

**EISENAUFNAHME IN ASTROGLIA-REICHEN  
PRIMÄRKULTUREN**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

vorgelegt

von

MAICO KÖPPE

UNIVERSITÄT BREMEN

2012

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln durchgeführt habe.

Maico Köppe  
Bremen, 19. März 2012

## I Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Professor Dringen für die Überlassung des interessanten Themas, sowie seine Betreuung und Begutachtung bedanken. Darüber hinaus danke ich Herrn Professor Kelm für die Übernahme des Korreferates.

Außerdem bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft sowie die zahlreichen Diskussionen und Anregungen – die wesentlich zum Erfolg der vorliegenden Arbeit beitrugen – bei Herrn Professor Beyersmann, Herrn Professor Breunig, Herrn Dr. Dietz, Herrn Dr. Kolliver-Brandl, Herrn Dr. Tillmann sowie Ivo Scheiber, Thaddeus Gbem und Doron Gollnast.

Für die Unterstützung im Labor danke ich Ketki Tulpule, Mark Geppert, Ivo Scheiber, Maria Brandmann, Yvonne Köhler, Maïke Schmidt, Anette Thiesen, Eva Luther sowie ganz besonders Monika Cox. Darüber hinaus danke ich insbesondere den Gastwissenschaftlern Jeff Liddell und Theresa Dang von der Monash University in Melbourne (Australien), die mir das Handwerkszeug für meine Doktorarbeit beibrachten.

Dem größten Dank bin ich jedoch meiner lieben Freundin Marli verpflichtet, ohne Deinen Zuspruch und Rückhalt wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.

*„If there's more than one possible outcome of a job or task, and one of those outcomes will result in disaster or an undesirable consequence, then somebody will do it that way.“  
Murphy's Law 1949*

## II Inhaltsverzeichnis

I	Danksagung .....	3
II	Inhaltsverzeichnis.....	4
III	Zusammenfassung.....	7
IV	Abkürzungen .....	9
1	Einleitung.....	11
1.1	Der Eisenstoffwechsel .....	11
1.1.1	Resorption von Eisen aus der Nahrung .....	14
1.1.2	Transferrin-Transferrin-Rezeptor-Zyklus.....	20
1.1.3	Homöostase des zellulären Eisengehaltes.....	23
1.1.4	Eisentoxizität durch oxidativen Stress .....	26
1.2	Eisenmetabolismus des Gehirns.....	27
1.2.1	Zelltypen des Gehirns .....	27
1.2.2	Astrocyten .....	29
1.2.3	Die Blut-Hirnschranke .....	31
1.2.4	Der Eisenmetabolismus von Astrocyten.....	33
1.2.5	Der Transfer von Eisen aus dem Blutkreislauf zu den Gehirnzellen.....	37
1.2.6	Neurodegenerative Erkrankungen aufgrund von Eisenakkumulationen .....	41
1.2.6.1	Aceruloplasminämie .....	41
1.2.6.2	Neuroferritinopathie .....	41
1.2.6.3	Pantothenatkinase-assoziierte Neurodegeneration .....	42
1.3	Aufgabenstellung.....	44
2	Material und Methoden.....	46
2.1	Material .....	46
2.1.1	Reagenzien und Chemikalien.....	46
2.1.2	Geräte .....	47
2.1.3	Verbrauchsmaterialien .....	48
2.1.4	Verwendete Puffer und Medien .....	49
2.2	Methoden.....	51
2.2.1	Astroglia-reiche Primärzellkulturen .....	51
2.2.2	Immuncytochemische Anfärbung.....	51

2.2.3	Experimentelle Inkubationen.....	52
2.2.4	Bestimmungsmethoden.....	53
2.2.4.1	Kolorimetrischer Test zur Bestimmung von Eisen.....	53
2.2.4.2	Proteinbestimmung.....	55
2.2.4.3	Zellvitalitätstest.....	56
2.2.4.4	Citratbestimmung.....	57
3	Ergebnisse.....	59
3.1	Charakterisierung Astroglia-reicher Primärkulturen als Modellsystem.....	59
3.1.1	Immuncytochemische Charakterisierung.....	59
3.1.2	Bestimmung der basalen Eisen- und Proteingehalte.....	60
3.2	Eisenakkumulation in serumfreien Kulturmedien.....	61
3.2.1	Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Eisenakkumulation nach Gabe von Eisenammoniumcitrat in Vollmedium.....	61
3.2.2	Einfluss von Citrat und Isocitrat.....	63
3.2.3	Abhängigkeit vom Inkubationsmedium.....	65
3.2.4	Temperaturabhängigkeit.....	69
3.2.5	Abhängigkeit vom extrazellulären pH-Wert.....	70
3.2.6	Einfluss von divalenten Kationen und Metallionen.....	72
3.2.7	Einfluss von Endocytose-Inhibitoren.....	74
3.3	Untersuchung zur Bildung von eisenhaltigen Niederschlägen.....	77
3.3.1	Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit.....	77
3.3.2	Temperaturabhängigkeit.....	80
3.3.3	pH-Wert-Abhängigkeit.....	81
3.3.4	Einfluss von Citrat.....	82
3.3.5	Einfluss von Phosphat.....	85
3.3.6	Filtration der Eisenpräzipitate.....	86
3.4	Eisenakkumulation in phosphatfreiem Inkubationspuffer.....	86
3.4.1	Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit.....	86
3.4.2	Temperaturabhängigkeit.....	89
3.4.3	pH-Wert-Abhängigkeit.....	91
3.4.4	Einfluss von Plasmaproteinen.....	92
3.4.5	Einfluss von Ascorbat.....	93
3.4.6	Effekt von Eisenchelatoren.....	94

<b>3.4.7</b>	<b>Einfluss von Citrat .....</b>	<b>95</b>
<b>3.4.8</b>	<b>Einfluss weiterer Medienkomponenten.....</b>	<b>96</b>
<b>3.4.9</b>	<b>Einfluss der extrazellulären divalenten Kationenkonzentration.....</b>	<b>97</b>
<b>3.4.10</b>	<b>Abhängigkeit der Eisenakkumulation vom Kulturalter .....</b>	<b>100</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>102</b>
<b>4.1</b>	<b>Astroglia-reiche Primärkulturen als Modellsystem.....</b>	<b>102</b>
<b>4.2</b>	<b>Eisenakkumulation in phosphathaltigen Kulturmedien .....</b>	<b>102</b>
<b>4.3</b>	<b>Entstehung von eisenhaltigen Niederschlägen.....</b>	<b>109</b>
<b>4.4</b>	<b>Eisenakkumulation in phosphatfreiem Inkubationspuffer .....</b>	<b>113</b>
<b>5</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>125</b>

### III Zusammenfassung

Eisen ist ein essentieller Bestandteil in einer Reihe von Proteinen und Enzymen. Das Gehirn besitzt aufgrund seiner hohen metabolischen Aktivität einen gesteigerten Bedarf an Eisen. Nicht Protein-gebundenes, niedermolekulares Eisen besitzt ein hohes toxisches Potential, weshalb der zelluläre Eisengehalt und die cytosolische ‚freie‘ Eisenkonzentration einer strengen Regulation unterliegen. Die vorliegende Arbeit untersuchte die Akkumulation von Eisen in kultivierte Astrocyten nach Gabe von Eisenammoniumcitrat (FAC). Es wurde gezeigt, dass die Eisenakkumulation von Astroglia-reichen primären Zellkulturen (APKs) aus FAC-haltigen Medien, durch die Bildung von Eisenpräzipitaten beeinflusst bzw. überlagert war, da Eisen aus FAC-Lösungen in Konzentrationen bis zu 300  $\mu\text{M}$  in phosphathaltigen Inkubationsmedien zur Niederschlagsbildung neigt. Diese Niederschlagsbildung konnte in Abwesenheit von Phosphat vermieden werden.

Die Charakterisierung der Eisenakkumulation von APKs aus phosphatfreien FAC-Lösungen zeigte, dass es sich bei der transferrinunabhängigen Eisenakkumulation in APKs um einen sättigbaren sowie zeit- und konzentrationsabhängigen zellulären Prozess handelt, der sowohl durch die Variation der Inkubationstemperatur, als auch der extrazellulären Konzentration an divalenten Kationen ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ), signifikant zu beeinflussen war. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass die Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  nicht limitierend für die beobachtete Eisenakkumulation ist. Außerdem war die Eisenakkumulation nicht durch den extrazellulären pH-Wert der Inkubationslösung zu beeinflussen und unabhängig von der extrazellulären Natrium-, Kalium- sowie Glucosekonzentration. Darüber hinaus wirkte die Gabe von Serumproteinen sowie Tricarbonensäuren wie Citrat bzw. Isocitrat inhibierend auf die Eisenakkumulation. Ebenso konnte die Eisenakkumulation von APKs aus dem FAC-Komplex mittels Eisenchelatoren verringert werden. Hierbei war die durch  $\text{Fe}^{3+}$ -Chelatoren erzielte Verminderung des zellulären Eisengehaltes ausgeprägter, als die durch  $\text{Fe}^{2+}$ -Chelatoren hervorgerufene Verminderung. Unter Berücksichtigung der geringen Ferrireduktionsaktivität von kultivierten Astrocyten und der beobachteten erschwerten Eisenakkumulation in Gegenwart von extrazellulärem Ascorbat, erscheint eine Akkumulation des Eisens als  $\text{Fe}^{3+}$ -Spezies wahrscheinlicher als eine Akkumulation des Eisens als  $\text{Fe}^{2+}$ -Spezies.

Durch die vorliegende Arbeit konnte eine solide Grundlage zur Aufklärung des Prozesses der transferrinunabhängigen Eisenakkumulation in APKs geschaffen werden. Ausgehend von den

gewonnenen neuen Erkenntnissen und der skizzierten Strategie zur weiteren Studie des Prozesses, erscheint es nun möglich zielgerichtet auf die Identifikation des verantwortlichen Transportweges zur Aufnahme von Eisen aus Eisencitrat-Komplexen in Astrogliazellen hinzuwirken.



## IV Abkürzungen

Nicht aufgeführt sind SI-Einheiten

Abb.	Abbildung
APKs	Astroglia-reiche Primärzellkulturen
ATP	Adenosintriphosphat
BBB	Blut-Hirnschranke (engl.: <i>Blood-Brain-Barrier</i> )
BPS	Bathophenanthrolindisulfonat
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cyto D	Cytochalasin D
CL	Citrat-Lyase
Cp	Ceruloplasmin
CPZ	Chlorpromazin
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
d	Tag
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamindino-2-phenylindol
Dcytb	duodenales Cytochrom b
DFX	Deferoxamin
d.h.	dass heißt
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagles-Medium
DMT1	divalenter Metall-Transporter 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
engl.	englisch
<i>et al.</i>	und andere
etc.	et cetera
FAC	Ferriammoniumcitrat
FCS	Fetales Kälberserum
FecA-Transporter	Außenmembran-Ferri-Citrat-Transporter in <i>E.coli</i>
FLVCR	Felin Leukemia Virus, Subklasse C, Rezeptor (engl.: <i>feline leukemia virus, subgroup C, rezeptor</i> )
FZ	Ferrozin
GFAP	gliales fibrilläres saures Protein
Gl.	Gleichung
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
griech.	griechisch
H-	schwer (engl.: <i>heavy</i> )
h	Stunde(n)
HCP1	Häm-Transport Protein 1
HO-1	Hämoxigenase-1
Hp	Hephaestin
IMP-Weg	Mobilferrin-Integrin-Paraferritin-Weg
Ip-Hepes	Inkubationspuffer-Hepes
IREs	Eisen-regulatorische Elemente (engl.: <i>iron regulatory elements</i> )
IREG1	Eisen regulierter-Transporter 1

IRPs	Eisen-reagierende Proteine (engl.: <i>iron responsive proteins</i> )
K	Komplexbindungskonstante
K <sub>M</sub>	Michaelis-Konstante
L-	leicht (engl.: <i>light</i> )
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LTCCs	L-Typ-Calcium-Kanäle
MDH	Malat-Dehydrogenase
min	Minute(n)
MM	Minimal-Medium
MTP1	Metall Transporter Protein 1
mRNA	Boten (engl.: <i>messenger</i> ) Ribonukleinsäure
MTf	Melanotransferrin
n	Anzahl
NaCs	Natrium-gekoppelte Carbonsäure-Transporter
NaCTs	Natrium-gekoppelte Citrat-Transporter
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
n.s.	nicht signifikant
NTA	Nitrilotriacetat
p	Wahrscheinlichkeit
PANK2	Pantothentkinase 2
PBS	phosphatgepufferte Saline
PCFT	Protonen-gekoppelter Folsäure Transporter (engl.: <i>Proton-coupled folate transporter</i> )
PKAN	Pantothentkinase-assoziierten Neurodegeneration
OAD	Oxalacetat-Decarboxylase
RNasen	Ribonukleinasen
ROS	reaktive Sauerstoffspezien
RSA	Rinderserumalbumin
RT	Raumtemperatur
Scara-5	Fresszellen Rezeptor 5 (engl.: <i>Scavenger receptor, member 5</i> )
SDR2	Bindegewebszellen-abgeleiteter Rezeptor 2 (engl.: <i>stromal cell-derived receptor 2</i> )
SD	Standardabweichung
Steap3	Sechsfach-Transmembranes Epithel Antigen der Prostata (engl.: <i>six-transmembrane epithelial antigen of the prostate</i> )
Tab.	Tabelle
TEA	Triethanolamin
Tf	Transferrin
TfR1	Transferrin-Rezeptor 1
TfR2	Transferrin-Rezeptor 2
TIM-2	T-Zellen Immunglobulin Domän und Mucin-Domän Protein 2 (engl.: <i>T cell immunoglobulin domain and mucin-domain protein 2</i> )
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRPCs	Transiente-Rezeptor-Potentiale-Kation-Kanäle
TTCCs	T-Typ-Calcium-Kanäle
V <sub>max</sub>	Maximalgeschwindigkeit
z.B.	zum Beispiel
Zip	ZRT- und IRT-ähnlichen Transportproteine

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Eisenstoffwechsel

Der Mensch kann ohne Eisen nicht leben. Eisen ist ein essentieller Bestandteil von Proteinen und Enzymen, die an grundlegenden zellulären Prozessen – wie z.B. dem Sauerstofftransport, der Energiegewinnung oder der Zellteilung – beteiligt sind (Crichton 2001). Obgleich Eisen das vierthäufigste Element auf der Erde darstellt, ist der Mangel an Eisen ein generelles Problem nahezu aller lebenden Organismen (Ponka 2004). Dieses Paradoxon liegt an den chemischen Eigenschaften des Eisens, welches in der Umwelt durch die oxidierende Wirkung des Sauerstoffs hauptsächlich als dreifach positiv geladenes Eisen(III) ( $\text{Fe}^{3+}$ ; Ferri-Eisen) vorliegt und in Verbindung mit Anionen wie z.B. Hydroxidionen ( $\text{OH}^-$ ) schwerlösliche Verbindungen eingeht (Jander *et al.* 2006). Eisenmangel ist weltweit die häufigste Ursache für Hämarmut (Anämie) und kann zu einer generellen Sauerstoffunterversorgung des Körpers führen (Andrews 1999). Eine Anämie macht sich durch Symptome wie Übelkeit, Ohnmacht, Schlaflosigkeit, Konzentrationsproblemen oder Sehstörungen bemerkbar (Boulet 1997; Rao und Georgieff 2002). Da alle Zellen des Körpers Eisen für ihren Stoffwechsel benötigen, ist eine ausreichende Eisenversorgung auch für das Gehirn essentiell. Als Folge eines Eisenmangels während der Entwicklungsphasen des Gehirns können irreversible mentale sowie motorische Störungen auftreten (Felt und Lozoff 1996; Lozoff *et al.* 2000).

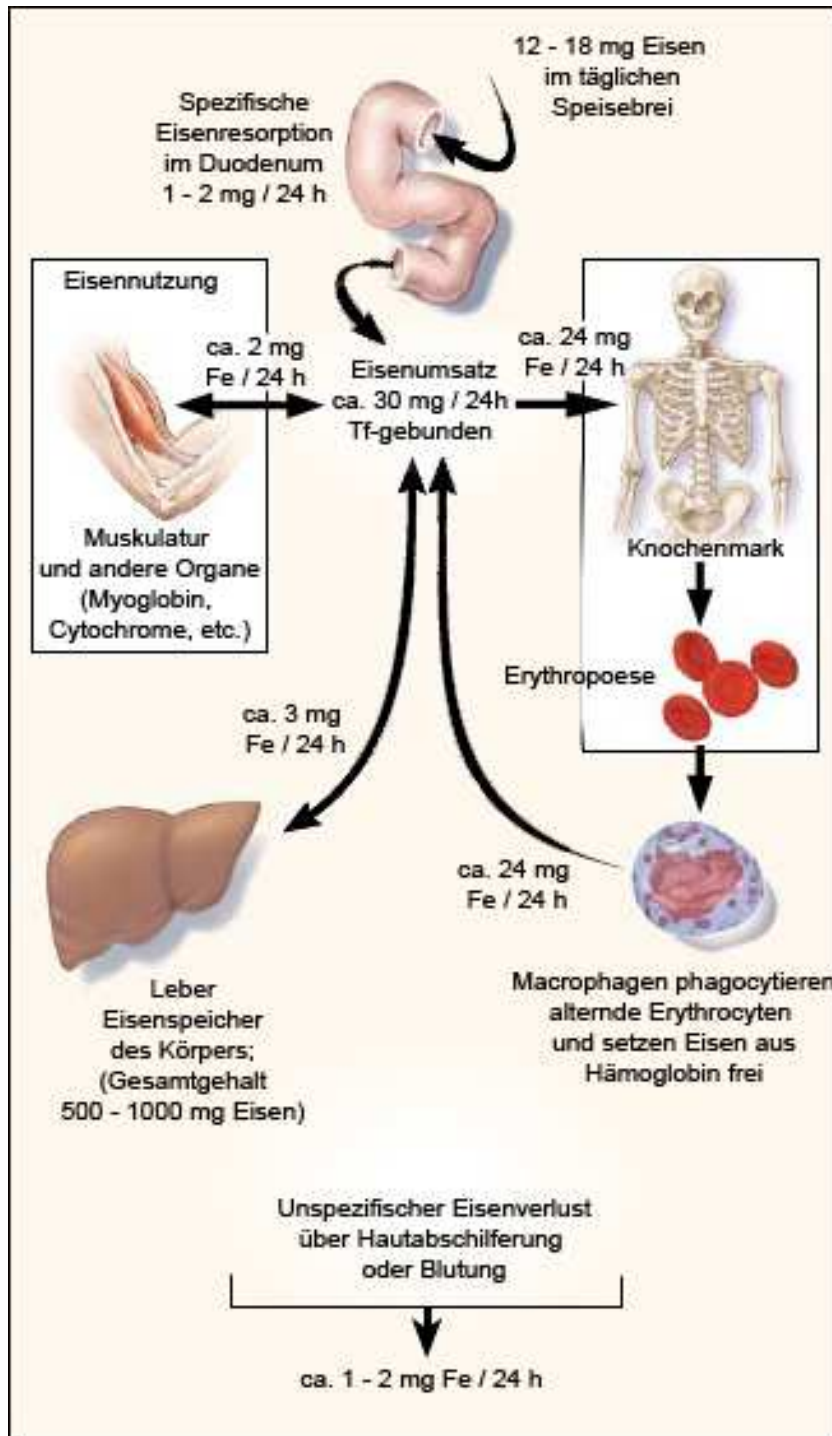
Eisen besitzt neben seinen biologischen Eigenschaften als Bestandteil von Metalloproteinen, allerdings auch ein hohes toxisches Potential (Halliwell und Gutteridge 2007). Eisen – in seiner niedermolekularen Form – wechselt relativ leicht zwischen seiner Ferri-Form ( $\text{Fe}^{3+}$ ) und Ferro-Form ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Dies wird einerseits bei vielen enzymatischen Reaktionen mit Ein-Elektronen-Übergängen ausgenutzt (Crichton 2001; Hentze *et al.* 2004), kann andererseits auch zur Bildung von hoch toxischen Hydroxylradikalen führen. Superoxid ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), das als Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung entsteht (Kudin *et al.* 2005), wird zur Entgiftung in Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) überführt (Korshunov *et al.* 1997; Inoue *et al.* 2003). Sofern Wasserstoffperoxid nicht durch die Zelle entgiftet wird kann es in Gegenwart von  $\text{Fe}^{2+}$  unter anderem zum hoch reaktiven Hydroxylradikal ( $\text{OH}^\cdot$ ) umgesetzt werden (Halliwell 2006). Das vermehrte auftreten von Hydroxylradikal im Organismus kann zu irreversiblen Zell- bzw. Organschäden führen (Halliwell und Gutteridge 2007). Im Allgemein bezeichnet man Zellschädigungen, die durch so genannte reaktive Sauerstoffspezien (ROS) verursacht werden, als oxidative Schädigung (Halliwell 2006; siehe auch Kapitel 1.1.4). Auf zellulärer Basis wird oxidativer Stress nicht nur durch die Gegenwart von niedermolekularen

