* = NAD(P)H-Flavin-Oxidoreduktase

Zudem schlussfolgerten Daily et al. aus ihren Untersuchungen an Membranfraktionen des Bakterienstammes *Spirillum itersonii*, dass die Reduktion von Eisen(III)-Citrat mit dem Elektronentransport der Atmungskette in Verbindung steht [71]. Da den Prokaryonten einige niedermolekulare Reduktionsmittel, wie z.B. die Ascorbinsäure fehlen, kann davon ausgegangen werden, dass die Reduktion von Eisenionen in Einzellern generell auf enzymatischem Weg durch die NAD(P)H-Flavin-Oxidoreduktasen erfolgt.

1.3.3. Die enzymatische (Re-)Reduktion des chelatisierbaren Eisens bei Eukaryonten

Bei den Eukaryonten wird die enzymatische (Re-)Reduktion der Eisenionen vorwiegend von membranständigen Flavoenzymen vermittelt, die viele strukturelle Übereinstimmungen mit Cytochromen des b-Typs aufweisen und Flavine als kovalent gebundene prosthetische Gruppe besitzen. So konnte in umfangreichen Arbeiten an Hefepilzen gezeigt werden, dass die für die Aufnahme in die Zelle erforderliche Reduktion der extrazellulären Eisen(III)-Komplexe durch eine Ferrireduktase, die mit der Plasmamembran assoziiert ist, vermittelt wird [72-75]. Neben einer zusätzlich im Cytosol der Hefezellen nachgewiesenen Ferrireduktaseaktivität, konnte auch in den Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* eine NADH-abhängige enzymatische Reduktion chelatisierbarer Eisen(III)-Komplexe detektiert werden [75]. Die dafür verantwortliche NADH-Flavo-Oxidoreduktase ist auf der cytosolischen Seite der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert und oxidiert somit, im Gegensatz zur NADH-Dehydrogenase des Komplex I der Atmungskette, cytosolisches NADH [72, 75]. Eine vergleichbare „externe“ NADH-Flavo-Oxidoreduktase der inneren Mitochondrienmembran wurde auch für pflanzliche Zellen beschrieben [76].

In den Zellen von Säugetieren wurden Ferrireduktaseaktivitäten vor allem in den Mikrosomen nachgewiesen. Mikrosomen sind während der Zellfraktionierung entstandene membranbegrenzte Vesikel, die aus Fragmenten des endoplasmatischen Retikulums (ER)

bestehen [77, 78]. Sie kommen in dieser Form zwar nicht in Eukaryontenzellen vor, können aber für die Untersuchung ER-gebundener Enzyme genutzt werden. So besitzen die aus Leberzellen isolierten Mikrosomen zwei Elektronentransport-Systeme: 1. ein NADH-abhängiges System bestehend aus NADH-Cytochrom- b_5 -Reduktase [EC 1.6.2.2], Cytochrom b_5 und einer Fettsäure-Desaturase [EC 1.14.99.5] sowie 2. einen NADPH-abhängigen Enzymkomplex bestehend aus NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase [EC 1.6.2.4] und Cytochrom P450 [54, 55, 79, 80]. Beide Enzymsysteme katalysieren die Reduktion von natürlich vorkommenden labilen Eisen(III)-Komplexen, wie z.B. Fe(III)-ATP, Fe(III)-Ammoniumsulfat, Fe(III)-Histidin, Fe(III)-Citrat, aber auch von artifiziellen Eisenchelaten wie Fe(III)-Ethylendiamintetraessigsäure (Fe(III)-EDTA) und Fe(III)-Diethylentriaminpentaessigsäure (Fe(III)-DTPA; [54, 55, 80]). In der Membran von Zellkernen konnten ähnliche Flavoenzymsysteme identifiziert werden, die ebenfalls die Reduktion chelatisierbaren Eisens vermitteln ([48, 49, 81]. SCHEIBER *et al.* berichteten von einer Ferrireduktase in der endosomalen Membran, die bevorzugt NADH als Elektronendonator verwendet, jedoch noch nicht näher klassifiziert wurde (siehe 1.1.; [65]). Zudem wurde in *in vitro* Experimenten mit isolierten Flavoenzymen wie der Lipoyl-Dehydrogenase, der Glutathion-Reduktase und der Cytochrom-*c*-Reduktase gezeigt, dass diese Enzyme die NAD(P)H-abhängige Ein-Elektronen-Reduktion von Fe(III)-Citrat, Fe(III)-ADP und Fe(III)-ATP sehr effektiv katalysieren können [64].

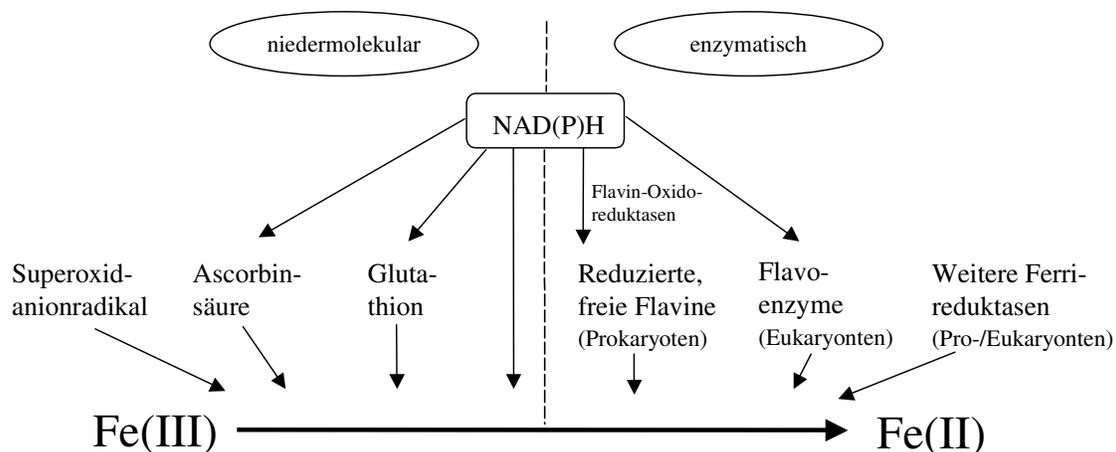


Abb. 2: Reduktionsmittel, die hauptsächlich für die intrazelluläre Reduktion von Fe^{3+} -Ionen verantwortlich gemacht werden.

Trotz dieser zahlreichen Studien ist die Frage nach dem/den dominierenden Reduktionsmittel/n (niedermolekular *versus* enzymatisch) für die (Re-)Reduktion von chelatisierbaren Eisenionen in Säugetierzellen weiterhin offen (Abb. 2), was angesichts der hohen pathophysiologischen Bedeutung des „Redox-Cyclings“ chelatisierbaren Eisens erstaunlich ist.

1.4. DIE PATHOBIOCHEMISCHE BEDEUTUNG DES EXTRAZELLULÄREN CHELATISIERBAREN EISENS

Im Hinblick auf die eisenabhängige, durch ROS vermittelte Pathogenese zahlreicher Erkrankungen (siehe 1.2.) wird auch die Beteiligung von extrazellulärem, chelatisierbarem und redox-aktivem Eisen diskutiert, dass im Zuge von Verletzungen freigesetzt werden kann oder dessen Vorkommen im Serum auf Gen-Defekten beruht. So konnte bei einigen erblichen Eisenspeicherkrankheiten, wie z.B. der Hämochromatose, eine erhöhte Konzentration chelatisierbaren Eisens im Blutplasma detektiert werden, die auf einer abnorm hohen Eisenresorption durch den Darm beruht und die Aufnahmekapazität des Transferrins für Eisenionen übersteigt [6, 56, 82, 83]. Unter diesen Bedingungen kommt es zur Ablagerung des Eisens in der Leber, Bauchspeicheldrüse, Hypophyse, im Herz und anderen Organen sowie in den Gelenken, wodurch sich bei unbehandelten Patienten verschiedene Erkrankungen, wie z.B. eine Leberzirrhose, Leberkarzinome, Diabetes und Bauchspeicheldrüsenkrebs, ausbilden können [6, 56, 83]. Für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen wird die stark beschleunigte Oxidation von Low-Density-Lipoproteinen in den Gefäßwänden verantwortlich gemacht, die durch eine erhöhte Konzentration redox-aktiver Eisenionen im Serum, freigesetzt aus zerstörten arteriellen Gefäßwänden, vermittelt wird und unter anderem zu Arteriosklerose führen kann [84, 85]. Auch in der Gelenkflüssigkeit von arthritischen Patienten konnten „freie“ Eisenionen nachgewiesen werden [86]. Zudem führen Schädigungen des Gehirns und Verletzungen des Rückenmarks, die durch exogene, mechanische Einwirkungen (= stumpfes Trauma, mechanisches Trauma) hervorgerufen wurden, zur Freisetzung von Eisenionen aus den Zellen des zerstörten Gewebes in die umgebende Extrazellularflüssigkeit [17, 87].

Nach der experimentellen Induktion von Gewebetraumata bei Ratten wurden reaktive Sauerstoffspezies [88, 89] und Ascorbyl-Radikale [90] im Extrazellularraum des verletzten Gewebes gefunden, was auf das Vorkommen von extrazellulären, redox-aktiven Eisenionen

schließen lässt [88, 89]. In Übereinstimmung mit diesen Befunden konnten die Autoren LIU *et al.* in einer weiteren Studie zeigen, dass die durch Verletzung des Rückenmarks ausgelöste extrazelluläre Bildung von Hydroxylradikalen mit einem Anstieg der extrazellulären Eisenkonzentration im geschädigten Gewebe korreliert [87].

1.4.1. Das mechanische Trauma der Skelettmuskulatur

Die mechanische, durch exogene Einflüsse hervorgerufene Schädigung der Skelettmuskulatur (= mechanisches Muskeltrauma) führt ebenfalls zu einer vermehrten Bildung von freien Radikalen. So konnte in neueren Untersuchungen gezeigt werden, dass experimentell induzierte Kompressionstraumata (Druckschädigungen) an den Hintergliedmaßen von Mäusen die sofortige Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in dem zerstörten Muskelgewebe auslösen [91]. Auch SCHASER *et al.* demonstrierten an einem ähnlichen experimentellen Modell, dass die nach dem Trauma auftretenden mikrozirkulären Dysfunktionen und Muskelnekrosen durch die Gabe des Antioxidans N-Acetylcystein minimiert werden können, was auf die Beteiligung von freien Radikalen schließen lässt [92]. In Übereinstimmung mit diesen Befunden konnte an isolierten Muskelzellen (Myozyten) eine auf Druckschädigung basierende $O_2^{\cdot-}$ -Produktion nachgewiesen werden, die durch membrangebundene, elektronentransferierende Enzymsysteme, insbesondere NADPH-Oxidase, verursacht wird und letztlich zur Bildung von weit reaktiveren Spezies wie dem Hydroxylradikal beiträgt [93]. Ein genaues Bild über die an der Schädigung der Skelettmuskulatur beteiligten reaktiven Sauerstoffspezies und dem Mechanismus ihrer Entstehung im Hinblick auf die Beteiligung von chelatisierbaren, redox-aktiven Eisenionen existiert jedoch bislang nicht. Dabei erscheint es nahe liegend, dass, ähnlich wie beim Gewebetrauma des zentralen Nervensystems (siehe 1.4.), die Bildung von hochreaktiven Sauerstoffspezies im verletzten Muskelgewebe durch aus den geschädigten Zellen freigesetztes, redox-aktives Eisen vermittelt wird.

Es ist bekannt, dass infolge eines mechanischen Traumas der Skelettmuskulatur viele Zellinhaltsstoffe in den Extrazellularraum bzw. in die Blutbahn entlassen werden. Dazu gehören neben Kaliumionen, Phosphationen und spezifischen Enzymen, wie z.B. die Kreatinkinase, hauptsächlich Myoglobin [94-96]. Myoglobin, das aus einer Polypeptidkette mit 153 Aminosäureresten und einer Eisen-Protoporphyringruppe (Hämgruppe) bestehende sauerstoffspeichernde Protein der Muskelzellen, erleichtert die Sauerstoffdiffusion zwischen

der Plasmamembran und den Mitochondrien in schnell kontrahierendem Muskelgewebe. Neben dieser physiologischen Funktion im intakten Muskelgewebe ist andererseits jedoch auch bekannt, dass unter pathologischen Bedingungen die redox-aktive Hämgruppe des Myoglobins unter anderem die Peroxidation von Lipiden initiieren kann [95-99]. So konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Freisetzung von Myoglobin aus verletztem Muskelgewebe zu massiven funktionellen Schäden der Nieren führt, die, laut Schlussfolgerung der Autoren, durch die oxidierende Wirkung der zentralen Hämgruppe ausgelöst werden [95, 96, 99]. Ebenso können die durch übermäßige und/oder lang anhaltende Muskelbeanspruchung induzierten Schäden der Skelettmuskulatur auf eine erhöhte Bildungsrate an ROS zurückgeführt werden, die durch Myoglobin und Hämoglobin vermittelt werden soll [98].

Trotz der zahlreichen Studien ist die Freisetzung von redox-aktiven, chelatisierbaren Eisenionen infolge eines mechanischen Muskeltraumas bisher noch nicht zweifelsfrei belegt worden. Desweiteren ist auch der Ursprung des extrazellulär freigesetzten, redox-aktiven Eisens nicht eindeutig identifiziert, d.h. ob es ursprünglich zum intrazellulären chelatisierbaren Eisenpool gehörte oder aus dem Protoporphyrin-Eisen des (intakten) Myoglobins besteht bzw., ob es während oder nach dem Muskeltrauma aus der Hämgruppe des Myoglobins als chelatisierbares Eisen freigesetzt wurde.

1.5. PROBLEMSTELLUNG

Da das zytotoxische Potential des chelatisierbaren Eisenpools in erheblichem Maße von seiner (Re-)Reduktion abhängt (siehe 1.3.), sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, welche intrazellulären Reduktionsmittel, niedermolekulare *versus* enzymatische, chelatisierbare Fe^{3+} -Ionen am effektivsten reduzieren können.

Vor dem Hintergrund der bereits beschriebenen intrazellulären Kompartimentierung der Ferrireduktaseaktivitäten [48, 49, 54, 55, 65, 79-81], sollte zunächst mit Hilfe von spektrophotometrischen Techniken und der Elektronenspinresonanz-Spektrometrie vergleichend untersucht werden, wie effektiv isolierte Zellorganellen der Rattenleber, d.h. die Mitochondrien, die Mikrosomen, die Zellkerne und das Cytosol, den physiologischen Eisenkomplex Fe(III)-ATP reduzieren können. Basierend hierauf war anschließend das absolute Fe(III) -Reduktionsvermögen der einzelnen Organellen bezogen auf ihre tatsächlichen intrazellulären Mengenverhältnisse von Interesse. Zudem sollte der

Mechanismus der Fe(III)-Reduktion genauer untersucht und möglichst das für den Eisen(III)-Reduktionsprozess verantwortliche enzymatische System identifiziert werden.

Zusätzlich geplant war anhand eines *in vitro*-Traumamodells, d.h. in einem 1:10-Homogenat der Wadenmuskeln (*Musculus gastrocnemius*) der Ratte, zu untersuchen, ob es infolge eines mechanischen Muskeltraumas zu einer nachweisbaren Freisetzung von chelatisierbaren Eisenionen kommt. Dazu sollte im 16000 x g-Überstand des Muskelhomogenats das chelatisierbare Fe(II) mit Hilfe des Fluoreszenzindikators Phen Green SK (PG SK) und der Laser-Scanning-Mikroskopie nachgewiesen und anschließend quantifiziert werden. Nach dem Nachweis einer traumabedingten Eisenfreisetzung war es weiterhin wichtig, diesen chelatisierbaren Fe(II)-Pool hinsichtlich seiner Eigenschaften näher zu untersuchen, um sein pathobiochemisches Potential abschätzen zu können. Zudem sollte der Beitrag des Myoglobin-Eisens an der eisenvermittelten ROS-Bildung im Muskelhomogenat bestimmt werden.

2. ERGEBNISSE

2.1. REDUKTION CHELATISIERBARER FE(III)-IONEN DURCH ISOLIERTE ZELLORGANELLEN DER RATTENLEBER

2.1.1. Reinheit der isolierten Zellfraktionen

Für die Abschätzung der Fe(III)-Reduktionskapazität aller untersuchter Zellorganellen musste zunächst die Reinheit der einzelnen Fraktionen bestimmt werden, um eventuell auftretende Kontaminationen mit Fremdorganellen in die Ergebnisse mit einbeziehen zu können. Einerseits erfolgte die Reinheitsbestimmung mit Hilfe von Markerenzymaktivitäten (siehe Material und Methoden 5.2.4.), die für alle Zellfraktionen ermittelt und in Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt wurden. Andererseits erfolgte die Quantifizierung des Zellkernvorkommens in allen Fraktionen visuell mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Propidiumiodid, der selektiv in die Kern-DNA interkaliert (siehe Material und Methoden 5.2.4.5.).

Tabelle 1: Proteingehalt und Markerenzymaktivitäten in den einzelnen Zellfraktionen

Fraktionen	Protein (mg/ml)	Glutamat- Dehydrogenase (kU/l)	Glucose-6- Phosphatase (kU/l)	Lactat- Dehydrogenase (kU/l)	Fumarase* (kU/l)
Mitochondrien	32,0 ± 8,6	50,5 ± 6,1	1,7 ± 1,1	11,7 ± 0,6	16,4 ± 0,6
Mikrosomen	24,2 ± 6,1	3,1 ± 1,0	8,5 ± 2,1	2,2 ± 0,3	n. g.
Cytosol	4,6 ± 1,0	0,1 ± 0,04	0,03 ± 0,03	44,5 ± 2,6	n. g.
Zellkerne	13,4 ± 2,4	n. g.	0	1,6 ± 0	0,1 ± 0,02

* Markerenzym der Mitochondrien zur Untersuchung der Zellkernfraktion, da die Nuclei ebenfalls das mitochondriale Markerenzym Glutamat-Dehydrogenase besitzen.

Die angegebenen Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit Zellorganellen der Leber von verschiedenen Ratten; n. g. = nicht gemessen.

Wie in Abbildung 3 A repräsentativ für die mitochondriale Fraktion gezeigt, konnten sowohl in dieser als auch in der mikrosomalen- bzw. cytosolischen Fraktion (Daten nicht dargestellt) kaum Zellkerne detektiert werden. Im Vergleich dazu wies die eigentliche Kernfraktion eine dichte Packung an intakten Zellkernen auf (Abb. 3 B).

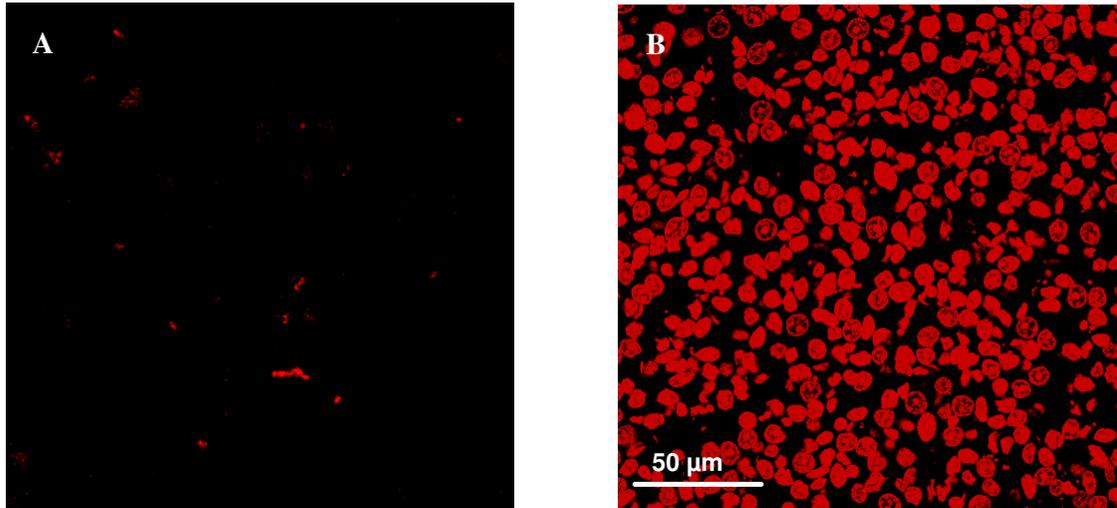


Abb. 3: Nachweis von Zellkernen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid. Die (A) Mitochondrienfraktion und (B) die Zellkernfraktion wurden für 2 Minuten mit Propidiumiodid (5 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert und anschließend dessen Fluoreszenz mit Hilfe der Laser-Scanning-Mikroskopie bei den Wellenlängen $\lambda_{\text{exc.}} = 543$ nm und $\lambda_{\text{em.}} \geq 560$ nm in der jeweils gleichen Fokusebene dargestellt. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Experimente mit isolierten Zellorganellen der Leber von verschiedenen Ratten.

Mit Hilfe der Angaben aus Tabelle 1 sowie den Ergebnissen der mikroskopischen Zellkernerfassung konnte die Reinheit der einzelnen Zellfraktionen bestimmt werden (siehe Material und Methoden 5.2.4., Gleichung 2), die zusammenfassend in Tabelle 2 dargestellt wurde.

Die cytosolische- und die Kernfraktion zeichneten sich durch eine sehr hohe Reinheit aus, d.h. in diesen Fraktionen waren fast keine anderen Zellorganellen auffindbar (Tab. 2). Demgegenüber wurden 9,5% des mitochondrialen Markerenzym Glutamat-Dehydrogenase in der mikrosomalen Fraktion gefunden, während umgekehrt 20% der für die Mikrosomen spezifischen Glucose-6-Phosphatase-Aktivität in der Mitochondrienfraktion nachweisbar waren. Beide Fraktionen enthielten jedoch kaum Bestandteile des Cytosols (< 4%) und der Kernfraktion (< 2%).

Tabelle 2: Reinheit der Zellfraktionen

Fraktionen	Glutamat-Dehydrogenase/Fumarase (% Mitochondrien)	Glucose-6-Phosphatase (% Mikrosomen)	Lactat-Dehydrogenase (% Cytosol)	Laser-Scanning-Mikroskopie (% Zellkern)
Mitochondrien	100	20,0 ± 13,2	3,8 ± 0,2	< 2
Mikrosomen	9,5 ± 3,1	100	2,6 ± 1,0	< 2
Cytosol	1,7 ± 0,7	3,0 ± 2,8	100	< 2
Zellkerne	2,2 ± 0,2	0	1,3 ± 0	100

Die Daten sind aufgeführt in Prozent der Markerenzymaktivität bzw. der gezählten Kerne relativ zur Ursprungsfraktion. Die angegebenen Daten sind entsprechend der Tabelle 1 Mittelwerte ± Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit Organellen der Leber von verschiedenen Ratten.

2.1.2. Reduktion von Fe(III) durch die isolierten Zellorganellen in Ab- und Anwesenheit von NAD(P)H

Wenn man die einzelnen Zellorganellen (0,01 mg Protein/ml) jeweils mit 50 µM des Fe(III)-ATP-Komplexes über einen 60-minütigen Zeitraum inkubierte, ließ sich keine nennenswerte, mit 1,10-Phenanthrolin photometrisch (510 nm) detektierbare Eisen(II)-Bildung nachweisen (Abb. 4 A–D). Da die Pyridin-Nucleotide NADH und NADPH sowohl als niedermolekulare Reduktionsmittel für Fe(III) als auch als Cosubstrate für viele eisenreduzierende Enzyme dienen können (siehe 1.3.1. – 1.3.3.), wurde ihr Einfluss auf den Fe(III)-Reduktionsprozess untersucht. Nach dem Zusatz von NADH (200 µM) stieg das Fe(III)-Reduktionsvermögen der Mitochondrien und Mikrosomen um das 50- bzw. 60-fache an, wobei das zugegebene Eisen(III) innerhalb einer Stunde fast vollständig reduziert wurde (Abb. 4 A/B). Demgegenüber erhöhte sich mit NADH die Reduktionsrate in der Kernfraktion nur leicht bzw. blieb in der cytosolischen Fraktion nahezu unverändert (Abb. 4 C/D). Im Gegensatz zu NADH konnte das Pyridin-Nucleotid NADPH (200 µM) nur einen geringfügigen Anstieg der Fe(III)-Reduktionsrate in den Mitochondrien und Mikrosomen bewirken und hatte überdies kaum sichtbare Auswirkungen auf die Fe(II)-Bildung in den beiden anderen Fraktionen. In Kontrollen ohne Organellen wurde deutlich, dass die hohe, durch NADH vermittelte Fe(III)-Reduktionskapazität der Mitochondrien und Mikrosomen nicht durch einen direkten

Elektronentransfer von NADH auf Fe(III) zustande kam (Abb. 5; vgl. mit Abb. 4 A/B). Allerdings basierte vermutlich die geringfügig gesteigerte Fe(II)-Bildungsrate der mitochondrialen- und mikrosomalen Fraktion in Anwesenheit von NADPH zu ca. 60% auf einer direkten Elektronenübertragung von NADPH auf Fe(III).

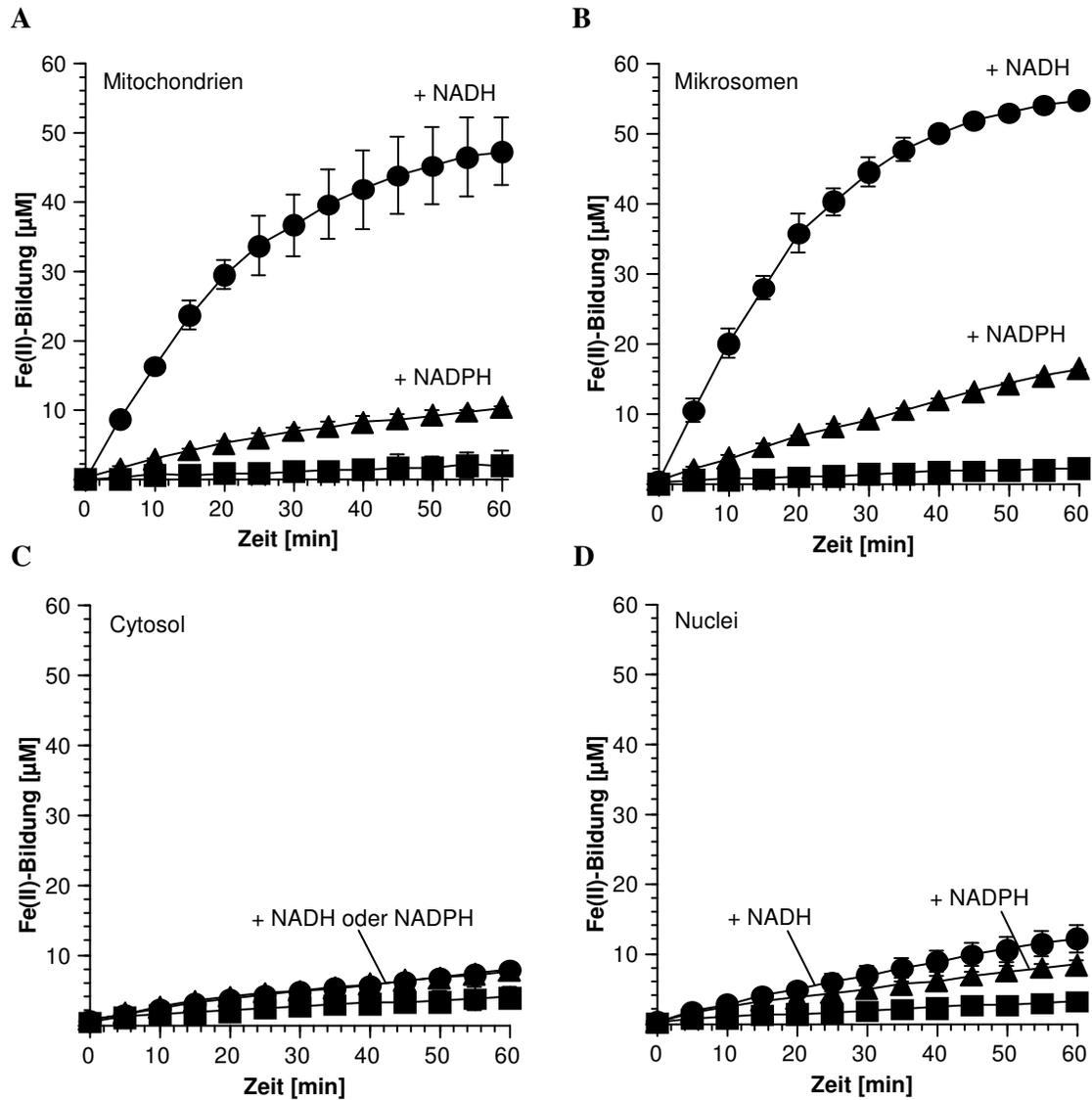


Abb. 4: Reduktion von Fe(III) durch isolierte Zellorganellen der Rattenleber. Fe(III)-ATP (50 μM) und 1,10-Phenanthrolin (200 μM) wurden mit (A) Mitochondrien, (B) Mikrosomen, (C) Cytosol oder (D) Zellkernen (jeweils 0,01 mg Protein/ml) in Abwesenheit (■) und Anwesenheit von (●) NADH oder (▲) NADPH (jeweils 200 μM) in Tris/HCl-Puffer (5 mM, pH 7,5 bei 22°C), versetzt mit Mannitol (210 mM) und Saccharose (70 mM), inkubiert. Die Bildung von Fe(II), d.h. die Reduktion von Fe(III), wurde anhand der Absorption des [Fe(II) (1,10-Phenanthrolin)₃]²⁺-Komplexes bei 510 nm bestimmt und mit Hilfe einer Kalibrierungskurve, basierend auf Fe(II)-Standards und 1,10-Phenanthrolin, quantifiziert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit isolierten Zellorganellen der Leber von verschiedenen Ratten.

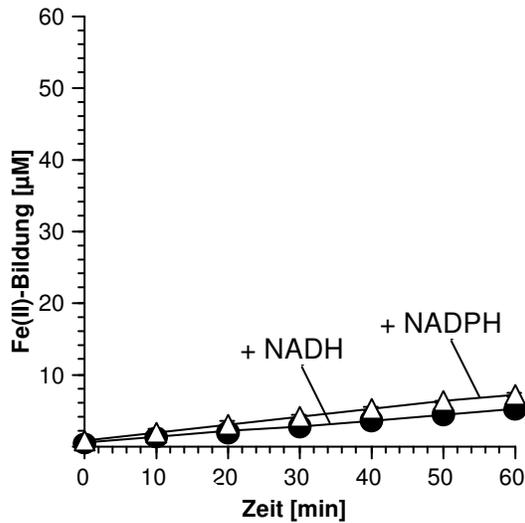


Abb. 5: Reduktion von chelatisierbarem Fe(III) in Abwesenheit der Zellorganellen. Fe(III)-ATP (50 μM) und 1,10-Phenanthrolin (200 μM) wurden mit (●) NADH oder (Δ) NADPH (jeweils 200 μM) in Tris/HCl-Puffer (5 mM, pH 7,5 bei 22°C), versetzt mit Mannitol (210 mM) und Saccharose (70 mM), inkubiert. Die Bildung von Fe(II), d.h. die Reduktion von Fe(III), wurde anhand der Absorption des $[\text{Fe(II)} (1,10\text{-Phenanthrolin})_3]^{2+}$ -Komplexes bei 510 nm bestimmt und mit Hilfe einer Kalibrierungskurve, basierend auf Fe(II)-Standards und 1,10-Phenanthrolin, quantifiziert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten. Die nicht sichtbaren Standardabweichungen werden durch die Symbole verdeckt; vergl. mit Abb. 4.

2.1.3. Einfluss der Mitochondrien und Mikrosomen auf das Elektronenspinresonanz-Signal (ESR-Signal) des Fe(III)-ATP-Komplexes

Um auszuschließen, dass das NADH-abhängige Fe(III)-Reduktionsvermögen der Mitochondrien und Mikrosomen nur auf der Anwesenheit des Eisenchelators 1,10-Phenanthrolin beruhte, wurde die Eisen(II)-Bildung ohne 1,10-Phenanthrolin mittels Elektronenspinresonanz-Spektrometrie (ESR-Spektrometrie) untersucht; eine eventuell auftretende Komplexbildung von 1,10-Phenanthrolin und Fe(III) könnte zu einer Veränderung der Redoxpotentiale führen (siehe 3.3.).

ATP-gebundenes Fe(III) (5 mM) zeigte ein charakteristisches ESR-Spektrum von high-spin Fe(III) bei $g = 4,27$ und $S = 5/2$ (Abb. 6). Nach der Zugabe von NADH (20 mM) und den Mitochondrien (5 mg Protein/ml) zu dem Fe(III)-ATP-Komplex konnte eine rapide Abnahme des ESR-Signals mit einer Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von $9,0 \pm 0,6$ Minuten beobachtet werden (Abb. 6 und 7 A). Da im Bereich des magnetischen Feldes zwischen 50 – 400 mT kein weiteres ESR-Signal nachgewiesen wurde (Daten nicht dargestellt), konnte die Bildung eines low-spin Fe(III)-Komplexes bei $g \approx 2$ und $S = 1/2$ ausgeschlossen werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Abnahme des ESR-Signals auf der Reduktion des high-spin Fe(III)-ATP zu einem low-spin Fe(II)-Komplex beruhte, welcher mittels ESR-Spektrometrie bekanntermaßen nicht detektierbar ist.

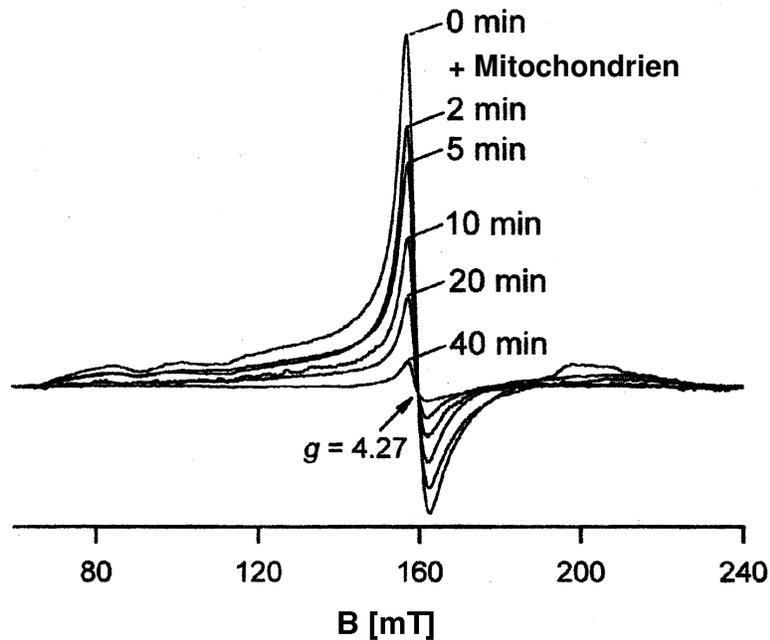


Abb. 6: Einfluss von Lebermitochondrien und NADH auf das Spektrum des Fe(III)-ATP-Komplexes. Fe(III)-ATP (5 mM) und NADH (20 mM) wurden in Tris/HCl-Puffer (5 mM, pH 7,5 bei 22°C), versetzt mit Mannitol (210 mM) und Saccharose (70 mM), für 15 Minuten mit Argon begast. Eine Probe der Lösung (0,2 ml) wurde mit einer Hamilton-Spritze in ein mit Argon geflutetes Suprasil-Quarzröhrchen überführt und sofort in flüssigem Stickstoff auf 77 K abgekühlt. Nach der Aufnahme des Fe(III)-ATP-Signals mit dem ESR-Spektrometer wurden Mitochondrien (5 mg Protein/ml) zu dem hypoxischen Reaktionsgemisch im Vorratsgefäß pipettiert und die ESR-Spektren verschiedener Proben im zeitlichen Verlauf aufgezeichnet. Die gezeigten Spektren, korrigiert um die Basislinienverschiebung mit Hilfe von SigmaPlot, sind repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Experimente mit isolierten Lebermitochondrien von verschiedenen Ratten; B = magnetische Feldstärke.