Eisem katalysiert. Auch andere Metalle wie z.B. Kupfer oder Cobalt spielen hier eine Rolle (Halliwell 2006). Im Vergleich zum Eisen treten diese Metallionen *in vivo* unter physiologischen Bedingungen aber in weit geringeren Mengen als Eisen auf (Huidobro-Toro *et al.* 2008). Das toxische Potential von Eisen wird nicht allein durch den zellulären Eisengehalt bestimmt, sondern auch durch zellspezifische Faktoren wie z.B. den partiellen Sauerstoffgehalt oder den Antioxidantiengehalt beeinflusst (Dringen *et al.* 2005). Als Schlussfolgerung ergibt sich hieraus die Notwendigkeit einer effektiven Kontrolle des zellulären Eisenstatus in Abhängigkeit zu den spezifischen Eigenschaften einer Zelle.

Obwohl Eisen lediglich zu den Spurenelementen zählt, macht es 4-5 g des gesamten Körpergewichtes eines durchschnittlichen erwachsenen Menschen aus (Bothwell und Finch 1962). So beinhaltet beispielweise jedes rote Blutkörperchen über 1 Billion Eisenatome, eingebunden in den roten Blutfarbstoff Hämoglobin (Andrews 2000). Zur Aufrechterhaltung der Anzahl an roten Blutkörperchen im Blutkreislauf werden täglich ca.  $2 \cdot 10^{20}$  Eisenatome für die Entwicklung von erythroiden Vorläuferzellen im Knochenmark benötigt (Andrews 2000). Daher befinden sich zwei Drittel des gesamten Körpereisens (d.h. 2.7-3.3 g) in den Erythrocyten bzw. erythroiden Vorläuferzellen eines Menschen (Barisani und Conte 2002). Der Hauptanteil des nicht erythroiden Eisens (0.5-1.0 g) ist in der Leber gespeichert (Barisani und Conte 2002) während sich der restliche Anteil des Körpereisens (0.7-0.8 g) auf die übrigen Organe bzw. Gewebe des Körpers verteilt (siehe Abbildung 1.1).

Der tägliche Eisenumsatz im Blutkreislauf eines adulten Menschen beläuft sich auf gerade einmal ~30 mg, welches hauptsächlich an das Eisentransportprotein Transferrin (Tf) gebunden ist (Ponka 2004). Im Blut assoziiert niedermolekulares Eisen in einer festen aber reversiblen Bindung mit einer Komplexbindungskonstanten von  $\sim 1 \cdot 10^{23} \text{ M}^{-1}$  an das Tf-Protein, wobei jedes Tf zwei Ferri-Eisenionen binden kann (Aisen *et al.* 1978). Der Hauptanteil des Tf-gebundenen Eisens im Blutserum stammt aus dem Hämoglobin von alternden Erythrocyten, die von Macrophagen abgebaut werden (~24 mg; Andrews 2000). Zur Aufrechterhaltung der Anzahl an roten Blutkörperchen, nimmt das Knochenmark zur Reifung von erythroiden Vorläuferzellen ungefähr 80 % (d.h. ~24 mg) des täglichen Eisenbedarfs des Blutkreislaufs auf (Ponka 2004). Der restliche Anteil des zirkulierenden Tf-gebundenen Eisens (~5 mg) wird von den nicht erythroiden Organen des Körpers – zu einem Großteil von der Leber (~3 mg) – aufgenommen (Ponka 2004). Des Weiteren verliert der Körper täglich ~1-2 mg Eisen über unspezifische Mechanismen wie etwa der Hautabschilferung oder

Blutung (Andrews 1999). Dieser Verlust wird durch die Aufnahme von ~1-2 mg Eisen aus der Nahrung kompensiert (Andrews 1999; Crichton *et al.* 2002; Ponka 2004).



**Abb. 1.1: Täglicher Eisenumsatz des adulten Körpers.**

Im Körper des adulten Menschen werden täglich ~30 mg Tf-gebundenes Eisen umgesetzt. Hiervon nimmt das Knochenmark ~24 mg Eisen zur Reifung von erythroiden Vorläuferzellen auf. Macrophagen wiederum generieren ~24 mg/Tag aus alternden Erythrocyten. Die restliche ~5 mg des täglichen Eisenumsatzes entfällt auf die Leber (~3 mg) sowie die Muskulatur und die nicht-erythroiden Organe des Körpers (~2 mg). Hierzu zählt auch das Gehirn. Der Verlust von ~1-2 mg Eisen/Tag über unspezifische Mechanismen, muss durch die spezifische Resorption von ~1-2 mg Eisen/Tag aus der Nahrung ausgeglichen. Modifiziert nach Andrews (1999).

Mit der Nahrung nimmt der adulte Mensch täglich jedoch ~12-18 mg Eisen zu sich, welches sich hauptsächlich in Ferri-Form gebunden in Hämproteinen oder Eisen-Schwefel-Cluster-Proteinen befindet (Crichton *et al.* 2002). Tatsächlich absorbieren die Enterocyten des Dünndarms pro Tag jedoch nur ~1-2 mg Eisen, welches entweder direkt als Häm-Gruppe oder als niedermolekulares Eisen in den Organismus gelangt (Crichton *et al.* 2002).

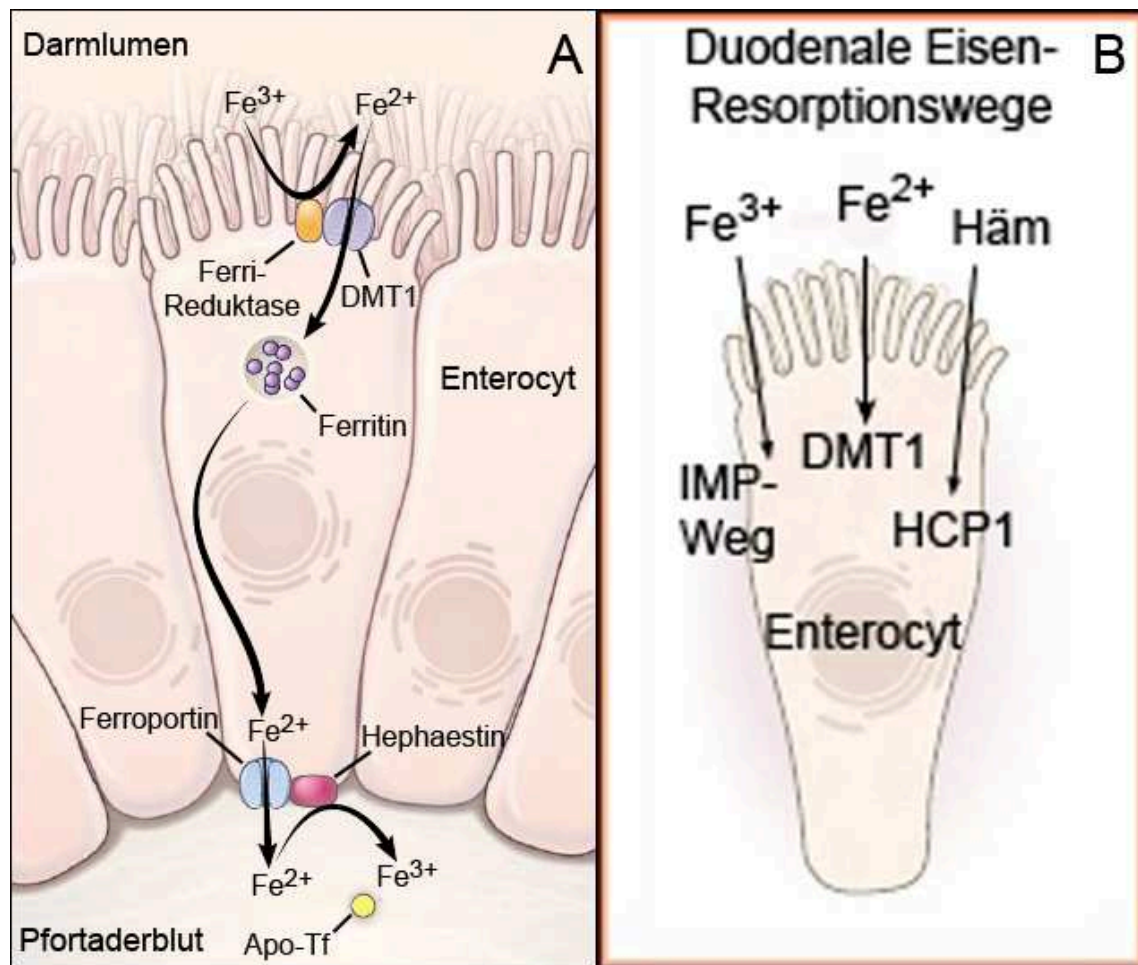
### **1.1.1 Resorption von Eisen aus der Nahrung**

Im Körper eines neugeborenen Kindes befinden sich ~250 mg Eisen. Im Laufe des Lebens wächst dieser Eisengehalt bis auf durchschnittlich 4-5 g eines ~70 kg schweren erwachsenen Menschen an (Bothwell und Finch 1962; Andrews 2000; Conrad und Umbreit 2002). Der heranwachsende Mensch entnimmt das Eisen aus dem Nahrungsbrei. Der Eisenbedarf variiert je nach Alter, Geschlecht und körperlicher Konstitution eines Menschen (Conrad und Umbreit 2002). Nachfolgend soll erläutert werden wie Eisen von den Enterocyten des Darms resorbiert wird und in den Blutkreislauf gelangt.

Die Enterocyten bilden die äußerste Zellschicht des Darms und darüber hinaus mit ihrer luminalen (dem Darmlumen zugewandten), als auch mit ihrer basolateralen (dem Pfortaderblut zugewandten) Zellmembran, die erste physiologische Barriere zur Aufnahme des Eisens in den Organismus (siehe auch Abb. 1.2). Die Eisenresorption aus dem Speisebrei unterscheidet sich deutlich von der zellulären Eisenaufnahme aus dem Blutplasma. Tatsächlich findet die Eisenaufnahme über den Transferrin-Transferrin-Rezeptor 1-Transportweg (Tf-TfR1-Zyklus) (siehe hierzu auch Kapitel 1.1.2) an der luminalen Zellmembran von Enterocyten nicht statt (Parmley *et al.* 1985; Pietrangelo *et al.* 1992). Vielmehr wird Eisen aus dem Speisebrei entweder eingebunden in Proteine – hauptsächlich als Häm-gebundenes Eisen – oder als niedermolekulares Eisen aufgenommen (Crichton *et al.* 2002; Conrad und Umbreit 2002). Die im nachfolgenden beschriebenen Mechanismen der Eisenaufnahme sind nicht exklusiv auf Enterocyten beschränkt, ihre Funktionsweise soll aber exemplarisch an diesem Zelltyp erläutert werden.

Eisen wird vorwiegend im Duodenum resorbiert (Andrews 2000; Garrick und Garrick 2009). Das Duodenum (Zwölffingerdarm) ist der erste kurze Abschnitt des Dünndarms im Anschluss an dem Magen. Bei einer entsprechenden Ernährungsweise wird der tägliche Eisenbedarf zu zwei Drittel durch die Resorption von Häm-gebundenem Eisen gedeckt (Carpenter and Mahoney 1992; Conrad und Umbreit 2002). Häm – ein ringförmiges Molekül mit einem

Protoporphyrin-Ring und einem zentralen Eisenatom – ist sowohl Bestandteil des Hämoglobins als auch des Myoglobins (Crichton 2001; Conrad und Umbreit 2002).



**Abb. 1.2: Eisenresorption der Enterocyten des Duodenums.**

Zum Transfer des mit dem Speisebrei aufgenommenen Eisens in das Pfortaderblut, muss sowohl die luminalen als auch die basolaterale Zellmembran der duodenalen Enterocyten überwunden werden. **A:** Enterocyten können Eisen aus der Nahrung via DMT1 aufnehmen. Hierzu wird  $Fe^{3+}$  durch eine Ferri-reduktase (z.B. Dcytb oder SDR2) zu  $Fe^{2+}$  reduziert. Nach der Aufnahme ins Cytosol, können die Eisenionen in Ferritin gespeichert oder zur basolateralen Membran weitergeleitet werden. Der Transfer über die basolaterale Membran wird durch Ferroportin vermittelt. Exportiertes  $Fe^{2+}$  wird durch die Ferroxidase Hephaestin zu  $Fe^{3+}$  oxidiert und kann so im Pfortaderblut an Tf binden. **B:** Neben der Fähigkeit zur Aufnahme von  $Fe^{2+}$  via DMT1, sind Enterocyten vermutlich auch in der Lage Eisen direkt als  $Fe^{3+}$  über den Mobilferrin-Integrin-Paraferritin-Transportweg (IMP-Weg) oder als Häm-gebundenes Eisen über das Häm-Transport-Protein 1 (HCP1) aufzunehmen. Modifiziert nach Andrews (1999).

Die Resorption des Häm-gebundenen Eisens beginnt mit der enzymatischen Spaltung der Hämproteine im Darm (Conrad und Umbreit 2002). Es wird sehr effektiv von den Enterocyten des Duodenums resorbiert (Latunde-Dada *et al.* 2006), wobei unklar ist welcher Rezeptor oder Transporter der luminalen Zellmembran hierfür verantwortlich ist (Anderson und Vulpe 2009). Das Häm-Transport-Protein 1 (HCP1), welches ursprünglich als duodendaler Häm-Transporter charakterisiert wurde (Shayeghi *et al.* 2005), erwies sich in

nachfolgenden Untersuchungen als hoch affiner Folsäure-Transporter und wurde daher in PCFT (*Proton-coupled folate transporter*) umbenannt (Qiu *et al.* 2006; Garrick und Garrick 2009). Eine duale Funktion sowohl als Transporter von Folsäure als auch von Häm im Duodenum ist aber nicht ausgeschlossen (Garrick und Garrick 2009).

Nach der Resorption des Häm durch die Enterocyten, wird es zum endoplasmatischen Retikulum (ER) geleitet. Am ER wird Häm durch die Hämoxygenase-1 (HO-1) in Biliverdin, Kohlenstoffmonoxid und niedermolekulares Eisen gespalten, welches anschließend dem Eisenstoffwechsel zur Verfügung steht (Dunn *et al.* 2007). Allerdings ist die Häm-Resorption nicht der einzige Weg der Eisenversorgung des menschlichen Körpers.

Ein weiterer Mechanismus zur Resorption von Eisen aus der Nahrung stellt die DMT1-vermittelte Aufnahme von niedermolekularem Ferro-Eisen dar. Der ‚divalente Metall-Transporter 1‘ (DMT1) ist auf der luminalen Zellmembran der Enterocyten des Duodenums präsent (Garrick und Garrick 2009). Das Expressionsniveau von DMT1 wird durch den zellulären Eisengehalt beeinflusst und verhält sich reziprok zu diesem (Gunshin *et al.* 1997). Der Metalltransporter DMT1 ist Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen gewesen, die wesentlich zum besseren Verständnis der zellulären Eisenaufnahme beigetragen haben (Gunshin *et al.* 1997; 2001; Garrick *et al.* 2006). Die DMT1-Sequenz von 561 Aminosäuren weist 12 Transmembrandomänen auf (Gunshin *et al.* 1997). Das Auftreten mehrerer Transmembrandomänen ist charakteristisch für Transportproteine bzw. Rezeptoren. DMT1 ist als ein Symporter von zweiwertigen Metallionen und Protonen ( $H^+$ ) beschrieben (Gunshin *et al.* 1997; Dunn *et al.* 2007). Da es im Falle eines Gendefekts von DMT1 zu einer generellen Eisenunterversorgung im Tiermodell kommt, wird der Anteil des via DMT1 resorbierten Eisen als wesentlich eingeschätzt (Fleming *et al.* 1997, 1998; Su *et al.* 1998; Andrews 2000). DMT1 verfügt über eine ungewöhnlich breite Spezifität und kann neben Ferro-Eisenionen auch zweiwertige Zink-, Mangan-, Cobalt-, Cadmium-, Kupfer-, Nickel- und Bleiionen transportieren (Gunshin *et al.* 1997).

Wie bereits zuvor erwähnt, liegt niedermolekulares Eisen in der Nahrung überwiegend als trivalentes Eisenion vor. Ferri-Eisenionen müssen daher für die DMT1-vermittelten Eisenaufnahme zu Ferro-Eisenionen reduziert werden. Die luminale Oberfläche des Duodenums weist Eisenreduktionsaktivität auf (Riedel *et al.* 1995), welche mit der Reduktase Dcytb (duodenales Cytochrom b) in Verbindung gebracht wird (McKie *et al.* 2000). Es ist



allerdings nicht ausgeschlossen, dass bei der Reduktion von trivalentem Eisen auch andere Reduktasen (wie z.B. SDR2) oder extrazelluläre Substanzen mit einer Eisenreduktionskapazität wie Ascorbat, Cystein, Histidin etc. eine Rolle spielen (van Campen 1972; Simpson *et al.* 1998; Vargas *et al.* 2003; Mizutani *et al.* 2007).

Als dritter Weg zur Eisenresorption ist die Aufnahme von niedermolekularen  $\text{Fe}^{3+}$  über den sogenannten Mobilferrin-Integrin-Paraferritin-Weg (IMP-Weg) beschrieben worden (Conrad *et al.* 2000). Die Assoziation von niedermolekularen  $\text{Fe}^{3+}$  an die strukturgebenden Bestandteile (Mucine) der Mucosa der Darmschleimhaut wird hier als erster Schritt der Eisenaufnahme angesehen (Simovich *et al.* 2003). Es wird vermutet, dass die Mucine das Resorptionsareal der Enterocyten erhöhen und Eisen-chelatierende Eigenschaften besitzen (Simovich *et al.* 2003). Die duodenale Schleimhaut weist das Protein Mobilferrin auf (Conrad *et al.* 2000), welches ein Homolog des Calreticulins ist. Im Vergleich zum Calreticulin fehlt dem Mobilferrin jedoch am Carboxy-Terminus eine Sequenz zur Bindung an das endoplasmatische Retikulum (Conrad und Umbreit 2002). Es wird postuliert, dass sich mit  $\text{Fe}^{3+}$ -beladenes Mobilferrin an den extrazellulären Teil des  $\beta_3$ -Integrin-Oberflächenproteins bindet und in dieser Form in das Cytosol der Enterocyten geleitet wird (Conrad und Umbreit 2002). Der exakte Mechanismus zur Aufnahme des eisenbeladenen Mobilferrin- $\beta_3$ -Integrin-Proteinkomplexes ist jedoch unklar (Conrad und Umbreit 2002). Darüber hinaus ist die physiologische Relevanz des IMP-Weges umstritten (Garrick und Garrick 2009). Des Weiteren ist beschrieben, dass der internalisierte Eisenprotein-Komplex im Cytosol mit der Flavinmonooxygenase zu einem 520 kDa großen Multiproteinkomplex assoziiert, der als Paraferritin bezeichnet wird (Conrad und Umbreit 2002). Paraferritin besitzt Ferrireduktaseaktivität und es wird vermutet, dass es die Funktion eines intrazellulären Eisenchaperons erfüllt (Simovich *et al.* 2003).

Resorbiertes Eisen steht dem Metabolismus zur Verfügung und wird unter anderem zur Synthese von eisenhaltigen Proteinen in den Mitochondrien der Zelle genutzt (Rouault und Tong 2005). Niedermolekulares Eisen trifft im cytosolischen Milieu auf eine Reihe von potentiellen Liganden wie etwa Citrat, ATP oder Ascorbat von dem es chelatiert werden kann (Bradbury 1997; Moos *et al.* 2007). Die Gesamtheit des niedermolekularen cytosolischen Eisens bezeichnet man als den ‚labilen Eisenpool‘ einer Zelle (Petrat *et al.* 2000; Pantopoulos 2004; Dunn *et al.* 2007; Gaasch *et al.* 2007). Es wird angenommen, dass der Eisengehalt des ‚labilen Eisenpools‘ ein wichtiger Faktor für die Expressionsregulierung vieler klassischer

Eisenstoffwechselproteine ist (z.B. DMT1; HCP1; TfR1; Ferritin etc.; siehe hierzu Abschnitt 1.1.3). Jedoch ist der Eisengehalt des ‚labilen Eisenpools‘ nur indirekt messbar und seine Existenz nicht für alle Körperzellen zweifelsfrei belegt (Petrat *et al.* 2000; Dunn *et al.* 2007).

Unzweifelhaft ist dagegen, dass ein zellulärer Eisenüberschuss zu einem Großteil in dem Eisendepotprotein Ferritin gespeichert wird (Crichton 2001). Das Protein Ferritin oder dem Ferritin ähnliche Homologe kommen in nahezu allen bekannten Organismen vor (Harrison *et al.* 1998). Humanes Ferritin ist ein oligomeres Protein, das sich aus insgesamt 24 L- und H-Ferritin-Untereinheiten zusammensetzt und eine molekulare Masse von ca. 500 kDa besitzt (Chasteen und Harrison 1999; Crichton 2001). Unbeladenes eisenfreies Ferritin wird als Apo-Ferritin bezeichnet, es bildet eine kreisrunde Proteinhülle in deren Inneren bis zu 4500 Fe<sup>3+</sup>-Atome gespeichert werden können (Crichton 2001). Die Untereinheiten des Ferritins werden als L-Ferritin (*light*; ca. 20 kDa) bzw. H-Ferritin (*heavy*; ca. 22 kDa) bezeichnet. Die H-Ferritin-Untereinheit weist darüber hinaus Ferroxidaseaktivität auf (Bauminger *et al.* 1993; Treffry *et al.* 1995; Chasteen und Harrison 1999; Crichton 2001; Torti und Torti 2002).

Neben Ferritin gibt es in Säugetierzellen noch weitere Proteine mit einem hohen Eisengehalt. Zwei Vertreter davon sind ‚mitochondriales Ferritin‘ und Hämosiderin. Mitochondriales Ferritin besteht nur aus H-Ferritin-Untereinheiten und fungiert vermutlich als Eisenspeicher in den Mitochondrien (Corsi *et al.* 2002; Torti und Torti 2002). Hämosiderin enthält Ferritin oder seine endosomalen Abbauprodukte (Shoden *et al.* 1953; Richter 1978). Darüber hinaus kommt eisenhaltiges Ferritin in sehr geringen Konzentrationen (0.3-0.7 nM) auch im Blutserum vor (Lipschitz *et al.* 1974).

Im Blutserum wird ‚freies Eisen‘ primär von dem Eisentransportprotein Tf gebunden (Dunn *et al.* 2007). Der Weg auf dem das niedermolekulare Eisen über die basolaterale Membran der Enterocyten in das Pfortaderblut gelangt führt über den Membran-gebundenen Eisenexporter Ferroportin (Ganz 2005). Ferroportin ist auch unter den Synonymen MTP1/ Ferroportin1/ IREG1 bekannt und fungiert als zellulärer Exporter von niedermolekularem Eisen (Abboud und Haile 2000; Donovan *et al.* 2000; McKie *et al.* 2000). Das Protein Ferroportin besitzt eine molekulare Masse von ca. 62 kDa mit einer Sequenz von insgesamt 570 Aminosäuren, die mindestens zehn Transmembrandomänen aufweisen (McKie *et al.* 2000; Abboud und Haile 2000). Ferroportin zeigt Sequenzhomologien zu DMT1 auf und zählt wie DMT1 zu der SLC- (engl.: *Solute carrier*) Gen-Familie (Abboud und Haile 2000). Im Gegensatz zu DMT1 wird

Ferroportin von Enterocyten nur auf der basolateralen Membran exprimiert (McKie *et al.* 2000; Abboud und Haile 2000). Hier liegt Ferroportin in Co-Lokalisation mit der membranverankerten extrazellulären Ferroxidase Hephaestin (Hp) vor (Vulpe *et al.* 1999; Dunn *et al.* 2007). Man nimmt an das Ferroportin intrazellulär  $\text{Fe}^{2+}$  bindet, das extrazellulär durch Hp zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert wird (Pantopoulos 2004; Dunn *et al.* 2007). Wie bereits erwähnt bindet Ferri-Eisen im Pfortaderblut an Tf. Des Weiteren kommt ein Homolog des Hp, das Ceruloplasmin (Cp), als lösliches Protein im Blutplasma vor. Das Cp wird vorwiegend von den Hepatocyten der Leber synthetisiert (Patel und David 1997; Harris 2003).

Ferroportin kommt in allen Körperzellen vor die eine bedeutsamen Eisenumsatz aufweisen, z.B. Enterocyten (Resorption), Hepatocyten (Eisenspeicher) und Macrophagen (Rückgewinnung von Eisen; McKie *et al.* 2000; Abboud und Haile 2000; Le und Richardson 2002; Ganz 2005). Darüber hinaus wird Ferroportin auch von den Zellen des Gehirns exprimiert, hier unter anderem von den Endothelzellen der Blutkapillaren sowie den Astrocyten und den Neuronen (Wu *et al.* 2004).

In Säugetierzellen ist Ferroportin als einziger Exporter von niedermolekularen Eisen bekannt. Allerdings kann Eisen von Säugetierzellen auch in Form von Ferritin oder Häm sezerniert werden (Anderson und Vulpe 2009). Wie bereits erwähnt wird überschüssiges Eisen intrazellulär in Ferritin gespeichert (Harrison und Arosio 1996). Darüber hinaus ist eisenbeladenes Ferritin auch im Blutplasma in geringen Konzentrationen nachzuweisen (0.3-0.7 nM; Lipschitz *et al.* 1974). Es konnte zwar bereits gezeigt werden, dass Kupffer-Zellen Ferritin exportieren können (Sibille *et al.* 1988), allerdings ist unklar ob dies eine Relevanz für die Eisenvorsorgung weiterer Organe besitzt (Anderson und Vulpe 2009). Auch der Mechanismus des Ferritin-Exportes ist bisher noch nicht abschließend geklärt.

Unter anderem scheint das Oberflächenprotein TIM-2 (*T cell immunoglobulin domain and mucin-domain protein 2*) ein möglicher Rezeptor für den Transfer bzw. Export von Ferritin über Zellmembranen zu sein (Chen *et al.* 2005). So konnte bereits demonstriert werden, dass H-Ferritin-Untereinheiten an TIM-2 binden und von Hepatocyten, Nierenzellen und B-Zellen internalisiert werden (Chen *et al.* 2005). Ob TIM-2 darüber hinaus auch Ferritin exportieren kann ist nicht geklärt (Mills *et al.* 2010).

Des Weiteren ist das Protein Scara-5 (*scavenger receptor, member 5*) als Rezeptor für L-Ferritin-Untereinheiten beschrieben (Li *et al.* 2009). Scara-5 wird vorwiegend eine Rolle als Eisen-Importer während der embryonalen Entwicklungsphase der Niere zugesprochen (Li *et al.* 2009). Allerdings wird Scara-5 auch von den Zellen der adulten Niere sowie den Epithelzellen der Gonaden exprimiert (Anderson und Vulpe 2009). Eine Funktion als Ferritin-Exporter wird auch für Scara-5 nicht ausgeschlossen (Mills *et al.* 2010). Auch das humane TfR1-Protein wurde bereits als Ferritin-Rezeptor beschrieben (Li *et al.* 2010). Ob dies jedoch unter physiologischen Bedingungen eine Relevanz für die Eisenvorsorgung der Organe des Körpers besitzt ist ebenfalls unklar (siehe hierzu auch Kapitel 1.1.2).

Darüber hinaus wird ein beträchtlicher Teil des Körpereisens in den Mitochondrien zur Biosynthese von Häm-Proteinen genutzt. Insbesondere in erythroiden Vorläuferzellen sowie Macrophagen kann es im Cytosol zur Akkumulation von Häm-Proteinen kommen. Der Export von Häm aus den genannten Zellen erfolgt durch den Rezeptor FLVCR (*feline leukemia virus, subgroup C, receptor*; Quigley *et al.* 2004; Keel *et al.* 2008). Über die physiologische Relevanz dieses Häm-Exporters für weitere Zellen des Organismus ist bisher nur wenig bekannt (Garrick und Garrick 2009).

### **1.1.2 Transferrin-Transferrin-Rezeptor-Zyklus**

Das Eisen-bindende Serumprotein Tf ist primär verantwortlich für die Verteilung von Eisen im menschlichen Organismus (Garrick und Garrick 2009). Tf kann über eine Reihe von unterschiedlichen zellulären Mechanismen sein gebundenes Eisen an die Zellen des Körpers abgeben. Der so genannte Tf-TfR1-Zyklus ist unter diesen Mechanismen der am besten charakterisierte (Anderson und Vulpe 2009).

Zunächst ist die Gegenwart von Tf-gebundenem Eisen im extrazellulären Raum eine notwendige Voraussetzung für die zelluläre Aufnahme von Tf-gebundenem Eisen. Dies ist jedoch bei sämtlichen Zellen des menschlichen Körpers mit einem direkten Zugang zum Blut gegeben. Das Tf-Protein ist ein lösliches Serumprotein bestehend aus ca. 680 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von ca. 80 kDa (Bailey *et al.* 1988). Tf weist zwei Eisen-bindende homologe Domänen (N- und C-Domäne) auf, wobei jede Domäne je ein Ferri-Eisenion binden kann (Bailey *et al.* 1988). Ferri-Eisen bindet extrazellulär bei pH 7.4 in einer festen aber reversiblen Bindung an Tf (Aisen 2004).

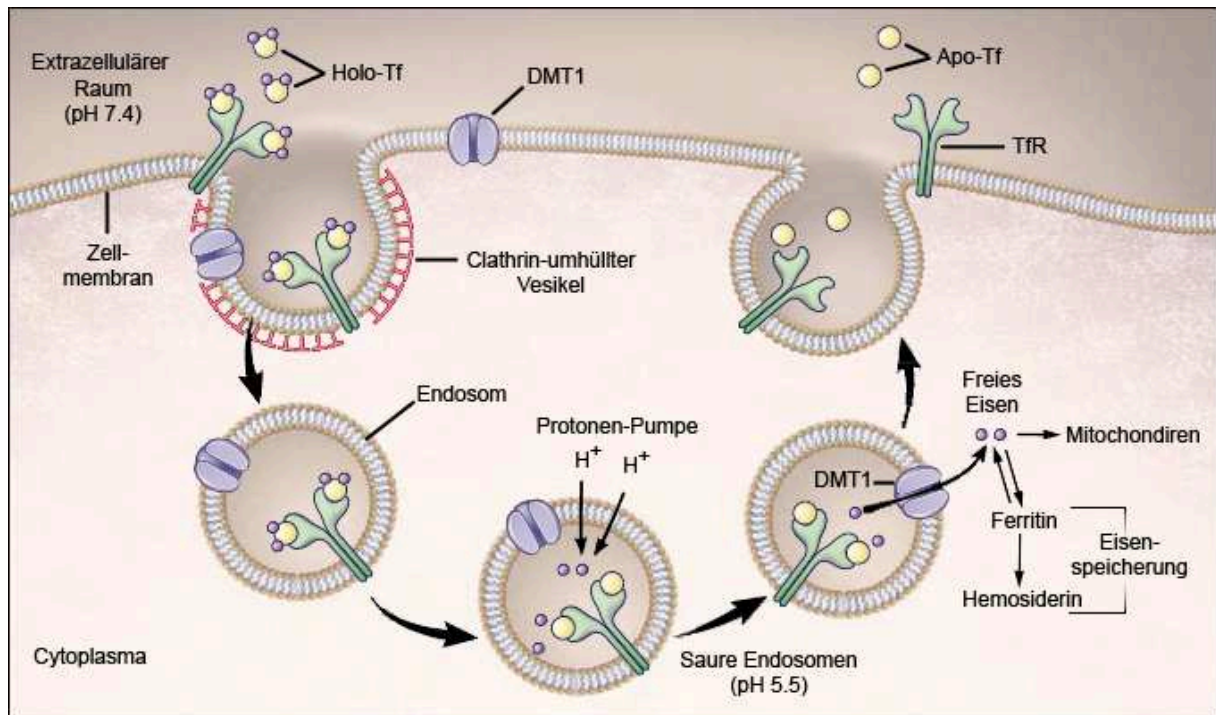
Zellen, die Eisen über den Tf-TfR1-Zyklus aufnehmen, exprimieren auf ihrer Zellmembran in Abhängigkeit vom zellulären Eisenstatus den Transferrin-Rezeptor 1 (TfR1) (Aisen 2004). TfR1 ist ein Membran-gebundenes homodimeres Glykoprotein, bestehend aus zwei identischen Untereinheiten (je ca. 90 kDa). Jede TfR1-Untereinheit besteht aus einer Sequenz von 760 Aminosäuren, wobei die beiden Untereinheiten über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind (Schneider *et al.* 1984; McClelland *et al.* 1984; Jing und Trowbridge 1987). Jede TfR1-Untereinheit verfügt über eine kurze cytosolische Domäne (Aminosäure 1-67), eine hydrophobe Transmembrandomäne (Aminosäure 68-88), sowie einer großen extrazellulären Domäne (Aminosäure 89-760; Schneider *et al.* 1984; McClelland *et al.* 1984; Aisen 1998).