Im Gegensatz zu den auf spektrophotometrischen Untersuchungen basierenden Ergebnissen (Abb. 4 A) bewirkte auch NADPH (20 mM) eine erhebliche mitochondriale Reduktion des Fe(III)-ATP-Komplexes ($t_{1/2} = 16,9 \pm 0,5$ min; Abb. 7 A). In vergleichenden Experimenten mit den Mikrosomen wurde im Grunde genommen ein ähnliches Ergebnis erzielt, wobei das Fe(III)-ATP-Signal in Ansätzen mit NADPH sogar schneller abnahm ($t_{1/2} = 10,9 \pm 3,0$ min) als in solchen mit NADH ($t_{1/2} = 21,2 \pm 10,0$ min; Abb. 7 B). Der abweichende Einfluss von NADPH im Vergleich zu den photometrischen Versuchen (vgl. Abb. 4 A/B mit Abb. 7 A/B) resultierte wahrscheinlich aus den unterschiedlichen Konzentrationen an NADPH, die unter den jeweiligen Versuchsbedingungen Anwendung fanden (siehe 2.2.4.). In Experimenten ohne NAD(P)H konnte für beide Organellen keine Abnahme, sondern sogar eine leichte Zunahme des ESR-Signals verzeichnet werden (Abb. 7 A/B). Der Anstieg des Signals könnte auf Modifikationen der Spin-Relaxations-Zeit bzw. der ESR-Linienbreite beruhen, die

möglicherweise durch das zugesetzte biologische Material, beispielsweise durch die Bildung eines Protein-ATP/Fe(III)-Komplexes, hervorgerufen wurden. In Kontrollen ohne Organellen hatte NADH keinen Einfluss auf das Fe(III)-ATP-Signal (Daten nicht dargestellt), ein weiterer Hinweis darauf, dass NADH nicht als direkter Elektronendonator für Fe(III) fungierte.

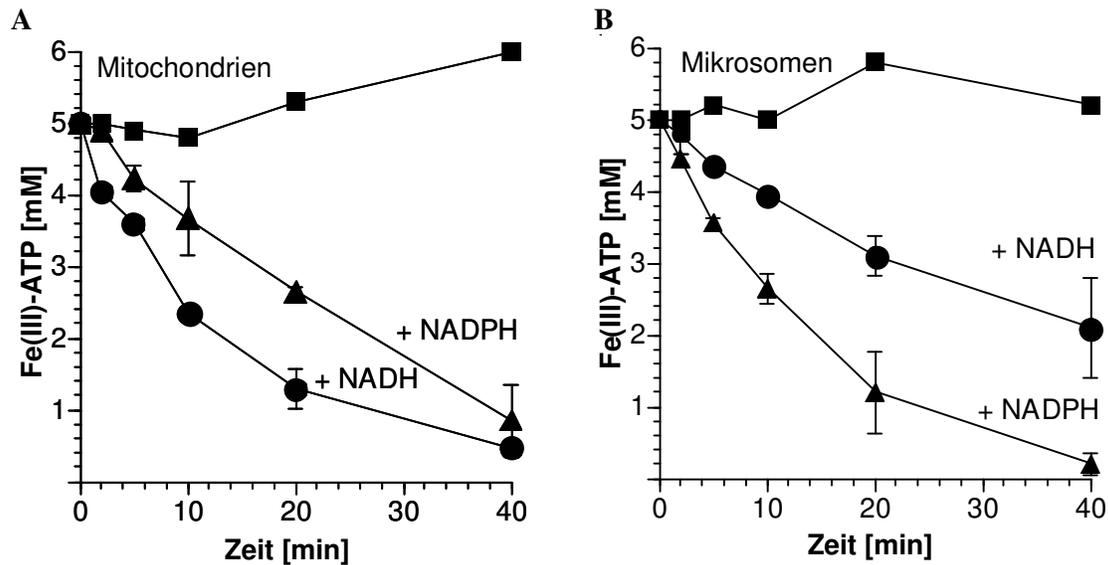


Abb. 7: Einfluss der Mitochondrien und Mikrosomen auf das ESR-Signal von Fe(III)-ATP in Ab- und Anwesenheit von NAD(P)H. Fe(III)-ATP (5 mM) wurde in Abwesenheit (■) und Anwesenheit von (●) NADH oder (▲) NADPH (jeweils 20 mM) in Tris/HCl-Puffer (5 mM, pH 7,5 bei 22°C), versetzt mit Mannitol (210 mM) und Saccharose (70 mM), für 15 Minuten mit Argon begast. Eine Probe der Lösung (0,2 ml) wurde mit einer Hamilton-Spritze in ein mit Argon geflutetes Suprasil-Quarzröhrchen überführt und sofort in flüssigem Stickstoff auf 77 K abgekühlt. Nach der Aufnahme des Fe(III)-ATP-Signals mit dem ESR-Spektrometer wurden (A) Mitochondrien oder (B) Mikrosomen (jeweils 5 mg Protein/ml) zu dem hypoxischen Reaktionsgemisch im Vorratsgefäß pipettiert und die ESR-Spektren verschiedener Proben im zeitlichen Verlauf aufgezeichnet. Die gezeigten Daten, korrigiert um die Basislinienverschiebung mit Hilfe von SigmaPlot, sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit isolierten Zellorganellen der Leber von verschiedenen Ratten.

2.1.4. Fe(III)-Reduktionskapazität der einzelnen Leberorganellen unter Berücksichtigung ihrer intrazellulären Verhältnisse

Die unter 2.1.2. und 2.1.3. beschriebenen Ergebnisse wurden in vergleichenden Untersuchungen mit jeweils identischen Proteinkonzentrationen der eingesetzten Fraktionen erzielt. Um die Bedeutung der einzelnen Zellorganelltypen für die NADH-abhängige Reduktion von chelatisierbarem Fe(III) in der Leberzelle abschätzen zu können, mussten jedoch ihre tatsächlichen, intrazellulären Mengenverhältnisse berücksichtigt werden. Da bei der Fraktionierung auf eine möglichst hohe Reinheit geachtet wurde, konnte ein

Organellenverlust durch mehrere Waschvorgänge nicht vermieden werden. Daher geben die experimentell ermittelten Proteinkonzentrationen aller Organellen nicht die tatsächlichen Verhältnisse in den Leberzellen wider. Aus diesem Grund wurden zur Bestimmung der absoluten Fe(III)-Reduktionskapazitäten Konzentrationsangaben aus der Literatur verwendet, die in Tabelle 3 zusammengefasst wurden.

Tabelle 3: Proteinkonzentration der Zellorganelltypen im Lebergewebe (Literaturwerte)

Fraktionen	Konzentration [mg Protein/g Leber]	Quelle
Mitochondrien	120	[100, 101]
Mikrosomen	25	[102, 103]
Cytosol	90	[100, 104, 105]
Zellkern	30	[105-107]

Die aufgeführten Daten wurden entweder direkt der Literatur entnommen oder aus den dort gemachten Angaben berechnet. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte basierend auf den einzelnen Quellenangaben.

Basierend auf den in Tabelle 3 aufgeführten Proteinkonzentrationen und den in den Abbildungen 4 A–D dargestellten Ergebnissen konnte die NADH-abhängige Fe(III)-Reduktionskapazität der einzelnen Zellorganellen nach folgender Gleichung (9) berechnet werden:

$$\text{Fe(III)-Reduktionskapazität (\%)} = \frac{A_{510} \text{ nach 10 min} \times \text{Proteinkonzentration (mg/ml)}}{\text{Gesamt-} A_{510} \text{ nach 10 min}^* \times \text{Proteinkonzentration (mg/ml)}} \times 100 \% \quad (9)$$

* = Summe A_{510} aller untersuchter Zellorganellen nach 10 min

Die Ergebnisse der Berechnungen ergaben, dass chelatisierbares Fe(III) in Leberzellen vorwiegend durch die Mitochondrien reduziert werden sollte (Abb. 8). Da die mitochondriale Fraktion 20% der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität, d.h. 20% des mikrosomalen Proteins

enthielt und ca. 10% der Mitochondrien in der mikrosomalen Fraktion vorkamen (Tab. 2), mussten die errechneten Werte um diese Verunreinigungen korrigiert werden. Es zeigte sich, dass auf die Mikrosomen 23% der gesamten Fe(III)-Reduktionskapazität der Organellen entfiel, während die Mitochondrien mit 65% eine fast dreimal höhere Kapazität zur Reduktion von Fe(III) aufwiesen (Abb. 8). Demgegenüber fiel die Beteiligung der cytosolischen- und der Kernfraktion an der Fe(III)-Reduktionskapazität aller Organellen mit 9% bzw. 2,8% eher gering aus. Wurden die Berechnungen zum intrazellulären Fe(III)-Reduktionsvermögen der Mitochondrien und Mikrosomen anhand der ESR-Daten erhoben (Abb. 7 A/B), ergab sich das gleiche Verhältnis zwischen den beiden Fraktionen wie oben beschrieben (Daten nicht dargestellt).

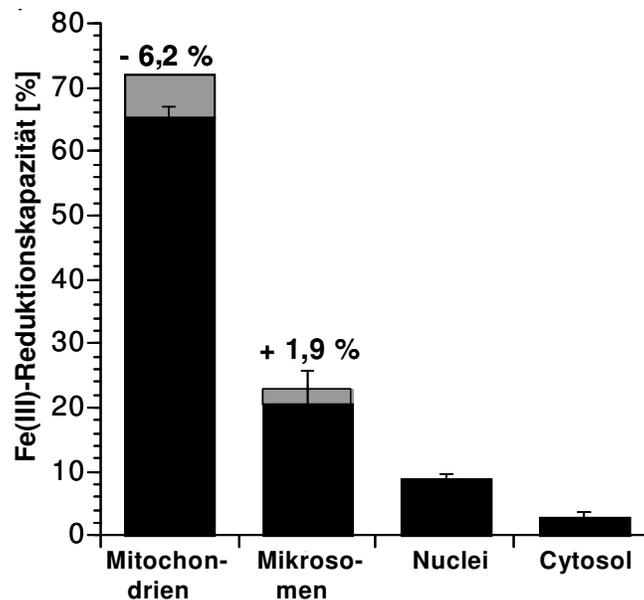


Abb. 8: Fe(III)-Reduktionskapazität der untersuchten Zellorganellen. Der Literatur entnommene Werte zum Proteingehalt der einzelnen Zellorganelltypen im Leberhomogenat (Tab. 3) wurden mit dem jeweiligen Fe(III)-Reduktionsvermögen der Fraktionen (der ersten 10 Minuten), dargestellt in den Abb. 4 A–D, multipliziert und die Ergebnisse in Prozent der gesamten Fe(III)-Reduktionskapazität aller untersuchten Zellorganellen angegeben. Die grauen Anteile der Balken (Mitochondrien und Mikrosomen) repräsentieren die errechneten Beträge durch kontaminierende Organellenbestandteile anderer Fraktionen (Tab. 2), um die die Originaldaten korrigiert wurden. Entsprechend Abbildung 4 sind die gezeigten Daten Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit isolierten Zellorganellen der Leber von verschiedenen Ratten.

Da sich die cytosolische Fraktion aus dem kompletten Überstand des ersten Ultrazentrifugationsschrittes zusammensetzte (siehe Material und Methoden 5.2.1.3.), konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sich neben Verunreinigungen mit den anderen Fraktionen

(Tab. 2) auch Bestandteile nicht untersuchter Organellen, wie z.B. der Zellmembran, in dieser Fraktion befanden. Um den Beitrag hochmolekularer Bestandteile an der cytosolischen, NADH-abhängigen Fe(III)-Reduktionskapazität zu ermitteln, wurden die größeren Moleküle mittels Filtration (Cut-off Filter; Ausschluss ≥ 30 kDa) vor der photometrischen Messung entfernt. Daraufhin verringerte sich die Geschwindigkeit der cytosolischen Fe(II)-Bildung um mehr als die Hälfte (Abb. 9), womit der beobachtete Fe(III)-Reduktionsprozess nicht nur durch die im Cytosol vorkommenden niedermolekularen Bestandteile erklärt werden kann, sondern vermutlich auch auf Proteinbestandteilen beruht. Der geringe Einfluss der niedermolekularen Reduktionsmittel auf die cytosolische Fe(II)-Bildung wurde am Beispiel der Ascorbinsäure durch Versuche mit Ascorbat-Oxidase weiter verifiziert. So hatte die Anwesenheit von Ascorbat-Oxidase (200 U/ml), ein Enzym, das die Oxidation von Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure katalysiert, keine Auswirkungen auf das Fe(III)-Reduktionsvermögen der cytosolischen Fraktion (Daten nicht dargestellt).

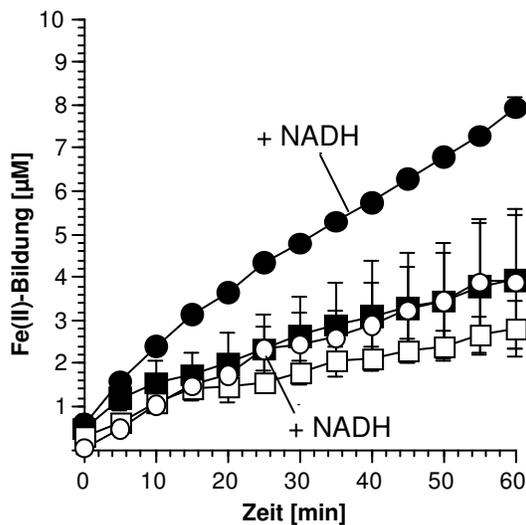


Abb. 9: Der Beitrag hochmolekularer Reduktionsmittel an der cytosolischen Fe(III)-Reduktion. Aliquots der cytosolischen Fraktion wurden mit Hilfe eines Cut-off-Filters (Ausschluss ≥ 30 kDa) durch 10-minütige Zentrifugation bei $16000 \times g$ filtriert. Das unfiltrierte Cytosol (0,01 mg Protein/ml; ausgefüllte Symbole) und gleiche Volumina des Filtrates (offene Symbole) wurden mit Fe(III)-ATP (50 μ M) in Abwesenheit (\blacksquare/\square) und Anwesenheit (\bullet/\circ) von NADH (200 μ M) in Tris/HCl-Puffer (5 mM, pH 7,5 bei 22°C), versetzt mit Mannitol (210 mM) und Saccharose (70 mM), inkubiert. Die Bildung von Fe(II), d.h. die Reduktion von Fe(III), wurde anhand der Absorption des [Fe(II) (1,10-Phenanthrolin) $_3$] $^{2+}$ -Komplexes bei 510 nm bestimmt und mit Hilfe einer Kalibrierungskurve, basierend auf Fe(II)-Standards und 1,10-Phenanthrolin, quantifiziert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit dem Cytosol der Leber von verschiedenen Ratten. Die nicht sichtbaren Standardabweichungen werden durch die Symbole verdeckt.

Da, wie oben beschrieben, in Leberzellen hauptsächlich die mitochondriale Fraktion für die effektive, NADH-abhängige Reduktion des Eisen(III)-ATP-Komplexes in Frage kommen sollte, wurde im Folgenden das Fe(III)-Reduktionssystem der Mitochondrien genauer untersucht.

2.2. CHARAKTERISIERUNG DES NADH-ABHÄNGIGEN FE(III)-REDUKTASE-SYSTEMS DER LEBERMITOCHONDRIEN

2.2.1. Einfluss von niedermolekularen Reduktionsmitteln auf die mitochondriale, NADH-abhängige Fe(III)-Reduktion

Die Anwesenheit von SOD (100 U/ml) hatte keine Auswirkungen auf die NADH-abhängige, mitochondriale Reduktion von Fe(III) (Abb. 10). Somit konnte eine Beteiligung des Superoxidanionradikals ($O_2^{\cdot-}$) an der Fe(II)-Bildung ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da bereits in den ESR-Experimenten unter Ausschluss von Sauerstoff eine effektive Reduktion des Fe(III)-ATP-Komplexes gezeigt wurde (Abb. 6 und 7).

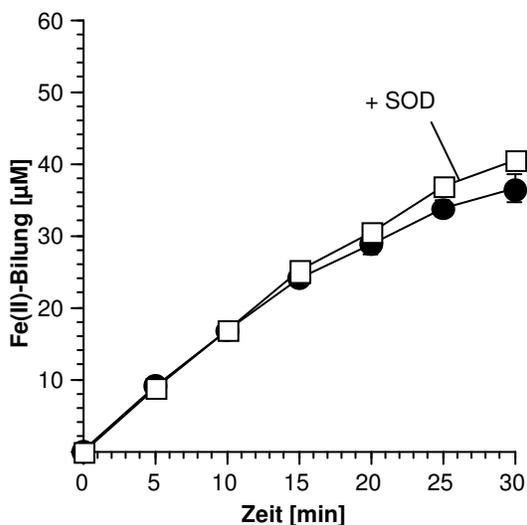


Abb. 10: Einfluss von SOD auf die NADH-abhängige Reduktion von chelatisierbarem Fe(III) durch die Lebermitochondrien. Fe(III)-ATP (50 μ M), 1,10-Phenanthrolin (200 μ M) und NADH (200 μ M) wurden mit den Mitochondrien (0,01 mg Protein/ml) in Abwesenheit (●) und Anwesenheit (□) von SOD (100 U/ml) in Tris/HCl-Puffer (5 mM, pH 7,5 bei 22°C), versetzt mit Mannitol (210 mM) und Saccharose (70 mM), inkubiert. Die Bildung von Fe(II), d.h. die Reduktion von Fe(III), wurde anhand der Absorption des [Fe(II) (1,10-Phenanthrolin) $_3$] $^{2+}$ -Komplexes bei 510 nm bestimmt und mit Hilfe einer Kalibrierungskurve, basierend auf Fe(II)-Standards und 1,10-Phenanthrolin, quantifiziert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit isolierten Lebermitochondrien von verschiedenen Ratten. Die nicht sichtbaren Standardabweichungen werden durch die Symbole verdeckt.

Die Zugabe von Ascorbat-Oxidase (200 U/ml) hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die NADH-abhängige, durch intakte Mitochondrien vermittelte Fe(III)-Reduktion (Abb. 11). Zusätzlich wurden die Mitochondrien permeabilisiert, um die Oxidation von intramitochondrialer Ascorbinsäure durch die zugesetzte, nicht membrangängige Ascorbat-Oxidase zu gewährleisten. Doch auch in diesem Fall konnte keine Beeinträchtigung der mitochondrialen Fe(III)-Reduktion festgestellt werden (Daten nicht dargestellt). Somit wurde die mitochondriale Fe(III)-Reduktion ebenfalls nicht durch Ascorbinsäure vermittelt.

Die unter 2.1.2., 2.1.3. und in Abbildung 5 dargestellten Ergebnisse verdeutlichen zudem, dass auch NADH nicht als niedermolekulares Reduktionsmittel für Fe(III) in Frage kommt.

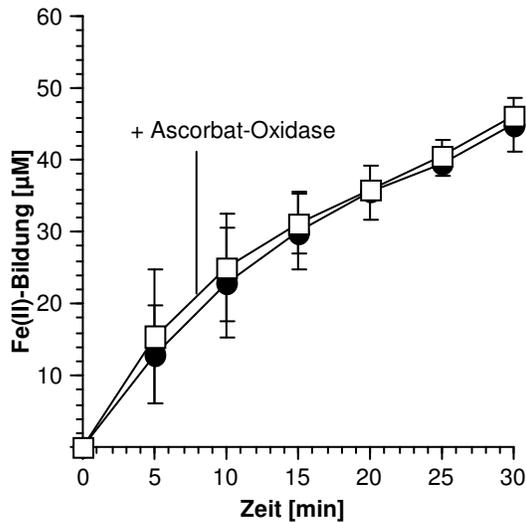


Abb. 11: Einfluss von Ascorbat-Oxidase auf die NADH-abhängige Reduktion von chelatisierbarem Fe(III) durch die Lebermitochondrien. Fe(III)-ATP (50 µM), 1,10-Phenanthrolin (200 µM) und NADH (200 µM) wurden mit den Mitochondrien (0,01 mg Protein/ml) in Abwesenheit (●) und Anwesenheit (□) von Ascorbat-Oxidase (200 U/ml) in Tris/HCl-Puffer (5 mM, pH 7,5 bei 22°C), versetzt mit Mannitol (210 mM) und Saccharose (70 mM), inkubiert. Die Bildung von Fe(II), d.h. die Reduktion von Fe(III), wurde anhand der Absorption des [Fe(II) (1,10-Phenanthrolin)₃]²⁺-Komplexes bei 510 nm bestimmt und mit Hilfe einer Kalibrierungskurve, basierend auf Fe(II)-Standards und 1,10-Phenanthrolin, quantifiziert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit isolierten Lebermitochondrien von verschiedenen Ratten. Die nicht sichtbaren Standardabweichungen werden durch die Symbole verdeckt.

2.2.2. Einfluss von 4,5-Dihydroxyanthrachinon (Rhein) auf die mitochondriale, NADH-abhängige Fe(III)-Reduktion

Der Ausschluss von niedermolekularen Reduktionsmitteln deutete auf einen enzymatischen Fe(III)-Reduktionsprozess hin. Um diesen in Hinblick auf die Rolle von NADH näher zu verifizieren, wurde der Einfluss von 4,5-Dihydroxyanthrachinon (Rhein) auf die Reduktion von Fe(III) untersucht. Rhein, ein Inhibitor von NADH-Dehydrogenasen, konkurriert mit dem Pyridin-Nucleotid um dessen Bindungsstelle am Enzym (Abb. 12; [108, 109]).

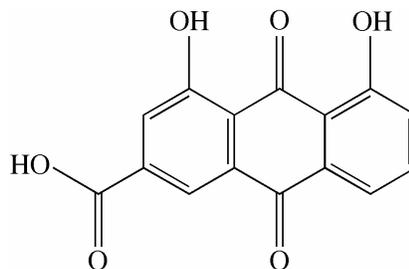


Abb. 12: Strukturformel von 4,5-Dihydroxyanthrachinon (Rhein).

Die Inkubation mit 500 μM Rhein bewirkte eine sehr deutliche Abnahme des schnellen initialen Anstiegs der mitochondrialen Fe(II)-Bildung (Abb. 13). Somit verhinderte Rhein die Fe(III)-Reduktion zwar nicht vollständig, verzögerte diese jedoch erheblich. Aus diesem Ergebnis kann geschlussfolgert werden, dass der Eisen(III)-Reduktionsprozess der Mitochondrien höchstwahrscheinlich durch NADH-Dehydrogenasen vermittelt wird.

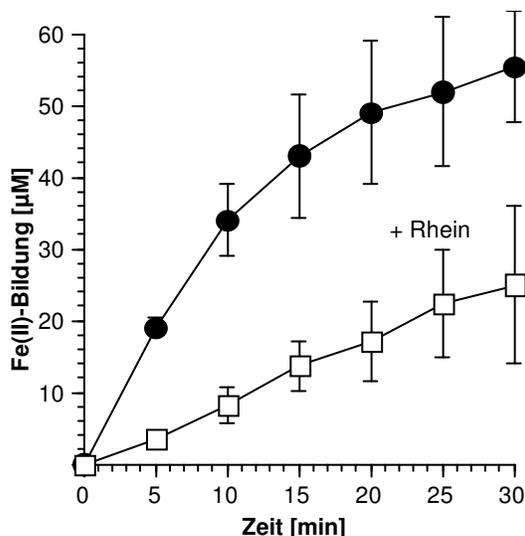


Abb. 13: Einfluss von Rhein auf die NADH-abhängige Reduktion von Fe(III) durch die Lebermitochondrien. Fe(III)-ATP (50 μM), 1,10-Phenanthrolin (200 μM) und NADH (200 μM) wurden mit den Mitochondrien (0,01 mg Protein/ml) in Abwesenheit (\bullet) und Anwesenheit (\square) von Rhein (500 μM) in Tris/HCl-Puffer (5 mM, pH 7,5 bei 22°C), versetzt mit Mannitol (210 mM) und Saccharose (70 mM), inkubiert. Die Bildung von Fe(II), d.h. die Reduktion von Fe(III), wurde anhand der Absorption des $[\text{Fe(II)}(1,10\text{-Phenanthrolin})_3]^{2+}$ -Komplexes bei 510 nm bestimmt und mit Hilfe einer Kalibrierungskurve, basierend auf Fe(II)-Standards und 1,10-Phenanthrolin, quantifiziert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit isolierten Lebermitochondrien von verschiedenen Ratten. Die nicht sichtbaren Standardabweichungen werden durch die Symbole verdeckt.

2.2.3. Untersuchungen zur mitochondrialen Oxidation von NADH und NADPH

Da die mitochondriale Reduktion von Fe(III) stark NADH-abhängig verlief, d.h. NADH offensichtlich auf indirektem Weg als Elektronendonator fungierte, musste mit der messbaren Fe(II)-Bildung auch eine entsprechende Oxidation des Pyridin-Nucleotides einhergehen. Wenn die Mitochondrien mit NADH in Abwesenheit des Eisenkomplexes inkubiert wurden, konnte nahezu keine Oxidation des Pyridin-Nucleotides detektiert werden (Abb. 14 A). Dieses Ergebnis liefert einen Beleg für die funktionelle Integrität der Mitochondrien, (siehe auch 2.2.5.1.), da der Komplex I der Atmungskette (NADH-Dehydrogenase) in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, wobei sich die Bindungsstelle für NADH von außen unzugänglich im Matrixraum befindet (siehe 3.2.2. und Abb. 36); Mitochondrien, die eine nicht intakte innere Membran aufweisen, sollten das Pyridin-Nucleotid durch den Komplex I oxidieren können. Im Vergleich zu NADH konnten die intakten Mitochondrien NADPH in geringem Umfang oxidieren.

In Anwesenheit von Fe(III)-ATP (50 μM) und Abwesenheit der mitochondrialen Fraktion kam es, in Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Ergebnissen (2.1.2., 2.1.3. und Abb. 5), zu keiner wesentlichen, über die Geschwindigkeit der Autoxidation hinausgehenden NADH-Oxidation (Abb. 14 B). Demgegenüber zeigte sich eine deutliche NADPH-Oxidation, die nicht mit der Fe(II)-Bildung korrelierte (vgl. Abb. 14 B mit Abb. 5).

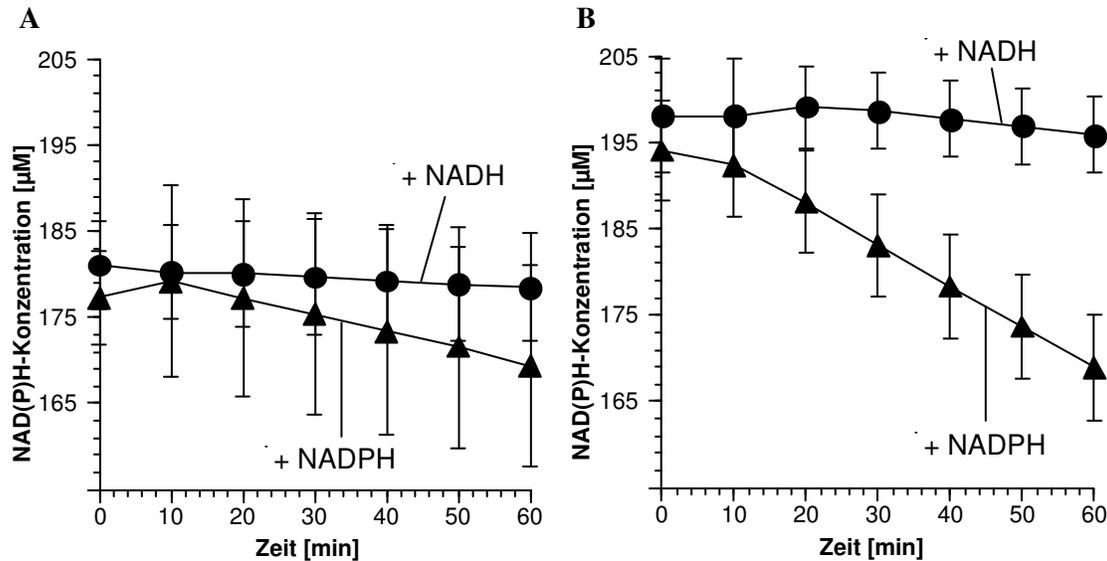


Abb. 14: Durch die Lebermitochondrien oder Fe(III)-ATP vermittelte NAD(P)H-Oxidation. 1,10-Phenanthrolin (200 μM) und (●) NADH (200 μM) oder (▲) NADPH (200 μM) wurden entweder mit (A) Mitochondrien (0,01 mg Protein/ml) oder (B) mit Fe(III)-ATP (50 μM) in Tris/HCl-Puffer (5 mM, pH 7,5 bei 22°C), versetzt mit Mannitol (210 mM) und Saccharose (70 mM), inkubiert. Die Oxidation von NAD(P)H wurde anhand der Absorptionsabnahme bei 340 nm mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für NAD(P)H ($\epsilon = 6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) quantifiziert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten in Ab- und Anwesenheit isolierter Lebermitochondrien von verschiedenen Ratten.

Wenn nun die mitochondriale Fe(III)-Reduktion und die entsprechende Oxidation von NADH oder NADPH im Standardversuch jeweils um die Reduktions- bzw. Oxidations-Werte in Abwesenheit der Organellen bereinigt wurden, ergaben sich für die beiden Parameter folgende Verhältnisse: Ungefähr 1 Mol NADH wurde für die mitochondriale Bildung von 1 Mol Fe(II) verbraucht (Abb. 15 A). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu früheren Untersuchungen unter hypoxischen Bedingungen mit isolierten Flavoenzymen, die zeigten, dass ein NADH-Molekül zwei Elektronen für die Reduktion von zwei Fe(III)-Ionen liefert ([64]; siehe 3.3.).

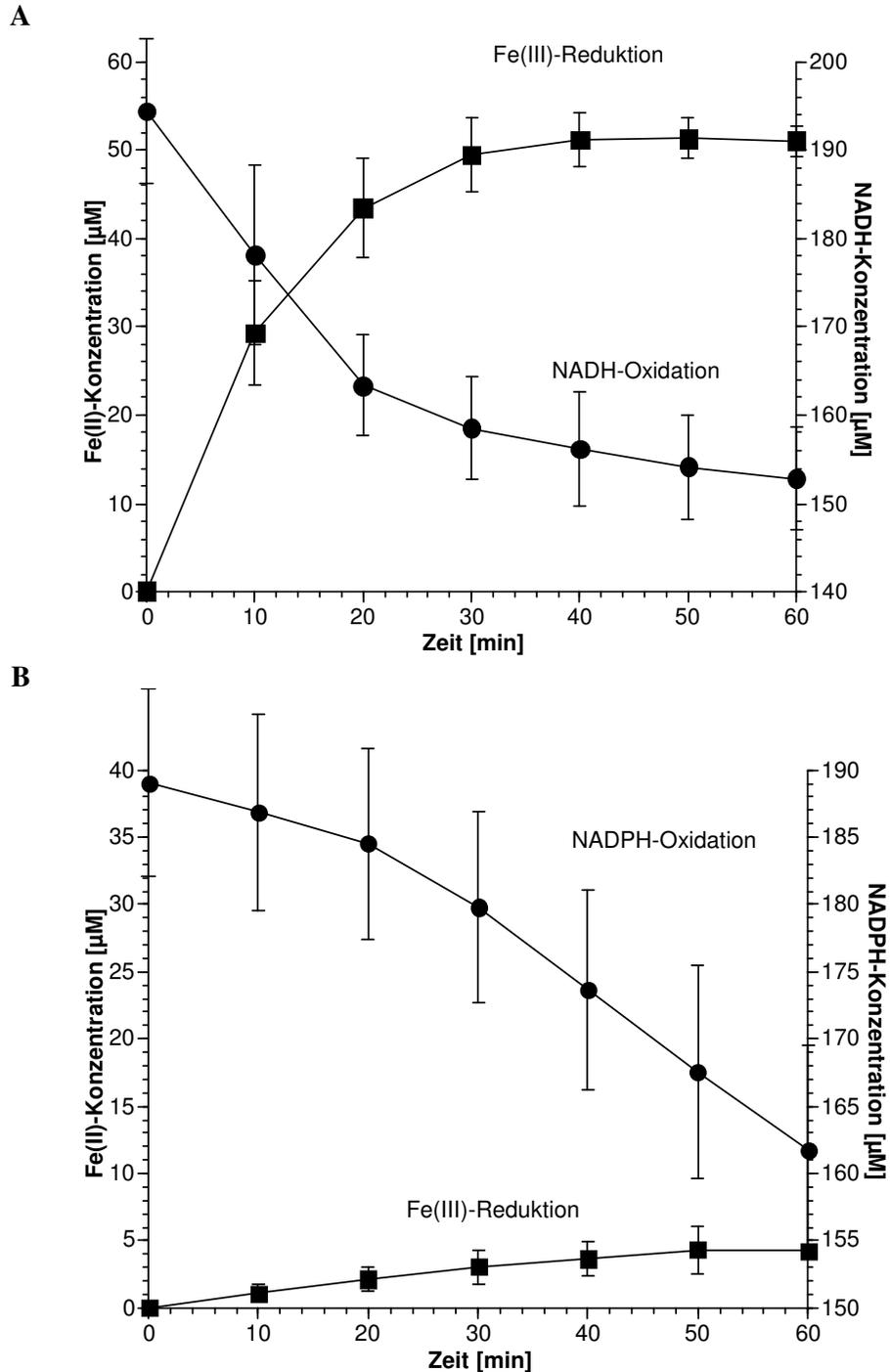


Abb. 15: Stöchiometrie der durch die Lebermitochondrien vermittelten Fe(III)-Reduktion und NAD(P)H-Oxidation. Fe(III)-ATP (50 μM) und 1,10-Phenanthrolin (200 μM) wurden mit Mitochondrien (0,01 mg Protein/ml) in Anwesenheit von (A) NADH oder (B) NADPH (jeweils 200 μM) in Tris/HCl-Puffer (5 mM, pH 7,5 bei 22°C), versetzt mit Mannitol (210 mM) und Saccharose (70 mM), inkubiert. Die Bildung von Fe(II), d.h. die Reduktion von Fe(III), wurde anhand der Absorption des $[\text{Fe(II)} (1,10\text{-Phenanthrolin})_3]^{2+}$ -Komplexes bei 510 nm bestimmt und mit Hilfe einer Kalibrierungskurve, basierend auf Fe(II)-Standards und 1,10-Phenanthrolin, quantifiziert. Die Oxidation von NAD(P)H wurde anhand der Absorptionsabnahme bei 340 nm mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für NAD(P)H ($\epsilon = 6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) quantifiziert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit isolierten Lebermitochondrien von verschiedenen Ratten.

Im Gegensatz zum 1:1-Verhältnis der NADH-Oxidation/Fe(III)-Reduktion wurden bis zu 6 Mol NADPH für die Bildung von 1 Mol Fe(II) benötigt (Abb. 15 B). Die gefundene Korrelation der NADPH-Oxidation und der entsprechenden Fe(III)-Reduktion könnte auf der Existenz von NADPH-Oxidasen in den Mitochondrien basieren, die kaum Ferri-reduktaseaktivitäten aufweisen und vermutlich die Elektronen von NADPH auf molekularen Sauerstoff übertragen, wodurch vermehrt O_2^- aber nur sehr wenig Fe(II) gebildet wird.