Der Rezeptor TfR1 bindet zweifach mit Eisen beladene Tf-Proteine (Holo-Tf) ~10-fach stärker als einfach eisenbeladenes Tf, sowie ~2000-fach stärker als eisenfreies Apo-Tf (Tsunoo und Sussman 1983). Hierdurch wird eine hohe Effektivität der Bindung von Holo-Tf an den zellulären Rezeptor gewährleistet. Die Bindung von Holo-Tf an den TfR1 initiiert die Clathrin-vermittelte Endocytose des Protein-Eisen-Komplexes (Aisen 2004). Hierbei wird eine beginnende Einstülpung der Zellmembran an der Innenseite durch die Konjugation von Clathrin-Molekülen verstärkt. Dies führt schließlich zur Bildung von cytoplasmatischen Clathrin-umhüllten Membranvesikeln (Conner und Schmid 2003). Nach der Ablösung von der Zellmembran lösen sich die Clathrin-Moleküle von den Vesikeln ab und die Vesikel fusionieren mit frühen Endosomen. In den Endosomen herrscht ein relativ geringer pH-Wert (~5.5), der durch eine ATP-abhängige Protonenpumpe erzeugt wird. Durch die Verringerung des pH-Wertes wird eine Konformationsänderung des TfR1-gebundenen Tfs begünstigt, wodurch das Tf-gebundene Eisen freigesetzt wird (Cheng *et al.* 2004). Das nun ‚freie‘ Eisen wird durch eine Ferrireduktase (möglicherweise Steap3; Ohgami *et al.* 2005) zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert und nachfolgend durch DMT1 aus dem endosomalen Vesikel in das Cytosol überführt (Fleming *et al.* 1998; Andrews 1999). Der Apo-Tf-TfR1-Komplex wird in Vesikeln zur luminalen Zellmembran zurückgeleitet und mit dieser refusioniert (Aisen 2004). An der extrazellulären Umgebung bei pH 7.4 dissoziiert Apo-Tf von TfR1 und steht zur erneuten Bindung von  $\text{Fe}^{3+}$  im Blutplasma zur Verfügung (siehe auch Abb. 1.3). Die Halbwertszeit von Tf im humanen Blutkreislauf beträgt ca. 8 Tage (Katz 1961). Es wird angenommen, dass ein Tf-TfR1-Zyklus in ~5-20 min abgeschlossen ist, Tf kann so insgesamt mehr als hundert Tf-TfR1-Zyklen durchlaufen (Katz 1961). Außerdem erscheint auch eine direkte Transcytose der eisenbeladenen Tf-TfR1-Vesikel zur basalen Zellmembran möglich (Mills *et al.* 2010). Eine

Fusionierung mit der basalen Zellmembran hätte die Entlassung von Tf-gebundenem Eisen in den extrazellulären Raum zu benachbarten Zellen mit keinem direkten Zugang zum Blutkreislauf zur Folge (siehe hierzu auch Kapitel 1.2.3 Blut-Hirnschranke).

Tf gehört zu einer Familie von eisenbindenden Transferrinen. Neben Tf spielen Lactoferrin (Lf) und Melanotransferrin (MTf) eine Rolle im Eisenmetabolismus des Menschen. Beides sind Tf-Homologe, die DNA-Sequenz-Homologien von ca. 37-39 % aufweisen (Richardson 2000; Dunn *et al.* 2007). Lf kommt hauptsächlich in der Muttermilch vor und ist wahrscheinlich relevant für die Eisenversorgung von Neugeborenen. Außerdem wird Lf eine antibakterielle Wirkung in der Immunabwehr zugesprochen (Ward *et al.* 2003). Im Unterschied zu Tf und Lf ist MTf mittels eines Glycosylphosphatidylinositol-Ankers (GPI-Anker) mit der Zellmembran verbunden. Im gesunden Gewebe kommt MTf in den Zellen der Niere, des Hoden sowie der Speichel- und Bauchspeicheldrüsen vor (Sekyere *et al.* 2006). Darüber hinaus ist die Expression MTf in Melanomzellen (Hauptkrebszellen) stark erhöht (Richardson 2000). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass MTf die Blut-Hirnschranke passieren könnte und somit möglicherweise in der Versorgung des Gehirns mit Eisen involviert ist (Moroo *et al.* 2003). Doch gelang es weder *in vitro* noch *in vivo* experimentell nachzuweisen, dass MTf eine entscheidende Rolle bei der zellulären Eisenaufnahme spielt (Richardson 2000; Dunn *et al.* 2007). Darüber hinaus kam es sowohl bei Lf- als auch MTf-Gen-*Knockout*-Mäusen phänotypisch zu keiner Eisenunterversorgung (Ward *et al.* 2003; Sekyere *et al.* 2006).

Neben dem bereits erwähnten TfR1, existiert bei Säugetieren ein zweiter Transferrin-Rezeptor (TfR2). TfR2 scheint allerdings nur indirekt an der zellulären Eisenaufnahme beteiligt zu sein (Dunn *et al.* 2007). So kommt es bei Mutationen des TfR2 zur Deregulierung der Eisenhomöostase und in dessen Folge zu einer Eisenüberladung des Organismus (Wallace *et al.* 2005). TfR2 wird eine regulierende Wirkung auf das Hormon Heparin zugesprochen, welches von der Leber in den Blutkreislauf ausgeschüttet wird (Wallace *et al.* 2005). Heparin induziert den Abbau von Eisentransportproteinen wie Ferroportin (siehe auch Kapitel 1.1.3; Muckenthaler *et al.* 2004; Dunn *et al.* 2007). Darüber hinaus gibt es Hinweise aus der Literatur (Graham *et al.* 2008), dass TfR2 möglicherweise an einem Tf-abhängigen sowie an einem Tf-unabhängigen Eisenaufnahmeprozess beteiligt sein könnte.



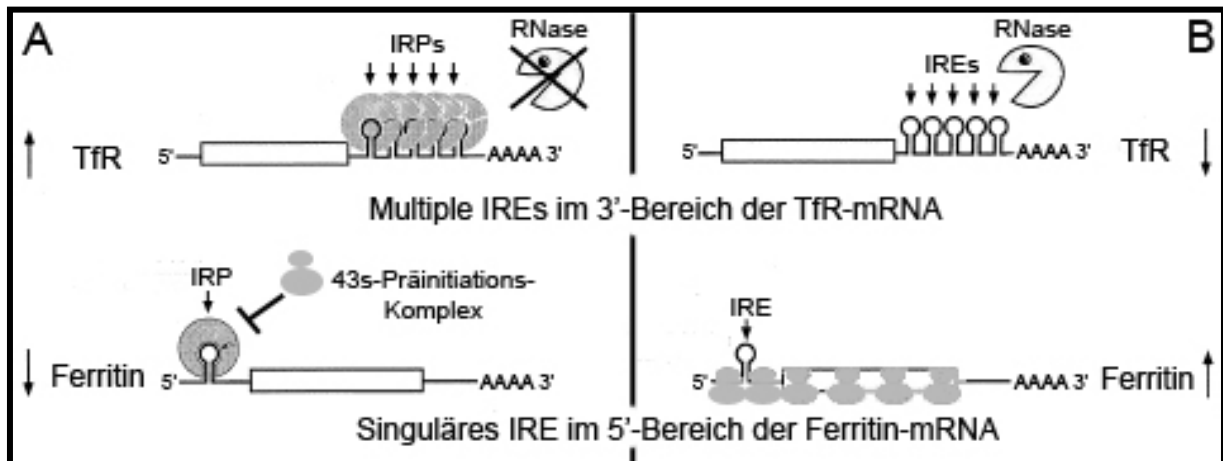
**Abb. 1.3 : Transferrin-Transferrin-Rezeptor-Zyklus**

Zweifach mit Eisen beladenes Holo-Transferrin (Holo-Tf) bindet extrazellulär bei pH 7.4 an den Transferrin-Rezeptor (TfR) auf der Zelloberfläche. In Vesikeln wird der Eisen-Tf-TfR-Komplex durch clathrinabhängige Endocytose in die Zelle aufgenommen. Die Ansäuerung der Endosomen durch Protonen-Pumpen führt zur Konformationsänderung des Tfs. Hierdurch wird das gebundene Eisen freigesetzt durch eine Ferrireduktase (Steap3) zu Fe<sup>2+</sup> reduziert und anschließend via DMT1 ins Cytopsol geleitet. Nach der Refusionierung der endosomalen Vesikeln mit der Zellmembran, löst sich Apo-Tf bei pH 7.4 vom TfR ab. Tf steht nun zur erneuten Bindung von Eisen zur Verfügung. Modifiziert nach Andrews (1999).

### 1.1.3 Homöostase des zellulären Eisengehaltes

Die Homöostase des Eisengehaltes von Säugetierzellen beruht auf der ausbalancierten Regulierung der zellulären Expression von Eisenstoffwechselproteinen. Die Expressionsregulation erfolgt dabei primär auf posttranskriptionaler Ebene (Crichton 2001; Martini *et al.* 2002; Torti und Torti 2002; Pantopoulos 2004). Unter anderem spielen hierbei regulatorische Sequenzen, so genannte ‚Eisen-regulierende Elemente‘ (engl.: *iron regulatory elements*; IREs) eine Schlüsselrolle. Die IREs sind kurze Nukleotidsequenzen im 3'- oder 5'-untranslatierten mRNA-Bereich von Eisenstoffwechselproteinen wie TfR1, Ferritin oder Ferroportin, die Haarnadelstrukturen ausbilden. An diese Strukturen auf der mRNA binden in Abhängigkeit vom Eisenstatus der Zelle so genannte ‚Eisen-reagierende Proteine‘ (engl.: *iron responsive proteins*; IRPs; Aziz und Munro 1987; Ke und Theil 2002). Die IRPs fungieren dabei als Sensor des cytosolischen Eisengehaltes. Entscheidend für die direkten Konsequenzen hinsichtlich der Genexpression ist allerdings die Lage der IREs auf den mRNA-Abschnitten. Eine Anlagerung der IRPs an den 5'-Bereich der mRNA führt zu einer Behinderung der Translation. Hingegen wirkt ein im 3'-Bereich bindendes IRP stabilisierend

auf die mRNA und verhindert ihre Degradierung durch zelluläre RNasen (Eisenstein 2000; Hentze *et al.* 2004; Pantopoulos 2004). Anders formuliert kommt es durch die Anlagerung der IRPs im 5'-Bereich der Sequenz zu einer Verminderung und im 3'-Bereich zu einer Erhöhung der Synthese des jeweiligen Eisenstoffwechselproteins (siehe Abb. 1.4).



**Abb. 1.4: Posttranskriptionale Expressionsregulation der Eisenstoffwechselproteine**

In Abhängigkeit zum Eisenstatus der Zelle interagieren IRPs mit IREs im 5'- oder 3'-untranslatierten Bereich der mRNA von Eisenstoffwechselproteinen und regulieren deren Translation. **A:** Unter Eisenmangel binden IRPs an IREs und verhindern - je nach Lage der IREs - entweder die Degradierung der mRNA (siehe TfR) oder inhibieren ihre Translation (siehe Ferritin). **B:** Im Fall einer ausreichenden Eisenversorgung wird die Interaktion von IRPs und IREs aufgehoben. Hierdurch verringert sich einerseits die Stabilität der TfR1-mRNA und andererseits erfolgt nun die Translation des Ferritins. Modifiziert nach Pantopoulos (2004).

Dies erscheint zunächst ausreichend für eine Selbstregulation des zellulären Eisengehaltes. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die IREs nur auf dem 3'-Bereich oder auf dem 5'-Bereich der betreffenden mRNA-Sequenz vorhanden sind (siehe auch Tab. 1.1). Folglich ist also ein weiterer Mechanismus, der die Bindung der IRPs steuert notwendig. Wie bereits erwähnt, reagieren die IRPs auf den cytosolischen Eisengehalt und liegen jeweils nur in einer von zwei möglichen Konformationen vor. Wobei nur eine der beiden Konformation an die IREs bindet (Pantopoulos 2004).

In der Literatur sind nur zwei Typen an spezifischen IRPs beschrieben (IRP1 und IRP2). IRP1 ist ein Eisen-Schwefel-Cluster-Protein, das auch als cytosolische Aconitase bekannt ist (Anderson und Vulpe 2009). Bei zellulärem Eisenmangel wird dem Protein IRP1 Eisen entzogen. In dieser Konformation bindet IRP1 an die IREs (Hirling *et al.* 1994; Eisenstein 2000). Das IRP2 ist im Unterschied zum IRP1 kein eisenhaltiges Protein, wird aber in Gegenwart von Eisen oxidiert und kann im oxidierten Zustand nicht an die IREs binden (Iwai *et al.* 1995; Guo *et al.* 1994, 1995). IRP2 kommt im Wesentlichen nur im Darm sowie dem



Gehirn vor wohingegen IRP1 in nahezu allen Geweben des Körpers vorhanden ist (Mullner *et al.* 1992; Henderson *et al.* 1993; Samaniego *et al.* 1994).

**Tab. 1.1: Expressionsniveau der Eisenstoffwechselproteine in Abhängigkeit zum Eisenstatus**

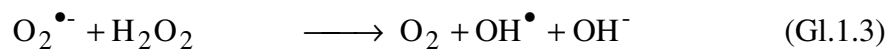
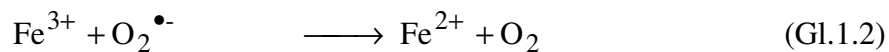
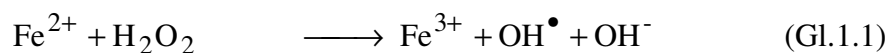
Protein des Eisenstoffwechsels	Lokalisation des IRE im	Expression bei Eisen-		Funktion im Eisenstoffwechsel
		magel	sättigung	
H-Ferritin	3'-Bereich	niedrig	hoch	Eisenspeicherung
L-Ferritin	3'-Bereich	niedrig	hoch	Eisenspeicherung
Aconitase	3'-Bereich	niedrig	hoch	Citratzyklus
Ferroportin	3'-Bereich	niedrig	hoch	Eisenexport
TfR1	5'-Bereich	hoch	niedrig	Eisenaufnahme
DMT1	5'-Bereich	hoch	niedrig	Eisenaufnahme

Modifiziert nach Hentze *et al.* (2004).

Neben der Expressionsregulation durch die Interaktion von IREs und IRPs, spielt das Hormon Hepcidin eine wichtige Rolle bei der Regulation der zellulären Eisenhomöostase. Hepcidin ist als reziproker Regulator des zellulären Eisenhaushaltes beschrieben (Nicolas *et al.* 2001, 2002a, b; Lesbordes-Brion *et al.* 2006). Hepcidin, das primär von der Leber exprimiert und sezerniert wird (Park *et al.* 2001), interagiert bei einer ausreichenden Eisenversorgung direkt mit Ferroportin. Hierdurch wird Ferroportin internalisiert und enzymatisch degradiert (Nemeth *et al.* 2004). Als Folge dessen setzt eine Hemmung des Eisenexportes von Hepatocyten, Enterocyten und Macrophagen ein (Knutson *et al.* 2003, 2005; Nemeth *et al.* 2004). Genetisch bedingte Fehlregulationen des Hepcidin führen bei einem verminderten Expressionsniveaus des Ferroportins zum Phänotyp der Hämochromatose, die eine Eisenüberladung der peripheren Organe zufolge hat (Nicolas *et al.* 2001; Lesbordes-Brion *et al.* 2006). Hingegen kann eine Überexpression des Hepcidins zu einer Anämie führen (Nicolas *et al.* 2002a). Darüber hinaus wird vermutet, dass Hepcidin auch vermindern auf die Expression von DMT1 sowie Dcytb wirkt (Viatte *et al.* 2005; Mena *et al.* 2006). Die Regulation der Expression von Hepcidin wird wiederum durch eine Reihe von Rezeptoren auf der Plasmamembran von Hepatocyten beeinflusst. Dies sind HFE (Hemochromatose-Protein), TfR2, HJV (Hemojuvelin) und IL-6 Rezeptor (Interleukin-6; Anderson und Vulpe 2009). Die exakte Signaltransduktion dieser Rezeptoren ist bisher nur unzureichend aufgeklärt (Anderson und Vulpe 2009).

#### 1.1.4 Eisentoxizität durch oxidativen Stress

Die Akkumulation von niedermolekularem Eisen in Zellen führt zu oxidativem Stress, der in einer irreversiblen Zell- bzw. Gewebsschädigung resultieren kann. Hydroxylradikale entstehen in der so genannten Fenton-Reaktion (Gl. 1.1), bei der Wasserstoffperoxid in der Gegenwart von  $\text{Fe}^{2+}$  zu einem Hydroxylradikal ( $\text{OH}^\bullet$ ) und einem Hydroxylanion ( $\text{OH}^-$ ) reagiert (Halliwell und Gutteridge 2007). Wasserstoffperoxid entsteht in den Zellen beispielsweise bei der Entgiftung von Superoxid ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) durch die Aktivität der Superoxiddismutase (Inoue *et al.* 2003). Superoxid wiederum tritt als Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung auf (Korshunov *et al.* 1997; Inoue *et al.* 2003; Halliwell 2001).



Als ein Produkt der Fenton-Reaktion entsteht  $\text{Fe}^{3+}$  (Gl. 1.1), das unter zellulären Bedingungen durch Superoxid oder Reduktionsmittel wie Ascorbat leicht zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert wird (Gl. 1.2; Dringen *et al.* 2007). Hieraus ergibt sich die katalytische Wirkung des Eisens bei der Generierung von Sauerstoffradikalen. Dies findet seinen Ausdruck in der so genannten Haber-Weiss-Reaktion (Gl. 1.3).

Niedermolekulares Eisen kann als Katalyt in der Haber-Weiss-Reaktion (Gl. 1.3) zur Generierung von ROS wie dem Hydroxylradikal ( $\text{OH}^\bullet$ ) führen. Hydroxylradikale sind höchst reaktive freie Radikale, die unmittelbar mit ihrer Umgebung reagieren. Dies kann schwere negative Folgen für die Vitalität einer Zelle haben (Halliwell 2006). Die starke toxische Wirkung des Hydroxylradikals ist seiner hohen Reaktivität geschuldet. Hydroxylradikale schädigen *in vivo* Biomoleküle wie Proteine, Lipide oder Nukleotide. Hierdurch kann beispielsweise die Schädigung der DNA verursacht werden (Halliwell 1992, 2001).

Als ein weiteres Beispiel für die toxische Wirkung der Hydroxylradikale sei die Lipidperoxidation genannt (Halliwell 1992, 2001). Die Lipidperoxidation ist eine Kettenreaktion bei der zunächst einer mehrfach ungesättigten Fettsäure (z.B. der Linolensäure) ein Wasserstoffatom entzogen wird. Im Zusammenwirken mit molekularem Sauerstoff kann nun ein Peroxylradikal ( $\text{ROO}^\bullet$ ) entstehen, welches wiederum Wasserstoff von benachbarten bisher

unbeschädigten Fettsäuren entzieht. Dies führt zur Bildung zahlreicher Lipidhydroperoxide und schädigt somit die Integrität der Zellmembranen und damit auch die Viabilität der Zelle.

Zum Schutz vor zu hohem oxidativen Stress wird daher der zelluläre Eisengehalt sehr genau den Bedürfnissen des jeweiligen Zelltyps angepasst (Kapitel 1.1.3). Kommt es zu einer Störung der zellulären Eisenhomöostase, kann dies sehr schwerwiegende degenerative Erkrankungen zur Folge haben (siehe hierzu auch Kapitel 1.2.4).

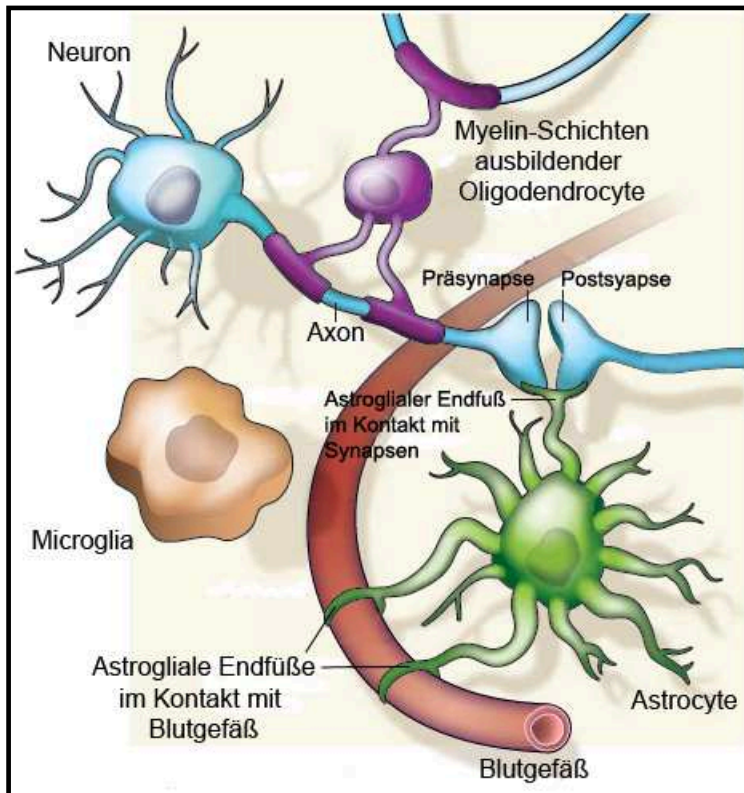
## **1.2 Eisenmetabolismus des Gehirns**

### **1.2.1 Zelltypen des Gehirns**

Das Nervensystem des Menschen und der höheren Säugetiere ist sehr komplex, besteht aber im Wesentlichen nur aus zwei Zelltypen: Den Neuronen und den Gliazellen (Allen und Barres 2009). Die Gliazellen machen ungefähr 90 % der Zellen, jedoch nur ungefähr 50 % der Zellmasse des Gehirns aus (Kuffler und Nicholls 1966; Somjen 1988; Kurosinski und Gotz 2002). Die Bedeutung der Neuronen für das Gehirn ist allgemein bekannt und stand für lange Zeit im Fokus nahezu aller wissenschaftlichen Studien zur Untersuchung der zellulären Basis für komplexe Vorgänge wie die Verarbeitung von Informationen oder der Koordinierung von motorischen Aktionen. Hingegen wurden die Gliazellen (Glia; griech.: Leim) zunächst nur als Bindegewebe des Nervensystems betrachtet (Pfrieger und Barres 1996; Kirchhoff *et al.* 2001; Allen und Barres 2009). Tatsächlich erfüllen die Gliazellen darüber hinaus eine Reihe von unentbehrlichen Funktionen für die Neurotransmission (Benarroch 2005; Kettenmann und Ransom 2005; Markiewicz und Lukomska 2006; Allen und Barres 2009).

Die Gliazellen des Gehirns lassen sich in drei Haupttypen unterteilen, die Astrocyten, die Oligodendrocyten und die Microgliazellen (Abb. 1.5). Neuronen, Astrocyten und Oligodendrocyten entwickeln sich während der embryonalen Phase aus neuronalen Stammzellen, hingegen stammen Microgliazellen von invasierenden Macrophagen (Sauvageot und Stiles 2002; Sun *et al.* 2003; Doetsch 2003; He und Sun 2007).

Die sternförmigen Astrocyten stellen den quantitativ höchsten Anteil an Zelltypen des Gehirns dar (Somjen 1988; Markiewicz und Lukomska 2006). Sie stehen über ihre Endfüße und ihre Zellfortsätze in engem Kontakt zu den Synapsen der Neuronen sowie den Epithelzellen der Blutkapillaren (Dringen *et al.* 2007; Allen und Barres 2009).



**Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Zelltypen des Gehirns**

Die verschiedenen Gliazelltypen des Gehirns – im Wesentlichen sind dies Astrocyten (grün), Oligodendrocyten (lila) und Microglia (braun) – interagieren mit den Neuronen. Astrocyten stehen darüber hinaus in engem Kontakt zu den Blutgefäßen des Gehirns. Die verschiedenen Gliazelltypen erfüllen dabei unterschiedliche Funktionen wie z.B. die Ausbildung von isolierenden Myelin-Schichten, die Phagozytose von Fremdkörpern, Inhibierung bzw. Verstärkung neuronaler Aktivität oder die Anregung des Blutdurchflusses in bestimmten Arealen des Gehirns (Allen und Barres 2009).

Die Oligodendrocyten besitzen im Vergleich zu den Astrocyten nur einen relativ kleinen kreisrunden Zellkörper, dafür aber zahlreiche lange, dünne Zellfortsätze. Mit diesen Fortsätzen bilden Oligodendrocyten die isolierende Myelinschicht um die Nervenbahnen der Neuronen aus (Baumann und Pham-Dinh 2001; Butt 2005). Microgliazellen sind die Immunzellen des Zentralen Nervensystems, die Fremdkörper und Zelldebris phagozytieren (Dringen 2005). Bei der allgemeinen Betrachtung der neuralen Zelltypen sollte jedoch nicht außer acht gelassen werden, dass sich die Funktion der einzelnen Zelltypen je nach Lokalisation in den verschiedenen Gehirnarealen stark unterscheiden kann (Kettenmann und Ransom 2005).

Neben den genannten Zelltypen (Neuronen, Astrocyten, Oligodendrocyten und Microglia), existieren im Gehirn noch weitere Zelltypen wie beispielsweise die so genannten radialen Gliazellen oder die Ependymzellen des Gehirns. Diese Zelltypen sind jedoch vorwiegend ruhende Zellen des adulten Gehirns (Doetsch 2003; He und Sun 2007). Da das Thema der

vorliegenden Studie die Untersuchung des Eisenstoffwechsels von Astroglia-reichen Primärkulturen ist, wird im Nachfolgenden lediglich die Funktionalität der Astrocyten im Gehirn näher erläutert.

### **1.2.2 Astrocyten**

Die spezifischen Eigenschaften der Astrocyten sind hinsichtlich vielfältiger Funktionen des Gehirns unverzichtbar. Astrocyten sind mit zahlreichen Fortsätzen versehene sternförmige Zellen (Astron; griech.: Stern). Sie bilden im Verbund dichte Netzwerke im Gehirn aus (Kirchhoff *et al.* 2001), die die Neurotransmission unterstützen bzw. ermöglichen (Allen und Barres 2009). Astrocyten lassen sich in zwei Gruppen von Zelltypen unterteilen. Einerseits in protoplasmische Astrocyten, die in der ‚grauen Substanz‘ des Gehirns vorkommen und andererseits in faserförmige Astrocyten, die in der ‚weißen Substanz‘ des Gehirns vorkommen (Allen und Barres 2009). Protoplasmische Astrocyten stehen sowohl im engen Kontakt zu den Blutkapillaren des Gehirns als auch zu den neuronalen Zellkörpern sowie deren Synapsen (Barres 2008). Faserförmige Astrocyten sind hingegen mit neuronalen Axonen sowie den Blutkapillaren des Gehirns assoziiert (Barres 2008).

Astrocyten sind durch so genannte ‚*gap junctions*‘ miteinander verbunden (Kirchhoff *et al.* 2001). Diese Verbindungen ermöglichen eine interzelluläre Kommunikation über Calciumsignale und die Ausbildung eines gemeinsam genutzten cytoplasmatischen Raums, auch Synzytium genannt (Kirchhoff *et al.* 2001; Bennett *et al.* 2003; Ransom und Ye 2005; Haydon und Carmignoto 2006).

Im Durchschnitt steht im Gehirn jeder Astrocyt im Kontakt zu ungefähr 160 000 Synapsen (Bushong *et al.* 2002) und verfügt über zahlreiche Rezeptoren, die auch auf den Zellmembranen von Synapsen vorkommen (Allen und Barres 2009). Dies ermöglicht Astrocyten auf neuronale Aktivität zu reagieren und beispielsweise Neurotransmitter wie Glutamat oder Kaliumionen aufzunehmen (Anderson und Swanson 2000; Walz 2000; Barreto *et al.* 2011), die als Folge der Erregungsleitung an den Synapsen von Neuronen ausgeschüttet werden. Darüber hinaus bedecken Astrocyten mit ihren terminalen Fortsätzen, den so genannten ‚Endfüßen‘, ~99 % der abluminalen Gefäßoberfläche der Blutkapillaren im Gehirn (Simard *et al.* 2003). Als Reaktion auf erhöhte lokale neuronale Aktivität ist es den Astrocyten möglich, den Blutdurchfluss in bestimmten Arealen des Gehirns zu erhöhen (Allen und Barres 2009). Hierdurch wird die Versorgung des betreffenden Gehirnareals mit

Glucose und Sauerstoff erhöht (Allen und Barres 2009). Die von den Astrocyten aufgenommene Glucose kann zum Teil in Lactat umsetzt und anschließend exportiert werden (Kirchhoff *et al.* 2001; Barreto *et al.* 2011). Neuronen können Lactat aufnehmen und zu Pyruvat umsetzen, welches den Neuronen zur effektiven Generierung von ATP-Molekülen dient (Kirchhoff *et al.* 2001; Barreto *et al.* 2011). Dieser Zusammenhang wird auch als die Kopplung des Glucosemetabolismus bzw. Glucose/Lactat-Shuttle zwischen Astrocyten und Neuronen bezeichnet (Pellerin *et al.* 2007; Castro *et al.* 2009; Magistretti 2009, 2011).

Darüber hinaus können Astrocyten nicht nur Signale von Neuronen erhalten sondern auch selber Neuronen bzw. deren Synapsen anregen (Barreto *et al.* 2011). So können Astrocyten als Folge einer Signalkaskade neuroaktive Substanzen wie ATP freisetzen und so für die Signalübertragung zwischen nicht direkt benachbarten Neuronen verantwortlich sein (Kirchhoff *et al.* 2001; Fellin und Carmignoto 2004). Man kann also behaupten, dass Astrocyten bidirektional mit Neuronen kommunizieren können und zur Inhibierung oder Verstärkung neuronaler Aktivität beitragen (Allen und Barres 2009; Barreto *et al.* 2011).

Ein weiterer Aspekt ist der Einfluss von Astrocyten auf die Ausbildung und Reifung von neuronalen Synapsen (Pfrieger 2010). Neuronale synaptische Verbindungen entstehen nicht nur während der prä- und postnatalen Lebensphase. Auch im adulten Gehirn eines Menschen werden Synapsen gebildet sowie eliminiert (Pfrieger 2010). Man bezeichnet dies auch als die neuronale Plastizität des Gehirns. Die durchschnittliche Lebensdauer von synaptischen Verbindungen beträgt postnatal Minuten bis Stunden und im adulten Gehirn Tage bis Monate (Bhatt *et al.* 2009). Eine wichtige Rolle bei der neuronalen Plastizität des Gehirns scheinen dabei die Astrocyten zu spielen. So konnte durch *in vitro* Untersuchungen festgestellt werden, dass sich die synaptische Aktivität durch Co-Kultivierungen von Neuronen mit Astrocyten ca. um den Faktor Hundert gegenüber reinen Neuronen-Kulturen erhöht (Barres 2008). Auch war festzustellen, dass sich in Anwesenheit von Astrocyten ~10-fach mehr Synapsen zwischen Neuronen ausbilden als in reinen Neuronen-Kulturen (Barres 2008). Ein wichtiger Botenstoff für die Ausbildung von Synapsen scheint dabei das von Astrocyten ausgeschüttete Protein Thrombospondin zu sein (Christopherson *et al.* 2005; Barres 2008; Pfrieger 2010). Auch die Ausreifung, Stabilisierung sowie Eliminierung von synaptischen Verbindungen scheint von Astrocyten durch die Ausschüttung von Stoffen wie Cholesterin, TNF $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) oder Ephrin-A3 beeinflusst zu werden (Pfrieger 2010).

Des Weiteren produzieren Astrocyten Antioxidantien wie Glutathion und Superoxid-dismutasen, die zur Erhöhung der Resistenz von Neuronen gegenüber oxidativem Stress beitragen (Dringen *et al.* 2000; Slemmer *et al.* 2008; Barreto *et al.* 2011). Wie bereits erläutert, sind Astrocyten an der Versorgung von Neuronen mit Metaboliten beteiligt, was nicht nur den Austausch von Nährstoffen wie Glucose und Lactat, sondern auch die Versorgung der Neuronen mit essentiellen Spurenelementen wie Eisen, Zink oder Kupfer einschließt (Tiffany-Castiglioni und Qian 2001). Als Beleg hierfür kann unter anderem die Fähigkeit der Astrocyten zur Aufnahme, Speicherung und Weitergabe von Tf-ungebundenem Eisen angesehen werden (Jeong und David 2003; Hoepken *et al.* 2004; Tulpule *et al.* 2010; Lane *et al.* 2010).

### **1.2.3 Die Blut-Hirnschranke**

Das Gehirn ist ein komplexes Organ, dessen Zellen – insbesondere die Neuronen – anfällig gegenüber Milieuschwankungen sind und nur über eine begrenzte Regenerationskapazität verfügen (Barres 2008; Barreto *et al.* 2011). Das Gehirn wird von der Schädelhöhle geschützt und gegenüber der Peripherie durch die Hirnhaut abgegrenzt. Darüber hinaus ist es im Hirnliquor bzw. der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) eingebettet. Diese Eigenheiten heben die Stellung des Gehirns gegenüber anderen Organen des Körpers ab und führen in ihrer Konsequenz zu einer Sonderstellung des Eisenstoffwechsels, welche im nachfolgenden erläutert werden.

Die Sonderstellung des Eisenstoffwechsels des Gehirns begründet sich primär mit der Existenz der so genannten Blut-Hirnschranke (engl.: *Blood-Brain-Barrier*; BBB), welche eine physikalische und metabolische Barriere darstellt (Zlokovic 2008). Diese Barriere verhindert den ungestörten Austausch von im Blutserum gelösten oder suspendierten Stoffen (wie z.B. exzitatorische Aminosäuren) mit den Zellen des Gehirns (Demeuse *et al.* 2002; Visser *et al.* 2004; Ponka 2004).

Im Gegensatz zu den peripheren Organen existieren zwischen den Endothelzellen der Blutkapillaren des Gehirns keine Zwischenräume oder feine Öffnungen (Fenestrisierung; Rubin und Staddon 1999; Visser *et al.* 2004). Im Wesentlichen bilden also die festen Zell-Zellverbindungen zwischen den Endothelzellen der Blutkapillaren des Gehirns die BBB (Kuffler und Nicholls 1966). Vermittelt werden die festen Zell-Zellverbindungen zwischen

den Endothelzellen des Gehirns durch so genannte ‚tight junctions‘ (Demeuse *et al.* 2002; Nedergaard *et al.* 2003; Visser *et al.* 2004).

Die Kapillaren des Gehirns sind abluminal zu ~99 % von den Endfüßen der Astrogliazellen bedeckt (Rubin und Staddon 1999; Kandel *et al.* 2000; Simard *et al.* 2003; Bauer *et al.* 2005; Haseloff *et al.* 2005). Die sternförmigen Astrogliazellen fördern durch Ausschüttung von Botenstoffen die Aufrechterhaltung der BBB und stehen in einem engen Kontakt zu Neuronen (Wolburg *et al.* 1994; Abbott 2002; Demeuse *et al.* 2002; Nedergaard *et al.* 2003; Benarroch 2005; Barres 2008).

**Tab. 1.2: Inhaltsstoffe des CSF und des Blutserum mit Relevanz für den Eisenstoffwechsel**

Inhaltsstoff	Konzentration im	
	Blutserum	CSF
<b>Albumin</b>	700 µM	2.5 µM
<b>Ascorbat</b>	25 µM	78 µM
<b>Citrat</b>	90 µM	175 µM
<b>Ceruloplasmin</b>	1.6-3.4 µM	5.8-6.8 nM
<b>Eisen</b>		
> niedermolekulares	9-30 µM	0.4-1.2 µM
> freies	Nicht nachweisbar	0.01-0.1 µM
<b>Ferritin</b>	300-700 pM	6.67 pM
<b>Lactoferrin</b>	5-16 nM	0.075 nM
<b>Transferrin</b>	25 µM	0.21-0.28 µM

Modifiziert nach Gaasch *et al.* 2007

Wie bereits in Kapitel 1.2.1 erläutert ist aufgrund ihrer Positionierung anzunehmen, dass die Aufnahme von Stoffwechselprodukten bzw. Spurenelementen in das Gehirn primär über die Passage der Astrogliazellen stattfindet (Allen und Barres 2009; Barreto *et al.* 2011). Die Existenz der BBB ermöglicht die Aufrechterhaltung eines substanziellen Gradienten zwischen dem Blutplasma und dem CSF (Gaasch *et al.* 2007). Beispielsweise findet sich im Plasma ca. 280-fach mehr Albumin und im CSF ein um ca. 2- bis 3-fach erhöhter Ascorbat- bzw. Citratgehalt (Gaasch *et al.* 2007). Auch der Gehalt löslicher Proteine des Eisenstoffwechsels (Tf oder Ferritin) im CSF unterscheidet sich wesentlich zu dem des Blutplasmas (Tab. 1.2).



#### 1.2.4 Der Eisenmetabolismus von Astrocyten

Die sternförmigen Astrocyten stehen über ihre Zellfortsätze sowohl im engen Kontakt zu den Synapsen der Neuronen als auch zu den Endothelzellen der Blutgefäße des Gehirns und bedecken die Blut-Hirnschranke mit ihren Endfüßen abluminal zu ~99 % (Simard *et al.* 2003; Allen und Barres 2009). Die astroglialen Endfüße verhindern die freie Diffusion von gelösten Stoffen, die über die Blut-Hirnschranke ins Gehirn gelangen und schirmen so andere Zelltypen des Gehirns gegenüber toxischen Fremdstoffen wie etwa Quecksilber oder Blei ab (Nedergaard *et al.* 2003; Hamm *et al.* 2004). Außerdem versorgen Astrocyten die Zellen des Gehirns – insbesondere die Neuronen – mit Nährstoffen und Metaboliten (Pellerin *et al.* 2007; Castro *et al.* 2009; Magistretti 2009, 2011). Der Transfer von Eisen über die Blut-Hirnschranke unterliegt ebenso wie der Transfer anderer Metaboliten einer strengen Regulation und verläuft über spezifische Transportmechanismen (Rouault und Cooperman 2006).