2.2.4. Kinetische Eigenschaften und Vergleich der mitochondrialen NADH- und NADPH-abhängigen Fe(III)-Reduktion

Untersuchungen hinsichtlich der Konzentrationsabhängigkeit der mitochondrialen Fe(II)-Bildung ergaben für variierende Fe(III)- oder NAD(P)H-Konzentrationen jeweils Michaelis-Menten-Kinetiken. Bei konstanten Konzentrationen mitochondrialen Proteins (0,01 mg/ml) und NADH (200 μ M) wurde für Fe(III) eine Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit (K_m) von $0,95 \pm 0,4$ mM gefunden und eine Maximalgeschwindigkeit des Substratumsatzes (V_{max}) von $25,7 \pm 2,9$ μ M/min ermittelt (Abb. 16 A). Durch den Einsatz von NADPH (200 μ M) statt des NADHs erhöhte sich der K_m -Wert für Fe(III) um mehr als das dreifache ($K_m = 3,4 \pm 0,8$ mM), während V_{max} im Vergleich um den Faktor 3 abnahm ($V_{max} = 8,1 \pm 1,1$ μ M/min; Abb. 16 B). Daraus lässt sich eine Präferenz des mitochondrialen Fe(III)-Reduktasesystems für NADH ableiten. Bei einer konstanten Fe(III)-ATP-Konzentration (50 μ M) und einer Variation der NADH- oder NADPH-Konzentration zeigte sich eine hohe Affinität des mitochondrialen Fe(III)-Reduktionssystems für NADH mit einem sehr niedrigen K_m -Wert von nur $0,6 \pm 0,4$ μ M (Abb. 16 C), während der K_m -Wert für NADPH im millimolaren Bereich lag ($K_m = 1,7 \pm 0,5$ mM; Abb. 16 D). Dies könnte erklären, warum niedrige NADPH-Konzentrationen, eingesetzt in den photometrischen Versuchen, die mitochondriale Fe(III)-Reduktion nur marginal beschleunigten (Abb. 4 A), während hohe Konzentrationen, erforderlich für die ESR-Spektrometrie, die Geschwindigkeit des Reduktionsprozesses so effektiv erhöhten (Abb. 7 A). Im Vergleich zu den K_m -Werten, bewegten sich die V_{max} -Werte von NADH und NADPH mit $1,6 \pm 0,2$ μ M/min bzw. $3,7 \pm 0,3$ μ M/min in der gleichen Größenordnung.

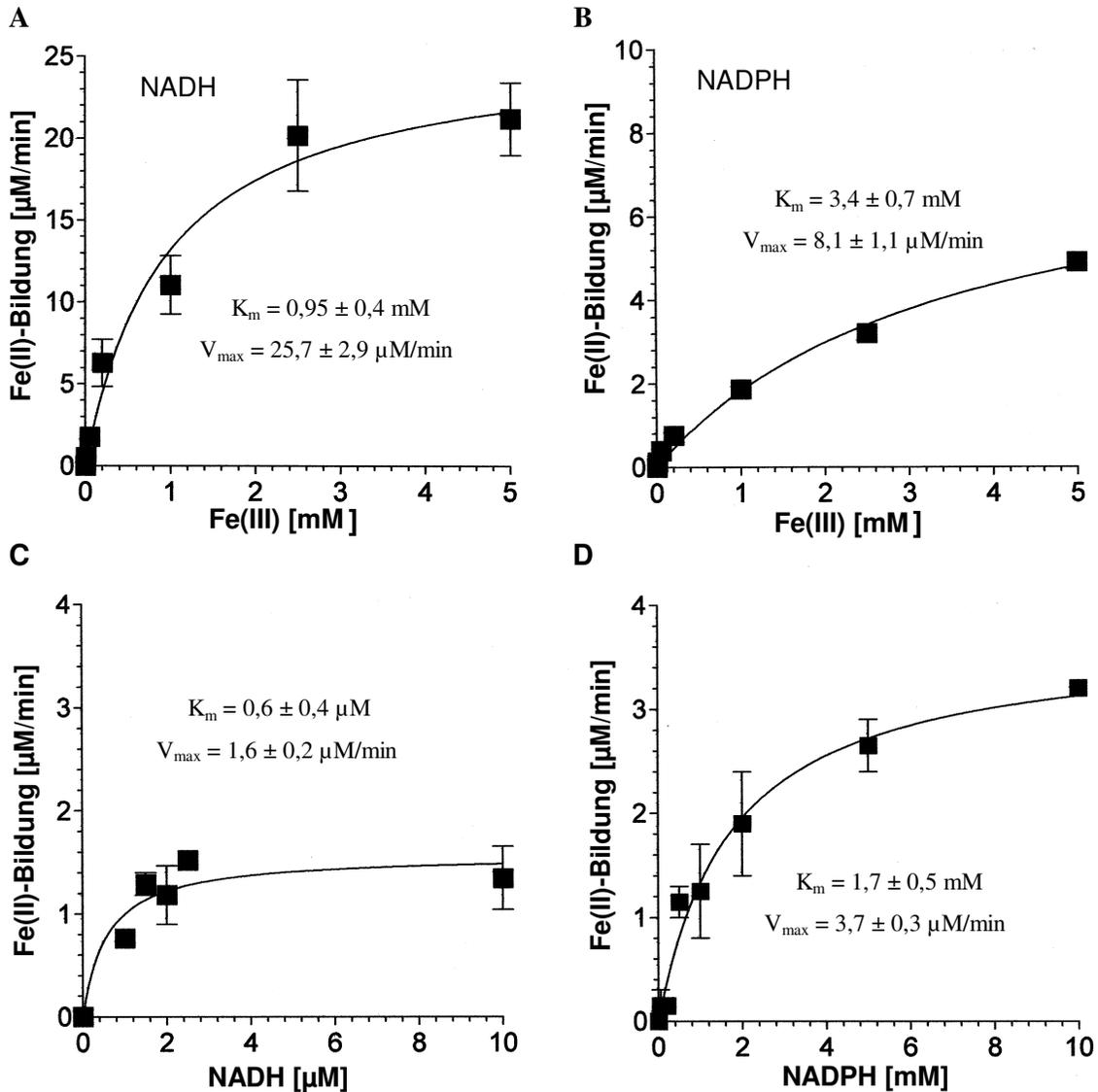


Abb. 16: Abhängigkeit der mitochondrialen Fe(III)-Reduktionsgeschwindigkeit von den Konzentrationen an Fe(III)-ATP und NAD(P)H. Variierende Konzentrationen an Fe(III)-ATP (0,01 – 5 mM) wurden mit einem 4-fachen Überschuss an 1,10-Phenanthrolin und Mitochondrien (0,01 mg Protein/ml) in Anwesenheit von (A) NADH oder (B) NADPH (jeweils 200 μM) inkubiert. In anderen Versuchen wurden Fe(III)-ATP (50 μM) und 1,10-Phenanthrolin (200 μM) mit den Mitochondrien (0,01 mg Protein/ml) und variierenden Konzentrationen an (C) NADH (1 – 10 μM) oder (D) NADPH (0,05 – 10 mM) inkubiert. Die Experimente wurden in Tris/HCl-Puffer (5 mM, pH 7,5 bei 22°C), versetzt mit Mannitol (210 mM) und Saccharose (70 mM), durchgeführt. Die Bildung von Fe(II), d.h. die Reduktion von Fe(III), wurde anhand der Absorption des [Fe(II) (1,10-Phenanthrolin)₃]²⁺-Komplexes bei 510 nm bestimmt und mit Hilfe einer Kalibrierungskurve, basierend auf Fe(II)-Standards und 1,10-Phenanthrolin, quantifiziert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit isolierten Lebermitochondrien von verschiedenen Ratten. Die kinetischen Daten wurden mit Hilfe von GraphPad Prism erhoben. Der Anpassungstest für alle gefitteten Kurven (R^2) lieferte Werte zwischen 0,8 und 0,98.

Insgesamt deuten die unter 2.2.1. – 2.2.4. dargestellten Ergebnisse darauf hin, dass die mitochondriale, NADH-abhängige Reduktion des Fe(III)-ATP-Komplexes ausschließlich durch einen enzymatischen Prozess vermittelt wird.

2.2.5. Lokalisation des enzymatischen Fe(III)-Reduktasesystems der Mitochondrien

2.2.5.1. Funktionelle Integrität der isolierten Mitochondrien

Um Aussagen über die submitochondriale Lokalisation der Fe(III)-Reduktaseaktivität treffen zu können, wurde zunächst die funktionelle Integrität der isolierten Mitochondrien überprüft (Abb. 17). Dazu wurde die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung anhand des Sauerstoffverbrauchs durch polarografische Respirationmessungen mittels einer Clark-Sauerstoffelektrode untersucht und die respiratorische Kontrollrate (RCI) in Abwesenheit (state 4) und Anwesenheit von 100 μM ADP (state 3) bestimmt [110]. Die state 3/state 4-RCI-Rate ist ein Ausdruck für die Kopplung von Respiration und Phosphorylierung und somit für die funktionelle Integrität der Mitochondrien.

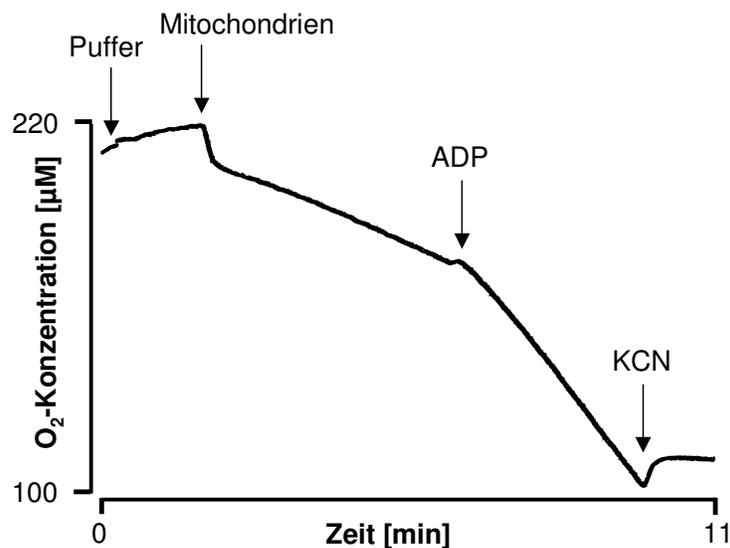


Abb. 17: Sauerstoffverbrauch der Lebermitochondrien in Ab- und Anwesenheit von ADP. Die Mitochondrien (ca. 3 mg Protein/ml) wurden in Respirations-Puffer (60 mM KCl, 10 mM KH_2PO_4 , 5 mM MgCl_2 , 60 mM Tris/HCl, 110 mM Mannitol, 0,5 mM EGTA), versetzt mit den Substraten Glutamat (8 mM) und Malat (4 mM, pH 7,4), inkubiert. Nach einem definierten Zeitraum wurde zunächst ADP (100 μM) und abschließend KCN (2 mM) zugegeben. Der O_2 -Verbrauch wurde mit Hilfe einer Clark-Sauerstoffelektrode aufgezeichnet. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 5 unabhängig durchgeführte Experimente mit isolierten Lebermitochondrien von 3 verschiedenen Ratten.

Wie in Abbildung 17 repräsentativ gezeigt, wurde der konstante Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien (state 4) durch die Zugabe von 100 μM ADP (state 3) mehr als verdoppelt. Die respiratorische Kontrollrate aller vorgenommenen Messungen ($n = 5$) ergab einen RCI von 2 – 3, was auf eine ausreichend gute funktionelle Integrität schließen lässt [110]. Unter Einbeziehung des Ergebnisses, dass NADH in Abwesenheit des Elektronenakzeptors Fe(III) nicht durch die Mitochondrien oxidiert wurde (siehe 2.2.3.), konnte aus diesen und den oben dargestellten Daten geschlossen werden, dass die Mitochondrien nach der Isolation und während der kompletten Versuchsdauer funktionell intakt waren.

2.2.5.2. Beteiligung von Enzymen der mitochondrialen Atmungskette an der NADH-abhängigen Reduktion von Fe(III)

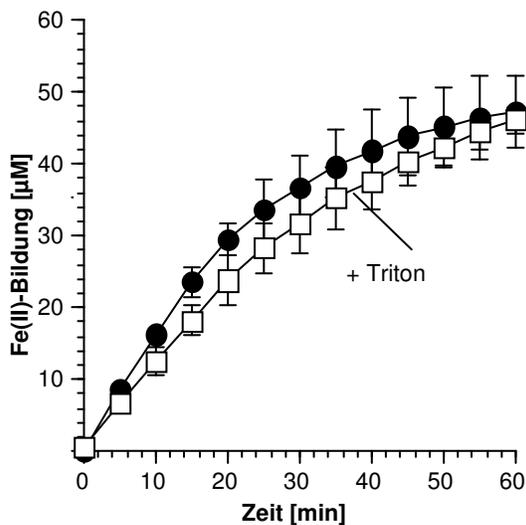


Abb. 18: Einfluss von Triton X-100 auf die NADH-abhängige Reduktion von chelatisierbarem Fe(III) durch die Lebermitochondrien. Die Mitochondrien (0,01 mg Protein/ml) wurden mit Triton X-100 (1%) für 20 Minuten bei 37°C vorbehandelt. Die (□) permeabilisierten und (●) intakte Mitochondrien wurden mit Fe(III)-ATP (50 μM), 1,10-Phenanthrolin (200 μM) und NADH (200 μM) in Tris/HCl-Puffer (5 mM, pH 7,5 bei 22°C), versetzt mit Mannitol (210 mM) und Saccharose (70 mM), inkubiert. Die Bildung von Fe(II), d.h. die Reduktion von Fe(III), wurde anhand der Absorption des $[\text{Fe(II)}(1,10\text{-Phenanthrolin})_3]^{2+}$ -Komplexes bei 510 nm bestimmt und mit Hilfe einer Kalibrierungskurve, basierend auf Fe(II)-Standards und 1,10-Phenanthrolin, quantifiziert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit isolierten Lebermitochondrien von verschiedenen Ratten.

Eine Permeabilisierung der äußeren- und inneren Mitochondrienmembran durch die Inkubation mit 1% Triton X-100 hatte keinen Einfluss auf die NADH-abhängige Reduktion des Fe(III)-ATP-Komplexes (Abb. 18). Die gleichen Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Mitochondrien durch die Behandlung mit Digitonin (1,1 mg/mg mitochondriales Protein) lysiert oder mechanisch mittels Ultraschallwellen bzw. durch schnelles Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem schnellem Auftauen permeabilisiert wurden (Daten nicht dargestellt). In Übereinstimmung mit diesen Resultaten hatten weder Rotenon (10 μM),

das den Elektronenfluss von den Fe-S-Zentren im Komplex I der Atmungskette zum Ubichinon und somit die gesamte oxidative Phosphorylierung hemmt, noch Antimycin A (10 μM), das den Elektronentransfer vom Cytochrom b zum Cytochrom c_1 im Komplex III blockiert, einen Einfluss auf die NADH-abhängige Fe(III)-Reduktion (Abb. 19).

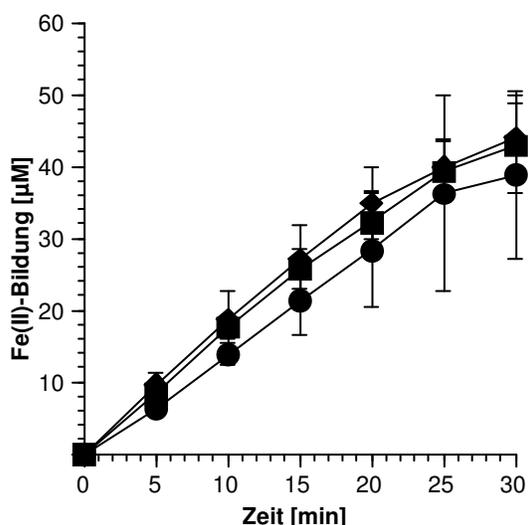


Abb. 19: Einfluss von Rotenon und Antimycin A auf die NADH-abhängige Reduktion von chelatisierbarem Fe(III) durch die Lebermitochondrien. Fe(III)-ATP (50 μM), 1,10-Phenanthrolin (200 μM) und NADH (200 μM) wurden mit den Mitochondrien (0,01 mg Protein/ml) in Abwesenheit (●) und Anwesenheit von (■) Rotenon oder (◆) Antimycin A (jeweils 10 μM) in Tris/HCl-Puffer (5 mM, pH 7,5 bei 22°C), versetzt mit Mannitol (210 mM) und Saccharose (70 mM), inkubiert. Die Bildung von Fe(II), d.h. die Reduktion von Fe(III), wurde anhand der Absorption des $[\text{Fe(II)} (1,10\text{-Phenanthrolin})_3]^{2+}$ -Komplexes bei 510 nm bestimmt und mit Hilfe einer Kalibrierungskurve, basierend auf Fe(II)-Standards und 1,10-Phenanthrolin, quantifiziert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit isolierten Lebermitochondrien von verschiedenen Ratten.

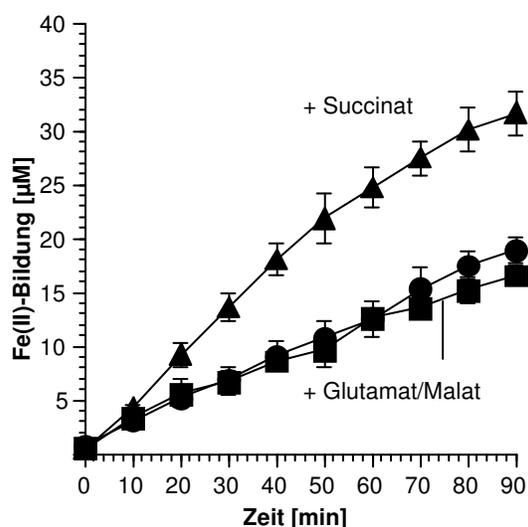


Abb. 20: Einfluss von Succinat und Glutamat/Malat auf die NADH-abhängige Reduktion von chelatisierbarem Fe(III) durch die Lebermitochondrien. Die Mitochondrien (1 mg Protein/ml) wurden mit NADH (200 μM) und Fe(III)-ATP (50 μM) in Abwesenheit (●) und Anwesenheit von (■) Glutamat/Malat (je 5 mM) bzw. (▲) Succinat (5 mM) in Tris/HCl-Puffer (5 mM, pH 7,5 bei 22°C), versetzt mit Mannitol (210 mM) und Saccharose (70 mM), unter Sauerstoffausschluss (Argonatmosphäre) in einer Glove-Box inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, mit 1,10-Phenanthrolin (200 μM) und Metaphosphorsäure (8%) versetzt und anschließend die gefällten Proteine durch Zentrifugation bei 15000 \times g (5 min) entfernt. Das gebildete Fe(II) (im Überstand), d.h. die Reduktion von Fe(III), wurde anhand der Absorption des $[\text{Fe(II)} (1,10\text{-Phenanthrolin})_3]^{2+}$ -Komplexes bei 510 nm bestimmt und mit Hilfe einer Kalibrierungskurve, basierend auf Fe(II)-Standards und 1,10-Phenanthrolin, quantifiziert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit isolierten Lebermitochondrien von verschiedenen Ratten.

Glutamat und Malat (je 5 mM), Substrate für den im Matrixraum der Mitochondrien lokalisierten Citratzyklus, hatten ebenfalls keine Auswirkungen auf den Reduktionsprozess (Abb. 20). Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass ein weiteres Substrat dieses Zyklus, das Succinat (5 mM), die NADH-abhängige Reduktion von Fe(III) effektiv beschleunigte (Abb. 20), was unter 3.2.2. ausführlich diskutiert wird.

2.2.5.3. Reduktion von Fe(III) durch submitochondriale Fraktionen

Da eine Beteiligung von Enzymen der Atmungskette an dem NADH-abhängigen Fe(III)-Reduktionsprozess ausgeschlossen werden konnte, wurde im Folgenden die submitochondriale Lokalisation der Fe(III)-Reduktaseaktivität mittels Subfraktionierung der Mitochondrien näher untersucht. Dazu wurden die äußeren Membranen (OM), die Mitoplasten (MP), bestehend aus inneren Membranen und der mitochondrialen Matrix, sowie die Intermembranfraktionen (IM), bestehend aus den löslichen Bestandteilen zwischen den beiden Membranen, separiert. Um eine Aussage treffen zu können, welche der submitochondrialen Fraktionen die höchste NADH-abhängige Fe(III)-Reduktaseaktivität besitzt, wurde wiederum die Reinheit der einzelnen Fraktionen bestimmt. Hierzu diente die NADH-Cytochrom-*c*-Reduktase, ein in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiertes Markerenzym, dessen Aktivität in den submitochondrialen Fraktionen unter Verwendung der jeweils gleichen Proteinkonzentration (0,01 mg/ml) bestimmt wurde (Tab. 4).

Die in der Mitoplastenfraktion nachgewiesene NADH-Cytochrom-*c*-Reduktase-Aktivität von knapp 56 U/l (siehe Tab. 4) ist vermutlich auf eine Kontamination mit intakten Mitochondrien zurückzuführen, da sich die nicht durch Digitonin permeabilisierten Mitochondrien auf Grund der für die Isolation der Mitoplastenfraktion erforderlichen hohen Gravitationskraft (12000 x g) in der Mitoplastenfraktion ansammeln können. Demgegenüber war die lösliche Intermembranfraktion kaum mit Bestandteilen der äußeren Membran kontaminiert, während in Kontrollen mit intakten Mitochondrien ca. 50% der Markerenzymaktivität der äußeren Membranfraktion nachweisbar waren.

Tabelle 4: Proteingehalt, Markerenzymaktivität und Reinheit der submitochondrialen Fraktionen

Fraktionen/ Subfraktionen	Protein (mg/ml)	NADH-Cytochrom- c-Reduktase (kU/l)	NADH-Cytochrom- c-Reduktase (%)
intakte Mitochondrien	35,5 ± 8,6	129,7 ± 8,1	51,0 ± 3,1
äußere Membran (OM)	11,8 ± 5,7	254,7 ± 23,5	100
Mitoplast (MP)	29,6 ± 0,9	55,7 ± 9,3	22,0 ± 4,1
Intermembran- Fraktion (IM)	0,4 ± 0,4	11,3 ± 5,3	4,7 ± 2,5

Zur Ermittlung der NADH-Cytochrom-*c*-Reduktase-Aktivität wurde jeweils die gleiche Proteinmenge, d.h. 0,01 mg/ml eingesetzt. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit Mitochondrien der Leber von verschiedenen Ratten.

Wenn man jeweils 0,01 mg submitochondriales Protein pro ml im Standardansatz (50 µM Fe(III)-ATP, 200 µM NADH, 200 µM 1,10-Phenanthrolin im Messpuffer) inkubierte, zeigte sich, dass die Reduktion von Eisen(III) am effektivsten von der äußeren Membranfraktion vermittelt wurde, wobei der Fe(III)-ATP-Komplex innerhalb von 10 Minuten fast vollständig reduziert wurde (Abb. 21 A). In Gegenwart von NADPH war die Fe(III)-Reduktionsrate analog zu den unter 2.1.2. beschriebenen Ergebnissen erheblich niedriger, wobei wiederum in der äußeren Membranfraktion die höchste Fe(II)-Bildungsrate gemessen wurde (Abb. 21 B).

Das Fe(III)-Reduktionsvermögens der Mitoplasten- und Intermembranfraktion wurde um den Beitrag, der durch kontaminierende äußere Membranen zustande kam (Tab. 4), rechnerisch bereinigt. Die höchste spezifische, NADH-abhängige Fe(III)-Reduktionsaktivität (U/mg Protein) konnte in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert werden, während die beiden anderen submitochondrialen Fraktionen wesentlich niedrigere spezifische Aktivitäten aufwiesen (Abb. 22). Kontrollmessungen mit intakten Mitochondrien zeigten, in Übereinstimmung mit dem Wert der Reinheitsbestimmung (Tab. 4), dass diese eine um etwa die Hälfte geringere spezifische Aktivität im Vergleich zur äußeren Membran besitzen.

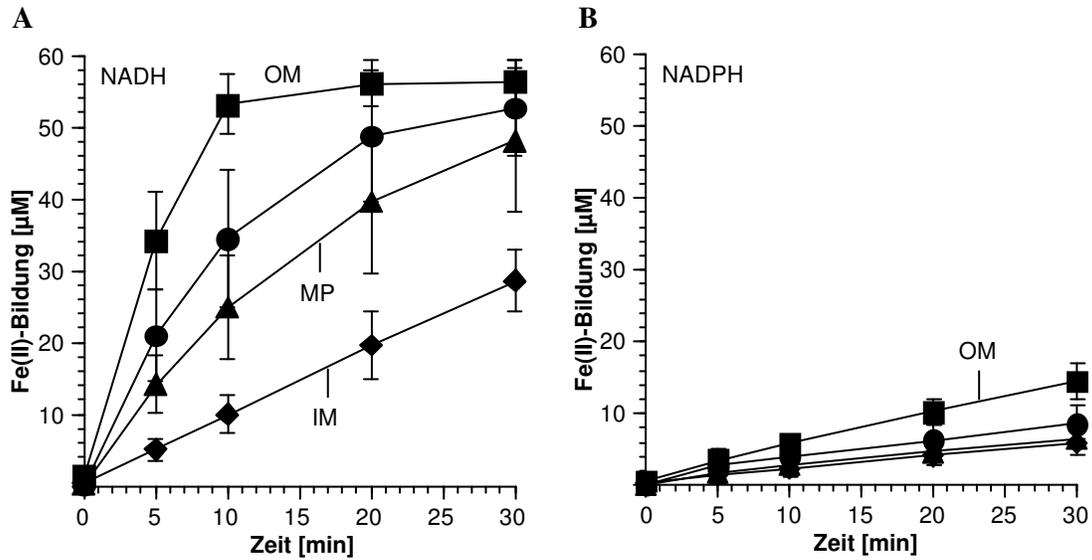


Abb. 21: Reduktion von chelatisierbarem Fe(III) durch submitochondriale Fraktionen der Rattenleber. Fe(III)-ATP (50 μ M) und 1,10-Phenanthrolin (200 μ M) wurden mit (●) intakten Mitochondrien, (■) der äußeren Membranfraktion (OM), (▲) den Mitoplasten (MP) und (◆) der Intermembranfraktion (IM) (jeweils 0,01 mg Protein/ml) in Anwesenheit von (A) NADH oder (B) NADPH (jeweils 200 μ M) in Tris/HCl-Puffer (5 mM, pH 7,5 bei 22°C), versetzt mit Mannitol (210 mM) und Saccharose (70 mM), inkubiert. Die Bildung von Fe(II), d.h. die Reduktion von Fe(III), wurde anhand der Absorption des $[\text{Fe(II)} (1,10\text{-Phenanthrolin})_3]^{2+}$ -Komplexes bei 510 nm bestimmt und mit Hilfe einer Kalibrierungskurve, basierend auf Fe(II)-Standards und 1,10-Phenanthrolin, quantifiziert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit isolierten Mitochondrien und submitochondrialen Fraktionen der Leber von verschiedenen Ratten.

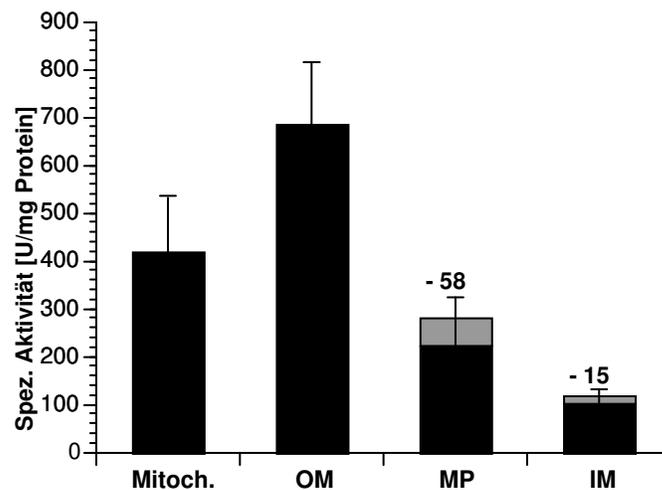


Abb. 22: Spezifische Fe(III)-Reduktionskapazität der submitochondrialen Fraktionen. Die spezifischen Aktivitäten der Fe(III)-Reduktion (U/mg Protein) wurden aus den in Abbildung 21 A dargestellten Absorptionsanstiegen A_{510} (innerhalb ersten 5 Minuten) berechnet. Die grauen Anteile der Balken (der Mitoplasten und der Intermembranfraktion) repräsentieren die Beiträge durch kontaminierende Bestandteile aus der äußeren Membranfraktion (Tab. 4), um die die Originaldaten korrigiert wurden. Entsprechend Abbildung 21 A sind die gezeigten Daten Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit isolierten Mitochondrien und submitochondrialen Fraktionen der Leber von verschiedenen Ratten; Mitoch. = Mitochondrienfraktion, OM = äußere Membranfraktion, MP = Mitoplastenfraktion, IM = Intermembranfraktion.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die NADH-abhängige Reduktion von Fe(III) durch intakte Mitochondrien hauptsächlich durch einen an der äußeren Mitochondrienmembran stattfindenden enzymatischen Prozess vermittelt wird.

Um zweifelsfrei auszuschließen, dass das (geringe) Fe(III)-Reduktionsvermögen der inneren Membran/Matrix-Fraktion (Mitoplast) eventuell doch auf den hier lokalisierten Atmungskettenenzymen beruhte, wurde diese Fraktion zusätzlich in Anwesenheit von Rotenon und Antimycin A untersucht. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen an intakten Mitochondrien (siehe 2.2.5.2.) konnte gezeigt werden, dass die Atmungsketteninhibitoren keinen Einfluss auf die NADH-vermittelte Fe(III)-Reduktion der Mitoplasten ausübten (Abb. 23).

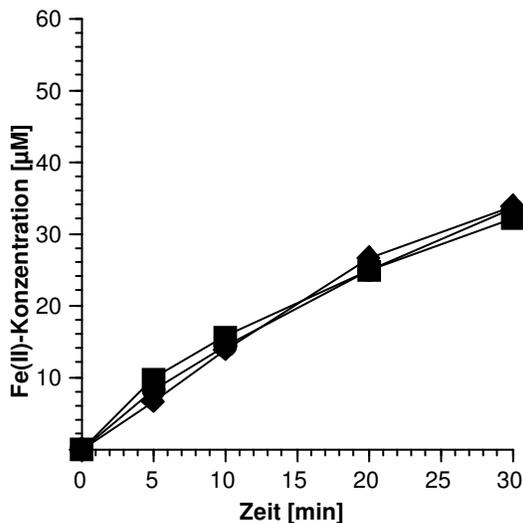


Abb. 23: Einfluss von Rotenon und Antimycin A auf die NADH-abhängige Reduktion von chelatisierbarem Fe(III) durch die Mitoplastenfraktion. Fe(III)-ATP (50 µM), 1,10-Phenanthrolin (200 µM) und NADH (200 µM) wurden mit den Mitoplasten (0,01 mg Protein/ml) in Abwesenheit (●) und Anwesenheit von (■) Rotenon oder (◆) Antimycin A (jeweils 10 µM) in Tris/HCl-Puffer (5 mM, pH 7,5 bei 22°C), versetzt mit Mannitol (210 mM) und Saccharose (70 mM), inkubiert. Die Bildung von Fe(II), d.h. die Reduktion von Fe(III), wurde anhand der Absorption des [Fe(II) (1,10-Phenanthrolin)₃]²⁺-Komplexes bei 510 nm bestimmt und mit Hilfe einer Kalibrierungskurve, basierend auf Fe(II)-Standards und 1,10-Phenanthrolin, quantifiziert. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Experimente mit den Mitoplasten der Lebermitochondrien von verschiedenen Ratten.

2.2.6. Intramitochondriale Aufnahme von Fe(II) während der mitochondrialen Fe(III)-Reduktion

Es wurde beschrieben, dass nur extramitochondriales labiles Eisen toxische Wirkungen auf die Zelle ausübt, während der intramitochondriale chelatisierbare Fe(II)-Pool nicht an Zellschädigungsprozessen beteiligt ist [111, 112]. Da im Zuge der in den Mitochondrien stattfindenden Häm-synthese chelatisierbare Fe²⁺-Ionen benötigt werden, deren Aufnahme in die mitochondriale Matrix mit einer vorausgehenden Reduktion von Fe(III)-Komplexen gekoppelt ist [113], wurde in der vorliegenden Arbeit die Fähigkeit der intakten

Lebermitochondrien zur Aufnahme des zuvor von ihnen reduzierten Eisens untersucht; die Aufnahme der reduzierten Fe(III)-Ionen würde das toxische Potential des Reduktionsprozesses vermindern. Wenn verschiedene Konzentrationen an Eisen(III) mit den Mitochondrien (1 mg Protein/ml) in Anwesenheit von NADH (5 mM) inkubiert wurden, zeigte sich, dass das reduzierte Eisen nach Entfernung der Organellen fast vollständig im Überstand detektierbar war und somit nicht von den Mitochondrien aufgenommen wurde (Abb. 24). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die mitochondriale, NADH-abhängige Reduktion einer hohen Fe(III)-Konzentration nicht mit der Aufnahme des reduzierten Eisens durch die Mitochondrien gekoppelt ist.

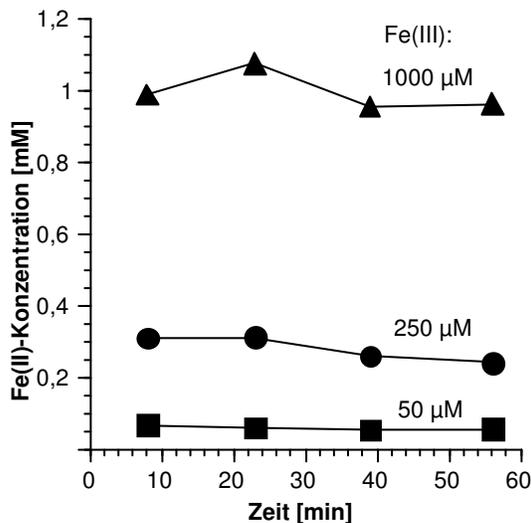


Abb. 24: Extramitochondriale Konzentration an Fe(II) im Anschluss an die NADH-abhängige Fe(III)-Reduktion durch die Mitochondrien. Die Mitochondrien (1 mg/ml) wurden mit NADH (5 mM) und (■) 50 µM, (●) 250 µM oder (▲) 1000 µM Fe(III)-ATP in Tris/HCl-Puffer (5 mM, pH 7,5 bei 22°C), versetzt mit Mannitol (210 mM) und Saccharose (70 mM), inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und bei 16000 x g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend für 20 Minuten mit Ascorbinsäure (20 mM) inkubiert und dann mit 1,10-Phenanthrolin (200 µM) versetzt. Das gebildete Fe(II) (im Überstand) wurde anhand der Absorption des $[\text{Fe(II)}(1,10\text{-Phenanthrolin})_3]^{2+}$ -Komplexes bei 510 nm bestimmt und mit Hilfe einer Kalibrierungskurve, basierend auf Fe(II)-Standards und 1,10-Phenanthrolin, quantifiziert. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Experimente mit isolierten Lebermitochondrien von verschiedenen Ratten.