*In vitro* kultivierte Astrocyten bilden den Rezeptor TfR1 aus und sind in der Lage Tf-gebundenes Eisen zu akkumulieren (Swaiman und Machen 1986; Qian *et al.* 1999, 2000; Hoepken *et al.* 2004). Im Gegensatz hierzu ist die Expression des TfR1 *in vivo* für Astrocyten nicht nachzuweisen (Moos *et al.* 1999; Jeong und David 2006). Der Eisenaufnahmeweg für Astrocyten im Gehirn scheint daher Tf-unabhängig zu sein. Kultivierte Astrocyten sind in der Lage nicht-Tf-gebundenes Eisen aus verschiedensten Eisenquellen wie Eisenchlorid, FAC oder Eisennitrioltriacetat (Fe-NTA) zu akkumulieren. Die Eisenaufnahmegeschwindigkeit hängt dabei stark von der Konzentration sowie dem Redoxstatus des Eisens bzw. den Kultivierungsbedingungen ab (Swaiman und Machen 1985; Takeda *et al.* 1998; Jeong und David 2003; Hoepken *et al.* 2004). Insbesondere nach Gabe von FAC als Eisenquelle ist bei kultivierten Astrocyten eine erstaunlich Zunahme des spezifischen zellulären Eisengehaltes um den Faktor 30 innerhalb von 24 h zu verzeichnen (Riemer *et al.* 2004). Anscheinend ist der Eisencitrat-Komplex des FAC besonders geeignet für die zelluläre Aufnahme.

Der divalente Metalltransporter DMT1 – der unter anderem Ferro-Eisen transportiert – wird sowohl *in vivo* als auch *in vitro* von Astrocyten exprimiert (Burdo *et al.* 2001; Jeong und David 2003; Erikson und Aschner 2006). Darüber hinaus weisen Astrocyten *in vivo* eine Polarisation der Expression von DMT1 auf. So ist DMT1 nur auf astroglialen Endfüßen, die im Kontakt zu Blutgefäßen stehen, nachzuweisen (Burdo *et al.* 2001; Wang *et al.* 2001). Des Weiteren bilden Astrocyten weitere Transporter oder Anion-Kanäle wie z.B. L-Typ-Calcium-Kanäle (LTCCs) oder TRPC6 (,Transienter-Rezeptor-potentialer-Kationkanal 6') aus, die

Ferro-Eisen über die Zellmembran transportieren können (Latour *et al.* 2003; Beskina *et al.* 2007). Weiterhin ist zumindest auf mRNA-Ebene die Expression des Zip14 Transporters – der ebenfalls Tf-ungebundenes Eisen transportiert (Liuzzi *et al.* 2006) – für kultivierte Astrocyten belegt (Bishop *et al.* 2010). Es erscheint deshalb wahrscheinlich, dass niedermolekulares Eisen das über die Endothelzellen der Blut-Hirnschranke in das Gehirn gelangt (siehe Kapitel 1.2.3), von den sie umschließenden astroglialen Endfüßen via DMT1 oder anderen nicht-Tf-abhängige Eisentransportern aufgenommen wird.

Da die genannten Tf-unabhängigen Eisentransporter *unisono* Ferro-Eisentransporter sind und bei physiologischen pH-Werten Ferro-Eisen umgehend zu Ferri-Eisen oxidiert (Schröder *et al.* 2003), müssen Astrocyten entweder Ferrireduktasen auf der Zelloberfläche besitzen oder Substanzen sezernieren, die die Oxidation von Ferro-Eisen verhindern. Tulpule und Kollegen (2010) konnten für kultivierte Ratten-Astrocyten Ferrireduktase-mRNA von Dcytb und SDR2 sowie extrazelluläre Eisenreduktionsaktivität nachweisen. Des Weiteren konnte die Expression von SDR2 auf Ependymzellen des murinen Gehirns festgestellt werden (Vargas *et al.* 2003). In der extrazellulären Flüssigkeit der Gehirnzellen sowie in der CSF ist nicht-Tf-gebundenes niedermolekulares Eisen nachzuweisen (Bradbury 1997). Es wird angenommen, dass dieses Ferri-Eisen durch Moleküle wie Citrat, ATP oder Ascorbat chelatiert bzw. reduziert wird (Moos *et al.* 2007; Lane *et al.* 2010). Es ist außerdem bekannt, dass Astrocyten sowie andere Zellen des Gehirns eben diese genannten Moleküle exportieren können (Sonnewald *et al.* 1991; Guthrie *et al.* 1999; Montana *et al.* 2006). Insbesondere die hohe Konzentration an Ascorbat im extrazellulären Milieu des Gehirns (~78 µM Ascorbat in CSF; Gaasch *et al.* 2007) legt die Vermutung nahe, dass die Expression einer Ferrireduktase keine notwendige Voraussetzung für die Aufnahme von nicht-Tf-gebundenen Eisen durch Astrocyten darstellt.

Im Gehirn erfolgt die Speicherung von Eisen, wie in der Peripherie, hauptsächlich in Ferritin. Mindestens ein Drittel des gesamten Eisens des Gehirns ist in Ferritin gespeichert (Morris *et al.* 1992; Koeppen 1995; Bradbury 1997; Gaasch *et al.* 2007). Im adulten Gehirn sind Astrocyten nur selten mit Eisen beladen und daher auch weitestgehend ferritinfrei, allerdings können Astrocyten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Ferritin exprimieren (Connor *et al.* 1990; Benkovic und Connor 1993; Hoepken *et al.* 2004). Darüber hinaus ist der basale Eisengehalt kultivierter Astrocyten relativ gering (ca. 10 nmol/mg Zellprotein; Hoepken *et al.* 2004; Riemer *et al.* 2004). Dies spricht für die Hypothese, dass Astrocyten wesentlich für die

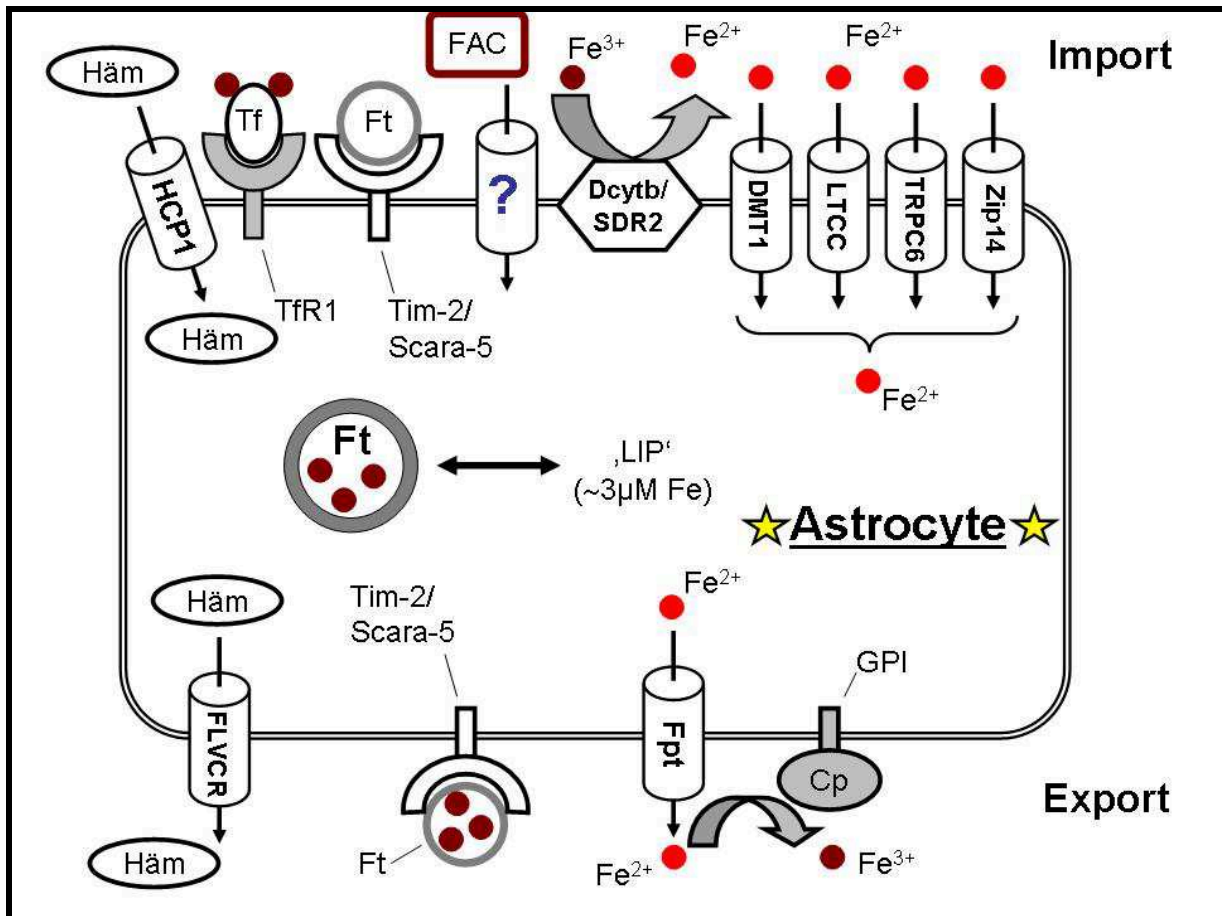
Verteilung von Eisen im Gehirn und im Geringeren für die Eisenspeicherung verantwortlich sind. Der Gehalt an Ferritin in kultivierten Astrocyten lässt sich jedoch innerhalb weniger Stunden durch die Gabe von extrazellulärem FAC, Hämoglobin, Hämin oder Ferro-Sulfaten stark erhöhen (Papadopoulos *et al.* 1998; Regan *et al.* 2002; Hoepken *et al.* 2004). Außer durch Eisengabe, lässt sich die astrogliale Ferritinexpression auch durch hypoxische Kultivierungsbedingungen, der Reoxygenierung nach ischämischem Infarkt sowie durch die Überexpression des ‚Anti-Apoptoses-Gens‘ *bcl-xL* beeinflussen (Xu *et al.* 1999; Irace *et al.* 2005).

Astrocyten sind in der Lage extrazelluläres ‚eisenfreies‘ Apo-Ferritin durch Rezeptorvermittelte Endocytose aufzunehmen (Regan *et al.* 2002). Die Membranproteine Scara-5 und Tim-2 wurden vor kurzem als Ferritin-Rezeptoren identifiziert (Todorich *et al.* 2009; Li *et al.* 2009), wobei bisher nicht bekannt ist ob diese Rezeptoren von Astrocyten exprimiert werden. Hingegen konnte die Exocytose von Ferritin – bzw. dem lysosomalen Abbauprodukt von Ferritin dem Hämosiderin – bis *dato* für alle untersuchten Säugetier-Zelltypen nachgewiesen werden (Reddy *et al.* 2001). Der Nachweis der lysosomalen Exocytose für Astrocyten steht allerdings ebenfalls noch aus (Mills *et al.* 2010).

Die Biosynthese der HO-1 durch Astrocyten gilt als Indikator für die Involvierung der Astrocyten in den Häm-Stoffwechsel des Gehirns (Ham und Schipper 2000; Mills *et al.* 2010). Im Gehirn kann Häm in bedeutenden Konzentrationen durch absterbende Zellen oder unter pathologischen Bedingungen durch das Eindringen von Blut ins Gehirn freigesetzt werden (Dringen *et al.* 2007). Kultivierte Astrocyten können Häm effizient akkumulieren (Regan *et al.* 2002; Dang *et al.* 2010). HCP1 bzw. PCFT gilt aber als ein möglicher Häm-Transporter für Astrocyten (Dang *et al.* 2010, 2011).

Hingegen ist bekannt, dass Astrocyten in der Lage sind niedermolekulares Eisen genau wie anderen Zelltypen des Organismus via Ferroportin zu exportieren (Wu *et al.* 2004). Der astrogliale Eisenefflux via Ferroportin ist dabei abhängig von der Gegenwart der Ferroxidaseaktivität des Cp. Astrocyten besitzen auf ihrer Plasmamembran eine GPI-verankerte Form des Cps, das  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert (Patel und David 1997). Die Abhängigkeit des astroglialen Eiseneffluxes ist experimentell durch die Kultivierung von Cp-defizienten murinen Astrocyten belegt (Jeong und David 2003). Im Einklang hiermit steht die Beobachtung, dass

Patienten die unter der Aceruloplasminämie leiden, erhöhte Eisengehalt in den astroglialen Endfüßen entlang der Blut-Hirnschranke aufweisen (Kaneko *et al.* 2002b).



**Abb. 1.6: Der Eisenmetabolismus kultivierter Astrocyten.**

Astrocyten können Eisen – aus verschiedensten Quellen – aufnehmen, speichern und weitergeben. Tf-gebundenes Eisen gelangt per Endocytose via Tf-TfR-Zyklus in kultivierten Astrocyten. Ferro-Eisen – wie etwa Eisensulfat – kann über divalente Metalltransporter oder Anionen-Kanäle (z.B. DMT1, LTCC, TRPC6 oder Zip14) importiert werden. Allerdings müsste das Ferri-Eisen des FACs zunächst durch eine extrazelluläre Ferri-reduktase (z.B. Dcytb oder SDR2) zugänglich für den etwaigen Import via Ferro-Transporter gemacht werden. Des Weiteren sind kultivierte Astrocyten in der Lage gebundenes Eisen in Form von Häm (wahrscheinlich via HCP1) oder Ferritin (Ft) (wahrscheinlich via Tim-2 oder Scara-5 Rezeptor) aufzunehmen. Die Speicherung von niedermolekularem Eisen erfolgt vorwiegend in Ft. Daneben existiert noch ein cytosolischer so genannter ‚Labiler Eisen-Pool‘ (‚LIP‘). Dieses niedermolekulare Eisen (~ 3 µM Fe pro Zellen) wird von Molekülen wie Citrat, ATP oder Ascorbat chelatiert. Außerdem können Astrocyten Ferro-Eisen im Zusammenwirken des Transporters Ferroportin (Fpt) und der Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Ferroxidase Ceruloplasmin (Cp) exportieren. Darüber hinaus ist der Export von gebundenem Eisen via Häm-Exporter FLVCR bzw. die Rezeptor-vermittelte (Tim-2 oder Scara-5) Exocytose von Holo-Ft für Astrocyten nicht auszuschließen (für Referenzen siehe Text).

Wie dargestellt verfügen Astrocyten also über spezifische Eisenaufnahme-, Eisenspeicherungs- und Eisenexportmechanismen. Im Zusammenhang mit der Existenz der Blut-Hirnschranke sowie dem hohen Eisenbedarf anderer Zelltypen des Gehirns (Neuronen und Oligodendrocyten), ist es daher wahrscheinlich, dass Astrocyten eine wichtige

regulatorische Funktion hinsichtlich des Eisenmetabolismus im Gehirn zukommt (Dringen *et al.* 2007; Mills *et al.* 2010).

### 1.2.5 Der Transfer von Eisen aus dem Blutkreislauf zu den Gehirnzellen

Wie bereits erläutert stellt die BBB eine Diffusionsbarriere für im Blutkreislauf gelöstes Eisen dar (Kapitel 1.2.3). Demnach ist für die Aufnahme von Eisen ins Gehirn ein Mechanismus zum Transfer von Eisen über die BBB notwendig. Dieser Weg des Eisens aus dem Blut ins Gehirn beginnt unzweifelhaft an den Endothelzellen der BBB. Die Dichte an TfR auf der luminalen Membran der Endothelzellen ist sehr hoch ( $1 \cdot 10^5$  Rezeptoren pro Endothelzelle des bovinen Gehirns; Raub und Newton 1991). Darüber hinaus ist das gesamte Tf des Blutkreislaufs – unter physiologischen Bedingungen – nur bis zu ~30 % mit Ferro-Eisen gesättigt (Lash und Saleem 1995). Das heißt, dass freies niedermolekulares Eisen im Blutkreislauf unter physiologischen Bedingungen nicht vorkommt (Gaasch *et al.* 2007). Es ist daher davon auszugehen, dass der erste Schritt der Eisenaufnahme ins Gehirn die Transferrin-Rezeptor-vermittelte Endocytose von Tf-gebundenen Eisen darstellt (Gaasch *et al.* 2007). Allerdings wird das Eisen-beladene Holo-Tf nicht direkt an die Zellen des Gehirns weitergeleitet, sondern von den Endothelzellen im Zuge des Tf-TfR1-Zyklus als Apo-Tf wieder an den Blutkreislauf entlassen (Bradbury 1997; Moos und Morgan 1998; Moroo *et al.* 2003; Ponka 2004).

Tf kommt– wie in Tabelle 1.2 aufgeführt – auch im CSF vor, allerdings nur ca. zu einem Hundertstel der Konzentration des Tfs im Blutserum. Auch wenn die Tf-Konzentration des CSF nur als Näherungswert für die tatsächliche Tf-Konzentration in der extrazellulären Flüssigkeit der Gehirnzellen angesehen werden kann. So ist doch davon auszugehen, dass zur Tf-Konzentration im Blutserum ein deutlicher Gradient besteht (Bradbury 1997). Der Ursprung des Tfs im CSF ist vermutlich primär auf die Synthese von Tf durch die Oligodendrocyten des Gehirns zurückzuführen (Bloch *et al.* 1985, 1987; Bradbury 1997; Moos und Morgan 1998). Des Weiteren herrscht im CSF im Gegensatz zum Blut ein molarer Überschuss von Eisenionen gegenüber Tf (Bradbury 1997; Moos und Morgan 1998; Gaasch *et al.* 2007). Hieraus resultiert eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass nicht Tf-gebundenes Eisen im CSF vorliegt. Neuronen weisen *in vivo* im adulten Gehirn Tf-Rezeptoren auf, Gliazellen hingegen nicht (Moos 1996; Moos *et al.* 1999; Jeong und David 2006). Es ist deshalb anzunehmen, dass Tf-ungebundenes Eisen im CSF relevant für die Eisenaufnahme von Gliazellen ist. Zumal für Astrogliazellen bereits demonstriert wurde, dass sie Tf-

ungebundenes Eisen aufnehmen können (Oshiro *et al.* 1998; Takeda *et al.* 1998; Jeong und David 2003)

Der Eisenexporter Ferroportin kommt in sämtlichen Gehirnarealen vor, die Expressionsdichte des Ferroportin ist insbesondere im Bereich um die Blutkapillaren stark erhöht (Wu *et al.* 2004; Gaasch *et al.* 2007). Sowohl die Endothelzellen der Blut-Hirnschranke als auch Astrocyten, Neuronen und Oligodendrocyten exprimieren *in vivo* Ferroportin (Wu *et al.* 2004). Es ist davon auszugehen, dass niedermolekulares  $\text{Fe}^{3+}$  über die Passage der Endothelzellen der BBB sowie den sie umgebenden Astrocyten die weiteren Zelltypen des Gehirns erreicht. Die Weitergabe des Eisens als  $\text{Fe}^{3+}$  durch die Astrocyten erscheint als wahrscheinlich, da kultivierte Astrocyten niedermolekulares Eisen nur in Gegenwart der Ferroxidase Cp exportieren können (Jeong und David 2003). Hingegen ist der zelluläre Mechanismus der Tf-unabhängigen Eisenaufnahme von Astrocyten bisher unklar, auch wenn von manchen Autoren eine Aufnahme durch DMT1 postuliert wird (Mills *et al.* 2010). Zwar konnte bereits die Existenz des  $\text{Fe}^{2+}$  Transporters DMT1 auf der Membran von Astrocyten-Endfüßen gezeigt werden (Burdo *et al.* 2001; Wang *et al.* 2001). Doch kann dies nicht als Beweis einer *in vivo* DMT1-vermittelte Eisenaufnahme angesehen werden. Da auch andere Mechanismen der Tf-unabhängigen Eisenaufnahme denkbar sind, wie beispielsweise ein Transport von Eisen über Anionen-Kanäle (LTCCs), oder anderen Metalltransportern wie Zip14 oder TRPC6 (siehe hierzu auch Kapitel 1.2.4). Zusätzlich weisen einige Studien zur Tf-unabhängigen Eisenakkumulation auf eine Abhängigkeit von der Calciumkonzentration hin (Kaplan *et al.* 1991; Musilkova und Kovar 2001; Oudit *et al.* 2006).

Grundsätzlich bleibt also festzuhalten, dass sich die Eisenaufnahme des Gehirns im Vergleich zu der Peripherie unterscheidet. Dies manifestiert sich letztlich auch in den Beobachtungen von Krankheitsverläufen bei denen eine Störung des Eisenstoffwechsels vorliegt. Ein Beispiel hierfür ist die Hämochromatose, bei der eine generelle Eisenüberladung des Körpers einhergeht mit einer erhöhten Eisenkonzentration im Blutplasma. Der Eisengehalt des Gehirns bleibt hingegen nahezu unverändert (Andrews 2000; Moos *et al.* 2000). Darüber hinaus ist aus Tierexperimenten bekannt, dass sich eine Eisenmangelernährung weit weniger drastisch auf den Eisengehalt des Gehirns als auf den Eisengehalt der Peripherie auswirkt (Dallman *et al.* 1975; Bradbury 1997), obwohl das Gehirn nach der Leber den zweithöchsten Eisenbedarf hat (Bradbury 1997; Gaasch *et al.* 2007). Die *Substantia nigra* und der *Globus pallidus* weisen lokale Eisengehalte von 3.3 bis 3.8 mM Eisen auf, die sogar über den

Eisengehalten der Leber liegen (Hallgren und Sourander 1958; Schenck und Zimmerman 2004).

Der erhöhte Eisenbedarf des Gehirns begründet sich primär mit der hohen oxidativen metabolischen Aktivität neuronaler Zellen (Bradbury 1997; Beal 1998; Moos und Morgan 2004). So setzt das Gehirn 20 % des aufgenommenen Sauerstoffs um, obwohl es nur 2 % der Körpermasse ausmacht (Clarke und Sokoloff 1999; Dringen 2000). Neuronen benötigen Eisen als Co-Faktor unter anderem zur Energiegewinnung und zur Synthese von Neurotransmittern (Youdim *et al.* 1990; Moos und Morgan 2004; Gaasch *et al.* 2007; siehe auch Tab. 1.3).

**Tab. 1.3: Die Rolle von Eisen in Entwicklung und Funktionalität des Gehirns**

---

Physiologische Funktionen des Eisens im Gehirn

---

Embryonale Neuronen-Entwicklung

- Cofaktor der Ribonukleotidreduktase

Myelin-Bildung

Neurotransmitter-Synthese und Metabolismus

- Serotonin
- Dopamin
- Noradrenalin
- $\gamma$ -Aminobutansäure (GABA)

Oxidative Phosphorylierung / ATP-Synthese

- Cofaktor der Cytochrome a, b, c  
und Cytochromoxidase
- 

Modifiziert nach Gaasch *et al.* 2007

Im Gehirn erfolgt die Speicherung von Eisen wie in der Peripherie hauptsächlich in Ferritin. Mindestens ein Drittel des gesamten Eisens des Gehirns ist in Ferritin gespeichert (Morris *et al.* 1992; Koeppen 1995; Bradbury 1997; Gaasch *et al.* 2007). Allerdings unterscheidet sich das neuronale Ferritin von dem der Peripherie, so besteht neuronales Ferritin zu einem höheren Anteil aus den H-Ferritin-Untereinheiten. Außerdem ist die Speicherkapazität des neuronalen Ferritins mit maximal 1000 bis 2000 Eisenatomen, wesentlich geringer als die des Ferritins der Leber oder der Milz, mit bis zu 4500 Eisenatomen (Fleming und Joshi 1987; Bradbury 1997; Crichton 2001).

Unter den Zelltypen des Gehirns weisen Oligodendrocyten sowohl die höchsten Eisen- als auch Ferritingehalte auf (Gerber und Connor 1989; Gelman *et al.* 1995; Thorburne und Juurlink 1996; Connor *et al.* 2001). Im adulten Gehirn sind Astrocyten und ruhende Microglia nur selten mit Eisen beladen und daher auch weitestgehend Ferritin frei. Allerdings können beide Zelltypen Ferritin exprimieren (Connor *et al.* 1990; Benkovic und Connor 1993; Hoepken *et al.* 2004). In Neuronen kommt Ferritin unter physiologischen Bedingungen nur in einigen wenigen Arealen des Gehirns vor, z.B. *Globus pallidus* und *Interpedunculat nucleus* (Hansen *et al.* 1999). Insbesondere in Gehirnarealen wie der *Substantia nigra pars compacta*, in der akkumuliertes Eisen zu Zellschädigungen führt, verfügen Neuronen über kein Ferritin (Moos *et al.* 2000). Man nimmt an dass Neuronen die über kein Ferritin verfügen überschüssiges Eisen exportieren (Moos und Morgan 2004).

In der Literatur lassen sich einige *in vivo* Studien zum Transfer von radioaktiv markierten Eisen über die BBB finden, die teilweise zu recht unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Die Gründe für diese Unterschiede sind nicht in jedem Fall klar, können ihren Ursprung aber im Alter, Gattung oder Rasse sowie dem Eisenstatus der untersuchten Tiere haben. Allen gemeinsam ist jedoch, dass ein Transfer von Eisen über die BBB festzustellen war, der postnatal größer ist als bei adulten Tieren (Crowe und Morgan 1992; Morris *et al.* 1992; Murphy und Rapoport 1992; Ueda *et al.* 1993; Bradbury 1997).

In der postnatalen Phase akkumuliert Eisen zunächst in den Microgliazellen des Gehirns. Da adulte Microgliazellen nahezu keine Eisendepots aufweisen, wird vermutet, dass im Zuge der Reifung des Gehirns Microgliazellen Eisen an Oligodendrocyten abgeben. Deren Differenzierung von Vorläuferzellen zu Myelin-bildenden Oligodendrocyten wird unter anderem durch die Eisenverfügbarkeit im Gehirn reguliert (Morath und Mayer-Proschel 2001).

Der Eisentransfer über die BBB erreicht postnatal sein Maximum, doch auch das adulte Gehirn nimmt weiterhin Eisen auf. Dies lässt sich einerseits daran ausmachen, dass mit zunehmendem Alter der Eisengehalt des Gehirns ansteigt (Connor *et al.* 1995; Zecca *et al.* 2004). Andererseits zeigen einige wenige vererbte Störungen der Eisenhomöostase, dass auch im adulten Gehirn Eisen akkumulieren kann (siehe nachfolgendes Kapitel 1.2.6).



## **1.2.6 Neurodegenerative Erkrankungen aufgrund von Eisenakkumulationen**

### **1.2.6.1 Aceruloplasminämie**

Die Aceruloplasminämie ist eine autosomale rezessive neurodegenerative Erkrankung bei der es als Folge einer Störung des zellulären Eisenexportes zu massiven Eisenakkumulationen im adulten Gehirn kommt (Harris 2003; Ponka 2004; Moos und Morgan 2004). Diese Störung wird durch multiple Mutationen des für Cp kodierenden Gens hervorgerufen (Yoshida *et al.* 1995; Daimon *et al.* 1995; Harris *et al.* 1996; Okamoto *et al.* 1996; Hellman *et al.* 2002). Ein Funktionsverlust des Cps führt zur Hemmung des zellulären Eisenexports via Ferroportin (Jeong und David 2003). Im Gehirn wird Cp vorwiegend von Astrocyten in einer membranverankerten Form exprimiert (Patel und David 1997). Man nimmt an, dass Neuronen zum Export von Eisen ebenfalls die extrazelluläre astrogliale Ferroxidaseaktivität benötigen (Moos und Morgan 2004).

Die Symptome der Aceruloplasminämie sind Augenlidkrämpfe verbunden mit einer Degeneration der Retina, Diabetes mellitus sowie eine Degeneration von Neuronen und Gliazellen, vorwiegend in den basalen Ganglien und der *Substantia nigra* (Miyajima *et al.* 1987). Diese Symptome gehen zwar einher mit einer generellen Abwesenheit von Cp, hohem Ferritin- sowie niedrigem Eisengehalt im Blutplasma, einer Verminderung der Erythrocytenanzahl (Anämie), sowie einer Eisenüberladung auch in anderen Organen (Morita *et al.* 1995; Andrews 2000; Harris 2003; Ponka 2004). Doch überwiegt im Krankheitsverlauf die Folgen der neuronalen Degeneration. Diese macht sich auf zellulärer Ebene durch eine Zunahme der Lipidperoxidation, einer Schädigung mitochondrialer Enzyme sowie der oxidativen Modifikation des Astrocyten-Markerproteins gliales fibrilläres saures Protein (GFAP) bemerkbar (Miyajima *et al.* 1996; Yoshida *et al.* 2000; Kohno *et al.* 2000; Kaneko *et al.* 2002a). Dies sind Anzeichen für eine Zunahme des oxidativen Stresses im Gehirn. Phänotypisch treten Symptome erst im fortgeschrittenen Alter (> 50 Jahre) auf (Miyajima *et al.* 1987; Harris 2003). Letztlich kann die Erkrankung der Aceruloplasminämie als Beweis für eine Eisenaufnahme des adulten Gehirns angesehen werden.

### **1.2.6.2 Neuroferritinopathie**

Ähnlich wie bei der Aceruloplasminämie, kommt es auch bei der Neuroferritinopathie zu einer Degeneration von Neuronen und Gliazellen, hervorgerufen durch die Toxizität von zellulären Eisenakkumulationen in zahlreichen Bereichen des Gehirns (Ponka 2004; Moos und Morgan 2004). Symptome dieser Erkrankung machen sich ebenfalls erst im

fortgeschrittenen Alter (> 40 Jahre) bemerkbar (Ponka 2004). Symptome der neuronalen Degeneration sind unfreiwillige sowie unkontrollierte Bewegungsanfälle, die kognitiven Fähigkeiten des Gehirns bleiben allerdings unbeeinträchtigt (Curtis *et al.* 2001). Als Ursache für diese Erkrankung wurde eine Mutation der L-Ferritin-Untereinheit identifiziert, deren Sequenz um 4 Aminosäuren verlängert ist und damit vermutlich zu einer Instabilität des Eisendepotproteins Ferritin führt (Ponka 2004). Man nimmt an, dass hierdurch die Bildung von ROS begünstigt wird (Ponka 2004). Die Gehirne der betroffenen Patienten wiesen abnormale Akkumulationen von Eisen- und Ferritin auf, vorwiegend in den Neuronen des *Globus pallidus*, aber auch im Vorderhirn sowie im Kleinhirn (Curtis *et al.* 2001).

### **1.2.6.3 Pantothenatkinase-assoziierte Neurodegeneration**

Ein genetischer Defekt der mitochondrialen Pantothenatkinase 2 (PANK2) ist die Ursache einer seltenen, autosomalen, rezessiven Erkrankung, der so genannten Pantothenatkinase-assoziierten Neurodegeneration (PKAN), vormals als Hallervorden-Spatz-Syndrom bekannt (Zhou *et al.* 2001; Johnson *et al.* 2004). Bei der PKAN kommt es in Folge einer Störung des Coenzym A-Metabolismus zu einer massiven Erhöhung des Eisengehaltes insbesondere im *Globus pallidus* und der Substantia nigra. Eisenakkumulationen außerhalb des Gehirns werden bei dieser Erkrankung nicht beobachtet (Ponka 2004; Gregory und Hayflick 2005).

Die Pantothenatkinase ist das regulatorisch limitierende Enzym in der Biosynthese von Coenzym A (CoA). CoA wiederum wird unter anderem im zellulären Energiemetabolismus, der Fettsäure-Synthese sowie dem Neurotransmitter- und dem Glutathionmetabolismus benötigt (Gregory und Hayflick 2005). Das Produkt der durch PANK2 katalysierten Reaktion ist Phosphopantothenat. In den Mitochondrien des Gehirns kondensiert Phosphopantothenat mit Cystein. Bei einem Defekt der PANK2 findet diese Reaktion nicht statt, als Folge dessen kann es zur Akkumulation von cysteinhaltigen Nebenprodukten der CoA-Biosynthese – wie N-Pantothenoyl-Cystein und Pantethein – im Gehirn kommen (Hayflick 2003; Ponka 2004; Gregory und Hayflick 2005). Tatsächlich konnte bei PKAN-Patienten im *Globus pallidus* erhöhte Cysteingehalte festgestellt werden (Perry *et al.* 1985).

Da eine verminderte CoA-Synthese vielfältige Auswirkungen auf den zellulären Stoffwechsel hat, ist bisher nicht geklärt welches die primäre Ursache der PKAN-Erkrankung darstellt und welches sekundäre Erscheinungen dieser Erkrankung sind (Gregory und Hayflick 2005, Leoni *et al.* 2011). Es ist allerdings bekannt, dass Cystein Eisen-chelatierende Wirkung besitzt und

in dessen Gegenwart oxidiert wird. Die durch Eisen vermittelte Autooxidation des Cysteins kann wiederum zur Produktion von freien Radikalen führen (Yoon *et al.* 2000). Insbesondere in Gehirnarealen mit einem erhöhten Eisengehalt kommt es tatsächlich zu massiven Zellschädigungen. Darüber hinaus sind auch Areale wie die Retina betroffen, die besonders sensitiv auf einen erhöhten oxidativen Stress reagieren (Gregory und Hayflick 2005).

Die ersten Symptome der PKAN äußern sich im Laufe der ersten zwei Lebensdekaden unter anderem in einem gestörten Bewegungsablauf, Steifheit, Störung des Spannungszustandes der Muskulatur, Demenz sowie den Verlust des Augenlichtes. Da die Erkrankung in der Regel progressiv verläuft, erreichen PKAN-Patienten selten das 30igste Lebensjahr (Andrews 2000; Ponka 2004).

### 1.3 Aufgabenstellung

Kultivierte Astrocyten sind in der Lage, nicht Tf-gebundenes Eisen aus verschiedensten Eisenquellen wie Eisenchlorid, FAC oder Fe-NTA, zu akkumulieren (Takeda *et al.* 1998; Oshiro *et al.* 1998, 2000; Qian *et al.* 2000; Jeong und David 2003; Hoepken *et al.* 2004; Riemer *et al.* 2004; Bishop *et al.* 2010, 2011; Keenan *et al.* 2010; Tulpule *et al.* 2010; Lane *et al.* 2010). Insbesondere sticht hierbei die astrogliale Eisenakkumulation nach Gabe von FAC als Eisenquelle hervor, bei der eine Zunahme des spezifischen zellulären Eisengehaltes von kultivierten Astrocyten um den Faktor 30 innerhalb von 24 h zu verzeichnen war (Riemer *et al.* 2004). Es ist daher anzunehmen, dass der Eisencitrat-Komplex des FAC besonders geeignet für die astrogliale Eisenaufnahme ist.

Ziel der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ist deshalb die Charakterisierung der Eisenakkumulation von Astroglia-reichen Primärkulturen nach Gabe von Eisen als FAC. Zur Charakterisierung der Eisenakkumulation soll der Eisengehalt Astroglia-reicher Primärkulturen nach der Gabe von FAC durch einen colorimetrischen Test quantifiziert und Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Eisenakkumulation bestimmt werden. Um eine Beeinträchtigung der Eisenakkumulation durch toxische Nebenwirkung auszuschließen, soll parallel die zelluläre Vitalität durch Messung der Lactat-Dehydrogenase-Freisetzung (LDH-Freisetzung) bestimmt werden. Die LDH ist ein cytosolisches Enzym welches nur von Zellen freigesetzt wird, wenn die Integrität der Zellmembran gestört ist. Extrazelluläre LDH-Aktivität kann als Indikator für eine verminderte Vitalität der behandelten Zellkultur angesehen werden.

Darüber hinaus soll der Einfluss des Inkubationsmediums auf die Eisenakkumulation untersucht werden. Insbesondere sollen potentielle Einflüsse der Inkubationsmedien (,offenes Bicarbonat-/CO<sub>2</sub>-abhängigen Puffersystem' bzw. ,geschlossenes Puffersystems') untersucht werden. Im Anschluss hieran soll der Einfluss der Temperatur auf die Eisenakkumulation untersucht werden um der Frage nachzugehen ob es sich bei der durch Riemer und Kollegen (2004) beobachteten Eisenakkumulation um zelluläre Eisenaufnahme oder um Anhaftungen von Eisen an den Zelloberflächen handelt.