2.3. REDUKTION CHELATISIERBARER FE(III)-IONEN DURCH ISOLIERTE MITOCHONDRIEN AUS DER SKELETTMUSKULATUR DER RATTE

Um zu untersuchen, ob die Fähigkeit zu einer effektiven, NADH-abhängigen Reduktion von Fe(III) auf die Mitochondrien des Lebergewebes beschränkt ist, wurden vergleichende Experimente mit isolierten Mitochondrien aus dem Wadenmuskel der Ratte (*Musculus gastrocnemius*) vorgenommen. Der direkte Vergleich im Standardversuch (0,01 mg mitochondriales Protein/ml, 50 µM Fe(III)-ATP, 200 µM NAD(P)H, 200 µM 1,10-

Phenanthrolin), durchgeführt im Messpuffer der Lebermitochondrien sowie in KCl-Lösung (150 mM; Daten nicht dargestellt), zeigte sowohl in Versuchen mit NADH als auch mit NADPH keinen Unterschied in der Fe(III)-Reduktionskapazität der Mitochondrien beider Gewebe (Abb. 25; vgl. mit Abb. 4 A). Auch die kinetischen Daten für NADH, basierend auf Versuchen mit 0,01 mg Protein/ml und 50 μM Fe(III), bewegten sich mit einem K_m -Wert von $0,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$ und einem V_{max} -Wert von $2,2 \pm 0,1 \mu\text{M}/\text{min}$ im selben Rahmen wie die für die Lebermitochondrien ermittelten Werte (Abb. 26; vgl. mit Abb. 16 C).

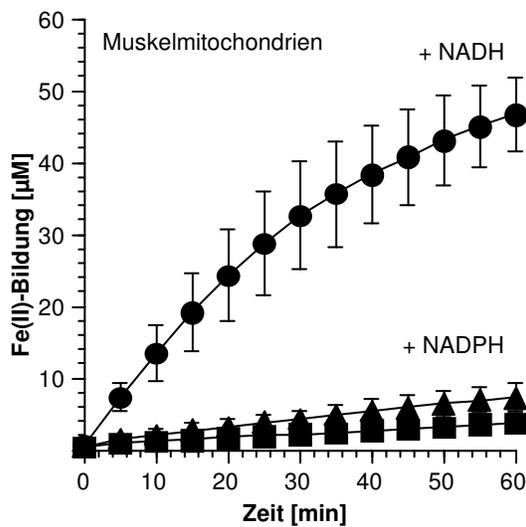


Abb. 25: Reduktion von chelatisierbarem Fe(III) durch isolierte Mitochondrien der Skelettmuskulatur. Fe(III)-ATP (50 μM) und 1,10-Phenanthrolin (200 μM) wurden mit Skelettmuskelmitochondrien (0,01 mg Protein/ml) in Abwesenheit (\blacksquare) und Anwesenheit von (\bullet) NADH oder (\blacktriangle) NADPH (jeweils 200 μM) in Tris/HCl-Puffer (5 mM, pH 7,5 bei 22°C), versetzt mit Mannitol (210 mM) und Saccharose (70 mM), inkubiert. Die Bildung von Fe(II), d.h. die Reduktion von Fe(III), wurde anhand der Absorption des $[\text{Fe(II)} (1,10\text{-Phenanthrolin})_3]^{2+}$ -Komplexes bei 510 nm bestimmt und mit Hilfe einer Kalibrierungskurve, basierend auf Fe(II)-Standards und 1,10-Phenanthrolin, quantifiziert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit isolierten Mitochondrien der Skelettmuskulatur (*Musculus gastrocnemius*) von verschiedenen Ratten.

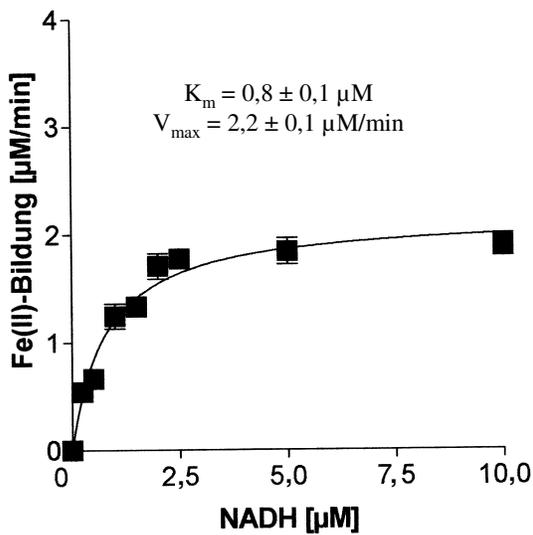


Abb. 26: Abhängigkeit der Geschwindigkeit der durch Skelettmuskelmitochondrien vermittelten Fe(III)-Reduktion von der NADH-Konzentration. Variierende Konzentrationen an NADH (1 – 10 μM) wurden mit Fe(III)-ATP (50 μM), 1,10-Phenanthrolin (200 μM) und Skelettmuskelmitochondrien (0,01 mg Protein/ml) in Tris/HCl-Puffer (5 mM, pH 7,5 bei 22°C), versetzt mit Mannitol (210 mM) und Saccharose (70 mM), inkubiert. Die Bildung von Fe(II), d.h. die Reduktion von Fe(III), wurde anhand der Absorption des $[\text{Fe(II)} (1,10\text{-Phenanthrolin})_3]^{2+}$ -Komplexes bei 510 nm bestimmt und mit Hilfe einer Kalibrierungskurve, basierend auf Fe(II)-Standards und 1,10-Phenanthrolin, quantifiziert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit isolierten Mitochondrien der Skelettmuskulatur (*Musculus gastrocnemius*) von verschiedenen Ratten. Die kinetischen Daten wurden mit Hilfe von GraphPad Prism erhoben. Der Anpassungstest für die gefittete Kurve (R^2) liegt bei 0,94.

Da, wie oben beschrieben, sowohl die Leber- als auch die Muskelmitochondrien sehr effektiv Fe(III)-Ionen reduzieren können, das gebildete Fe(II) aber nicht aufnehmen (gezeigt an den Lebermitochondrien), verbleibt dieser Fe(II)-Pool Fenton-reaktiv im Cytosol.

Die Toxizität des cytosolischen, redox-aktiven Eisens wird unter physiologischen Bedingungen (geringe Konzentration des chelatisierbaren Eisens) durch intrazelluläre Antioxidantien wie Katalase und SOD minimiert. Eine extrazelluläre Freisetzung dieses Eisenpools könnte jedoch durch pathologische Prozesse, wie z.B. durch ein mechanisches Gewebetrauma, verursacht werden und damit auf Grund der fehlenden Katalase oder durch Aktivierung von NADPH-Oxidasen (siehe 1.4.1.) entscheidend zur Bildung von extrazellulären, reaktiven Sauerstoffspezies beitragen, die bekanntermaßen die zell- und gewebeschädigenden Prozesse im Zuge des Traumas weiter vorantreiben (siehe 1.4.). Auf Grund dieser Vermutung wurde im Folgenden untersucht, ob ein induziertes mechanisches Muskeltrauma mit der Freisetzung von chelatisierbaren, redox-aktiven Eisenionen einhergeht.

2.4. FREISETZUNG VON CHELATISIERBAREM EISEN NACH MECHANISCHEM MUSKELTRAUMA

2.4.1. Detektion chelatisierbaren Eisens im Muskelhomogenat

Die (potentielle) Freisetzung chelatisierbaren Eisens als Folge eines größeren mechanischen Muskelschadens wurde mit Hilfe eines *in vitro*-Traumamodells, d.h. im Überstand (16000 x g-Überstand) eines 1:10-Muskelhomogenats, bestehend aus dem zerkleinerten Gewebe der entnommenen Wadenmuskeln (*Musculus gastrocnemius*) der Ratte, untersucht. Zum Nachweis des chelatisierbaren Eisens wurde der fluoreszierende Eisenchelator PG SK (Abb. 27) verwendet, dessen Fluorophor in Folge der Komplexbildung von Fe²⁺-Ionen durch seinen Phenanthrolinanteil eine Fluoreszenzauslöschung (= Fluoreszenzquenchung) erfährt [12, 114]. Die Quantifizierung des chelatisierbaren Eisens erfolgte, basierend auf der stabilen 3:1-Bindungsstöchiometrie des PG SK:Fe²⁺-Komplexes [114], zum einen aus der direkten Fluoreszenzquenchung durch den Muskelüberstand und zum anderen unter Verwendung eines definierten internen Fe(II)-Standards (siehe 5.2.8.2.).

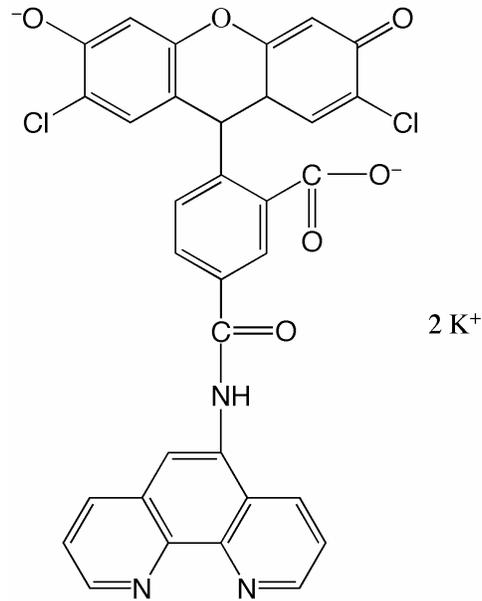


Abb. 27: Strukturformel von Phen Green SK (PG SK, di-Kaliumsalz)

Wurde der 16000 x g-Überstand des 1:10-Muskelhomogenats mit 50 μM PG SK versetzt, konnte mit dem Laser-Scanning-Mikroskop eine deutliche Abnahme der PG SK-Fluoreszenz im Vergleich zu eisenfreiem Puffer nachgewiesen werden (Abb. 28), die einer Fe(II)-Konzentration von 5 μM entsprach. Die ermittelte Konzentration chelatisierbaren Eisens konnte sofort nach der Zerstörung des Muskelgewebes detektiert werden und war auch noch nach 24 Stunden im 16000 x g-Überstand nachweisbar (Abb. 29). Die gleiche Eisenfreisetzung wurde berechnet, wenn der Homogenatüberstand zusätzlich mit 5 μM des internen Fe(II)-Standards versetzt wurde, und aus der nun resultierenden stärkeren Abnahme der PG SK-Fluoreszenz die ursprünglich in der Muskelsuspension vorhandene Konzentration an chelatisierbaren Fe(II) berechnet wurde (siehe Material und Methoden 5.2.8.2.; Abb. 28 und 29). Das ist ein Beleg dafür, dass die Fluoreszenzabnahme in der Muskelprobe nur auf der Komplexbildung mit Fe(II) beruhte und andere mögliche Gründe für eine Fluoreszenzquenchung wie Ionenstärke, Viskosität, absorbierende und adsorbierende (an PG SK) Biomoleküle ausgeschlossen werden können. Deshalb wurden im Folgenden nur noch die durch die direkte Fluoreszenzabnahme ermittelten Werte grafisch dargestellt, während die 2. Quantifizierungsmethode als Kontrolle ebenfalls immer durchgeführt, die daraus resultierenden Ergebnisse jedoch nicht gezeigt werden.

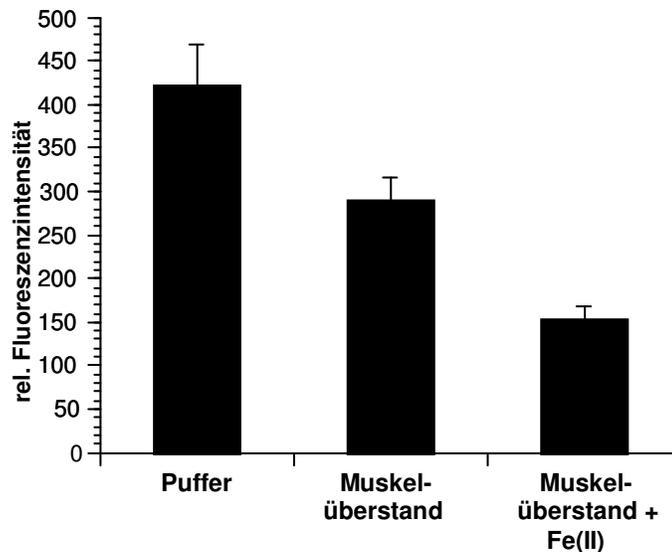


Abb. 28: Konzentration von chelatisierbarem Fe(II) im Überstand des Skelettmuskelhomogenats der Ratte. Der Skelettmuskel wurde mit Chelex-behandeltem NaCl (0,9%)/HEPES-Puffer (20 mM, pH 7,5 bei 37°C) versetzt (1:10 w/v), mittels eines Ultra-Turrax homogenisiert und das Homogenat anschließend bei 16000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der resultierende Überstand und Aliquots des Puffers wurden zunächst für 20 Minuten mit Ascorbinsäure (1 mM) und dann für 2 Minuten mit Phen Green SK (50 µM) inkubiert. Die PG SK-Fluoreszenz der Proben (100 µl) wurde mittels Laser-Scanning-Mikroskopie ($\lambda_{exc.} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em.} \geq 505\text{-}530 \text{ nm}$) in einer Fokusebene von 10 µm über der Deckglasoberfläche (d.h. innerhalb der Flüssigkeitssäule) gemessen. Anschließend wurden die Proben des Überstandes mit 5 µM Eisen(II)-Ammoniumsulfat (= interner Standard) versetzt und erneut die Fluoreszenz gemessen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit den Wadenmuskeln (*Musculus gastrocnemius*) von verschiedenen Ratten.

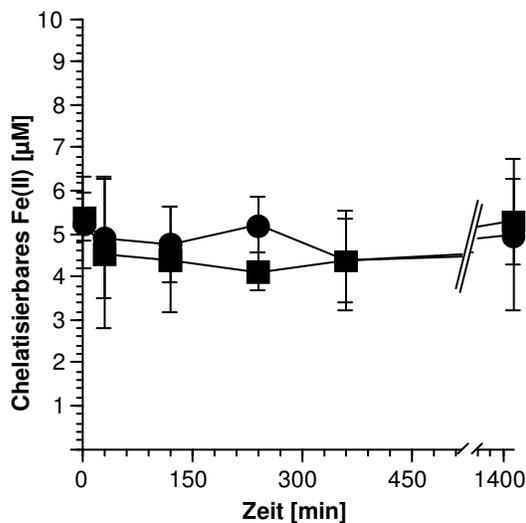


Abb. 29: Zeitverlauf der Konzentration von chelatisierbarem Fe(II) im Überstand des Muskelhomogenats. Der Skelettmuskel wurde mit Chelex-behandeltem NaCl (0,9%)/HEPES-Puffer (20 mM, pH 7,5 bei 37°C) versetzt (1:10 w/v), mittels eines Ultra-Turrax homogenisiert und das Homogenat anschließend zu definierten Zeiten bei 16000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde zunächst für 20 Minuten mit Ascorbinsäure (1 mM) und dann für 2 Minuten mit Phen Green SK (50 µM) inkubiert. Die PG SK-Fluoreszenz der Proben (100 µl) wurde mittels Laser-Scanning-Mikroskopie ($\lambda_{exc.} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em.} \geq 505\text{-}530 \text{ nm}$) in einer Fokusebene von 10 µm über der Deckglasoberfläche (d.h. innerhalb der Flüssigkeitssäule) gemessen. Die Quantifizierung des chelatisierbaren Fe(II) erfolgte entweder (●) aus der Fluoreszenzdifferenz im Vergleich zur ungequenchten PG SK-Fluoreszenz (im Puffer) oder (■) aus der Quenchung nach Zugabe von 5 µM Eisen(II)-Ammoniumsulfat (= interner Standard) anhand der 3:1-Bindungsstöchiometrie des PG SK/Fe²⁺-Komplexes. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit den Wadenmuskeln (*Musculus gastrocnemius*) von verschiedenen Ratten.

Um auszuschließen, dass ein gewisser Anteil chelatisierbaren Eisens während der Zentrifugation bei 16000 x g verloren ging, wurde die Gravitationskraft bis auf 3000 x g herabgesetzt. Dies hatte jedoch keinen nennenswerten Effekt auf die detektierbare Konzentration chelatisierbaren Eisens (Abb. 30).

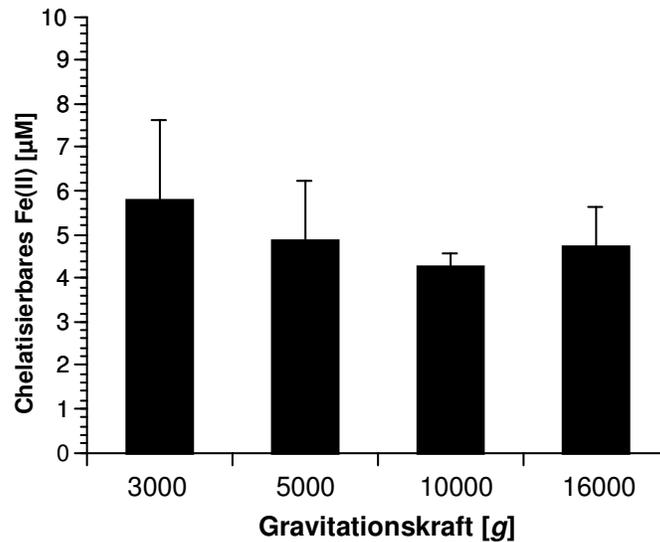


Abb. 30: Einfluss der Gravitationskraft auf die Konzentration von chelatisierbarem Fe(II) im Überstand des Muskelhomogenats. Der Skelettmuskel wurde mit Chelex-behandeltem NaCl (0,9%)/HEPES-Puffer (20 mM, pH 7,5 bei 37°C) versetzt (1:10 w/v), mittels eines Ultra-Turrax homogenisiert und das Homogenat anschließend bei variierender Gravitationskraft (3000 – 16000 x g) für 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden zunächst für 20 Minuten mit Ascorbinsäure (1 mM) und dann für 2 Minuten mit Phen Green SK (50 μM) inkubiert. Die PG SK-Fluoreszenz der Proben (100 μl) wurde mittels Laser-Scanning-Mikroskopie ($\lambda_{exc.} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em.} \geq 505\text{-}530 \text{ nm}$) in einer Fokusebene von 10 μm über der Deckglasoberfläche (d.h. innerhalb der Flüssigkeitssäule) gemessen. Die Quantifizierung des chelatisierbaren Fe(II) erfolgte aus der Fluoreszenzdifferenz im Vergleich zur ungequenchten PG SK-Fluoreszenz (im Puffer) anhand der 3:1-Bindungsstöchiometrie des PG SK/Fe²⁺-Komplexes. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit den Wadenmuskeln (*Musculus gastrocnemius*) von verschiedenen Ratten.

2.4.2. Gesamteisengehalt im Muskelgewebe

Die Bestimmung des Gesamteisengehalts im 1:10-Muskelhomogenat und seinem 16000 x g-Überstand erfolgte mit Hilfe der Atomabsorptionsspektrometrie (AAS), einer Methode zur quantitativen Analyse von Elementen in ihrer atomaren Form. Im Mittel war eine Gesamteisenkonzentration von $882 \pm 114 \text{ μg/l}$ bzw. $158,2 \pm 20,3 \text{ μM}$ im 1:10-Homogenat detektierbar (Tab. 5). Im 16000 x g-Muskelhomogenatüberstand konnte eine absolute Eisenkonzentration von $617 \pm 134 \text{ μg/l}$ bzw. $110,4 \pm 24 \text{ μM}$ nachgewiesen werden, was 2/3 des Gesamteisengehaltes der Myozyten entspricht. Der Vergleich der muskulären

Gesamteisenkonzentration mit der durch PG SK-detektierbaren Eisenkonzentration (5 μM) zeigte, dass durch die Zerstörung des Muskelgewebes ungefähr 3% des Eisens als chelatisierbares Eisen freigesetzt wurden, während im 16000 x *g*-Überstand ungefähr 4,5% des Eisens durch PG SK chelatisierbar waren.

Tabelle 5: Gesamteisengehalt im Muskelhomogenat und im 16000 x *g*-Überstand

Tiere	Muskelhomogenat		Überstand	
	Fe ($\mu\text{g/l}$)	Fe (μM)	Fe ($\mu\text{g/l}$)	Fe (μM)
1	765	136,9	790	141,1
2	854	153,9	725	130,0
3	929	166,6	469	84,0
4	1034	185,1	547	97,9
5	965	172,8	554	99,2
6	748	133,9	—	—

2.4.3. Bindung chelatisierbaren Eisens an physiologische Liganden des Muskelgewebes

Wie unter 1.1. näher ausgeführt, liegt chelatisierbares Eisen in der Zelle nicht in freier Form, sondern immer assoziiert mit niedermolekularen Liganden und/oder Makromolekülen vor. Wenn der 16000 x *g*-Überstand vor der Quantifizierung des chelatisierbaren Eisens filtriert wurde (Ausschluss ≥ 30 kDa), konnte mit PG SK nahezu kein Eisen mehr nachgewiesen werden (Abb. 31 A; vgl. mit Abb. 28 und 29). Somit scheint der allergrößte Teil des freigesetzten chelatisierbaren Eisens nicht an niedermolekulare Liganden, sondern an Makromolekülen gebunden vorzuliegen. Um diese Vermutung zu verifizieren, wurden die Proben vor der Filtration entweder mit Proteinase K (1 mU/ml) behandelt, um noch vorhandene Proteine zu verdauen oder mit Triton X-100 (1%) versetzt, um Membranfragmente zu zerstören. Nach der Inkubation mit Triton X-100 konnte nur ca. 1,0 μM chelatisierbares Eisen detektiert werden, während durch die Vorbehandlung mit Proteinase K die nachweisbare Konzentration chelatisierbaren Eisens auf 10,35 μM anstieg (Abb. 31 A). Versuche mit dem kompletten Muskelhomogenat lieferten ähnliche Verhältnisse

mit vergleichbaren Konzentrationen an chelatisierbarem Eisen (Abb. 31 B). Damit sprechen die Ergebnisse dafür, dass die mit PG SK detektierbaren Eisenionen hauptsächlich mit Proteinen (≥ 30 kDa) assoziiert sind und durch den enzymatischen Abbau der Proteine zusätzliches Fe(II) chelatisierbar wird.

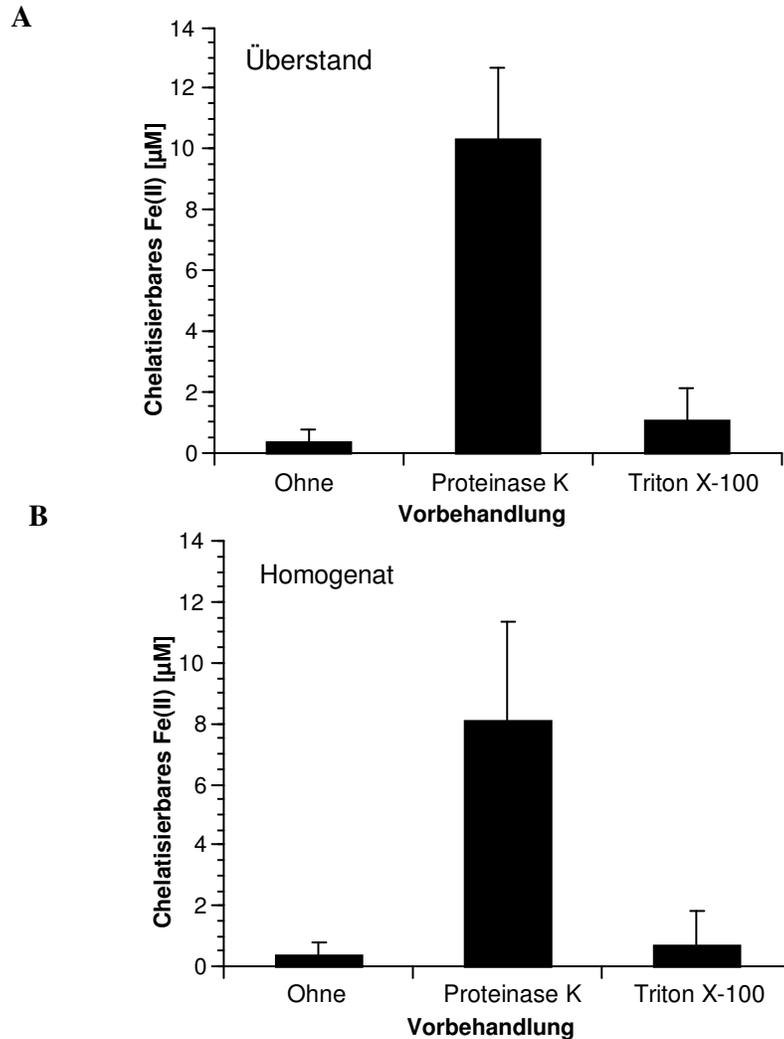


Abb. 31: Einfluss von Filtration, Proteinase K und Triton X-100 auf die Konzentration von chelatisierbarem Fe(II) im kompletten Muskelhomogenat und im Überstand. Proben des (B) 1:10-Muskelhomogenats und des (A) 16000 x g-Überstandes (siehe Legende zur Abbildung 28) wurden entweder ohne Vorbehandlung, nach Erhitzen in Anwesenheit von Proteinase K (1 mU/ml, 60°C für 30 min) oder nach der Inkubation mit Triton X-100 (1%, 37°C für 30 min) mit Hilfe eines Cut-off Filters (Ausschluss ≥ 30 kDa) filtriert (16000 x g für 10 min). Die Filtrate wurden zunächst für 20 Minuten mit Ascorbinsäure (1 mM) und dann für 2 Minuten mit Phen Green SK (50 μM) inkubiert. Die PG SK-Fluoreszenz der Proben (100 μl) wurde mittels Laser-Scanning-Mikroskopie ($\lambda_{\text{exc.}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{em.}} \geq 505$ -530 nm) in einer Fokusebene von 10 μm über der Deckglasoberfläche (d.h. innerhalb der Flüssigkeitssäule) gemessen. Die Quantifizierung des chelatisierbaren Fe(II) erfolgte aus der Fluoreszenzdifferenz im Vergleich zur ungequenchten PG SK-Fluoreszenz (im Puffer) anhand der 3:1-Bindungsstöchiometrie des PG SK/Fe²⁺-Komplexes. Die gezeigten Daten wurden um die Werte aus Kontrollversuchen ohne Muskelgewebe korrigiert und sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit den Wadenmuskeln (*Musculus gastrocnemius*) von verschiedenen Ratten.

Da sowohl im kompletten Muskelhomogenat als auch in seinem 16000 x g-Überstand eine nahezu gleiche Konzentration chelatisierbaren Eisens gefunden wurde, und auch die Verringerung der Gravitationskraft auf 3000 x g keine Auswirkung auf die durch PG SK detektierbare Eisenkonzentration hatte (vgl. Abb. 30), liegt die Vermutung nahe, dass die chelatisierbaren Eisenionen vorwiegend mit *löslichen* Proteinen assoziiert sind.

2.4.4. Detektierbarkeit von Häm-Eisen des Myoglobins und von Ferritin-Eisen mittels Phen Green SK

Um zu überprüfen, ob PG SK – vor allem nach dem enzymatischen Abbau der Proteine durch Proteinase K – auch das Häm-Eisen des Myoglobins detektiert, woraus eine Überschätzung der Konzentration des chelatisierbaren Eisens resultieren würde, wurden Kontrollexperimente mit zugesetztem Myoglobin vorgenommen. Dazu wurden dem Homogenisierungspuffer vor der Zerkleinerung des Muskelgewebes 3,15 mg Myoglobin/g Skelettmuskel (ca. 187 μM) zugefügt, was in etwa der natürlich vorkommenden Konzentration im Muskelgewebe entspricht [115]. Im 16000 x g-Überstand des 1:10-Muskelhomogenats mit zugesetztem Myoglobin wurden keine höheren Konzentrationen chelatisierbaren Eisens nachgewiesen (Abb. 32 A). Die Vorbehandlung des Myoglobin enthaltenden Muskelüberstandes mit Proteinase K führte ebenfalls zu keiner höheren Konzentration des PG SK-detektierbaren Eisens (Abb. 32 B). Das heißt, dass selbst nach der Verdauung des Myoglobins durch Proteinase K das Häm-Eisen im 1:10-Homogenat (ca. 18,7 μM) nicht durch PG SK chelatisiert werden konnte.

Aus weiteren Experimenten ging zudem hervor, dass auch im Ferritin gebundenes Eisen nicht mit PG SK detektierbar ist (Daten nicht dargestellt), wenn das Eisenspeicherprotein unter Verwendung der physiologischen Konzentration von 30 μg Ferritin/ml (ca. 68 nM; [116, 117]) dem Homogenisierungspuffer (ohne Muskelgewebe) zugesetzt wurde.

Die hier ermittelten Daten sprechen somit dafür, dass der mit PG SK in der Muskelsuspension detektierte Eisenpool weder dem Häm-Eisen des Myoglobins noch dem Ferritin-gebundenen Eisen entspricht, und dass das Protoporphyrin-Eisen während der Homogenisierung des Muskelgewebes nicht aus der Hämgruppe des Myoglobins freigesetzt wird.

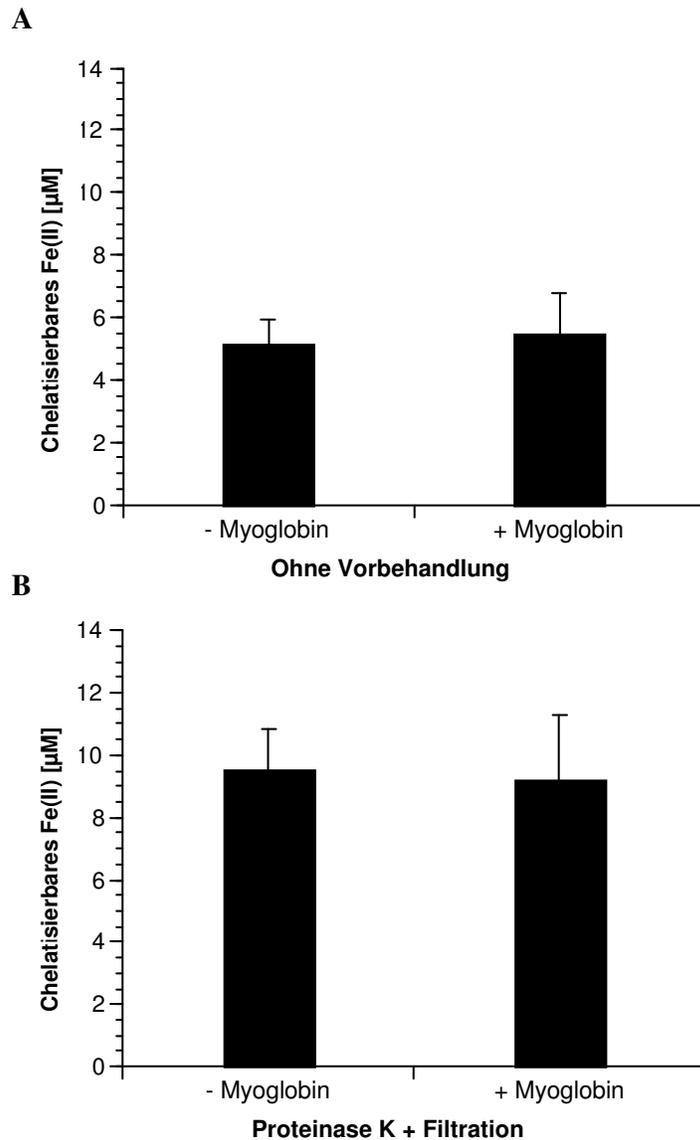


Abb. 32: Einfluss von exogenem Myoglobin auf die detektierbare Konzentration von chelatisierbarem Fe(II) im Überstand des Muskelhomogenats. Der Skelettmuskel wurde in Abwesenheit und Anwesenheit von Myoglobin (3,15 mg/g Muskel) mit Chelex-behandeltem NaCl (0,9%)/HEPES-Puffer (20 mM, pH 7,5 bei 37°C) versetzt (1:10 w/v), mittels eines Ultra-Turrax homogenisiert und das Homogenat anschließend bei 16000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden (A) ohne Vorbehandlung und Filtration sowie (B) nach Erhitzen in Anwesenheit von Proteinase K (1 mU/ml, 60°C für 30 min) und einer anschließenden Filtration (siehe Legende zur Abbildung 30) zunächst für 20 Minuten mit Ascorbinsäure (1 mM) und dann für 2 Minuten mit Phen Green SK (50 μM) inkubiert. Die PG SK-Fluoreszenz der Proben (100 μl) wurde mittels Laser-Scanning-Mikroskopie ($\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} \geq 505\text{-}530 \text{ nm}$) in einer Fokusebene von 10 μm über der Deckglasoberfläche (d.h. innerhalb der Flüssigkeitssäule) gemessen. Die Quantifizierung des chelatisierbaren Fe(II) erfolgte aus der Fluoreszenzdifferenz im Vergleich zur ungequenchten PG SK-Fluoreszenz (im Puffer) anhand der 3:1-Bindungsstöchiometrie des PG SK/ Fe^{2+} -Komplexes. Die gezeigten Daten wurden um die Werte aus Kontrollversuchen ohne Muskelgewebe korrigiert und sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit den Wadenmuskeln (*Musculus gastrocnemius*) von verschiedenen Ratten.

2.4.5. Bildung Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen (TBARS) im Muskelhomogenat

Das zytotoxische Potential des aus dem Muskelgewebe infolge eines mechanischen Traumas freigesetzten chelatisierbaren Eisens wurde anhand seiner „Fähigkeit“ untersucht, eine Lipidperoxidation im Muskelhomogenat auszulösen. Es ist bekannt, dass Hydroxylradikale Membranlipide peroxidieren können, wobei als Endprodukte dieses Prozesses u.a. kurzkettige Aldehyde entstehen, die über eine Farbreaktion mit Thiobarbitursäure nachgewiesen und mit Hilfe eines 1,1,3,3-Tetramethoxypropan-Standards quantifiziert werden können [118].

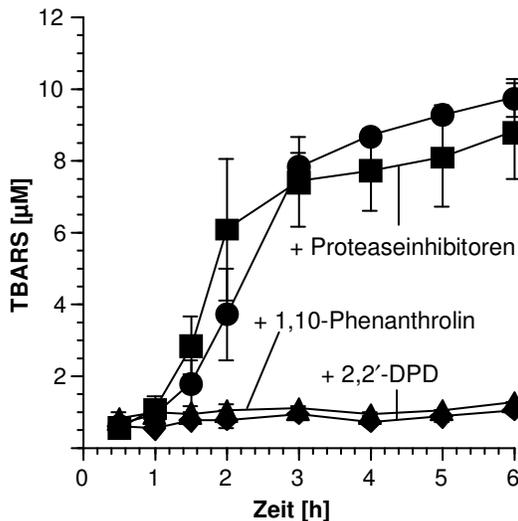


Abb. 33: Eisenabhängige Lipidperoxidation im Muskelhomogenat. Der Skelettmuskel wurde in Abwesenheit (●) und Anwesenheit von (■) Proteaseinhibitoren (10 µl/ml; kommerziell erwerblicher Cocktail), (▲) 1,10-Phenanthrolin (1 mM) oder (◆) 2,2'-DPD (1 mM) mit Chelex-behandeltem NaCl (0,9%)/HEPES-Puffer (20 mM, pH 7,5 bei 37°C) versetzt (1:10 w/v), mittels eines Ultra-Turrax homogenisiert und das Homogenat anschließend bei 37°C inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben (1 ml) entnommen, für 5 Minuten mit 0,5 ml Trichloressigsäure (30%) vorbehandelt, dann Thiobarbitursäure (17,5 mM) zugesetzt und die Proben für 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Die Konzentration der gebildeten TBARS im Muskelhomogenat wurde mit Hilfe des Standards 1,1,3,3-Tetramethoxypropan bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit den Wadenmuskeln (*Musculus gastrocnemius*) von verschiedenen Ratten. Die nicht sichtbaren Standardabweichungen werden durch die Symbole verdeckt.

Im unbehandelten, warm (37°C) inkubierten Muskelhomogenat konnte nach einer ca. einstündigen Verzögerungsphase die Bildung Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen nachgewiesen werden (Abb. 33). Dabei zeigte sich ein 2 Stunden währender steiler Anstieg in der TBARS-Bildung, gefolgt von einer Sättigungskinetik (10 µM TBARS nach 6 Stunden). Durch die Inkubation des Muskelhomogenats mit den Eisenchelatoren 1,10-Phenanthrolin oder 2,2'-DPD (jeweils 1 mM) wurde die Lipidperoxidation komplett verhindert (Abb. 33). Um auszuschließen, dass die Lipidperoxidation durch ursprünglich fest gebundene Eisenionen initiiert wurde, die während der Inkubation des Muskelhomogenats durch proteinabbauende

Enzyme (Proteasen) freigesetzt worden sind, wurden die proteolytischen Prozesse im Muskelhomogenat mit Hilfe von Proteaseinhibitoren gehemmt. Der die meisten Proteasen hemmende Inhibitor-Cocktail hatte jedoch keinen Einfluss auf den Verlauf der TBARS-Bildung, was nahe legt, dass das Häm-Eisen des Myoglobins nicht an der Initiierung der Lipidperoxidation im Muskelhomogenat beteiligt ist. Bestätigt wird diese Annahme durch den Effekt einer Vorinkubation des kompletten Muskelhomogenats mit Proteinase K, die lediglich einen Effekt auf die chelatisierbare Eisenkonzentration ausübte, während das Myoglobin-Eisen unbeeinflusst blieb (siehe 2.4.4.). In Übereinstimmung mit der durch die Vorbehandlung erhöhten Konzentration an chelatisierbarem Eisen (siehe 2.4.3.) wurde die TBARS-Bildung im Muskelhomogenat stark beschleunigt (Daten nicht dargestellt).

Weitere Versuche in Gegenwart von NADH oder NADPH zeigten, dass die Pyridin-Nucleotide keinen Einfluss auf die Entstehung der TBARS hatten (Daten nicht dargestellt).

2.4.6. Einfluss von Apo- und Holotransferrin auf die detektierbare Konzentration chelatisierbaren Eisens

Neben seiner Funktion als Transportprotein für Eisen im Blut (siehe 1.1.) verhindert Transferrin eisenabhängigen oxidativen Stress, da Transferrin-gebundene Eisenionen redox-inaktiv [1, 2] und nicht mit PG SK chelatisierbar sind. Daher stellt sich die Frage, ob Apotransferrin, d.h. die eisenfreie Form des Transferrins, in der Lage ist, das nach einer mechanischen Zerstörung des Muskelgewebes freigesetzte, chelatisierbare Eisen zu binden und somit dessen potentiell schädigende Wirkung zu verhindern.

In Anwesenheit von Apotransferrin wurde im 16000 x g-Überstand des 1:10-Homogenats statt 5 μM nur noch knapp 4 μM chelatisierbares Eisen nachgewiesen, d.h. ca. 1 μM des Eisens konnten nicht mehr mit PG SK komplexiert werden (Abb. 34). Dies deutet darauf hin, dass nur 1 μM des im Muskelhomogenat nachweisbaren chelatisierbaren Eisens durch Apotransferrin gebunden werden konnte. Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der Eisenbindung durch Apotransferrin ergaben, dass dessen Eisenbindungskapazität bereits nach 5 Minuten erschöpft war (Abb. 35) und es im weiteren Verlauf eher zu einem geringfügigen Konzentrationsanstieg des durch PG SK chelatisierbaren Eisens kam. Eisengesättigtes Transferrin (Holotransferrin) hatte, wie erwartet, keinen Effekt auf die Detektion des aus dem Muskelgewebe freigesetzten, chelatisierbaren Eisens (Abb. 34).

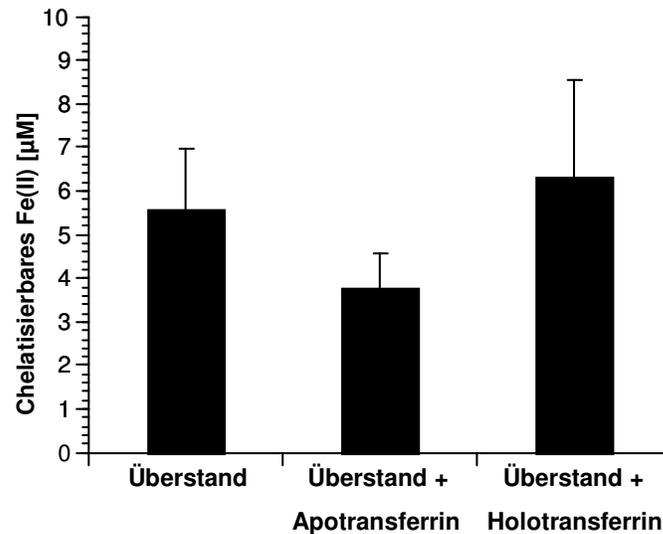


Abb. 34: Einfluss von Apo- und Holotransferrin auf die Konzentration von chelatisierbarem Fe(II) im Überstand des Muskelhomogenats. Der Skelettmuskel wurde mit Chelex-behandeltem NaCl (0,9%)/HEPES-Puffer (20 mM, pH 7,5 bei 37°C) versetzt (1:10 w/v), mittels eines Ultra-Turrax homogenisiert und das Homogenat anschließend bei 16000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände, versetzt mit NaHCO₃ (14,3 mM), wurden in Abwesenheit und Anwesenheit von Apo- oder Holotransferrin (jeweils 31,2 µM) für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Überstände wiederum im Brutschrank zunächst für 20 Minuten mit Ascorbinsäure (1 mM) und dann für 2 Minuten mit Phen Green SK (50 µM) inkubiert. Die PG SK-Fluoreszenz der Proben (100 µl) wurde mittels Laser-Scanning-Mikroskopie ($\lambda_{exc.} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em.} \geq 505\text{-}530 \text{ nm}$) in einer Fokusebene von 10 µm über der Deckglasoberfläche (d.h. innerhalb der Flüssigkeitssäule) gemessen. Die Quantifizierung des chelatisierbaren Fe(II) erfolgte aus der Fluoreszenzdifferenz im Vergleich zur ungequenchten PG SK-Fluoreszenz (im Puffer) anhand der 3:1-Bindungsstöchiometrie des PG SK/Fe²⁺-Komplexes. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit den Wadenmuskeln (*Musculus gastrocnemius*) von verschiedenen Ratten.

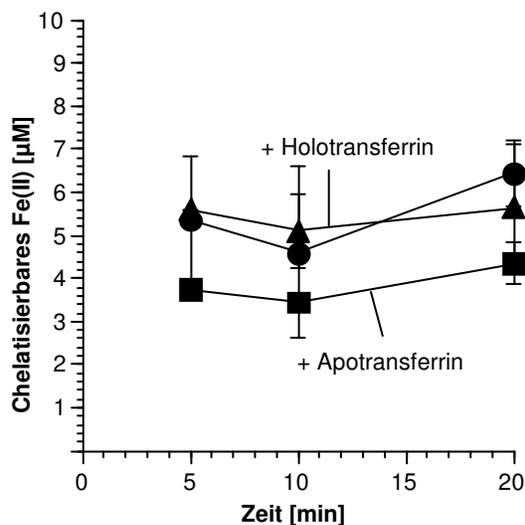


Abb. 35: Zeitverlauf des Einflusses von Apo- und Holotransferrin auf die Konzentration von chelatisierbarem Fe(II) im Überstand des Muskelhomogenats. Die Überstände des 1:10-Homogenats mit NaHCO₃ (14,3 mM; siehe Legende zur Abb. 34), wurden in Abwesenheit und Anwesenheit von Apo- oder Holotransferrin (jeweils 31,2 µM) für 5 – 20 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Überstände wiederum im Brutschrank zunächst für 20 Minuten mit Ascorbinsäure (1 mM) und dann für 2 Minuten mit Phen Green SK (50 µM) inkubiert. Die Messung erfolgte wie in der Legende zu Abb. 34 beschrieben. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit den Wadenmuskeln (*Musculus gastrocnemius*) von verschiedenen Ratten.

3. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass aus der Rattenleber isolierte Mitochondrien chelatisierbare Fe^{3+} -Ionen von allen untersuchten Zellorganellen am effektivsten in einem enzymatischen Prozess reduzieren, und dass diese NADH-abhängige Ferrereduktaseaktivität hauptsächlich an oder in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Außerdem konnte demonstriert werden, dass die mechanische Zerstörung von Muskelgewebe als *in vitro*-Modell des mechanischen Muskeltraumas zu einer Freisetzung von redox-aktiven, chelatisierbaren Eisenionen führt.

3.1. DIE KAPAZITÄT DER ZELLORGANELLEN ZUR REDUKTION CHELATISIERBARER FE(III)-IONEN

Da das parenchymale Volumen der Rattenleber zu 78% aus Hepatozyten besteht, während die Endothelzellen (2,8%), Kupffer-Zellen (2,1%) sowie die fettspeichernden Zellen (1,4%) zusammen nur 6,3% des Lebervolumens ausmachen (die restlichen 15,7% werden vom Extrazellularraum ausgefüllt; [100]), stammen die hier isolierten Zellfraktionen vornehmlich aus den Hepatozyten. Obwohl der größte Teil des hepatozellulären Volumens vom Cytosol (57,9%; [100]) eingenommen wird, das über hohe Konzentrationen an niedermolekularen Reduktionsmitteln wie Ascorbinsäure (2 mM; [119, 120]) und Glutathion (4,5 mM; [121, 122]) verfügt, fiel die Fe(III)-Reduktionskapazität dieser Fraktion vergleichsweise gering aus. Dieses Ergebnis ist zum Teil durch das Isolationsverfahren erklärbar, da die cytosolische Fraktion – und damit auch die in dieser enthaltenen niedermolekularen Reduktionsmittel – während der Aufarbeitung um einen Faktor von 10 verdünnt wurden. Auf der anderen Seite konnte jedoch auch gezeigt werden, dass das Enzym Ascorbat-Oxidase keinen inhibierenden Einfluss auf die geringe, cytosolische Reduktion von Fe(III) hatte, obwohl diese Fraktion ca. 200 μM Ascorbinsäure (und 450 μM Glutathion) enthalten sollte und deshalb ein gewisses Fe(III)-Reduktionsvermögen zu erwarten war. Somit scheint diesen niedermolekularen Reduktanten unter den hier vorherrschenden experimentellen Bedingungen nur eine geringe Rolle bei der Fe(III)-Reduktion zuzukommen. In Übereinstimmung mit dieser Annahme konnte in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass ca. die Hälfte des geringfügigen cytosolischen Fe(III)-Reduktionsvermögens durch Enzyme oder andere hochmolekulare

Reduktanten vermittelt wird, die entweder cytosolischen Ursprungs waren und/oder anderen kontaminierenden Fraktionen entstammten; z.B. kann die nicht untersuchte Plasmamembran sehr gut verschiedene Eisen(III)-Komplexe reduzieren [66, 73-75, 123-125].

Im Unterschied zur cytosolischen Fraktion besaßen die Mikrosomen, d.h. das fragmentierte endoplasmatische Retikulum, eine starke NADH-abhängige Eisen(III)-Reduktaseaktivität, die vermutlich auf einem durch das NADH-Cytochrom-b₅-Reduktase-System vermittelten Elektronentransfer beruht. In früheren Studien mit isolierten Mikrosomen wurde jedoch neben der NADH-abhängigen enzymatischen Reduktion verschiedener Eisen(III)-Komplexe [54, 55] auch eine effektive NADPH-abhängige Fe(III)-Reduktion durch das Enzymsystem NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase beschrieben [47, 80, 126]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war jedoch eine nennenswerte NADPH-abhängige Reduktion von Fe(III)-ATP nur in Anwesenheit hoher NADPH- und Eisen-Konzentrationen, wie sie für die ESR-Experimente erforderlich waren, zu beobachten. Eine mögliche Erklärung liefert eine frühere Studie, die belegt, dass die Affinität der NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase für Fe(III)-ATP mit einem K_m -Wert von $881 \pm 262 \mu\text{M}$ äußerst gering ist [64]. Somit erscheinen hohe Konzentrationen des Fe(III)-ATP-Komplexes (5 mM) erforderlich zu sein, damit NADPH als effektiver Elektronendonator für die mikrosomale Eisen(III)-Reduktion durch dieses Enzymsystem fungiert.

Obwohl die für die Mikrosomen beschriebenen NAD(P)H-abhängigen Flavoenzymsysteme auch in Zellkernen vorkommen und dort die Reduktion von Fe(III)-Ionen vermitteln können [48, 49, 81], war die detektierte Eisen(III)-Reduktionskapazität der Zellkernfraktion im Vergleich zu der mikrosomalen Fraktion eher gering. Dies ist wahrscheinlich durch die deutlich geringere Konzentration der NAD(P)H-Cytochrom-Reduktasen in den Zellkernen bedingt [48, 49]. Ein Teil der Enzymsausstattung der isolierten Zellkernfraktion könnte zudem ursprünglich dem endoplasmatischen Retikulum entstammen, welches in der Zelle mit der äußeren Kernmembran verbunden ist [78].

In vergleichenden Experimenten mit identischen Proteinkonzentrationen konnte gezeigt werden, dass das NADH-abhängige Fe(III)-Reduktionsvermögen der Mitochondrien und Mikrosomen annähernd gleich ist. Wenn man jedoch die ermittelten Reduktionsraten auf die tatsächlichen, intrazellulären Mengenverhältnisse dieser Organellen bezieht, so deutet alles darauf hin, dass chelatisierbare Fe^{3+} -Ionen hauptsächlich durch die Mitochondrien reduziert werden. Natürlich basiert diese Annahme auf *in vitro*-Experimenten mit isolierten Organellen – die intrazelluläre Verteilung der Fe(III)-Reduktaseaktivität in intakten Zellen ist nicht

bekannt. Allerdings scheint die mitochondriale Ferrireduktaseaktivität auch für das pathophysiologische Potential des chelatisierbaren Eisenpools von erheblicher Bedeutung zu sein (siehe 3.3.).

3.2. DER MECHANISMUS DER NADH-ABHÄNGIGEN REDUKTION CHELATISIERBARER FE(III)-IONEN DURCH DIE MITOCHONDRIEN

3.2.1. Fe(III)-Reduktion: Ein ausschließlich enzymatischer Prozess oder sind niedermolekulare Reduktionsmittel beteiligt?

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte verdeutlicht werden, dass die effektive NADH-abhängige Reduktion chelatisierbarer Fe(III)-Ionen nicht durch eine direkte Elektronenübertragung von NADH auf den Eisen(III)-Komplex zustande kommt. Die Pyridin-Nucleotide können jedoch nach Auffassung mehrerer Autoren auch auf indirektem Weg an der Reduktion von chelatisierbaren Fe(III)-Ionen beteiligt sein, indem sie den Redoxstatus der niedermolekularen Reduktionsmittel Ascorbinsäure und Glutathion aufrecht erhalten bzw. wieder herstellen (siehe 1.3.1.; [50, 61-63]). Wie in einer früheren Untersuchung, die allerdings in einem rein chemischen System durchgeführt wurde, dargestellt, kann die Ascorbinsäure als effektives niedermolekulares Reduktionsmittel für chelatisierbare Fe(III)-Ionen fungieren [64]. Wie erwartet, war die Ascorbinsäure am hier untersuchten NADH-abhängigen Fe(III)-Reduktionsprozess durch die Mitochondrien jedoch nicht beteiligt, da die Ascorbinsäure im Matrixraum intakter Mitochondrien für Fe(III)-Ionen (und extramitochondriales NADH) unzugänglich ist (siehe auch 3.2.2.). Die extramitochondriale Ascorbinsäure in der hier untersuchten mitochondrialen Fraktion (als Kontamination aus der cytosolischen Fraktion) war wahrscheinlich nur sehr gering konzentriert (ca. 50 μM) und NADH-abhängige, sie regenerierende Systeme konnten vermutlich nicht effektiv mit den oxidierenden Prozessen konkurrieren.

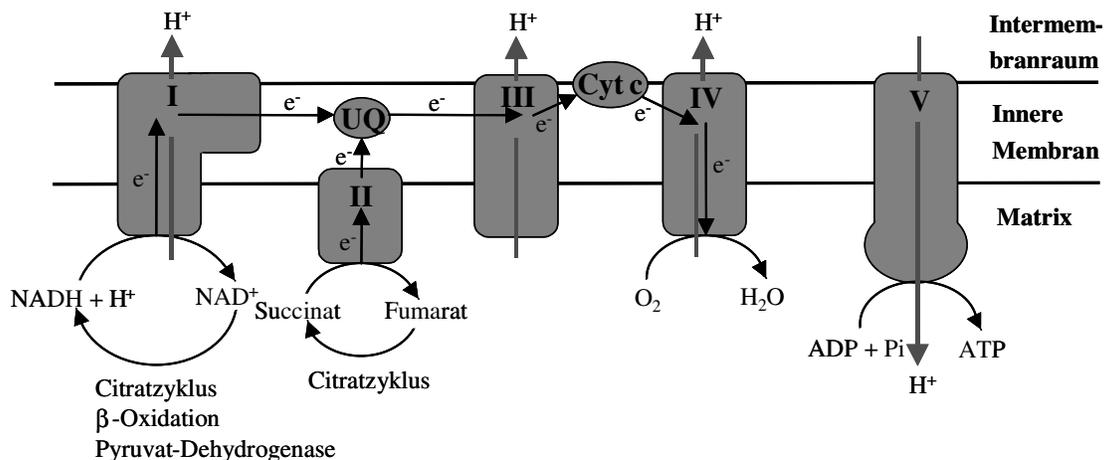
Neben der Ascorbinsäure wird das Superoxidanionradikal allgemein als ein geeignetes Reduktionsmittel für Eisen(III)-Ionen angesehen, wobei diese Behauptung zumeist auf Untersuchungen in zellfreien (chemischen) Systemen beruht [17, 20, 32, 58]. An dem hier beobachteten mitochondrialen Fe(III)-Reduktionsprozess scheint O_2^- jedoch nicht beteiligt zu sein, was in Versuchen unter hypoxischen Bedingungen und durch den fehlenden Effekt von

SOD demonstriert werden konnte. Dieses Ergebnis war nicht überraschend und sollte auch in lebenden Zellen Gültigkeit besitzen, was folgende Fakten belegen: Entsprechend PIERRE *et al.* ist das Standardredoxpotential E° des LFe(III)/LFe(II)-Übergangs > -160 mV [30]. Der genannte Wert (-160 mV) entspricht exakt dem Standardredoxpotential des $O_2/O_2^{\cdot-}$ -Übergangs [30]. Somit können die Fe(III)-Ionen nur dann effektiv reduziert werden, wenn die Konzentration des Sauerstoffs in etwa der des Superoxidanionradikals entspricht, d.h. $[O_2] = [O_2^{\cdot-}]$. In lebenden Zellen (in Abwesenheit oxidativer Stressbedingungen) beträgt die Sauerstoffkonzentration jedoch ca. $3,5 \times 10^{-5}$ M und die Konzentration des Superoxidanionradikals ca. $1,0 \times 10^{-11}$ M, wodurch das Redoxpotential auf $+230$ mV verschoben wird ($E = -160$ mV + $0,06 \log [O_2]/[O_2^{\cdot-}]$; [30]). Dadurch ist die reduzierende Kraft von Superoxidanionradikalen in lebenden Zellen viel geringer als gemeinhin angenommen und das natürliche Verhältnis von $[O_2]/[O_2^{\cdot-}]$ verhindert *per se* die Reduktion von Eisen(III)-Ionen durch $O_2^{\cdot-}$. Daher müssen andere, NADH-abhängige Reduktionsmittel für die Fe(III)-Reduktion durch die mitochondriale Fraktion verantwortlich sein, die unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen relevant werden könnten (siehe 3.3.).

Neben dem Ausschluss der „prominenten“, niedermolekularen Reduktionsmittel (NADH, $O_2^{\cdot-}$, Ascorbinsäure und Glutathion), wird der vorwiegend enzymatische Charakter des Fe(III)-Reduktionsprozesses durch die ermittelten Michaelis-Menten-Kinetiken sowie den inhibierenden Einfluss von Rhein verdeutlicht. Rhein, eine natürlich vorkommende Substanz, konkurriert mit NADH um die Bindung an Flavoenzyme, wodurch es zur Beeinträchtigung der Enzymaktivität kommt [108, 109]. Da der NADH-abhängige, mitochondriale Fe(III)-Reduktionsprozess durch Rhein erheblich verzögert wurde, ist anzunehmen, dass er durch Flavoenzyme vermittelt wird. In Übereinstimmung mit dieser Annahme wurde in einer früheren *in vitro*-Studie demonstriert, dass verschiedene isolierte Flavoenzyme (Lipoyl-Dehydrogenase, Glutathion-Reduktase, Cytochrom-c-Reduktase und Cytochrom P450-Reduktase) unter Verbrauch von NAD(P)H die Ein-Elektronen-Reduktion von Fe(III)-Citrat, Fe(III)-ADP und Fe(III)-ATP sehr effektiv katalysieren können [64]. Die Ferri-reduktaseaktivität der Flavoenzyme ist in dem niedrigen Redoxpotential des $FADH_2/FAD^{\cdot-}$ -Übergangs ($-0,15$ V bei pH 7,0; [127]), verglichen mit den hohen Redoxpotentialen der meisten physiologischen Eisenkomplexe, begründet [30], weshalb $FADH_2$ eines der effektivsten biologischen Reduktionsmittel für Fe(III) sein sollte.

3.2.2. Beteiligung der Atmungskettenenzyme an der mitochondrialen Reduktion chelatisierbarer Fe(III)-Ionen

Da ein Großteil der mitochondrialen Enzymausstattung integraler Bestandteil der Atmungskette ist, und ein Teil dieser Enzyme zur Gruppe der Flavoenzyme gehört, ist es nahe liegend, den Ort der oxidativen Phosphorylierung im Hinblick auf die Reduktion von Fe(III)-Ionen genauer zu betrachten (Abb. 36).



I = Komplex I: NADH-Dehydrogenase
 II = Komplex II: Succinat-Dehydrogenase
 III = Komplex III: Ubichinol-Cytochrom-c-Reduktase
 IV = Komplex IV: Cytochrom-c-Oxidase
 V = Komplex V: ATP-Synthase

UQ = Ubichinon
 Cyt c = Cytochrom c

Abb. 36: Stark vereinfachte, nicht-stöchiometrische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette. Abbildung abgewandelt nach KOOLMANN *et al.* [128].

In einigen älteren Studien mit isolierten Mitochondrien wurde berichtet, dass die Fe(III) reduzierenden Enzymsysteme in Verbindung mit der mitochondrialen Atmungskette stehen. In diesem Zusammenhang wurde von FLATMARK *et al.* angenommen, dass extramitochondriale Fe(III)-Ionen an bestimmte Liganden gebunden werden, die auf der cytosolischen Seite der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind, und der nachfolgende Fe(III)-Reduktionsprozess durch nicht näher benannte Interaktionen mit dem Cytochrom-c der Atmungskette vermittelt wird [113]. Andere Autoren belegen bzw. diskutieren ausführlich, dass die Reduktion von Fe(III)-Ionen durch die Enzyme der mitochondrialen

Atmungskette, d.h. durch die NADH-Dehydrogenase (Komplex I) und/oder Succinat-Dehydrogenase (Komplex II; [129-131]) sowie durch die Cytochrom-*c*-Oxidase (Komplex IV; [132]) vermittelt werden kann. Die meisten Ergebnisse bzw. Schlussfolgerungen aus diesen Untersuchungen basieren jedoch nicht, wie in der vorliegenden Arbeit, auf Experimenten mit intakten Organellen, sondern auf Versuchen mit submitochondrialen Fraktionen und isolierten Enzymkomplexen der Atmungskette [129-131]. Außerdem erfolgte der Nachweis der Fe(II)-Bildung zumeist nur indirekt über die Quantifizierung der mitochondrialen Hämsynthese (siehe 1.1. und 1.3.) oder anhand des Sauerstoffverbrauchs infolge der raschen Autoxidation der Fe(II)-Ionen [129, 131, 132]. Im Gegensatz zu diesen Studien deuten die hier dargestellten Ergebnisse aus Untersuchungen mit Rotenon, Antimycin A, verschiedenen Detergenzien sowie den einzelnen submitochondrialen Fraktionen darauf hin, dass Enzymsysteme der Atmungskette am Fe(III)-Reduktionsprozess durch intakte Mitochondrien nicht beteiligt sind. Hierfür spricht auch die hohe NADH-Abhängigkeit der mitochondrialen Ferrireduktaseaktivität: Wenn die Enzyme bzw. Enzymsysteme der Atmungskette für die Reduktion der Fe(III)-Ionen verantwortlich wären, sollte extramitochondriales NADH keinen Einfluss auf diesen Prozess haben, da die NADH-Bindungsstelle (NADH-Dehydrogenase, Komplex I) im mitochondrialen Matrixraum lokalisiert (Abb. 36) und die innere Mitochondrienmembran für Pyridin-Nucleotide undurchlässig ist. Auch kann ein Elektronentransport von NADH in den Matrixraum, z.B. durch den Aspartat-Malat-Shuttle, die schnelle Fe(III)-Reduktion nicht begründen. Wenn überhaupt sollte dieses Transportsystem nur noch mit sehr geringer Effektivität arbeiten, da die erforderlichen cytosolischen Bestandteile dieses Shuttles, d.h. Oxalacetat und die Malat-Dehydrogenase, im Zuge der Fraktionierung nahezu entfernt wurden. Gleichfalls hatten auch die Substrate Glutamat und Malat, die in der mitochondrialen Matrix über den Citratzyklus verstoffwechselt werden, keinen Einfluss auf die NADH-abhängige Fe(III)-Reduktion. Dies deutet darauf hin, dass auch im Matrixraum gebildetes NADH (über den Citratzyklus) nicht an der Fe(III)-Reduktion beteiligt ist. Anders als Glutamat und Malat beschleunigte das ebenfalls im Citratzyklus verstoffwechselte Substrat Succinat den mitochondrialen Fe(III)-Reduktionsprozess deutlich. Ein ähnliches Ergebnis, d.h. eine durch Succinat ausgelöste Steigerung der Hämsynthese und des Sauerstoffverbrauchs, fanden auch WILLIAMS *et al.* und BARNES *et al.* in ihren Untersuchungen mit submitochondrialen Partikeln und schlussfolgerten daraus, dass das Elektronentransportsystem der mitochondrialen Atmungskette in den Fe(III)-Reduktionsprozess involviert ist [129, 132]. Succinat kann Elektronen über die Succinat-

Dehydrogenase (Komplex II; Abb. 36) direkt in die Elektronentransportwege der Atmungskette einspeisen und könnte auf diesem Wege letztlich zur Fe(III)-Reduktion beitragen. Allerdings ist auch der Komplex II der Atmungskette nur über den mitochondrialen Matrixraum zugänglich (Abb. 36), so dass exogenes Succinat, genauso wie Malat und Glutamat, keinen Einfluss auf den Fe(III)-Reduktionsprozess durch intakte Mitochondrien ausüben sollte. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Mitochondrien unabhängig von der Atmungskette weitere Flavoenzyme besitzen, die mit Succinat als Elektronendonator arbeiten und für die hier beobachtete beschleunigte Reduktion der Fe(III)-Ionen verantwortlich sind.

Im Gegensatz zu BARNES *et al.*, der aus seinen indirekten Ergebnissen schlussfolgerte, dass nur lysierte Mitochondrien Fe(III) reduzieren können [129], belegen die vorliegenden Ergebnisse eine Reduktion von chelatisierbaren Eisen(III)-Ionen durch strukturell und funktionell intakte Mitochondrien. Somit muss die für den Reduktionsprozess verantwortliche Ferrereduktaseaktivität vom Cytosol her frei zugänglich sein.

3.2.3. Identifizierung des an der mitochondrialen Fe(III)-Reduktion beteiligten Enzymsystems

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse zur submitochondrialen Verteilung der Fe(III)-Reduktion zeigen, dass die höchste spezifische, NADH-abhängige Eisen(III)-Reduktaseaktivität an oder in der äußeren Mitochondrienmembran zu finden ist. In Übereinstimmung mit diesem Befund weisen die Ergebnisse verschiedener Autoren darauf hin, dass die Reduktion von Ferrizyanid und Cytochrom *c* in Gegenwart von externem NADH durch die äußere Mitochondrienmembran vermittelt wird [133-135]. Im Gegensatz dazu beschreiben BARNES *et al.* ein Elektronentransportsystem in der äußeren Membran von Lebermitochondrien, das zwar die Oxidation von extramitochondrialem NADH vermittelt, Eisen(III) jedoch nicht reduzieren kann [129]. Diese auch im Hinblick auf unsere Ergebnisse gegenteilige Beobachtung resultiert vermutlich aus der von den Autoren angewandten indirekten Messmethode zur Bestimmung der Fe(III)-Reduktion (siehe oben). In weiteren Studien konnte demonstriert werden, dass die Eisen- und NADH-abhängige Bildung von Hydroxylradikalen und die Peroxidation von Lipiden [136] sowie die Bildung von $O_2^{\cdot-}$ in Anwesenheit von Paraquat [137] durch das NADH-Cytochrom-*c*-Reduktasesystem der äußeren Mitochondrienmembran vermittelt wird. Zusammenfassend belegen zahlreiche

Studien an Lebermitochondrien eine Oxidation von extramitochondrialem, cytosolischem NADH durch das Rotenon- und Antimycin A-unabhängige NADH-Cytochrom-*c*-Reduktasesystem, welches in der äußeren Membran der Mitochondrien lokalisiert ist [133-139]. Dieses Enzymsystem gleicht dem NADH-Cytochrom-*c*-Reduktasesystem der Mikrosomen und besteht ebenfalls aus dem Flavoenzym Cytochrom-*b*₅-Reduktase und Cytochrom *b*₅ [133-139]. Es überträgt die Elektronen von NADH über Cytochrom *b*₅ auf ein externes Cytochrom *c* und von dort auf das Cytochrom *c* der inneren Mitochondrienmembran, von wo die Elektronen dann letztendlich über die Cytochrom-Oxidase (Komplex IV) in die Atmungskette eingespeist werden (Abb. 37; [133, 134, 138, 139]). Dadurch steht das nicht an der oxidativen Phosphorylierung beteiligte NADH-Cytochrom-*c*-Reduktasesystem der äußeren Mitochondrienmembran mit der Cytochrom-Oxidase der mitochondrialen Atmungskette über Cytochrom *c* in Verbindung, das somit als „Elektronenshuttle“ zwischen äußerer und innerer Membran fungiert [133, 134, 138, 139]. Über die genaue Lokalisation des externen Cytochrom *c* wird kontrovers diskutiert. Während LA PIANA *et al.* davon ausgehen, dass nur cytosolisches Cytochrom *c* die Elektronen von NADH aufnehmen kann [138], ist das elektronentransferierende externe Cytochrom *c* nach Meinung anderer Autoren im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert ([133, 139, 140]; Abb. 37).

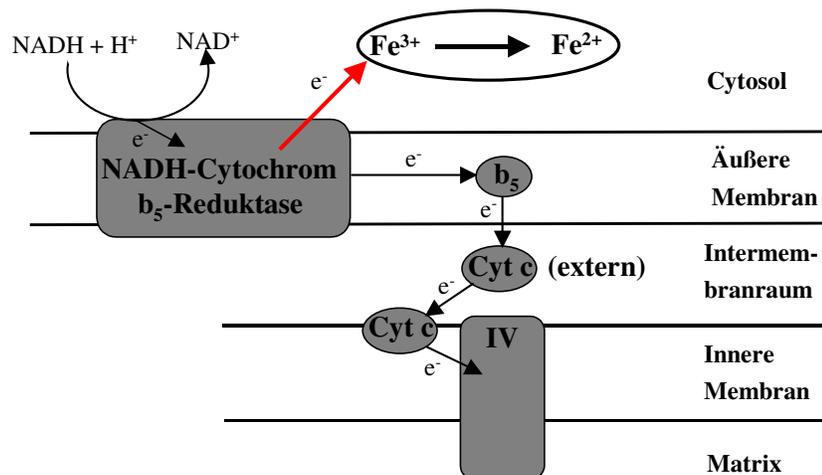


Abb. 37: Das enzymatische Elektronentransfersystem der äußeren Mitochondrienmembran. Der rote Pfeil stellt den vermuteten Mechanismus der Reduktion extramitochondrialer, chelatisierbarer Eisen(III)-Ionen dar.

Die hier dargestellten Ergebnisse, d.h. die ausgeprägte NADH-Abhängigkeit, der fehlende Einfluss von Detergenzien, der Ausschluss der Atmungskettenenzyme sowie die hohe spezifische Fe(III)-Reduktaseaktivität der äußeren Mitochondrienmembran sprechen dafür, dass das beschriebene Enzymsystem auch für den hier beobachteten Fe(III)-Reduktionsprozess verantwortlich ist. Anders als bei dem oben beschriebenen Elektronenfluss werden die Elektronen von NADH vermutlich nicht bzw. nicht mehr ausschließlich auf das Cytochrom *c*, sondern direkt auf die extramitochondrialen chelatisierbaren Fe(III)-Ionen transferiert (Abb. 37). Die ebenfalls beobachtete langsame, NADPH-abhängige Reduktion der Fe(III)-Ionen kann zum einen auf einer direkten Elektronenübertragung von NADPH auf Fe(III) beruhen. Zum anderen kann die NADPH-abhängige Fe(III)-Reduktion, wie von ITO *et al.* und KUKIELKA *et al.* postuliert, teilweise durch die mikrosomale Verunreinigung der Mitochondrien (mikrosomaler Anteil 20%) erklärt werden [136, 141], da das NADPH-abhängige Cytochrom-*c*-Reduktasesystem der Mikrosomen ebenfalls, wie bereits beschrieben (siehe 1.3.3.), die Fe(III)-Ionen reduzieren kann.

Aus vergleichenden Untersuchungen zur NADH-abhängigen Reduktion chelatisierbarer Eisen(III)-Ionen durch Mitochondrien, die aus dem Wadenmuskel (*Musculus gastrocnemius*) der Ratte isoliert wurden, gingen, bezogen auf die Mitochondrien der Hepatozyten, sowohl die gleiche Fe(III)-Reduktionsrate als auch nahezu identische enzymkinetische Werte für NADH hervor. In Übereinstimmung mit diesem Befund liefern einige Studien Hinweise darauf, dass das für die Lebermitochondrien beschriebene Enzymsystem der äußeren Membran auch in den Mitochondrien der Skelettmuskulatur vorkommt [135, 140, 142, 143]. Zusammenfassend kann somit angenommen werden, dass das durch das NADH-Cytochrom-*c*-Reduktasesystem vermittelte Fe(III)-Reduktionsvermögen eine generelle, zelltypunabhängige Eigenschaft der Mitochondrien darstellt.

3.3. DIE (PATHO-)PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER MITOCHONDRIALEN REDUKTION CHELATISIERBARER FE(III)-IONEN

Die Funktion des NADH-Cytochrom-*c*-Reduktasesystems der äußeren Mitochondrienmembran ist bisher noch nicht eindeutig geklärt worden. Es wird jedoch von mehreren Autoren diskutiert, dass dieses Enzymsystem einen alternativen „Elektronenshuttle“ für extramitochondriales NADH darstellt [138, 140, 143, 144]. LA PIANA *et al.* postulieren, dass

bei Beeinträchtigungen bzw. Schädigungen der ersten drei Atmungskettenkomplexe das Überleben der Zelle durch dieses Elektronentransfersystem gesichert werden kann [138]. So könnte das NADH/Cytochrom-*c*-System im Zusammenspiel mit der Cytochrom-Oxidase der Atmungskette ein elektrochemisches Membranpotential aufbauen, wodurch letztlich der Energiegewinnungsprozess partiell aufrecht erhalten werden kann [138]. Auf der anderen Seite wird diskutiert, dass ein Überschuss an cytosolischem NADH, wie z.B. unter Sauerstoffmangelsituationen, durch das Cytochrom-*c*-Reduktasesystem der äußeren Mitochondrienmembran ausgeglichen werden kann [138, 140, 144]. Durch diesen alternativen Weg könnte, laut Aussagen der Autoren, das physiologische NADH/NAD⁺-Verhältnis im Cytosol aufrecht erhalten bzw. wieder hergestellt und somit einer starken Akkumulation von Lactat bzw. der resultierenden Lactatazidose entgegengewirkt werden [140, 144], wobei jedoch der finale Elektronenakzeptor unter Hypoxie nicht näher definiert wurde.

Unabhängig von den diskutierten Funktionen kann basierend auf den vorliegenden Daten postuliert werden, dass das enzymatische Elektronentransfersystem der äußeren Mitochondrienmembran die Reduktion von extramitochondrialen (cytosolischen) chelatisierbaren Fe(III)-Ionen unter Verbrauch von cytosolischem NADH vermitteln könnte. Der für den Fe(III)-Reduktionsprozess durch die Rattenlebermitochondrien errechnete K_m -Wert von NADH beträgt etwa 0,6 μM und entspricht damit der physiologischen Konzentration von NADH im Cytosol von Hepatozyten (0,5 μM ; [145]). Im Hinblick auf die cytosolische NADH-Konzentration sollte somit diese Reaktion auch intrazellulär möglich sein. Zudem sollte ein Anstieg der cytosolischen NADH-Konzentration, ausgelöst durch vielfältige Faktoren wie Hypoxie (siehe oben; [42, 43]), die mitochondriale Fe(III)-Reduktion erheblich beschleunigen. Im Gegensatz dazu stellt NADPH auf Grund seines hohen K_m -Wertes von ca. 1,7 mM keinen effektiven Elektronendonator für die Fe(III)-Reduktion dar. Das erhärtet die Vermutung, dass NADPH nicht als Cosubstrat für das Cytochrom-*c*-Reduktasesystem fungieren kann und die detektierte, geringe NADPH-abhängige Fe(III)-Reduktion durch einen direkten Elektronentransfer bzw. mikrosomale Verunreinigungen der mitochondrialen Fraktion zustande kam.

Der im Hinblick auf den NADH-abhängigen Reduktionsprozess ermittelte K_m -Wert für Fe(III)-ATP ist mit 950 μM sehr hoch im Vergleich zur cytosolischen Konzentration chelatisierbaren Eisens, die beispielsweise in Hepatozyten nur ca. 6 μM beträgt (siehe 1.1.). Deshalb wird der beschriebene, durch die Mitochondrien vermittelte Fe(III)-Reduktionsprozess unter intrazellulären, physiologischen Bedingungen vermutlich kaum eine

Rolle spielen. Ein Anstieg der cytosolischen Konzentration chelatisierbaren Eisens, der für viele pathophysiologischen Bedingungen beschrieben worden ist (siehe 1.2.), sollte jedoch zu einer starken Beschleunigung der mitochondrialen Fe(III)-Reduktion führen (siehe unten). An dieser Stelle muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die berechneten K_m -Werte aus Ergebnissen resultieren, die aus methodischen Gründen in Gegenwart des starken Fe(II)-Chelators 1,10-Phenanthrolin erzielt wurden. Obwohl die Bindungskonstante (K_{app}) von 1,10-Phenanthrolin für Fe(III) relativ gering ist ($\log K_{app} = 14,1$; [146]), kann nicht ausgeschlossen werden, dass Fe(III) im Komplex mit 1,10-Phenanthrolin und nicht mit ATP reduziert wurde. Aus thermodynamischen Gründen, d.h. aufgrund seines sehr positiven Redoxpotentials (+1,15 V; [30]), lässt sich der $[Fe(III) (1,10-Phenanthrolin)_3]^+$ -Komplex sehr leicht reduzieren. Auch wenn Fe(III) im Komplex mit ATP reduziert worden wäre, hätte 1,10-Phenanthrolin sehr wahrscheinlich einen positiven Effekt auf die Reaktionskinetik gehabt, da es als starker Fe(II)-Chelator das gebildete Fe(II) aus dem Komplex mit ATP abgezogen und damit aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt hätte. Diese Überlegungen müssen jedoch spekulativ bleiben, da die Bindungskonstante von ATP für Fe(III) bisher noch nicht publiziert wurde.

Im Hepatozyten werden unter hypoxischen Bedingungen größere Mengen labiler Eisenionen aus den intrazellulären Speichern freigesetzt [42, 43]. Diese Eisenionen könnten geeignete Akzeptoren für Elektronen darstellen, die durch das Cytochrom-*c*-Reduktasesystem vom unter Hypoxie ebenfalls erhöhten cytosolischen NADH übertragen werden (siehe oben). Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit die mitochondriale Aufnahme der zuvor reduzierten Fe(III)-Ionen nicht gezeigt werden konnte, sollten diese redox-aktiven Eisenionen größtenteils im Cytosol verbleiben, wo sie eine Radikalbildung initiieren könnten. Diese Annahme deckt sich mit früheren Studien, in denen gezeigt wurde, dass ausschließlich extramitochondriales labiles Eisen an der durch H_2O_2 oder Kaltinkubation ausgelösten Zellschädigung beteiligt ist [111, 112]. Insgesamt kann somit postuliert werden, dass bei erhöhten Konzentrationen chelatisierbaren Eisens das NADH-Cytochrom-*c*-Reduktasesystem der äußeren Mitochondrienmembran das „Redox-Cycling“ dieses cytosolischen chelatisierbaren Eisenpools beschleunigen sollte. Zudem wird dieses Enzymsystem als eine Quelle für O_2^- beschrieben [147]. Dieser Befund und die bekannte Eigenschaft von Flavoenzymen Ein-Elektronen-Reduktionsprozesse zu katalysieren [64, 148, 149] könnte die hier unter normoxischen Bedingungen gefundene 1:1-Stöchiometrie der NADH-Oxidation und der korrespondierenden Fe(III)-Reduktion erklären. Vermutlich übertragen die Flavine des Enzymsystems ein Elektron von NADH auf Fe(III) und das andere auf O_2 , wodurch Fe(III)

reduziert und $O_2^{\cdot -}$ entstehen würde. Basierend auf dieser Annahme kann gefolgert werden, dass das enzymatische Elektronentransfersystem der äußeren Mitochondrienmembran unter pathophysiologischen Bedingungen, d.h. bei erhöhten Fe(III)-Konzentrationen, die Bildung von chelatisierbaren Fe(II)-Ionen und letztlich die Bildung von H_2O_2 (nach der Dismutation von $O_2^{\cdot -}$) vermittelt und somit über die Fenton-Reaktion zellschädigend wirken könnte. In Übereinstimmung hiermit kommt es während der Hypoxie zu erhöhten Eisen- und NADH-Konzentrationen im Hepatozyten und während der Reoxygenierung zu einer Zellschädigung, die unter anderem durch eine eisenabhängige Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies vermittelt wird [42, 43, 150].

Zusammenfassend kann aus den vorliegenden Daten geschlussfolgert werden, dass das NADH-Cytochrom-*c*-Reduktasesystem der äußeren Mitochondrienmembran vermutlich an eisenabhängigen und radikalvermittelten Zellschädigungsprozessen beteiligt ist, wenn es unter pathophysiologischen Bedingungen zu einer Freisetzung größerer Mengen chelatisierbarer Eisenionen aus den intrazellulären Speicherproteinen und zu einer Erhöhung der cytosolischen NADH-Konzentration kommt.

3.4. DIE EXTRAZELLULÄRE FREISETZUNG CHELATISIERBARER EISEN-IONEN INFOLGE EINES MECHANISCHEN MUSKELTRAUMAS

3.4.1. Freigesetzte, chelatisierbare Eisenionen im Muskelhomogenat

Neben der intrazellulären Freisetzung chelatisierbarer Eisenionen unter pathologischen Konditionen kann durch die exogene, mechanische Zerstörung von Gewebestrukturen chelatisierbares, redox-aktives Eisen auch in die extrazelluläre Umgebung freigesetzt werden. So wurden nach einer experimentell induzierten Schädigung (Homogenisierung) der Rattenleber durch Desferal chelatisierbare Eisenionen im Leberhomogenat nachgewiesen [25, 151]. Auch in Gehirnhomogenaten von Ratten wurden mit Bleomycin oder 2,2'-DPD chelatisierbare Eisenionen detektiert, die zur Initiierung einer Lipidperoxidation beitragen [21, 152]. Zudem wurde im Homogenat des Wadenmuskels (*Musculus gastrocnemius*) von Ratten „lose gebundenes“, Bleomycin-chelatisierbares Eisen nachgewiesen [24]. Auch IBRAHIM *et al.* detektierten im Skelettmuskelhomogenat von Ratten mit Hilfe von Nitrilotriessigsäure (NTA) chelatisierbare Eisenionen, wobei die von ihnen gefundene

Konzentration (40 nmol pro g Muskel; [23]) in etwa mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit übereinstimmt. So konnten hier im 1:10-Homogenat des Skelettmuskels, *Musculus gastrocnemius*, 5 μM chelatisierbares Eisen mit dem fluoreszierenden Eisenchelator PG SK nachgewiesen werden. Diese Konzentration ist ca. zehnmal höher als der intrazelluläre, mit PG SK-chelatisierbare Eisenpool in Hepatozyten (siehe 1.1.) und somit sehr wahrscheinlich auch deutlich höher als die intrazelluläre chelatisierbare Eisenkonzentration intakter Muskelzellen, die allerdings bisher noch nicht quantifiziert wurde. Die (vermutlich) erhöhte Konzentration des detektierten chelatisierbaren Eisens resultiert wahrscheinlich aus der vollständigen Zerstörung der Gewebestrukturen, was zu einer experimentell bedingten Freisetzung von Eisenionen (aus Eisenspeicher-, Eisen-Schwefel- oder anderen eisenhaltigen Proteinen) führen kann [5, 9]. Experimente mit dem in der Skelettmuskulatur in hohen Konzentrationen vorliegenden, eisenhaltigen Protein Myoglobin, das zusammen mit dem Muskelgewebe homogenisiert wurde, zeigten jedoch, dass das Myoglobin-Eisen offensichtlich nicht freigesetzt (chelatisierbar) wurde und somit andere Quellen für die detektierten Eisenionen, wie z.B. Ferritin oder Hämosiderin, in Frage kommen müssen.

Trotz der Annahme, dass vormals fest gebundene Eisenionen mobilisiert wurden, waren erstaunlicherweise nur ca. 3% des im Muskelhomogenat nachgewiesenen Eisens chelatisierbar. Dieser Wert deckt sich mit den Literaturangaben zum Verhältnis der intrazellulären Konzentration chelatisierbaren Eisens zum Gesamteisen (siehe 1.1.). Falls jedoch die hier im Muskelhomogenat detektierte Konzentration chelatisierbaren Eisens deutlich höher ist als die intrazelluläre Konzentration intakter Muskelzellen, dann sollte die ausgeprägte Mobilisierung des vormals proteingebundenen Eisens eine bedeutende pathophysiologische Konsequenz des mechanischen Muskeltraumas darstellen (siehe 3.4.2.).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Muskelhomogenat detektierten chelatisierbaren Eisenionen waren fast ausschließlich mit Makromolekülen, höchstwahrscheinlich Proteinen mit einem Molekulargewicht von ≥ 30 kDa, assoziiert. Für viele physiologische Vorgänge in lebenden Zellen ist jedoch ein Pool niedermolekular gebundener Eisenionen erforderlich (siehe 1.1.). Somit könnte einerseits die geringe im Filtrat des 1:10-Homogenats detektierte Konzentration chelatisierbaren Eisens (0,4 μM) dem ursprünglich intrazellulären, niedermolekular gebundenen Eisen entsprechen. Andererseits ist jedoch auch denkbar, dass in vitalen Myozyten die intrazelluläre Konzentration an niedermolekular gebundenem chelatisierbarem Eisen deutlich höher ist und ein während der Gewebeaufarbeitung erfolgter Ligandenaustausch zugunsten der Proteine stattgefunden hat, da durch die Homogenisierung

eine Vielzahl von Proteinbindungsstellen freigeworden ist. Gleichsam muss auch an dieser Stelle wiederum berücksichtigt werden, dass es infolge der vollständigen Zerstörung des Muskelgewebes zur Freisetzung vormals fest gebundenen Eisens kommen könnte, welches eher mit den durch die Homogenisierung zusätzlich freigewordenen Proteinbindungsstellen assoziierte, als durch niedermolekulare Moleküle gebunden zu werden.

3.4.2. Das toxische Potential des freigesetzten, chelatisierbaren Eisens

Untersuchungen zu den infolge eines mechanisches Muskeltraumas ausgelösten, durch Eisen vermittelten oxidativen Schäden fokussierten sich bisher hauptsächlich auf die Rolle des Myoglobins [95, 96, 99, 153, 154]. So wird angenommen, dass es nach der Trauma-induzierten Freisetzung von Myoglobin in das Blutgefäßsystem entweder zum Redox-Cycling des Häm-Eisens im intakten Myoglobin und dadurch zur Bildung von ROS in entfernteren Geweben wie der Niere kommt [95, 96, 99] oder dass toxische, labile Eisenionen aus dessen Hämgruppe freigesetzt werden [153, 154]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte jedoch demonstriert werden, dass chelatisierbare Eisenionen unabhängig vom Myoglobin freigesetzt werden, somit also nicht ursprünglich dem Häm-Eisen entstammen, obwohl ca. 10-15 μM Myoglobin im Überstand des 1:10-Muskelhomogenats gefunden wurden (Daten nicht vorgestellt); diese Konzentration stimmt mit den Angaben aus der Literatur überein [115]. Zudem konnte das hohe toxische Potential der PG SK-detektierbaren Eisenionen anhand der durch sie initiierten Lipidperoxidation im Muskelhomogenat nachgewiesen werden, während Häm-Eisen, das diesbezüglich oft beschrieben worden ist [95-99, 153, 154], unter den hier gewählten Versuchsbedingungen keine Rolle spielte. Dies wurde anhand der kompletten Inhibierung der Lipidperoxidation durch die Eisenchelatoren 1,10-Phenanthrolin und 2,2'-DPD, die das Häm-Eisen des Myoglobins nicht chelatisieren können, belegt. Die fehlende Komplexierung des Häm-Eisens durch 1,10-Phenanthrolin zeigte sich wiederum dadurch, dass es nicht mit PG SK, das die gleiche chelatisierende Funktion besitzt, detektierbar war. Zudem ging aus hier nicht vorgestellten Experimenten hervor, dass eine nach Zugabe von H_2O_2 durch Myoglobin ausgelöste Oxidation von DCFH, einem Nachweisreagenz für reaktive Sauerstoffspezies, nicht durch 1,10-Phenanthrolin und 2,2'-DPD hemmbar ist.

Im Hinblick auf die Initiierung der Lipidperoxidation scheint auch eine potentielle, auf proteolytischen Vorgängen basierende Freisetzung von Myoglobin-Eisen keine Rolle zu

spielen, da Proteaseinhibitoren keinen Einfluss auf das Ausmaß der TBARS-Bildung hatten. Zudem wurde durch eine experimentell induzierte Proteolyse (durch Proteinase K), die einen Anstieg des mit PG SK chelatisierbaren Eisens, jedoch keine Freisetzung des Protoporphyrin-Eisens aus dem Myoglobin bewirkte, die Lipidperoxidation verstärkt und zwar prozentual um den Betrag, um den auch die chelatisierbare Eisenkonzentration anstieg. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Proteolyse keine Rolle bei der infolge eines mechanischen Muskeltraumas ausgelösten Freisetzung chelatisierbarer Eisenionen und der durch diese initiierten Lipidperoxidation spielt. Demzufolge scheint ein rein mechanischer Prozess für die extrazelluläre Freisetzung der chelatisierbaren Eisenionen verantwortlich zu sein.

Aus den vorliegenden Daten, basierend auf unserem *in vitro*-Modell, kann zusammenfassend gefolgert werden, dass das infolge eines mechanischen Muskeltraumas freigesetzte, chelatisierbare Eisen ein viel höheres toxisches Potential als Myoglobin-Eisen besitzen sollte. Dies steht im Widerspruch zu früheren Studien, in denen jedoch die Auswirkungen des Muskeltraumas nicht im eigentlichen Traumagebiet, d.h. im zerstörten Muskel selbst, sondern in entfernteren Geweben wie den proximalen Tubuli der Nieren untersucht wurden [95, 96, 99, 153, 154]. Auch in diesen Untersuchungen fanden ZAGER *et al.* Hinweise darauf, dass chelatisierbare Eisenionen an der Initiierung der Lipidperoxidation beteiligt sein könnten, da der Eisenchelator Desferal die Bildung von Malondialdehyd in den proximalen Nierentubuli fast vollständig hemmte. Dies veranlasste die Autoren zu der Vermutung, dass Häm-Eisen als chelatisierbares Eisen freigesetzt wurde [153, 154]. Demgegenüber argumentieren andere Autoren, die ausschließlich das „Redox-Cycling“ des Myoglobin-Eisens für die Initiierung der Lipidperoxidation in den Nierentubuli verantwortlich machen, dass der Effekt von Desferal nicht auf der Komplexbildung von „freiem“ Eisen beruht, sondern auf seiner Rolle als direktes Antioxidans. Demnach soll Desferal sowohl als Radikalfänger dienen als auch die durch Hämproteine ausgelöste Peroxidation von Membranen verhindern, indem es deren Redoxstatus verändert [95, 96]; nur das dreiwertige und vierwertige (Perferrylmyoglobin und Ferrylmyoglobin) Häm-Eisen kann eine Lipidperoxidation initiieren [96, 97]. Zudem konnte durch Untersuchungen im chemischen System vergleichend dargestellt werden, dass Myoglobin in Anwesenheit eines H_2O_2 -generierenden Systems (Hypoxanthin/Xanthin-Oxidase) die Malondialdehydbildung deutlich effektiver initiiert als Fe(III)-ADP und Fe(II)-ADP [155]. Somit scheint das toxische Potential chelatisierbaren Eisens und Myoglobin-

Eisens im Hinblick auf die Initiierung der Lipidperoxidation erheblich von den gewählten Versuchsbedingungen abzuhängen. Festzuhalten bleibt jedoch, dass das infolge eines mechanischen Muskeltraumas freigesetzte Myoglobin-Eisen nicht an den lokalen toxischen Auswirkungen im zerstörten Muskelgewebe selbst beteiligt zu sein scheint, sondern ausschließlich chelatisierbares Eisen im eigentlichen Traumagebiet eine schädigende Rolle spielt.

3.4.3. Die potentiell pathophysiologische Bedeutung des infolge eines mechanischen Muskeltraumas ins Blutgefäßsystem freigesetzten chelatisierbaren Eisens

Unter physiologischen Bedingungen liegen im Blutplasma keine freien (chelatisierbaren) Eisenionen vor, da diese nach ihrer Resorption im Darm sofort durch das Eisentransportprotein Transferrin gebunden werden, dessen Eisensättigung lediglich 20-30% beträgt (siehe 1.1.). Durch die Bindung wird das Eisen redox-inaktiv, wodurch eisenabhängige, radikalgenerierende Prozesse wie die Fenton-Reaktion verhindert werden [1, 2]. Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass Transferrin nur einen sehr geringen Anteil der infolge des mechanischen Muskeltraumas freigesetzten, chelatisierbaren Eisenionen binden kann. Vermutlich verhindert die Assoziation der Eisenionen mit Proteinen aus sterischen Gründen die Eisenbindung durch Transferrin. Somit kann angenommen werden, dass dieses Eisen auch *in vivo* nach einem mechanischen Muskeltrauma ins Blut gelangt und dort als „labiles Plasma-Eisen“, d.h. redox-aktiv, chelatisierbar und nicht an Transferrin gebunden [83, 156], vorliegt. Das infolge eines mechanischen Muskeltraumas freigesetzte „labile Plasma-Eisen“ könnte über die Initiierung der ROS-Bildung zu oxidativen Schäden/Veränderungen an Blut- und Gefäßendothelzellen führen, in dessen Folge es z.B. zu mikrozirkulären Dysfunktionen, einer Ödembildung und zu Entzündungsreaktionen kommen kann.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Das zytotoxische Potential redox-aktiver, chelatisierbarer Eisenionen hängt entscheidend davon ab, wie schnell diese durch intrazelluläre Reduktionsmittel (re-)reduziert werden („Redox-Cycling“), da die eisenabhängige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) vorwiegend durch zweiwertige Eisenionen (Fe(II)) vermittelt wird. Welche intrazellulären Reduktionsmittel das radikalgenerierende „Redox-Cycling“ am effektivsten unterhalten, konnte jedoch bislang noch nicht geklärt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde vergleichend untersucht, wie effektiv isolierte Zellorganellen der Rattenleber, d.h. Mitochondrien, Mikrosomen, Zellkerne und das Cytosol, Fe(III)-ATP reduzieren können. Während die Fe(III)-Reduktionsrate durch das Cytosol und die Kernfraktion generell äußerst gering ausfiel, konnten die Mitochondrien und Mikrosomen (jeweils 0,01 mg Protein/ml) in Anwesenheit von NADH (200 μ M) 50 μ M Fe(III)-ATP innerhalb einer Stunde fast vollständig reduzieren. Eine Extrapolation auf die Proteinverhältnisse der Rattenleber ergab, dass die Mitochondrien die mit Abstand höchste (65%) NADH-abhängige Fe(III)-Reduktionskapazität aller Zellorganellen besitzen sollten, während auf die Mikrosomen 23% der NADH-abhängigen Fe(III)-Reduktionskapazität aller Organellen entfiel; die Fe(III)-Reduktionskapazität der cytosolischen Fraktion und der Zellkernfraktion betrug lediglich 9% bzw. 2,8%. Auf Grund seiner herausragenden Bedeutung wurde das NADH-abhängige Fe(III)-Reduktionssystem der Mitochondrien genauer untersucht. Eine Beteiligung von Ascorbinsäure und dem Superoxidradikal ($O_2^{\cdot-}$) am mitochondrialen Fe(III)-Reduktionsprozess sowie ein direkter Elektronentransfer von NADH auf Fe(III) waren nicht nachweisbar. Neben dem Ausschluss dieser prominenten, niedermolekularen Reduktionsmittel für Eisen(III), wiesen auch der hemmende Effekt von 4,5-Dihydroxyanthrachinon (Rhein) und die ermittelten Michaelis-Menten-Kinetiken auf einen durch Enzyme vermittelten Fe(III)-Reduktionsprozess hin. Eine Beteiligung der Atmungskettenenzyme an der Reduktion von Fe(III)-Ionen konnte ausgeschlossen werden, da sowohl die Atmungsketteninhibitoren Antimycin A und Rotenon als auch die Substrate Glutamat und Malat keinen Einfluss auf die NADH-abhängige Ferrireduktaseaktivität der mitochondrialen Fraktion hatten. Durch Versuche mit submitochondrialen Fraktionen konnte schließlich gezeigt werden, dass die höchste spezifische Fe(III)-Reduktaseaktivität an oder in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Aus den vorliegenden Ergebnissen wurde geschlussfolgert, dass ein NADH-abhängiges mitochondriales Enzymsystem, höchst-

wahrscheinlich das Cytochrom-*c*-Reduktasesystem der äußeren Mitochondrienmembran, entscheidend zur effektiven Reduktion der chelatisierbaren Fe(III)-Ionen beiträgt. Aufgrund des hohen K_m -Wertes für Fe(III)-ATP (ca. 0,95 mM) sollte dieser enzymatische Reduktionsprozess intrazellulär vor allem dann bedeutend werden, wenn die cytosolischen Konzentrationen von NADH und chelatisierbarer Fe(III)-Ionen unter pathologischen Bedingungen stark erhöht sind.

In vergleichenden Versuchen wurde weiterhin demonstriert, dass die Mitochondrien der Skelettmuskulatur (*Musculus gastrocnemius*) chelatisierbares Fe(III) genauso effektiv wie die Lebermitochondrien NADH-abhängig reduzieren können.

Das toxische Potential von extrazellulärem, chelatisierbarem Eisen im Rahmen des mechanischen Muskeltraumas wurde anhand eines *in vitro*-Traumamodells näher charakterisiert. Da bekannt ist, dass infolge einer mechanischen Zerstörung von Gewebestrukturen große Mengen intrazellulärer Metabolite freigesetzt werden, die zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies beitragen können, wurde zunächst die Freisetzung chelatisierbarer Eisenionen nach der Schädigung (Homogenisierung) des Skelettmuskels der Ratte untersucht. Im 1:10-Homogenat des Skelettmuskels *Musculus gastrocnemius* konnten mit dem Fluoreszenzindikator Phen Green SK (PG SK) 5 μ M chelatisierbares Eisen nachgewiesen werden, das unmittelbar nach der Zerstörung des Muskelgewebes freigesetzt wurde und dessen Konzentration über einen Beobachtungszeitraum von 24 Stunden konstant blieb. Das freigesetzte, chelatisierbare Eisen entsprach 3% des muskulären Gesamteisens und war hauptsächlich mit Makromolekülen (≥ 30 kDa), höchstwahrscheinlich Proteinen, assoziiert. Vermutlich aus sterischen Gründen wurde das PG SK-detektierbare Eisen nur zu einem sehr geringen Teil durch Apo-Transferrin gebunden. Zudem war es hoch redox-aktiv und vermittelte eine erhebliche Bildung Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen (TBARS) als Maß für eine Lipidperoxidation im Muskelhomogenat. Eine Beteiligung von Protoporphyrin-Eisen des Myoglobins konnte hierbei ausgeschlossen werden. Im Hinblick auf die *in vivo*-Situation wurde aus den vorliegenden Daten postuliert, dass infolge eines mechanischen Muskeltraumas erhebliche Mengen redox-aktiver, chelatisierbarer Eisenionen in den Blutkreislauf freigesetzt werden könnten, die nicht durch Transferrin gebunden werden und somit potentiell eisenabhängige, oxidative Schädigungsprozesse vermitteln.

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1. MATERIAL

5.1.1. Chemikalien

Hersteller	Substanz
Boehringer (Mannheim, Deutschland)	Pyruvat Xanthin-Oxidase (EC 2.4.2.1)
Fluka (Buchs, Schweiz)	Digitonin 2,2'-Dipyridyl (2,2'-DPD) Glucose-6-Phosphat Myoglobin (aus Pferdemuskel) 1,1,3,3-Tetramethoxypropan
Lancaster Synthesis (Morecambe, England)	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
Merck (Darmstadt, Deutschland)	Ammoniumacetat Kaliumzyanid Metaphosphorsäure Salpetersäure (suprapur, 65% v/v) 2-Thiobarbitursäure Trichloressigsäure Triton X-100
Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland)	Phen Green™ SK (di-Kaliumsalz; PG SK) Propidiumiodid
Pierce Biotechnology (Rockford, IL)	Halt™ Protease-Inhibitor-Cocktail
Serva (Heidelberg, Deutschland)	Coomassie Brilliant Blue G-250 Mannitol Rinderserumalbumin Saccharose
Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)	Adenosin-5'-diphosphat (ADP) Antimycin A Ascorbat-Oxidase (EC 1.10.3.3) Ascorbinsäure

Chelex 100 (chelating resin)
 Cytochrom *c* (aus Rinderherz)
 4,5-Dihydroxyanthrachinon (rhein)
 Ethylenglycol bis(2-aminoethylether)-
 N', N', N', N'-tetraessigsäure (EGTA)
 Eisen(II)-ammoniumsulfat
 Eisen(III)-chlorid
 Ferritin (aus Pferdemilz)
 Glutamat
 Inosin
 α -Ketoglutarat
 Malat
 Nucleosid-Phosphorylase (EC 2.4.2.1)
 1,10-Phenanthrolin
 Phenylmethansulfonsäurefluorid
 Rotenon
 Succinat
 Transferrin (Apo-, und Holo-)

Roche Molecular Biochemicals
 (Mannheim, Deutschland)

Adenosin-5'-triphosphat (ATP)
 NADH, NADPH
 Proteinase K (EC 3.4.21.64)
 Superoxid-Dismutase (SOD; EC 1.15.1.1)

5.1.2. Materialien & Geräte

Hersteller	Produkt
Menzel (Braunschweig, Deutschland)	Deckgläschen (\varnothing 28 mm)
B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)	Dounce Homogenisator
Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)	Ultrazentrifuge (Optima™ L-70k) Zentrifugenrotor 70 Ti
Bruker (Rheinstetten, Deutschland)	ESR-Spektrometer (ESP-300E X-Band)
Hansatech, Laborbedarf Saur (Reutlingen, Deutschland)	Clark-Sauerstoffelektrode

Hellma (Mühlheim, Deutschland)	Quarzküvetten (Halbmikroküvetten)
IKA (Staufen, Deutschland)	Ultra-Turrax (T-25)
Kendro Laboratory Products GmbH (Hanau, Deutschland)	Zentrifuge (Biofuge primo R) - Winkelrotor Falcon (r: 12,4/6,0 cm) - Mikroliterrotor (r: 8,7/5,9 cm)
Messer Griesheim (Krefeld, Deutschland)	Gase und Gasgemische
Nalge Nunc International (Wiesbaden, Deutschland)	Zentrifugenröhrchen
Perkin Elmer Life Sciences (Norwalk, CT, USA)	Atomabsorptionsspektrometer (4100 ZL) Spektralphotometer (UV/Visible Lambda 40)
Shimadzu (Duisburg, Deutschland)	Spektralphotometer (UV mini 1240)
Vivascience AG (Hannover, Deutschland)	Cut-off-Filter (Vivaspin concentrator 30 kDa)
Zeiss (Oberkochen, Deutschland)	Laser-Scanning-Mikroskop (Typ Axiovert 100 M mit LSM 510 Laser-Scanning-Modul)
Eigenbau der technischen Abteilung des UK Essen	Mikroskopiekammern (modifizierte Pentz- Kammern) Glove-Box

5.1.3. Versuchstiere

Männliche Ratten vom Stamm Wistar mit einem Gewicht von 300 – 500 g wurden vom Zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen oder von Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen (Raumtemperatur: $21 \pm 2^\circ\text{C}$; relative Luftfeuchte: $55 \pm 5\%$; konstanter Hell/Dunkel-Rhythmus: je 12 Stunden; Standardfutter und Wasser *ad libitum*) entsprechend den geltenden Tierschutzgesetzen aufgezogen und gehalten.

5.2. METHODEN

5.2.1. Isolation der Zellorganellen aus der Rattenleber

Die Perfusion der Rattenleber einschließlich der vorbereitenden Schritte erfolgte mit geringfügigen Abweichungen nach der von DE GROOT und BRECHT beschriebenen Methode [157]. Nach einer kurzen (1 – 2 min) *in situ*-Perfusion über die *Vena portae* mit Calcium-freiem Krebs-Henseleit-Puffer (KH; 115 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 5,9 mM KCl, 1,2 mM MgCl₂, 1,2 mM NaH₂PO₄, 1,2 mM Na₂SO₄, 20 mM HEPES, pH 7,35 bei 37°C) wurde die komplette Leber entnommen und sofort mit der Isolation der Zellorganellen begonnen.

Alle Schritte der Fraktionierung wurden bei 4°C mit vorgekühlten Puffern, Materialien und Geräten durchgeführt. Die isolierten Zellfraktionen wurden bis zu ihrer Verwendung (innerhalb von 6 Stunden) in entsprechenden Puffern auf Eis gelagert.

5.2.1.1. Isolation der Mitochondrien

Für die Fraktionierung der Mitochondrien wurde im wesentlichen das Protokoll von CLAYTON *et al.* [158] angewendet. Als Isolationsmedium diente ein Mitochondrien-Standard-Puffer (MS-Puffer), der sich aus folgenden Komponenten zusammensetzte: 210 mM Mannitol, 70 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 5 mM Tris/HCl (pH 7,5 bei 4°C). Die entnommene Leber wurde mit MS-Puffer gewaschen, in 1 – 2 mm große Stücke geschnitten und jeweils 3 g mit MS-Puffer auf 30 ml gebracht (1:10 w/v). Der Aufschluss der Leberzellen erfolgte vorsichtig von Hand mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) im Kühlraum bei 4°C. In der Regel wurden 5 – 6 Stöße benötigt, um jegliche sichtbaren Gewebestrukturen zu zerstören. Danach wurde das Homogenat bei 1300 x g für 10 Minuten zentrifugiert (Biofuge primo R, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland), der Überstand gesammelt und das Pellet nach Resuspension in MS-Puffer nochmals zentrifugiert. Die gewonnenen Überstände wurden nun erneut zweimal zentrifugiert (1300 x g für 10 min) und die Pellets jeweils verworfen. Anschließend wurde der Überstand gleichmäßig auf spezielle Zentrifugenröhrchen (Nalge Nunc International, Wiesbaden, Deutschland) verteilt und die mitochondriale Fraktion durch Zentrifugation bei 17000 x g (für 15 min; Optima™ L-70k, Rotor 70 Ti, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) separiert.

Nun wurden die Mitochondrien zuerst mit herkömmlichem MS-Puffer (siehe oben) und danach mit MS-Puffer ohne EDTA durch erneutes zentrifugieren gewaschen (bei 17000 x g für 15 min). Das so gewonnene Mitochondrienpellet wurde schließlich in 1 ml MS-Puffer ohne EDTA resuspendiert.

5.2.1.2. Subfraktionierung der Mitochondrien

Die Subfraktionierung der Lebermitochondrien erfolgte mittels Digitonin nach der von SCHNAITMAN und GREENWALT beschriebenen Methode [159]. Dazu wurde die erforderliche Menge des Detergenz (0,84 – 1,26 mg, in Abhängigkeit von der mitochondrialen Proteinkonzentration) in MS-Puffer ohne EDTA durch Erhitzen auf 95°C gelöst. Aliquots der abgekühlten (4°C) Digitoninlösung wurden unter ständigem Rühren zu gleichen Volumina der Mitochondriensuspension pipettiert, so dass ein Verhältnis von 1,05 mg Digitonin/10 mg mitochondrialem Protein erreicht wurde [159]. Die weitere Inkubation der Mitochondrien-Digitonin-Suspension erfolgte unter fortgesetztem Rühren für 15 Minuten bei 4°C im Kühlraum. Anschließend wurde das dreifache Volumen (v/v) MS-Puffer ohne EDTA zugesetzt und die Suspension zweimal bei 12000 x g für 15 Minuten zentrifugiert, wobei die Überstände jeweils gesammelt und die Pellets resuspendiert wurden. Das Pellet nach dem 2. Durchlauf repräsentierte die Fraktion der Mitoplasten (MP), bestehend aus innerer Mitochondrienmembran und dem Matrixraum. Durch Ultrazentrifugation der gesammelten Überstände bei 144000 x g für 1 Stunde wurde die äußere Membranfraktion (OM; angereichert im Pellet) von der Fraktion mit den löslichen Intermembranbestandteilen (IM) im Überstand getrennt.

5.2.1.3. Isolation der Mikrosomen und des Cytosols

Für die Isolation der Mikrosomen und des Cytosols wurde das Leberhomogenat anfangs so behandelt wie unter 5.2.1.1. für die Isolation der Mitochondrien beschrieben. Abweichend erfolgte der erste Zentrifugationsschritt bei 17000 x g (für 15 min) in MS-Puffer ohne EDTA. Zusätzlich wurde der Puffer noch mit 140 mM NaCl versetzt, da die Mikrosomen in Medien mit geringerer Ionenkonzentration, wie hier verwendet, das cytosolische Enzym Lactat-

Dehydrogenase (EC 1.1.1.27) binden können [160]. Anschließend wurde der Überstand bei 100000 x g für 1 Stunde zentrifugiert, um die cytosolische Fraktion (Überstand) von den Mikrosomen (Pellet) zu trennen. Das mikrosomale Pellet wurde abschließend in 1 ml MS-Puffer ohne EDTA resuspendiert.

5.2.1.4. Isolation der Zellkerne

Die Isolation der Zellkerne erfolgte in Retikulozyten-Standard-Puffer (RS-Puffer): 250 mM Saccharose, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0,5 mM Phenylmethansulfonsäurefluorid, 10 mM Tris/HCl (pH 7,4 bei 4°C). Dazu wurde die Leber in 1 – 2 mm große Stücke geschnitten, dann 1:20 (w/v) mit RS-Puffer versetzt und für 2 – 3 Minuten mit einem Ultra-Turrax (T-25, IKA, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Zum weiteren Aufschluss der Zellen wurde das Homogenat mittels eines Vortexers mehrmals kurz hintereinander kräftig gemixt und anschließend durch eine Lage Gaze mit einer Porenweite von 15 µm filtriert. Das Filtrat wurde dann zweimal bei 700 x g für 5 Minuten zentrifugiert und das so gewonnene Pellet in 10 ml RS-Puffer, der eine höhere Saccharose-Konzentration (2,2 M) enthielt, aufgenommen. Diese Fraktion wurde dann in spezielle Zentrifugenröhrchen gefüllt und vorsichtig mit 10 ml einer niedrigeren Saccharose-Konzentration (1,1 M) in RS-Puffer überschichtet. Das aus der nachfolgenden Dichtegradientenzentrifugation (110000 x g für 1 h) resultierende Kernpellet wurde anschließend in RS-Puffer mit 250 mM Saccharose aufgenommen und durch Zentrifugation bei 1000 x g (für 5 min) gewaschen. Schließlich wurde das Kernpellet in 1 ml MS-Puffer ohne EDTA resuspendiert.

5.2.2. Isolation der Mitochondrien aus dem *Musculus gastrocnemius* der Ratte

Im Anschluss an die Perfusion der Rattenleber (siehe 5.2.1.) wurde sowohl der linke als auch der rechte Wadenmuskel (*Musculus gastrocnemius*) komplett abgetrennt und der Ratte entnommen.

Die Isolation der Mitochondrien wurde in Anlehnung an das Protokoll von ERNSTER und NORDENBRAND [161] mit einigen Modifikationen durchgeführt. Das zur Isolation verwendete Chappel-Perry-Medium (CP-Medium) setzte sich wie folgt zusammen: 100 mM KCl, 5 mM

MgSO₄, 1 mM Na-ATP, 1 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl (pH 7,4 bei 4°C). Die beiden frisch entnommenen Wadenmuskeln wurden sorgfältig von anhängenden Geweberesten befreit, mit CP-Medium gewaschen und in kleine Stücke geschnitten. Die Muskelstücke wurden mit CP-Medium versetzt (1:10 w/v) und mit dem Ultra-Turrax homogenisiert (24000 U/min für ca. 1 min), bis nur noch einige Bindegewebsfasern übrig blieben. Danach wurde das Homogenat bei 2000 x g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand durch eine Lage Gaze (100 µm Porenweite) filtriert und anschließend das Filtrat zentrifugiert (2000 x g für 10 min). Die im Überstand enthaltenen Mitochondrien wurden nun abzentrifugiert (14000 x g für 10 min), resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Mitochondrienpellet wurde schließlich in 1 ml KCl-Lösung (150 mM) oder in 1 ml MS-Puffer ohne EDTA resuspendiert und bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

5.2.3. Bestimmung des Proteingehaltes der isolierten Zellfraktionen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den jeweiligen Organellen- und submitochondrialen Fraktionen erfolgte nach der Anleitung von Bradford [162] mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standard. Dazu wurden 5 ml Bradford-Reagenz (100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml Ethanol (95%), 100 ml Phosphorsäure (85%), 850 ml Aqua bidest) für 10 Minuten mit jeweils 100 µl der BSA-Standards bzw. der jeweiligen Fraktionen inkubiert. Die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen wurde aus den Absorptionswerten bei 595 nm (Spektralphotometer UV mini 1240; Shimadzu, Duisburg, Deutschland) mit Hilfe der Standards bestimmt.

5.2.4. Bestimmung der Reinheit der isolierten Zellfraktionen

Mit Ausnahme der Zellkerne, deren Vorkommen in allen Organellensuspensionen mit Hilfe der Laser-Scanning-Mikroskopie quantifiziert wurde (siehe 5.2.4.5.), erfolgte die Reinheitsbestimmung anhand von Markerenzymaktivitäten. Dazu wurde für jede Zellfraktion ein möglichst spezifisches Enzym ausgewählt (Markerenzym) und dessen Aktivität in allen Fraktionen photometrisch ermittelt. Zur Bestimmung der mitochondrialen Verunreinigung in den einzelnen Fraktionen wurde die Aktivität von zwei Enzymen untersucht, da das

mitochondriale Markerenzym Glutamat-Dehydrogenase auch in den Zellkernen vorkommt [163]. Aus diesem Grund wurde die Fumarase als mitochondrialer Marker für die Kernfraktion genutzt. Da zur Aktivitätsbestimmung unterschiedliche Proteinkonzentrationen eingesetzt wurden, musste diese Variable bei der Berechnung des Reinheitsgehaltes mit berücksichtigt werden (Gleichung 10).

$$\text{Reinheit (\%)} = \frac{\text{Enzymaktivität (kU/l) der untersuchten Fraktion} \times \text{Proteinkonzentration (mg/ml) der untersuchten Fraktion}}{\text{Enzymaktivität (kU/l) der Ursprungsfraktion*} \times \text{Proteinkonzentration (mg/ml) der Ursprungsfraktion}} \times 100\% \quad (10)$$

* = Fraktion mit Organellen, die das betreffende Markerenzym besitzen.

5.2.4.1. Bestimmung der Aktivität von Glutamat-Dehydrogenase und Fumarase als Markerenzyme der Mitochondrien

Die Bestimmung der Aktivität von Glutamat-Dehydrogenase, einem Enzym das in der Mitochondrien-Matrix lokalisiert ist [159], erfolgte nach der Anleitung von BERGMAYER durch die Messung der NADH-Oxidation bei 340 nm [164]. Aliquots der Mitochondrien, der Mikrosomen und des Cytosols wurden für 20 Minuten mit 4% Triton X-100 bei Raumtemperatur inkubiert. In Ansätzen mit 1 ml Endvolumen wurden 50 mM Triethanolamin-Puffer (pH 8,0 bei 25°C) mit einer NADH/ADP-Lösung (0,16 mM NADH/1 mM ADP), Ammoniumacetat (100 mM) und 200 µl der jeweiligen Organellen-Triton-Lösung vermischt und anschließend bei 340 nm die enzymunabhängige Absorptionsänderung über die Zeit gemessen. Danach wurde der enzymatische Substratumsatz durch Zugabe von α-Ketoglutarat (6,9 mM) gestartet und die Absorptionsänderung aufgenommen. Die Aktivität der Glutamat-Dehydrogenase wurde entsprechend der Anleitung von BERGMAYER [164] mit Hilfe der Formel $\Delta E/\text{min} \times 803$ berechnet.

Der Umsatz von L-Malat zu Fumarat durch Fumarase, einem Enzym der inneren Mitochondrienmembran, wurde nach der Methode von BERGMAYER bei 240 nm gemessen [164]. Dazu wurden mit Triton X-100 vorbehandelte (0,1%, für 20 min bei 22°C) Aliquots der Mitochondrien- und Kernfraktion zu Kaliumphosphat-Puffer (100 mM, pH 7,4 bei 22°C) pipettiert und die enzymatische Reaktion durch Zugabe von L-Malat (50 mM) gestartet. Die

Enzymaktivität wurde aus der Absorptionsänderung pro Zeit mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 2440 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ermittelt.

5.2.4.2. Bestimmung der Aktivität von NADH-Cytochrom-*c*-Reduktase als Markerenzym der äußeren Mitochondrienmembran

Die Reduktion von Cytochrom *c*, photometrisch nachweisbar bei 550 nm, diente zur Bestimmung der Aktivität von NADH-Cytochrom-*c*-Reduktase und erfolgte nach dem Protokoll von SOTTOCASA *et al.* [135]. Dazu wurden Proben der submitochondrialen Fraktionen zu einem Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5 bei 30°C) pipettiert, der mit Cytochrom *c* (50 μM), Rotenon (5 μM) und KCN (300 μM) versetzt wurde. Die Messung bei 30°C wurde durch Zugabe von NADH (0,1 mM) gestartet und die Aktivität anhand des Extinktionskoeffizienten von Cytochrom *c* ($\epsilon = 18500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) berechnet.

5.2.4.3. Bestimmung der Aktivität von Glucose-6-Phosphatase als Markerenzym für die Mikrosomen

Die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase wurde nach dem Protokoll von DE GROOT und NOLL anhand der bei 293 nm detektierbaren Bildung von Harnsäure bestimmt [165]. Die für diesen Versuch benötigten Enzyme, die Nucleosid-Phosphorylase und die Xanthin-Oxidase, wurden in 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,4 bei 4°C), versetzt mit 10 mM KCl, über Nacht dialysiert, um Kontaminationen mit Phosphatresten zu entfernen. Aliquots aller Organellensuspensionen wurden mit Nucleosid-Phosphorylase (200 U/l), Xanthin-Oxidase (20 U/l) und Inosin (2 mM) in einem KCl/Cacodylat-Puffer (50 mM/10 mM, pH 6,5 bei 37°C) für ca. 10 Minuten inkubiert und währenddessen die Absorptionsänderungen mit einem Spektralphotometer (UV/Visible Lambda 40, PerkinElmer Life Sciences, Norwalk, CT, USA) bei 37°C aufgezeichnet. Sobald der Absorptionsanstieg in den linearen Bereich übergang, wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von Glucose-6-Phosphat (6 mM) gestartet und der nachfolgende Absorptionsanstieg aufgenommen. Die Enzymaktivität wurde aus der Differenz von $\Delta E/\text{min}$ vor- und nach Zugabe von Glucose-6-Phosphat anhand des Extinktionskoeffizienten von Harnsäure ($\epsilon = 12600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bestimmt.

5.2.4.4. Bestimmung der Aktivität von Lactat-Dehydrogenase als Markerenzym für das Cytosol

Die Aktivität der Lactat-Dehydrogenase wurde in einem von BERGMAYER beschriebenen Standardverfahren bestimmt [166]. Die isolierten Organellen wurden dazu in einem Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5 bei 22 °C), der 190 μM NADH und 600 μM Pyruvat enthielt, inkubiert. Die Aktivitätsberechnung erfolgte aus $\Delta E_{340}/\text{min}$ anhand des Extinktionskoeffizienten von NADH ($\epsilon = 6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

5.2.4.5. Detektion der Zellkerne mittels Laser-Scanning-Mikroskopie

Proben aller Organellensuspensionen (1 ml) wurden auf Glasplättchen, eingespannt in modifizierte Pentz-Kammern, pipettiert und für 2 Minuten mit dem Kernfarbstoff Propidiumiodid (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl der gefärbten Kerne pro Gesichtsfeld mit Hilfe eines Laser-Scanning-Mikroskops (Typ Axiovert 100 M mit LSM 510 Laser-Scanning-Modul, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) in der jeweils gleichen Fokusebene ermittelt ($\lambda_{\text{exc.}} = 543 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em.}} \geq 560 \text{ nm}$).

5.2.5. Funktionelle Integrität und Lyse der isolierten Lebermitochondrien

5.2.5.1. Bestimmung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs

Der mitochondriale O_2 -Verbrauch wurde polarographisch mit Hilfe einer Clark-Elektrode (Hansatech, Laborbedarf Saur, Reutlingen, Deutschland) bestimmt. Die Messung erfolgte in einem mitochondrialen Respirations-Puffer (60 mM KCl, 10 mM KH_2PO_4 , 5 mM MgCl_2 , 60 mM Tris/HCl, 110 mM Mannitol, 0,5 mM EGTA, 8 mM Glutamat, 4 mM Malat, pH 7,4 bei 22°C). Der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien (ca. 3 mg Protein/ml) wurde in An- und Abwesenheit von ADP (100 μM) gemessen und aus dem Quotienten die respiratorische Kontrollrate berechnet. Abschließend wurde die mitochondriale Respiration durch den Zusatz von KCN (2 mM) gestoppt.

5.2.5.2. Lyse der Lebermitochondrien

Für einige Experimente mussten die Lebermitochondrien direkt vor der Messung lysiert werden. Dazu wurde 1 ml der Organellensuspension (ca. 30 mg Protein/ml) entweder mit Triton X-100 (1%, für 20 min bei 37°C) oder mit Digitonin (1,1 mg Digitonin/mg Mitochondrienprotein; siehe 5.2.1.2.) inkubiert. Alternativ wurden die Mitochondrien durch dreimaliges, kurz aufeinander folgendes Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen aufgeschlossen oder durch Ultraschall (für 30 s; Ultraschallbad Sonorex RK 100, Bandelin Electronic KG, Berlin, Deutschland) lysiert.

5.2.6. Nachweis der durch die isolierten Zellfraktionen vermittelten Fe(III)-Reduktion

5.2.6.1. Herstellung des Fe(III)-ATP-Komplexes

Für die Herstellung des physiologischen Fe(III)-ATP-Komplexes wurde Eisen(III)-chlorid in einer ATP-Stammlösung, bestehend aus Mannitol (210 mM), Saccharose (70 mM), Tris/HCl (5 mM, pH 7,5 bei 22°C) und einem sechsfachen Überschuss (relativ zu Fe(III)) an ATP, gelöst. Auf diese Weise konnte die bei neutralem pH-Wert auftretende Präzipitation von Fe(III) in Form unlöslicher Fe(III)-Oxyhydroxid-Polymere verhindert werden. Alle in der vorliegenden Arbeit benannten Stoffkonzentrationen beziehen sich auf die Fe(III)-Konzentration. Die Fe(III)-ATP-Stammlösung wurde täglich frisch hergestellt.

5.2.6.2. Bestimmung der durch die Organellen bzw. die submitochondrialen Fraktionen vermittelten Fe(III)-Reduktion und NAD(P)H-Oxidation mittels Spektrophotometrie

Der Nachweis der Fe(II)-Bildung erfolgte, basierend auf der Komplexbildung von Fe(II), durch den starken Eisenchelator 1,10-Phenanthrolin. Dieser bildet mit Fe(II) das rot gefärbte Tris-o-Phenanthrolin-Fe(II)-Ion $[\text{Fe(II)} (1,10\text{-Phenanthrolin})_3]^{2+}$, welches ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 510 nm aufweist, während der wesentlich schwächere Fe(III)-1,10-Phenanthrolin-Komplex bei dieser Wellenlänge kaum absorbiert. Durch die Bindung an 1,10-Phenanthrolin wird zudem die Reoxidation von Fe(II) verhindert. Alle bei

510 nm ermittelten Absorptionswerte wurden um die Hintergrundabsorption in Abwesenheit von 1,10-Phenanthrolin korrigiert. Die Konzentration des gebildeten Fe(II) wurde mit Hilfe einer Kalibrierungskurve, die unter Verwendung von Fe(II)-Standardlösungen und 1,10-Phenanthrolin (jeweils im 4-fachen Überschuss) erstellt wurde, berechnet. Dazu wurden Eisen(II)-ammoniumsulfat (1 mM) und Ascorbinsäure (20 mM) in Aqua bidest. gelöst, für 20 Minuten inkubiert und anschließend aus dieser Stammlösung die Fe(II)-Standards durch entsprechende Verdünnungen mit einer Ascorbinsäurelösung (20 mM in Aqua bidest.) hergestellt. Die Quantifizierung der Fe(II)-Konzentration wurde nicht durch die Anwesenheit des organischen Liganden ATP beeinflusst [64].

Die NAD(P)H-Oxidation wurde anhand der Absorptionsabnahme bei 340 nm, basierend auf dem Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, quantifiziert.

Jede Organellen- bzw. submitochondriale Fraktion (0,01 mg Protein/ml) wurde mit Fe(III)-ATP (50 μM) und 1,10-Phenanthrolin (200 μM) in Ab- und Anwesenheit von NADH oder NADPH (jeweils 200 μM) in einem Standardmesspuffer, bestehend aus Mannitol (210 mM), Saccharose (70 mM) und Tris/HCl (5 mM, pH 7,5 bei 22°C), inkubiert. Kontrollexperimente erfolgten mit und ohne Organellen, Fe(III)-ATP und 1,10-Phenanthrolin. Ein Teil der cytosolischen Fraktion wurde vor der Zugabe der einzelnen Zusätze mit Hilfe eines 30 kDa Cut-off-Filters (Vivaspin concentrator, Vivascience AG, Hannover, Deutschland) bei 16000 x g (für 10 min bei 22°C; Biofuge primo R, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland) filtriert oder mit Ascorbat-Oxidase (200 U/ml) inkubiert.

Für weitere, nur mit den Lebermitochondrien (0,01 mg Protein/ml) durchgeführte Experimente, wurden die Reaktionsansätze in Anwesenheit von Fe(III)-ATP (50 μM), 1,10-Phenanthrolin (200 μM) und NADH (200 μM) mit SOD (100 U/ml), Ascorbat-Oxidase (200 U/ml), Rotenon (10 μM), Antimycin A (10 μM) oder Rhein (500 μM) versetzt. Zusätzlich wurden die Mitochondrien mit 0,01 – 5 mM Fe(III) in Anwesenheit einer konstanten NAD(P)H-Konzentration (200 μM) und umgekehrt in Anwesenheit einer konstanten Fe(III)-Konzentration (50 μM) und 1 – 10 μM NADH oder 0,05 – 10 mM NADPH inkubiert. Unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen wurde auch an den Muskelmitochondrien die Geschwindigkeit der Fe(III)-Reduktion in Abhängigkeit von der NADH-Konzentration (1 – 10 μM) untersucht.

Für Untersuchungen zur Substratabhängigkeit der Fe(III)-Reduktion wurden die Lebermitochondrien (1 mg Protein/ml) mit NADH (200 μM), Fe(III)-ATP (50 μM) und

Glutamat/Malat (je 5 mM) oder Succinat (5 mM) unter Sauerstoffausschluss in einer mit Argon gefluteten Glove-Box inkubiert, um eine Reoxidation des gebildeten Fe(II) zu verhindern. Zu definierten Zeitpunkten wurden in der Glove-Box Proben des Versuchsansatzes entnommen, die mitochondrialen Proteine mit Metaphosphorsäure (8%) gefällt und anschließend diese Proben mit 1,10-Phenanthrolin versetzt. Die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation bei 15000 x g (5 min) aus dem Reaktionsgemisch entfernt und die Fe²⁺-Ionen im Überstand quantifiziert.

Die bei 510 nm detektierbare Fe(III)-Reduktion wurde in allen Versuchsanordnungen mit Hilfe des UV Mini-Spektralphotometers (Shimadzu, Duisburg, Deutschland) aufgezeichnet. Die Aufnahme von Absorptionsspektren (300 – 600 nm) zur simultanen Messung der Fe(II)-Bildung und der NAD(P)H-Oxidation innerhalb eines Versuchsansatzes erfolgte mit dem Spektralphotometer Lambda 40 (UV/Visible, PerkinElmer Life Sciences, Norwalk, CT, USA). Die spezifische Aktivität hinsichtlich der Fe(II)-Bildung (U/mg Protein) in den submitochondrialen Fraktionen wurde in Anwesenheit von NADH (200 µM) aus dem Absorptionsanstieg (A₅₁₀) innerhalb der ersten 5 Minuten berechnet. Die kinetischen Parameter der Fe(III)-Reduktion bzw. NAD(P)H-Oxidation (K_m und V_{max}) wurden unter Verwendung von GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) ermittelt.

5.2.6.3. Bestimmung der durch die Mitochondrien und Mikrosomen der Leber vermittelten Fe(III)-Reduktion mittels Elektronenspinresonanz-Spektrometrie (ESR-Spektrometrie)

Bei der Aufnahme eines ESR-Spektrums wird bei konstanter, monochromatischer Mikrowellen-Bestrahlung einer Probe das Magnetfeld moduliert. Stimmt die Aufspaltung der zu den verschiedenen Elektronenspin-Zuständen gehörigen Eigenenergien mit der Energie der eingestrahlten Photonen überein, kommt es zur Resonanz-Absorption. Fe(III) im high-spin-Zustand zeigt ein charakteristisches, leicht zu detektierendes ESR-Signal bei $g = 4,2$ und $g = 9-5$. Die Reduktion von high-spin-Fe(III) kann somit anhand der Abnahme dieses Signals verfolgt werden, d.h. der Einsatz eines Eisenchelators für den Nachweis von Fe(II) ist nicht erforderlich.

Die ESR-Spektren wurden bei 77 K mittels eines Bruker-Spektrometers (ESP-300E X-Band, Bruker, Rheinstetten, Deutschland), ausgestattet mit einer großporigen Cavität (TM₁₁₀),

aufgenommen. Die folgenden Instrumenteneinstellungen wurden für die Detektion des Fe(III)-Signals genutzt: Mikrowellenfrequenz 9,53 GHz; Modulationsamplitude 10 G; Signalverstärkung $2,5 \times 10^4$; Scanbereich 2000; Scanzeit 6 Minuten; Modulationsfrequenz 100 kHz. Alle ESR-Experimente fanden unter Schutzgasatmosphäre (Argon) statt, um die schnelle Reoxidation von Fe(II) durch Sauerstoff zu verhindern. Um ein günstiges Signal-Rausch-Verhältnis zu erzielen, wurden 5 mM Fe(III)-ATP eingesetzt und dementsprechend auch die Konzentration der untersuchten Zellorganellen auf 5 mg Protein/ml bzw. der Pyridin-Nucleotide auf 20 mM erhöht.

Vor den ESR-Messungen wurden 2 ml des Standardmesspuffers mit Fe(III)-ATP und NADH bzw. NADPH für 15 Minuten in einem mit einer Gummimembran luftdicht abgeschlossenen Vorratsgefäß kontinuierlich mit Argon begast, um den Sauerstoff aus der Lösung zu entfernen. Anschließend wurden 0,2 ml des Reaktionsansatzes mit einer gasdichten Hamilton-Spritze entnommen, in ein mit Argon geflutetes und mit einem Septum abgedecktes Suprasil-Quarzröhrchen (\varnothing 4 mm) gefüllt und dieses sofort in flüssigem Stickstoff auf 77 K abgekühlt. Nach Platzierung des Quarzröhrchens in einem Vakuum-Isoliergefäß wurde die ESR-Messung gestartet und das Grundsignal des Fe(III)-ATP-Komplexes aufgezeichnet. Anschließend wurden Proben der Mitochondrien oder Mikrosomen in das mit Argon geflutete Vorratsgefäß pipettiert und nun nur noch die Oberfläche der Lösung weiter mit Argon begast, um eine Zerstörung der Organellen durch Verwirbelungen zu vermeiden. Zu definierten Zeitpunkten wurden nun wiederholt, wie oben beschrieben, 0,2 ml des Reaktionsansatzes entnommen, abgekühlt und die ESR-Spektren aufgezeichnet. Kontrollexperimente wurden mit den Organellen in Abwesenheit von Fe(III)-ATP und NAD(P)H sowie in Abwesenheit der Organellen mit Fe(III)-ATP und NADH durchgeführt. Die aufgezeichneten Spektren wurden mit der Bruker-WinEPR-Software ausgewertet und nach Korrektur der Basislinienverschiebung mit Hilfe von SigmaPlot 8.0 (SPSS Inc.) dargestellt.

5.2.7. Bestimmung der mitochondrialen Fe(II)-Aufnahme

Lebermitochondrien (1 mg/ml) wurden mit Fe(III)-ATP (50 μ M, 250 μ M oder 1000 μ M) und NADH (5 mM) im Standardmesspuffer inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation bei 16000 x g (für 15 min bei 4°C) aus dem

Reaktionsgemisch entfernt und der Überstand für 20 Minuten mit Ascorbinsäure (20 mM) inkubiert, um die vollständige Reduktion des Fe(III)-ATP-Komplexes für seinen Nachweis durch 1,10-Phenanthrolin zu gewährleisten. Anschließend wurde die (extramitochondriale) Konzentration von Fe(II) im Überstand durch Zugabe von 1,10-Phenanthrolin (0,15, 0,75 oder 3 mM) photometrisch bei 510 nm quantifiziert.

5.2.8. Freisetzung von chelatisierbarem Eisen aus mechanisch zerstörtem Muskelgewebe

5.2.8.1. Herstellung des Muskelhomogenats

Für die Herstellung des Gewebehomogenats aus den Wadenmuskeln (*Musculus gastrocnemius*) der Ratte wurde ein auf 37°C temperierter Puffer, bestehend aus physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) und 20 mM HEPES (pH 7,5 bei 37°C) verwendet, der über Nacht mit Chelex 100 (5 g/100 ml) inkubiert worden war, um Kontaminationen mit Schwermetallionen zu minimieren. Für einige Experimente wurde der Puffer unmittelbar vor Versuchsbeginn mit Myoglobin (3,15 mg/g Muskel) versetzt.

Die Entnahme des *Musculus gastrocnemius* von beiden Hintergliedmaßen der Ratte erfolgte wie unter 5.2.2. beschrieben. Die entnommenen Wadenmuskeln wurden in warmem Puffer gewaschen, in 1 – 2 mm große Stücke geschnitten und mit dem Puffer versetzt (1:10 w/v). Anschließend wurden die Muskelstücke mit einem Ultra-Turrax bei 17500 U/min 30 Sekunden lang zerkleinert und das resultierende Homogenat bis zu seiner weiteren Verwendung bei 37°C aufbewahrt.

5.2.8.2. Bestimmung des chelatisierbaren Eisens im Muskelhomogenat mittels Laser-Scanning-Mikroskopie

Der Nachweis chelatisierbaren Eisens im Muskelhomogenat erfolgte mit dem Fluoreszenzindikator PG SK, dessen Fluoreszenz infolge der Komplexbildung von Fe(II)-Ionen gelöscht (gequencht) wird [12, 114]. Da der PG SK:Fe²⁺-Komplex eine 3:1 Stöchiometrie aufweist [114], konnte die Konzentration des chelatisierbaren Eisens im Muskelhomogenat direkt aus der Fluoreszenzdifferenz im Vergleich zur PG SK-Fluoreszenz

eines mit Chelex vorbehandelten, eisenfreien Puffers (0,9% NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,5 bei 37°C) berechnet werden. Um sicherzugehen, dass die niedrigere PG SK-Fluoreszenz der Muskelprobe ausschließlich auf der Komplexbildung mit chelatisierbarem Eisen beruhte, wurde eine zweite Quantifizierungsmethode, basierend auf einem internen Standard, eingesetzt. Hierzu wurde die Muskelprobe mit 5 µM Fe(II)-ammoniumsulfat (siehe 5.2.6.2.) versetzt und aus der resultierenden Abnahme der PG SK-Fluoreszenzintensität die Konzentration des ursprünglich freigesetzten, chelatisierbaren Eisens berechnet.

Aliquots des warmen (37°C) Muskelhomogenats wurden für 10 Minuten bei 16000 x g zentrifugiert (bei 22°C), um Gewebereste und ungelöste Proteine zu entfernen. Die resultierenden Überstände wurden für 20 Minuten mit Ascorbinsäure (1 mM) inkubiert, um das chelatisierbare Eisen in seine zweiwertige Form zu überführen. In einigen Versuchen wurden die Überstände direkt nach der Zentrifugation für 5 – 20 Minuten mit NaHCO₃ (14,3 mM) in Ab- und Anwesenheit von Apo- oder Holotransferrin (jeweils 31,2 µM) im Brutschrank bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre aus 5% CO₂ und 95% Raumluft inkubiert (Brutschrank Modell BB 16, Heraeus, Hanau, Deutschland), da es unter Raumluftatmosphäre in Gegenwart der physiologischen Bicarbonatkonzentration des Blutes zu einem Anstieg des pH-Wertes käme (Bicarbonat-Puffersystem). Die anschließende, zwanzigminütige Inkubation mit Ascorbinsäure erfolgte demzufolge ebenfalls im Brutschrank. Für weitere Untersuchungen wurden die 16000 x g-Überstände und Aliquots des Muskelhomogenats mit Hilfe von 30 kDa Cut-off-Filtern (d.h. Ausschlussgröße ≥ 30 kDa) bei einer Gravitationskraft von 16000 x g (für 10 min bei 22°C) filtriert. Vor der Filtration wurde ein Teil der Proben entweder für 30 Minuten in Anwesenheit von Proteinase K (1 mU/ml) auf 60°C erhitzt oder für 30 Minuten mit 1% Triton X-100 bei 37°C vorbehandelt. Anschließend wurden die Filtrate aller Proben wiederum für 20 Minuten mit Ascorbinsäure (siehe oben) inkubiert. Eisenfreie Kontrollansätze, d.h. Ansätze ohne Muskelgewebe, wurden mit Chelex-behandeltem Homogenisations-Puffer (0,9% NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,5 bei 37°C) für alle oben beschriebenen Variationen angesetzt und mit 1 mM Ascorbinsäure behandelt. Für zusätzliche Kontrollmessungen wurde Ferritin (68 nM) im Homogenisations-Puffer (ohne Muskelgewebe) gelöst.

Im Anschluss an die Behandlung mit Ascorbinsäure wurden die Muskelproben für 2 Minuten mit 50 µM PG SK inkubiert. Danach wurden 50 µl dieses Ansatzes auf ein Glasplättchen (0,1 mm dick) in einer modifizierten Pentz-Kammer pipettiert, und der verbliebene Ansatz mit 5

μM Eisen(II)-ammoniumsulfat (siehe 5.2.6.2.) für weitere 5 Minuten inkubiert, bevor auch hiervon 50 μl auf einem Glasplättchen positioniert wurden. Die Quantifizierung der PG SK-Fluoreszenzintensität der Proben erfolgte auf einem beheizbaren Mikroskoptisch bei 37°C mit Hilfe der Laser-Scanning-Mikroskopie nach Anregung mit einem Argon-Laser ($\lambda_{\text{exc.}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{em.}} \geq 505\text{-}530$ nm). Die Fluoreszenzintensität wurde für mindestens 5 verschiedene Gesichtsfelder in einer Fokusebene von 10 μm über der Glasoberfläche (d.h. innerhalb der Flüssigkeitssäule) mit der Software „physiology evaluation“ („mean roi“) des LSM 510-Systems gemessen, die Einzelwerte gemittelt und die mit PG SK detektierbare Eisenkonzentration mittels der oben beschriebenen Methodik in Anwesenheit und Abwesenheit des internen Standards quantifiziert.

5.2.8.3. Bestimmung des Gesamteisens mittels Atomabsorptionsspektrometrie (ASS)

Der Gesamteisengehalt des *Musculus gastrocnemius* wurde mittels ASS unter Verwendung einer modifizierten Standardmethode bestimmt [167, 168]. Dazu wurden Aliquots des Muskelhomogenats und des 16000 x g-Überstandes mit Proteinase K (1 mU/ml) für 90 Minuten bei 60°C vorverdaut. Anschließend erfolgte über Nacht die komplette Zellyse durch Inkubation mit konzentrierter Salpetersäure (1,58 N; hergestellt aus analysenreiner Salpetersäure). Mit Chelex behandelte Puffer-Proben (0,9% NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,5 bei 37°C) wurden ebenfalls der oben beschriebenen Prozedur unterzogen und als Kontrolle bzw. zur Bestimmung des Leerwertes mitgeführt. Die ASS-Messungen wurden von Herrn Diederichs (Institut für Arbeitsmedizin, Universitätsklinikum Essen) mit einem Atomabsorptionsspektrometer (Modell 4100 ZL, Perkin Elmer Life Sciences, Norwalk, CT, USA) vorgenommen. Der durchschnittliche Eisengehalt der Proben wurde unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren und nach Abzug des Leerwertes berechnet.

5.2.8.4. Nachweis Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen

Zum Nachweis der Lipidperoxidation im Muskelhomogenat wurde die Bildung von Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen (TBARS) mittels einer leicht modifizierten Standardmethode [118] untersucht. Dafür wurden die entnommenen Muskelstücke geteilt und

in Ab- und Anwesenheit von NADH (100 μ M), NADPH (100 μ M), Protease-Inhibitoren (10 μ l des kommerziell erwerblichen Cocktails/ml) oder der Eisenchelatoren 1,10-Phenanthrolin (1 mM) bzw. 2,2'-DPD (1 mM) wie unter 5.2.8.1. beschrieben homogenisiert. Ein Teil des unbehandelten Muskelhomogenats wurde mit Proteinase K (1 mU/ml) für 30 Minuten bei 60°C vorinkubiert. Anschließend wurden alle Homogenatproben in einem Wasserbad bei 37°C kontinuierlich geschüttelt, um eine ausreichende Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Aliquots (1 ml) der Homogenate entnommen, für 5 Minuten mit 0,5 ml Trichloressigsäure (30%) inkubiert, dann in Schliffgläser überführt, mit Thiobarbitursäure (17,5 mM) versetzt und für 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Nach Entfernung der gefällten Proteinbestandteile durch Zentrifugation bei 5000 x g (für 10 min bei 22°C), wurde die Absorption des gebildeten Farbstoffes im Überstand bei 532 nm bestimmt. Die Konzentration der gebildeten TBARS wurde mit Hilfe des Standards 1,1,3,3-Tetramethoxypropan, der den gleichen molaren Extinktionskoeffizienten besitzt, quantifiziert.

5.2.9. Statistik

Alle Experimente wurden mindestens dreimal mit Organellen/Geweben von verschiedenen Ratten wiederholt. Die in den Abbildungen gezeigten Verläufe sind repräsentativ für alle entsprechend durchgeführten Versuche. Die Daten wurden, wenn in der Legende nicht anders ausgewiesen, als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) dargestellt.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Anderson, G. J. (1999) Non-transferrin-bound iron and cellular toxicity. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 105-108
2. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1990) The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* **280**, 1-8
3. Fleming, M. D., Romano, M. A., Su, M. A., Garrick, L. M., Garrick, M. D. and Andrews, N. C. (1998) Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1148-1153
4. Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U. and Andrews, N. C. (2004) Balancing Acts: Molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* **117**, 285-297
5. Petrat, F., de Groot, H., Sustmann, R. and Rauen, U. (2002) The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity. *Biol. Chem.* **383**, 489-502
6. Young, S. P. and Aisen, P. (1994) The liver and iron. In: *The Liver: Biology and Pathobiology* (Arias, I. M., Boyler, J. L. and Fausto, N., eds.). pp. 597-617, Raven Press, New York
7. Baliga, R., Ueda, N. and Shah, S. V. (1993) Increase in bleomycin-detectable iron in ischaemia/reperfusion injury to rat kidneys. *Biochem. J.* **291**, 901-905
8. Gower, J. D., Healing, G. and Green, C. J. (1989) Determination of desferrioxamine-available iron in biological tissues by high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **180**, 126-130
9. Kakhlon, O. and Cabantchik, Z. I. (2002) The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 1037-1046
10. Linder, C. M., Mulligan, M. and Henley, D. (1983) Low molecular weight iron pools in tissues of the rat and pig. In: *Structure and functions of iron storage and transport proteins* (Urushizaki, I., ed.). pp. 465-471, Elsevier Science Publisher, Amsterdam
11. Öllinger, K. and Roberg, K. (1997) Nutrient deprivation of cultured rat hepatocytes increases the desferrioxamine-available iron pool and augments the sensitivity to hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **272**, 23707-23711

12. Petrat, F., Rauert, U. and de Groot, H. (1999) Determination of the chelatable iron pool of isolated rat hepatocytes by digital fluorescence microscopy using the fluorescent probe, phen green SK. *Hepatology* **29**, 1171-1179
13. Breuer, W., Epsztejn, S. and Cabantchik, Z. I. (1995) Iron acquired from transferrin by K562 cells is delivered into a cytoplasmic pool of chelatable iron(II). *J. Biol. Chem.* **270**, 24209-24215
14. Breuer, W., Epsztejn, S., Millgram, P. and Cabantchik, I. Z. (1995) Transport of iron and other transition metals into cells as revealed by a fluorescent probe. *Am. J. Physiol.* **268**, C1354-C1361
15. Browne, P., Shalev, O. and Hebbel, R. P. (1998) The molecular pathobiology of cell membrane iron: the sickle red cell as a model. *Free Radic. Biol. Med.* **24**, 1040-1048
16. Gurgueira, S. A. and Meneghini, R. (1996) An ATP-dependent iron transport system in isolated rat liver nuclei. *J. Biol. Chem.* **271**, 13616-13620
17. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**, 1-85
18. Weaver, J. and Pollack, S. (1989) Low- M_r iron isolated from guinea pig reticulocytes as AMP-Fe and ATP-Fe complexes. *Biochem. J.* **261**, 787-792
19. Ceccarelli, D., Gallesi, D., Giovannini, F., Ferrali, M. and Masini, A. (1995) Relationship between free iron level and rat liver mitochondrial dysfunction in experimental dietary iron overload. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**, 53-59
20. Stohs, S. J. and Bagchi, D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 321-336
21. Bralet, J., Schreiber, L. and Bouvier, C. (1992) Effect of acidosis and anoxia on iron delocalization from brain homogenates. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 979-983
22. Epsztejn, S., Kakhlon, O., Glickstein, H., Breuer, W. and Cabantchik, Z. I. (1997) Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. *Anal. Biochem.* **248**, 31-40
23. Ibrahim, W. and Chow, C. K. (2005) Dietary vitamin E reduces labile iron in rat tissues. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **19**, 298-303
24. Jenkins, R. R., Krause, K. and Schofield, L. S. (1993) Influence of exercise on clearance of oxidant stress products and loosely bound iron. *Med. Sci. Sports. Exerc.* **25**, 213-217

25. Yegorov, D. Y., Kozlov, A. V., Azizova, O. A. and Vladimirov, Y. A. (1993) Simultaneous determination of Fe(III) and Fe(II) in water solutions and tissue homogenates using desferal and 1,10-phenanthroline. *Free Radic. Biol. Med.* **15**, 565-574
26. Petrat, F., de Groot, H. and Rauen, U. (2001) Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopic study in isolated rat hepatocytes and rat liver endothelial cells. *Biochem. J.* **356**, 61-69
27. Rauen, U., Springer, A., Weisheit, D., Petrat, F., Korth, H.-G., de Groot, H. and Sustmann, R. (2007) Assessment of chelatable mitochondrial iron by using mitochondrion-selective fluorescent iron indicators with different iron-binding affinities. *Chem. Biol. Chem.* **8**, 341-352
28. Yu, Z., Persson, H. L., Eaton, J. W. and Brunk, U. T. (2003) Intralysosomal iron: a major determinant of oxidant-induced cell death. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 1243-1252
29. Ponka, P. and Lok, C. N. (1999) The transferrin receptor: role in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **31**, 1111-1137
30. Pierre, J. L., Fontecave, M. and Crichton, R. R. (2002) Chemistry for an essential biological process: the reduction of ferric iron. *Biometals* **15**, 341-346
31. Linn, S. (1998) DNA damage by iron and hydrogen peroxide in vitro and in vivo. *Drug Metab. Rev.* **30**, 313-326
32. Qian, S. Y. and Buettner, G. R. (1999) Iron and dioxygen chemistry is an important route to initiation of biological free radical oxidations: an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1447-1456
33. de Groot, H. (1994) Reactive oxygen species in tissue injury. *Hepato-Gastroenterol.* **41**, 328-332
34. Gerlach, M., Ben Shachar, D., Riederer, P. and Youdim, M. B. (1994) Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J. Neurochem.* **63**, 793-807
35. Halliwell, B. (1993) The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* **23**, 118-126
36. Imlay, J. A. and Linn, S. (1988) DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* **240**, 1302-1309

37. Sergent, O., Morel, I., Cogrel, P., Chevanne, M., Padeloup, N., Brissot, P., Lescoat, G., Cillard, P. and Cillard, J. (1995) Increase in cellular pool of low-molecular-weight iron during ethanol metabolism in rat hepatocyte cultures. *Biol. Trace Element Res.* **47**, 185-192
38. Kozlov, A. V., Ceccarelli, D., Bini, A., Meletti, E., Gallesi, D., Giovannini, F., Masini, A. and Tomasi, A. (1997) Low temperature EPR characterization in liver experimental iron overload: effect of combined ethanol intoxication. *J. Magn. Reson. Anal.* **3**, 141-148
39. Ozaki, M., Fuchinoue, S., Teraoka, S. and Ota, K. (1994) Mobilization of low-molecular-weight iron and peroxidative damage during ischemia and reoxygenation of the rat liver. *Transplant. Proc.* **26**, 918-921
40. Rauen, U., Polzar, B., Stephan, H., Mannherz, H. G. and de Groot, H. (1999) Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J.* **13**, 155-168
41. Voogd, A., Sluiter, W., van Eijk, H. G. and Koster, J. F. (1992) Low molecular weight iron and the oxygen paradox in isolated rat hearts. *J. Clin. Invest.* **90**, 2050-2055
42. Khan, S. and O'Brien, P. J. (1995) Modulating hypoxia-induced hepatocyte injury by affecting intracellular redox state. *Biochim. Biophys. Acta* **1269**, 153-161
43. Niknahad, H., Khan, S. and O'Brien, P. J. (1995) Hepatocyte injury resulting from the inhibition of mitochondrial respiration at low oxygen concentrations involves reductive stress and oxygen activation. *Chem.-Biol. Interact.* **98**, 27-44
44. Rauen, U., Petrat, F., Li, T. and de Groot, H. (2000) Hypothermia injury/cold-induced apoptosis - evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O₂⁻/H₂O₂ formation. *FASEB J.* **14**, 1953-1964
45. Rauen, U., Petrat, F., Sustmann, R. and de Groot, H. (2004) Iron-induced mitochondrial permeability transition in cultured hepatocytes. *J. Hepatol.* **40**, 607-615
46. Fenton, H. J. H. (1894) Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J. Chem. Soc.* **65**, 899-910
47. Cederbaum, A. I. (2003) Iron and CYP2E1-dependent oxidative stress and toxicity. *Alcohol.* **30**, 115-120
48. Kukielka, E. and Cederbaum, A. I. (1990) NADPH- and NADH-dependent oxygen radical generation by rat liver nuclei in the presence of redox cycling agents and iron. *Arch. Biochem. Biophys.* **283**, 326-333

49. Kukielka, E., Puntarulo, S. and Cederbaum, A. I. (1989) Interaction of ferric complexes with rat liver nuclei to catalyze NADH- and NADPH-dependent production of oxygen radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* **273**, 319-330
50. Lehnen-Beyel, I., de Groot, H. and Rauen, U. (2002) Enhancement of iron toxicity in L929 cells by D-glucose: accelerated (re-)reduction. *Biochem. J.* **368**, 517-526
51. Sakurai, K. and Cederbaum, A. I. (1998) Oxidative stress and cytotoxicity induced by ferric-nitritotriacetate in HepG2 cells that express cytochrome P450 2E1. *Mol. Pharmacol.* **54**, 1024-1035
52. Woodmansee, A. N. and Imlay, J. A. (2002) Reduced flavins promote oxidative DNA damage in non-respiring *Escherichia coli* by delivering electrons to intracellular free iron. *J. Biol. Chem.* **277**, 34055-34066
53. Yamashoji, S., Ikeda, T. and Yamashoji, K. (1991) Extracellular generation of active oxygen species catalyzed by exogenous menadione in yeast cell suspension. *Biochim. Biophys. Acta* **1059**, 99-105
54. Yang, M.-X. and Cederbaum, A. I. (1995) Role of cytochrome b5 in NADH-dependent microsomal reduction of ferric complexes, lipid peroxidation, and hydrogen peroxide generation. *Arch. Biochem. Biophys.* **324**, 282-292
55. Yang, M.-X. and Cederbaum, A. I. (1996) Interaction of ferric complexes with NADH-cytochrome b5 reductase and cytochrome b5: lipid peroxidation, H₂O₂ generation, and ferric reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* **331**, 69-78
56. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**, 1-14
57. Henle, E. S. and Linn, S. (1997) Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **272**, 19095-19098
58. McCord, J. M. and Day, E. D. (1978) Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. *FEBS Lett.* **86**, 139-142
59. Burkitt, M. J. and Gilbert, B. C. (1989) The control of iron-induced damage in isolated mitochondria by respiration state and ascorbate. *Free Rad. Res. Comms.* **5**, 333-344
60. Brumaghim, J. L., Li, Y., Henle, E. and Linn, S. (2003) Effects of hydrogen peroxide upon nicotinamide nucleotide metabolism in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **278**, 42495-42504
61. Kirsch, M. and de Groot, H. (2001) NAD(P)H, a directly operating antioxidant? *FASEB J.* **15**, 1569-1574

62. Leopold, J. A., Cap, A., Scribner, A. W., Stanton, R. and Loscalzo, J. (2001) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency promotes endothelial oxidant stress and decreases endothelial nitric oxide bioavailability. *FASEB J.* **15**, 1771-1773
63. Przybykowski, E. and Averill-Bates, D. A. (1996) Correlation between glutathione and stimulation of the pentose cycle *in situ* in chinese hamster ovary cells exposed to hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **325**, 91-98
64. Petrat, F., Paluch, S., Dogruöz, E., Dörfler, P., Kirsch, M., Korth, H.-G., Sustmann, R. and de Groot, H. (2003) Reduction of iron(III) ions complexed to physiological ligands by lipoyl dehydrogenase and other flavoenzymes *in vitro*. Implications for an enzymatic reduction of Fe(III) ions of the labile iron pool. *J. Biol. Chem.* **278**, 46403-46413
65. Scheiber, B. and Goldenberg, H. (1993) NAD(P)H:ferric iron reductase in endosomal membranes from rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**, 225-230
66. Thorstensen, K. and Romslo, I. (1988) Uptake of iron from transferrin by isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **263**, 8844-8850
67. Cox, C. D. (1980) Iron reductases from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **141**, 199-204
68. Coves, J. and Fontecave, M. (1993) Reduction and mobilization of iron by a NAD(P)H:flavin oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **211**, 635-641
69. Fontecave, M., Eliasson, R. and Reichard, P. (1987) NAD(P)H:flavin oxidoreductase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**, 12325-12331
70. Halle, F. and Meyer, J.-M. (1992) Iron releases from ferrisiderophores. A multi-step mechanism involving a NADH/FMN oxidoreductase and a chemical reduction by FMNH₂. *Eur. J. Biochem.* **209**, 621-627
71. Dailey, H. A. and Lascelles, J. (1977) Reduction of iron and synthesis of protoheme by *Spirillum itersonii* and other organisms. *J. Bacteriol.* **129**, 815-820
72. de Vries, S. and Grivell, L. (1988) Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH:Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **176**, 377-384
73. Finegold, A. A., Shatwell, K. P., Segal, A. W., Klausner, R. D. and Dancis, A. (1996) Intramembrane bis-heme motif for transmembrane electron transport conserved in a yeast iron reductase and the human NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* **271**, 31021-31024

74. Howard, D. H. (1999) Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. *Clinical Microbiology Reviews*. **12**, 394-404
75. Lesuisse, E., Crichton, R. R. and Labbe, P. (1990) Iron-reductases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1038**, 253-259
76. Menz, R. I., Griffith, M., Day, D. A. and Wiskich, J. T. (1992) Matrix NADH dehydrogenases of plant mitochondria and sites of quinone reduction by complex I. *Eur. J. Biochem.* **208**, 481-485
77. Siekevitz, P. (1963) Protoplasm: endoplasmatic reticulum and microsomes and their properties. *Annu. Rev. Physiol.* **25**, 15-40
78. Smuckler, E. A. and Arcasoy, M. (1969) Structural and functional changes of the endoplasmatic reticulum of hepatic parenchymal cells. *Int. Rev. Exp. Pathol.* **7**, 305-418
79. Noshiro, M., Harada, N. and Omura, T. (1980) Immunochemical study on the route of electron transfer from NADH and NADPH to cytochrome P-450 of liver microsomes. *J. Biochem.* **88**
80. Puntarulo, S. and Cederbaum, A. I. (1991) Inhibition of the oxidation of hydroxyl radical scavenging agents after alkaline phosphatase treatment of rat liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1074**, 12-18
81. Galleano, M. and Puntarulo, S. (1994) Mild iron overload effect on rat liver nuclei. *Toxicology* **93**, 125-134
82. Batey, R. G., Lai Chung Fong, P., Shamir, S. and Sherlock, S. (1980) A non-transferrin-bound serum iron in idiopathic hemochromatosis. *Dig. Dis. Sci.* **25**, 340-346
83. Le Lan, C., Loreal, O., Cohen, T., Ropert, M., Glickstein, H., Laine, F., Pouchard, M., Deugnier, Y., Le Treut, A., Breuer, W., Cabantchik, I. Z. and Brissot, P. (2005) Redox active plasma iron in C282Y/C282Y hemochromatosis. *Blood* **105**, 4527-4531
84. Evans, P. J., Smith, C., Mitchinson, M. J. and Halliwell, B. (1995) Metal ion release from mechanically-disrupted human arterial wall. Implications for the development of atherosclerosis. *Free Radic. Res.* **23**, 465-469
85. Kruszewski, M. (2004) The role of labile iron pool in cardiovascular diseases. *Acta Biochim. Pol.* **51**, 471-480

86. Gutteridge, J. M. C. (1987) Bleomycin-detectable iron in knee-joint synovial fluid from arthritic patients and its relationship to the extracellular antioxidant activities of caeruloplasmin, transferrin and lactoferrin. *Biochem. J.* **245**, 415-421
87. Liu, D., Liu, J., Sun, D., Alcock, N. W. and Wen, J. (2002) Spinal cord injury increases iron levels: catalytic production of hydroxyl radicals. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 64-71
88. Liu, D., Sybert, T. E., Quian, H. and Liu, J. (1998) Superoxide production after spinal injury detected by microperfusion of cytochrome *c*. *Free Radic. Biol. Med.* **25**, 298-304
89. Liu, D., Liu, J. and Wen, J. (1999) Elevation of hydrogen peroxide after spinal cord injury detected by using the Fenton reaction. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 478-482
90. Awasthi, D., Church, D., Torbati, D., Carey, M. E. and Pryor, W. A. (1997) Oxidative stress following traumatic brain injury in rats. *Surg. Neurol.* **47**, 575-582
91. Kerkweg, U., Schmitz, D. and de Groot, H. (2006) Screening for the formation of reactive oxygen species and of NO in muscle tissue and remote organs upon mechanical trauma to the mouse hind limb. *Eur. Surg. Res.* **38**, 83-89
92. Schaser, K. D., Bail, H. J., Schewior, L., Stover, J. F., Melcher, I., Haas, N. P. and Mittlmeier, T. (2005) Acute effects of N-acetylcysteine on skeletal muscle microcirculation following closed soft tissue trauma in rats. *J. Orthop. Res.* **23**, 231-241
93. Kerkweg, U., Petrat, F., Korth, H. G. and de Groot, H. (2007) Disruption of skeletal myocytes initiates superoxide release: contribution of NADPH oxidase. *Shock* **27**, 552-558
94. Allison, R. C. and Bedsole, D. L. (2003) The other medical causes of rhabdomyolysis. *Am. J. Med. Sci.* **326**, 79-88
95. Holt, S. G. and Moore, K. P. (2000) Pathogenesis of renal failure in Rhabdomyolysis: the role of myoglobin. *Exp. Nephrol.* **8**, 72-76
96. Reeder, B. J. and Wilson, M. T. (2005) Hemoglobin and myoglobin associated oxidative stress: from molecular mechanisms to disease states. *Curr. Med. Chem.* **12**, 2741-2751
97. Baron, C. P. and Andersen, H. J. (2002) Myoglobin-induced lipid peroxidation. A review. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3887-3897

98. Cooper, C. E., Vollaard, N. B. J., Choueiri, T. and Wilson, M. T. (2002) Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 280-285
99. Moore, K. P., Holt, S. G., Patel, R. P., Svistunenko, D. A., Zackert, W., Goodier, D., Reeder, B. J., Clozel, M., Anand, R., Cooper, C. E., Morrow, J. D., Wilson, M. T., Darley-Usmart, M. and Roberts II, L. J. (1998) A causative role for redox cycling of myoglobin and its inhibition in the pathogenesis and treatment of rhabdomyolysis-induced renal failure. *J. Biol. Chem.* **273**, 31731-31737
100. Blouin, A., Bolender, R. P. and Weibel, E. R. (1977) Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. *J. Cell Biol.* **72**, 441-455
101. Tyler, D. D. (1992) *The mitochondrion in health and disease*. VCH Publishers, Inc., New York
102. Dallner, G., Siekevitz, P. and Palade, G. E. (1966) Biogenesis of endoplasmic reticulum membranes. II. Synthesis of constitutive microsomal enzymes in developing rat hepatocyte. *J. Cell Biol.* **30**, 97-117
103. Orrenius, S., Ericsson, J. L. E. and Ernster, L. (1965) Phenorbital-induced synthesis of the microsomal drug-metabolizing enzyme system and its relationship to the proliferation of endoplasmic membranes. A morphological and biochemical study. *J. Cell Biol.* **25**, 627-639
104. Darnell, J., Harvey, L. and Baltimore, D. (1994) *Molekulare Zellbiologie*. Walter de Gruyter, Berlin, New York
105. Weibel, E. R., Stäubli, W., Gnägi, H. R. and Hess, F. A. (1969) Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. *J. Cell Biol.* **42**, 68-91
106. Chauveau, J., Moule, Y. and Rouiller, C. (1956) Isolation of pure and unaltered liver nuclei. Morphology and biochemical composition. *Exptl. Cell Res.* **11**, 317-321
107. Frederiks, W. M. and James, J. (1978) Isolation and separation of rat liver nuclei. *Acta Histochemica Suppl.-Band XX*, 147-158
108. Bironaite, D. and Öllinger, K. (1997) The hepatotoxicity of rhein involves impairment of mitochondrial functions. *Chem.-Biol. Interact.* **103**, 35-50

109. Kean, E. A., Gutman, M. and Singer, T. P. (1971) Studies on the respiratory chain-linked nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase. XXII. Rhein, a competitive inhibitor of the dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **246**, 2346-2353
110. Dimino, M. J. and Hoch, F. L. (1972) Maintenance of respiratory control in mitochondria after rate zonal centrifugation. *Bioenergetics* **3**, 525-529
111. Rauen, U., Kerkweg, U., Weisheit, D., Petrat, F., Sustmann, R. and de Groot, H. (2003) Cold-induced apoptosis of hepatocytes: mitochondrial permeability transition triggered by nonmitochondrial chelatable iron. *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 1664-1678
112. Sturm, B., Bistrich, U., Sarsero, J. P., Rauen, U., Scheiber-Mojdehkar, B., de Groot, H., Ioannou, P. and Petrat, F. (2005) Friedreich's ataxia: no changes in mitochondrial labile iron in human lymphoblasts and fibroblasts. A decrease in antioxidative capacity? *J. Biol. Chem.* **280**, 6701-6708
113. Flatmark, T. and Romslo, I. (1975) Energy-dependent accumulation of iron by isolated rat liver mitochondria. Requirement of reducing equivalents and evidence for a unidirectional flux of Fe(II) across the inner membrane. *J. Biol. Chem.* **250**, 6433-6438
114. Petrat, F., de Groot, H. and Rauen, U. (2000) Determination of the chelatable iron pool of single intact cells by laser scanning microscopy. *Arch. Biochem. Biophys.* **376**, 74-81
115. Beyer, R. E. and Fattore, J. E. (1984) The influence of age and endurance exercise on the myoglobin concentration of skeletal muscle of the rat. *J. Gerontol.* **39**, 525-530
116. La Cross, D. M. and Linder, M. C. (1980) Synthesis of rat muscle ferritins and function in iron metabolism of heart and diaphragm. *Biochim. Biophys. Acta* **633**, 45-55
117. Munro, H. N. and Linder, M. C. (1978) Ferritin: structure, biosynthesis, and role in iron metabolism. *Physiol. Rev.* **58**, 317-396
118. Gutteridge, J. M. C. and Quinlan, G. J. (1983) Malondialdehyde formation from lipid peroxides in the thiobarbituric acid test: the role of lipid radicals, iron salts, and metal chelators. *J. Appl. Biochem.* **5**, 293-299
119. Forth, W. and Rummel, W. (1983) Vitamine, Spurenelemente. In: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. (Forth, W., Henschler, D. and Rummel, W., eds.). pp. 414-415, Bibliographisches Institut, Mannheim, Wien, Zürich

120. Gries, F. A., Toeller, M. and Koschnisky, T. (1984) Ernährungsstörungen. In: Lehrbuch der inneren Medizin. (Siegenthaler, W., Kaufmann, W., Hornbostel, H. and Waller, H. D., eds.). pp. 282-284, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
121. Garcia-Ruiz, C., Morales, A., Colell, A., Ballesta, A., Rodes, J., Kaplowitz, N. and Fernandez-Checa, J. C. (1995) Feeding S-adenosyl-L-methionine attenuates both ethanol-induced depletion of mitochondrial glutathione and mitochondrial dysfunction in periportal and perivenous rat hepatocytes. *Hepatology* **21**, 207-214
122. Snel, C. A. W., Pang, K. S. and Mulder, G. J. (1995) Glutathione conjugation of bromosulphophthalein in relation to hepatic glutathione content in the rat in vivo and in the perfused rat liver. *Hepatology* **21**, 1387-1394
123. Goldenberg, H., Crane, F. L. and Morre, D. J. (1979) NADH oxidoreductase of mouse liver membranes. *J. Biol. Chem.* **254**, 2491-2498
124. Goldenberg, H., Dodel, B. and Seidl, D. (1990) Plasma membrane Fe₂-transferrin reductase and iron uptake in K562 cells are not directly related. *Eur. J. Biochem.* **192**, 475-480
125. Nyhus, K. J., Wilborn, A. T. and Jacobson, E. S. (1997) Ferric iron reduction by *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **65**, 434-438
126. Puntarulo, S. and Cederbaum, A. I. (1988a) Comparison of the ability of ferric complexes to catalyze microsomal chemiluminescence, lipid peroxidation, and hydroxyl radical generation. *Arch. Biochem. Biophys.* **264**, 482-491
127. Meisel, D. and Neta, P. (1975) One-electron reduction potential of riboflavine studied by pulse radiolysis. *J. Phys. Chem.* **79**, 2459-2461
128. Koolman, J. and Röhm, K.-H. (1994) Taschenatlas der Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
129. Barnes, R., Connelly, J. L. and Jones, O. T. G. (1972) The utilization of iron and its complexes by mammalian mitochondria. *Biochem. J.* **128**, 1043-1055
130. Takeshige, K., Takayanagi, R. and Minakami, S. (1980) Lipid peroxidation and the reduction of ADP-Fe³⁺ chelate by NADH-ubiquinone reductase preparation from bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* **192**, 861-866
131. Taketani, S., Tanaka-Yoshioka, A., Masaki, R., Tashiro, Y. and Tokunaga, R. (1986) Association of ferrocyclase with complex I in bovine heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **883**, 277-283

132. Williams, D. M., Loukopoulos, D., Lee, G. R. and Cartwright, G. E. (1976) Role of copper in mitochondrial iron metabolism. *Blood* **48**, 77-85
133. Bernardi, P. and Azzone, G. F. (1981) Cytochrome *c* as an electron shuttle between the outer and inner mitochondrial membranes. *J. Biol. Chem.* **256**, 7187-7192
134. Ramirez, L. A. G. and Lemeshko, V. V. (2005) A possible restriction of ferro- and ferricyanide oxidoreductase activities of rat liver mitochondria by the outer membrane. *Arch. Biochem. Biophys.* **443**, 11-20
135. Sottocasa, G. L., Kuylenskierna, B., Ernster, L. and Bergstrand, A. (1967) An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. A. Biochemical and morphological study. *J. Cell Biol.* **32**, 415-438
136. Kukielka, E., Dicker, E. and Cederbaum, A. I. (1994) Increased production of reactive oxygen species by rat liver mitochondria after chronic ethanol treatment. *Arch. Biochem. Biophys.* **309**, 377-386
137. Hirai, K.-I., Ikeda, K. and Wang, G.-Y. (1992) Paraquat damage of rat liver mitochondria by superoxide production depends on extramitochondrial NADH. *Toxicology.* **72**, 1-16
138. La Piana, G., Marzulli, D., Gorgoglione, V. and Lofrumento, N. E. (2005) Porin and cytochrome oxidase containing contact sites involved in the oxidation of cytosolic NADH. *Arch. Biochem. Biophys.* **436**, 91-100
139. Mokhova, E. N., Skulachev, V. P. and Zhigacheva, I. V. (1977) Activation of external pathway of NADH oxidation in liver mitochondria of cold-adapted rats. *Biochim. Biophys. Acta* **501**, 415-423
140. Szczesna-Kaczmarek, A., Litwinska, D. and Popinigis, J. (1984) Oxidation of NADH via an "external" pathway in skeletal-muscle mitochondria and its possible role in the repayment of lactacid oxygen debt. *Int. J. Biochem.* **16**, 1231-1235
141. Ito, A. (1980) Cytochrome *b*₅-like hemoprotein of the outer mitochondrial membrane; OM cytochrome *b*. *J. Biochem.* **87**, 73-80
142. Fischer, J. C., Ruitenbeek, W., Trijbels, F. J. M., Veerkamp, J. H., Stadhouders, A. M., Sengers, R. C. A. and Janssen, A. J. M. (1986) Estimation of NADH oxidation in human skeletal muscle mitochondria. *Clin. Chim. Acta* **155**, 263-274
143. Szczesna-Kaczmarek, A. (1992) Regulating effect of mitochondrial lactate dehydrogenase on oxidation of cytoplasmic NADH via an "external" pathway in skeletal muscle mitochondria. *Int. J. Biochem.* **24**, 657-661

-
144. Nohl, H. and Schönheit, K. (1996) The effect of the exogenous NADH dehydrogenase of heart mitochondria on the transmembranous proton movement. *Arch. Biochem. Biophys.* **331**, 259-264
 145. Crow, K. E., Braggins, T. J., Batt, R. D. and Hardman, M. J. (1982) Rat liver cytosolic malate dehydrogenase: purification, kinetic, properties, role in control of free cytosolic NADH concentration. *J. Biol. Chem.* **257**, 14217-14225
 146. Smith, R. M. and Martell, A. E. (1990) *Critical stability constants*. Plenum Press, New York, London
 147. Nohl, H. (1987) A novel superoxide radical generator in heart mitochondria. *FEBS Lett.* **214**, 269-273
 148. Massey, V. and Veeger, C. (1961) Studies on the reaction mechanism of lipoyl dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 33-47
 149. Searls, R. L., Peters, J. M. and Sanadi, D. R. (1961) α -Ketoglutaric dehydrogenase. X. On the mechanism of dihydrolipoyl dehydrogenase reaction. *J. Biol. Chem.* **236**, 2317-2322
 150. Caraceni, P., van Thiel, D. H. and Borle, A. B. (1995) Dual effect of deferoxamine on free radical formation and reoxygenation injury in isolated hepatocytes. *Am. J. Physiol.* **269**, G132-G137
 151. Kozlov, A. V., Yegorov, D. Y., Vladimirov, Y. A. and Azizova, O. A. (1992) Intracellular free iron in liver tissue and liver homogenate: studies with electron paramagnetic resonance on the formation of paramagnetic complexes with desferal and nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* **13**, 9-16
 152. Miura, T., Muraoka, S. and Fujimoto, Y. (1998) Temperature-dependent lipid peroxidation of rat brain homogenate. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **100**, 117-128
 153. Zager, R. A. and Foerder, C. A. (1992) Effects of inorganic iron and myoglobin on in vitro proximal tubular lipid peroxidation and cytotoxicity. *J. Clin. Invest.* **89**, 989-995
 154. Zager, R. A., Burkhardt, K. M., Conrad, D. S. and Gmur, D. J. (1995) Iron, heme oxygenase, and glutathione: effects on myohemoglobinuric proximal tubular injury. *Kidney Int.* **48**, 1624-1634
 155. Grisham, M. B. (1985) Myoglobin-catalyzed hydrogen peroxide dependent arachidonic acid peroxidation. *J. Free Radic. Biol. Med.* **1**, 227-232

156. Esposito, B. P., Breuer, W., Sirankapracha, P., Pootrakul, P., Hershko, C. and Cabantchik, I. Z. (2003) Labile plasma iron overload: redox activity and susceptibility to chelation. *Blood* **102**, 2670-2677
157. de Groot, H. and Brecht, M. (1991) Reoxygenation injury in rat hepatocytes: mediation by $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ liberated by sources other than xanthine oxidase. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. **372**, 35-41
158. Clayton, D. A. (1998) Isolation of mitochondria from cells and tissues. In: *Culture and Biochemical Analysis of Cells*. (Spector, D. L., Goldman, R. D. and Leinwand, L. A., eds.). pp. 41.41-41.47, Cold Spring Harbor Laboratory Press
159. Schnaitman, C. and Greenwalt, J. W. (1968) Enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. *J. Cell Biol.* **38**, 158-175
160. Paigen, K. and Wenner, C. (1962) The intracellular location of the glycolytic dehydrogenases in liver and hepatoma. *Arch. Biochem. Biophys.* **97**, 213-216
161. Ernster, L. and Nordenbrand, K. (1967) Skeletal muscle mitochondria. In: *Methods in enzymology. Oxidation and phosphorylation*. (Eastbrook, R. W., ed.). pp. 86-94, Academic press, New York
162. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
163. Lai, J. C. K., Sheu, K.-F. R., Kim, Y. T., Clarke, D. D. and Blass, J. P. (1986) The subcellular localization of glutamate dehydrogenase (GDH): Is GDH a marker for mitochondria in brain? *Neurochem. Res.* **11**, 733-744
164. Bergmeyer, H. U. (1983) *Methods of Enzymatic Analyses*. Verlag Chemie, Weinheim
165. de Groot, H. and Noll, T. (1985) Enzymatic determination of inorganic phosphates, organic phosphates and phosphate-liberating enzymes by use of nucleoside phosphorylase-xanthine oxidase (dehydrogenase)-coupled reactions. *Biochem. J.* **229**, 255-260
166. Bergmeyer, H. U. (1974) *Methoden der enzymatischen Analyse. Band II*. Verlag Chemie, Weinheim
167. Brock, T. A., Brugnara, C., Canessa, M. and Gimbrone, M. A. (1986) Bradykinin and vasopressin stimulate $Na^+-K^+-Cl^-$ cotransport in cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **250**, C888-C895

168. Murphy, E., Aiton, J. F., Russell Horres, C. and Lieberman, M. (1983) Calcium elevation in cultured heart cells: its role in cell injury. *Am. J. Physiol.* **245**, C316-C321

7. ANHANG

7.1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CP-Medium	Chappel-Perry-Medium
2,2'-DPD	2,2'-Dipyridyl
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol bis(2-aminoethylether)-N', N', N', N'-tetraessigsäure
ESR	Elektronenspinresonanz
HEPES	2-(4-(Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IM	Intermembranfraktion
K_m	Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit
L	Ligand
MP	Mitoplast
MS-Puffer	Mitochondrien-Standard-Puffer
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat
NAD(P)H	NADH und NADPH
OM	Äußere Membran (englisch: Outer Membrane)
PG SK	Phen Green SK
RCI	Respiratorische Kontrollrate
Rhein	4,5-Dihydroxyanthrachinon
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (englisch: Reactive Oxygen Species)
RS-Puffer	Retikulozyten-Standard-Puffer
SOD	Superoxid-Dismutase
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V_{max}	Maximale Umsatzgeschwindigkeit des Substrates

7.2. VERÖFFENTLICHUNGEN IM RAHMEN DIESER ARBEIT

Originalarbeiten

Katja Pamp, Uta Kerkweg, Hans-Gert Korth, Frederik Homann, Ursula Rauen, Reiner Sustmann, Herbert de Groot, Frank Petrat. Enzymatic reduction of labile iron by organelles of the rat liver. Superior role of an NADH-dependent activity. *Biochimie* 2008; Im Druck.

Uta Kerkweg, **Katja Pamp**, Frank Petrat, Herbert de Groot. Destruction of skeletal muscle results in the release of redox-active iron into the extracellular space. In Revision.

Tagungsbeiträge

Katja Pamp, Hans-Gert Korth, Frederik Homann, Uta Kerkweg, Ursula Rauen, Reiner Sustmann, Herbert de Groot, Frank Petrat. Reduktion des Fe(III)-ATP-Komplexes durch isolierte Organellen der Rattenleber. Hinweise auf einen NAD(P)H-abhängigen enzymatischen Prozess. Vortrag, 11. Workshop zu Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung, 8. – 10. Dezember 2005, Xanten.

7.3. WEITERE VERÖFFENTLICHUNGEN

Originalarbeiten

Katja Pamp, Thorsten Bramey, Michael Kirsch, Herbert de Groot, Frank Petrat. NAD(H)-enhances the Cu(II)-mediated inactivation of lactate dehydrogenase by increasing the accessibility of sulfhydryl groups. *Free Radic. Res.* 2005; 39 (1): 31-40.

Thorsten Bramey, Patricia Freitag, Joachim Fandrey, Ursula Rauen, **Katja Pamp**, Jochen Erhard, Stilla Frede, Herbert de Groot, Frank Petrat. No evidence for protective erythropoietin alfa signalling in rat hepatocytes. Zur Veröffentlichung bei *Hepatology* eingereicht.

Tagungsbeiträge

Katja Pamp, Thorsten Bramey, Michael Kirsch, Herbert de Groot, Frank Petrat.
Inaktivierung der Laktat-Dehydrogenase durch Cu(II). Bedeutung der Coenzymbindung.
Vortrag, 2. Xantener Gespräch zur Medizinisch-Biologischen Chemie, 9. – 11. Dezember
2004, Xanten.

7.4. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Pamp
Vorname: Katja
Anschrift: Steinhausenstrasse 12, 45147 Essen
Geburtstag und Geburtsort: 31.12.1975, Berlin-Kaulsdorf
Familienstand: ledig

Schulbildung

1982 – 1984 Kurt-Schlosser-Oberschule Berlin-Friedrichshain
1984 – 1990 30. Oberschule Berlin-Hohenschönhausen
1990 – 1995 Stauffenberg-Gymnasium
1995 Abitur

Studium

1996 – 1998 Studium der Biologie, Freie Universität Berlin
(Grundstudium)
1998 – 2002 Studium der Biologie, Humboldt Universität Berlin
(Hauptstudium)
2002 Abschluss Diplom-Biologin

Berufliche Erfahrungen

2003 – 2004 Wissenschaftliche Hilfskraft, Institut für Physiologische Chemie, Universitätsklinikum Essen

Promotion

2004 – dato Promotion, Institut für Physiologische Chemie, Universitätsklinikum Essen