Des Weiteren sollen geeignete Versuchsbedingungen gefunden werden, die Rückschlüsse auf den Mechanismus der zellulären Eisenaufnahme zulassen. Hierzu soll zunächst der Einfluss des pH-Wertes sowie der Reduktionskapazität des Mediums auf die Eisenakkumulation

untersucht werden. Außerdem sollen spezifische Eisenchelatoren ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -Chelatoren) genutzt werden, um Erkenntnisse über den Oxidationsstatus des transportierten Eisens zu erhalten. Außerdem soll die Abhängigkeit der Eisenakkumulation von der Gegenwart eines molaren Überschusses an Citrat bzw. Isocitrat untersucht werden. Des Weiteren soll – nach erfolgter Charakterisierung des potentiellen zellulären Mechanismus der Eisenaufnahme – über die Wahl geeigneter Inhibitoren der Eisenaufnahmeweg in Astrocyten eingegrenzt bzw. wenn möglich identifiziert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien und Chemikalien	Bezugsquelle, Ort
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
<i>tri</i> -Ammoniumcitrat	Riedel-de-Haan, Seelze
<i>L</i> -Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Calciumchlorid, Dihydrat	Merck, Darmstadt
Chloroquin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chlorpromazin, hydrochlorid (CPZ)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Cholinchlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Citrat-Lyase (CL)	Roche, Mannheim
Cytochalasin D	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
4',6-Diamindino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Deferoxamin-Mesylat (DFX)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DPX-Mounting-Medium	Riedel-de-Haan, Seelze
Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium (DMEM)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe
Eisen(III)ammoniumcitrat (FAC)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Eisen(III)chlorid, Hexahydrat	Riedel-de-Haan, Seelze
Ferrozin (3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazin-4'-4''-disulfonsäure, Natriumsalz)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Folin-Ciocalteaus-Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	BioChrom, Berlin
$\alpha$ -D-Glucose	Serva, Heidelberg
Glycin	Riedel-de-Haan, Seelze
Hepes (N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
<i>D</i> -Isocitrat, <i>tri</i> -Natriumhydrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Riedel-de-Haan, Seelze
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
<i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumnatriumtartrat, Tetrahydrat	Merck, Darmstadt
Kaliumpermanganat	Acros Organics, Geel (Belgien)
Lactat-Dehydrogenase (LDH)	Roche, Mannheim
Magnesiumchlorid, Hexahydrat	Riedel-de-Haan, Seelze
Malat-Dehydrogenase (MDH)	Roche, Mannheim
<i>tri</i> -Natriumcitrat	Fluka, Buchs (Schweiz)
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt

Reagenzien und Chemikalien	Bezugsquelle, Ort
Natriumhydroxid	Fluka, Buchs (Schweiz)
Natriumpyruvat	Merck, Darmstadt
Neocuproin (2,9-Dimethyl-1-10-phenanthrolin)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Nigrosin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Penicillin / Streptomycin-Lösung	BioChrom AG, Berlin
Polyclonaler Kaninchen-Anti-GFAP-Antikörper	Dianova, Hamburg
Polyclonaler Anti-Kaninchen IgG Cy2 Antikörper	Dianova, Hamburg
Rinderserumalbumin (RSA)	AppliChem, Darmstadt
Saccharose	Acros Organics, Geel (Belgien)
Salzsäure, 37 %	Fisher Scientific, Schwerte
(Apo-)Transferrin, bovin	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)amminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triton X-100	Fluka, Buchs (Schweiz)
Triethanolaminhydrochlorid (TEA)	Merck, Darmstadt
Ziegenserum	Dako Cytomation, Glostrop
Zinkchlorid	Riedle-de-Haen, Seelze

### 2.1.2 Geräte

Geräte	Typbezeichnung	Hersteller
Autoclav	FV A/3,2666EC	Fedegarni Autoclavi S.P.A. Albiezarro (Italien)
Eismaschine	AF100	Scotsman, Vernon Hills (USA)
Fluoreszenzmikroskop	Eclipse TS2000U	Nikon, Düsseldorf
Haemocytometer	Neubauer	Brand, Wertheim
Hybridisierungsöfen	Mini Hybridisation Oven	Appligen, Illkirch (Frankreich)
Inkubator	MCO 18A10	Sanyo, Osaka (Japan)
Magnetrührer	IKA Combimag RCT	Jürgens, Bremen
Microtiterplattenphotometer	Sunrise-Basic	Tecan, Grödig
Phasenkontrastmikroskop	Eclipse T100	Nikon, Düsseldorf
pH-Meter	Inolab pH 720	WTW, Weilheim
Reinstwasseranlage	Ultra Clear UV Plus	SG Wasseraufbereitung, Barsbüttel

Geräte	Typbezeichnung	Hersteller
Pipettoren	Research	Eppendorf, Hamburg
	Multipette pro	Eppendorf, Hamburg
	Multipette stream	Eppendorf, Hamburg
	Proline 1200	Biohit, Helsinki (Finnland)
	ePet	Biohit, Helsinki (Finnland)
	Accu-Jet Pro	Brand, Wertheim
Schüttler	Unimax 1010	Heidolph, Schwalbach
Sterile Werkbank	HeraSafe	Thermo Scientific Langenselbold
Vortex-Mischer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Toronto (Kanada)
Waage	CP225D	Satorius, Göttingen
	440-35N	Kern, Balingen-Frommern
Wasserbäder	EIZU	Dinkelberg Analytics, Gablingen
	GFL	Jürgens, Bremen
Zentrifuge	Mini Spin	Eppendorf, Hamburg
	Multifuge 1S-R	Haereus, Hanau

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle, Ort
Deckgläser	Omnilab, Bremen
Einmal Sterilfilter	Milipore, Billerica (Massachusetts, USA)
Nylonnetzte	Sefar, Wasserburg (Schweiz)
Plastikwaren	Nerbe, Winsen
	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen	Braun, Kronberg
Steriles Zellkulturmaterial	Nunc, Roskilde (Dänemark)
Sterilfilter 0.2 µm	Renner, Darmstadt



## 2.1.4 Verwendete Puffer und Medien

<b>Puffer / Medium</b>	<b>Chemikalie</b>	<b>Konz. / Menge</b>
<b>Kulturmedium</b> (DMEM + FCS)	DMEM	90 %
	FCS	10 %
	Natriumhydrogencarbonat	44.6 mM
	Natriumpyruvat	1.0 mM
	Penicillin G	20 U/ml
	Streptomycin	20 µg/ml
	pH 7.4 bei 10 % CO <sub>2</sub>	
<b>Vollmedium</b> (DMEM)	DMEM	90 %
	Natriumhydrogencarbonat	44.6 mM
	Natriumpyruvat	1.0 mM
	Penicillin G	20 U/ml
	Streptomycin	20 µg/ml
	pH 7.4 bei 10 % CO <sub>2</sub>	
<b>Minimal-Medium</b> (MM)	Natriumchlorid	109.5 mM
	Natriumhydrogencarbonat	44.0 mM
	Glucose	5.0 mM
	Kaliumchlorid	5.4 mM
	Calciumchlorid, Dihydrat	1.8 mM
	Magnesiumchlorid, Hexahydrat	1.0 mM
	<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat	0.8 mM
	pH 7.4 bei 10 % CO <sub>2</sub>	
<b>Inkubationspuffer-Hepes</b> (Ip-Hepes)	Natriumchlorid	145.0 mM
	Hepes	20.0 mM
	Glucose	5.0 mM
	Kaliumchlorid	5.4 mM
	Calciumchlorid, Dihydrat	1.8 mM
	Magnesiumchlorid, Hexahydrat	1.0 mM
	<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat	0.8 mM
	pH 7.4; eingestellt mit NaOH (bei angegebener Inkubationstemperatur)	

<b>Puffer / Medium</b>	<b>Chemikalie</b>	<b>Konz. / Menge</b>
<b>Puck's D1-Medium</b>	Natriumchlorid	137.0 mM
	Saccharose	58.4 mM
	Glucose	5.0 mM
	Kaliumchlorid	5.4 mM
	Kaliumdihydrogenphosphat	0.22 mM
	<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat	0.17 mM
	Penicillin G	200 U/ml
	Streptomycinsulfat	200 µg/ml
	pH 7.4; eingestellt mit NaOH	
<b>LDH-Puffer</b>	Natriumchlorid	200.0 mM
	Tris	80.0 mM
	pH 7.2; eingestellt mit HCl	
<b>Phosphatgepufferte Saline (PBS)</b>	Natriumchlorid	150.0 mM
	<i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat	7.8 mM
	Kaliumdihydrogenphosphat	2.2 mM
	pH 7.4; eingestellt mit NaOH	
<b>Lowry-Reaktionsmischung</b>	2 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in 0.1 M NaOH	100 Aliquote
	1 % CuSO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O	1 Aliquote
	2 % NaK-Tartrat in H <sub>2</sub> O	1 Aliquote

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Astroglia-reiche Primärzellkulturen

Astroglia-reiche Primärzellkulturen wurden wie von Hamprecht und Löffler (1985) beschrieben aus Gehirnen postnataler Wistar-Ratten innerhalb von 24 h nach der Geburt angelegt und kultiviert. Hierzu wurden nach Dekapitierung der Tier die Gehirne in 20 ml gekühltem Puck's D1-Medium gesammelt. Der mechanische Aufbruch der Gewebstrukturen sowie die Vereinzelung der Zellen erfolgte durch das Passieren der Gehirne durch sterile Nylonnetze (Maschenweite 210 und 132  $\mu\text{m}$ ), aufgefangen in je 10 ml Puck's D1-Medium. Nach Zentrifugation der Zellsuspension bei 400xg für 5 Minuten bei 4 °C, wurden das Zellpellet in 200 ml Kulturmedium (DMEM + 10 % FCS) resuspendiert. Die Bestimmung der Anzahl an lebensfähigen Zellen erfolgte mittels Nigrosinausschluss (Kaltenbach *et al.* 1958). Zur Aussaat wurde die Zelldichte für 24-well-Zellkulturplatten auf 300 000 lebende Zellen in 1 ml Kulturmedium pro well eingestellt. Zur Erhaltung der Kulturen wurde das Medium alle 7 Tage erneuert. Zur Durchführung der experimentellen Untersuchungen wurden in der vorliegenden Arbeit sofern nicht anders angegeben, konfluente Kulturen im Alter von 14 bis 21 Tagen, für immuncytochemische Anfärbungen nicht konfluente Kulturen im Alter von 8-14 Tagen, verwendet.

### 2.2.2 Immuncytochemische Anfärbung

Zur Charakterisierung der gewonnenen Primärkulturen wurde eine immuncytochemische Färbung mit Antikörpern gegen das Astrocyten-Markerprotein GFAP (Ghandour *et al.* 1980) durchgeführt. Zur spezifischen Anfärbung der APKs gegen das GFAP wird die Bindung eines sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörpers an den primären polyclonalen Kaninchen-Anti-GFAP-Antikörper ausgenutzt. Zur Visualisierung der Zellkerne erfolgte eine Färbung mit 4',6-Diamino-2-phenylindol (DAPI).

Die Zellen wurden für die immuncytochemische Anfärbung in wells von 24-well-Zellkulturplatten für 8-14 Tagen kultiviert. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Zellen zur Entfernung von überschüssigen Substanzen oder ungebundenen Antikörpern jeweils dreimal für 5 min mit 1 ml PBS bei RT gewaschen. Nach Entfernen des Kulturmediums und zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen mit 400  $\mu\text{l}$  3.5 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS für 10 min fixiert. Anschließend wurde zum Absättigen von freien Aldehydgruppen in 400  $\mu\text{l}$  0.1 % Glycin in PBS für 5 min inkubiert. Sodann erfolgt die Permeabilisierung der Zellmembranen durch eine Inkubation in 400  $\mu\text{l}$  0.3 % Triton X-100 und 0.1 % Glycin in PBS

für 10 Minuten. Die fixierten Zellen wurden nun vorsichtig mit 30 µl des primären Anti-GFAP Antikörper (1: 500 verdünnt in PBS mit 10 % Ziegen Serum) benetzt und lichtgeschützt für 2 h bei RT inkubiert. Nach dem Waschen und Entfernen der ungebundenen primären Antikörper wurden nun 30 µl des sekundären Antikörpers (polyclonal Anti-Kaninchen-IgG-Cy3; 1:1000 verdünnt mit 10 % Ziegen Serum in PBS) auf die Zellen gegeben und im Dunkeln für 30 Minuten bei RT inkubiert. Abschließend wurden die Zellen zur Gegenfärbung der Zellkerne mit 200 µl einer DAPI-Lösung (1 µg/ml in H<sub>2</sub>O) für 3 Minuten bei RT gefärbt. Zur Konservierung wurden die Präparate in DPX-Mounting-Medium eingebettet, bevor die Anfärbung im Fluoreszenzmikroskop untersucht und dokumentiert wurde.

### 2.2.3 Experimentelle Inkubationen

Die experimentellen Inkubationen der vorliegenden Arbeit erfolgten, sofern nicht anders angegeben, mit konfluenten APKs im Kulturalter von 14 bis 21 Tagen. Inkubationsexperimente wurden in Vollmedium (DMEM), Minimal-Medium (MM) oder Inkubationspuffer-Hepes (Ip-Hepes) durchgeführt. Erfolgt die Experimente im offenen, Bicarbonat-gepufferten Systemen (DMEM bzw. MM), wurden die Medien zur Einstellung des pH-Wertes von 7.4 vor ihrer Verwendung über Nacht in Zellinkubator bei 10 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre sowie bei 37 °C und 100 % Wasserdampf-Sättigung equilibriert. Bei Verwendung von geschlossenen Hepes-gepufferten Inkubationssystemen (Ip-Hepes) wurde der pH-Wert bei der angegebenen Inkubationstemperatur mit Natriumhydroxid-Lösung eingestellt. Inkubationen erfolgten sofern nicht anders angegeben bei 37 °C und 100 %iger Wasserdampf-Sättigung je nach Anforderung des Puffersystems in Inkubatoren ohne bzw. mit 10 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

Vor Beginn der Eisenexposition von APKs in *wells* von 24-*well*-Kulturplatten wurden diese zweimal mit je 1 ml des entsprechenden Inkubationsmediums bzw. -puffers gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen unter den angegebenen experimentellen Bedingungen inkubiert. Zur Terminierung der Inkubation wurde die Kulturen auf Eis gestellt und das Inkubationsmedium abgenommen, anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und nach sorgfältiger vollständiger Entfernung des Überstandes bei -20 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

## 2.2.4 Bestimmungsmethoden

### 2.2.4.1 Kolorimetrischer Test zur Bestimmung von Eisen

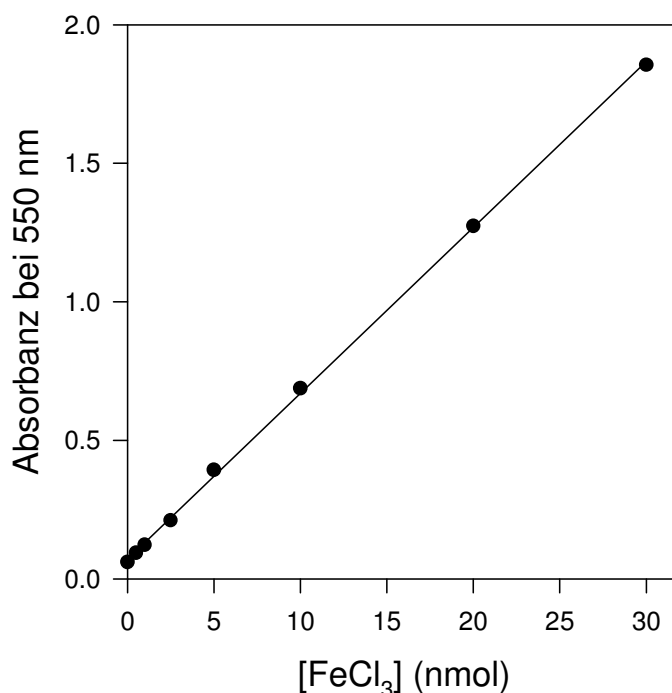
Der kolorimetrische Test beruht auf einer von Fish (1988) beschriebenen Methode und wurde in der Modifikation von Riemer *et al.* (2004) durchgeführt. Der Nachweis von zellulärem Eisen geschieht dabei in zwei Schritten. Eisen wird in einem ersten Schritt durch eine salzsaure Kaliumpermanganat-Lösung aus Komplexen und Proteinen freigesetzt. Diese Freisetzung muss besonders beim Nachweis von zellulären Eisengehalten sichergestellt werden. Im nachfolgenden zweiten Schritt wird sämtliches freigesetztes Eisen durch einen Überschuss an Ascorbat zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert. Ferro-Eisen bindet anschließend spezifisch an den  $\text{Fe}^{2+}$ -Chelator Ferrozin (FZ). Die Absorption des FZ- $\text{Fe}^{2+}$ -Komplexes bei 550 nm wurde zur Eisenquantifizierung genutzt. Zur Vermeidung von falsch positiven Ergebnissen durch die Bindung von Kupfer mit FZ wurde dem Reaktionsgemisch zudem der Kupferchelator Neocuproin beigelegt.

Zur Bestimmung des Eisengehaltes von eingefrorenen Zellen in *wells* von 24-*well*-Zellkulturplatten wurden diese zunächst durch die Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  50 mM NaOH solubilisiert. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  10 mM HCl (Lösungsmittel des verwendeten  $\text{FeCl}_3$ -Standards) erfolgt eine vollständige Freisetzung des Eisens aus Komplexen und Proteinen durch die Oxidation mittels 200  $\mu\text{l}$  Freisetzungsreagenz (1:1 Mischung aus 4.5 % Kaliumpermanganat-Lösung und 1.4 M HCl) bei 60 °C für 2 h. Zur Vermeidung von Volumenverlusten wurden die Kulturplatten mit nassem Papier und Haushaltsfolie umschlossen. Anschließend wurde pro *well* 60  $\mu\text{l}$  des Detektionsreagenz (6.5 mM FZ / 6.55 mM Neocuproin / 2.5 M Ammoniumacetat / 1 M Ascorbat) zu gegeben. Zur Abkühlung der Proben und der vollständigen Entwicklung des FZ-Eisen-Farbkomplexes wurden die Proben für 30 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Die Messung der Absorption bei 550 nm erfolgt nach dem Transfer von je 280  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Probe in eine Microtiterplatte. Zur Quantifizierung des Eisengehaltes diente die Messung der Absorptionen von gleich behandelten Standardmengen an  $\text{Fe}^{3+}$ -Chlorid (0-300  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$ ). Zur Bestimmung des Eisengehaltes von Medien bzw. Inkubationsüberständen wurde ein von der Eisenkonzentration abhängiges Volumen der Probe (Tab. 2.2.1) auf 200  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Zu diesem Ansatz wurden 100  $\mu\text{l}$  Freisetzungsreagenz gegeben und für 2 h bei 60 °C inkubiert. Nachfolgende Zugabe von 30  $\mu\text{l}$  Detektionsreagenz und Inkubation bei RT für 30 min führte zur Entwicklung des FZ- $\text{Fe}^{2+}$ -Komplexes.

**Tab. 2.2.1: Probenvolumen in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration im Medium**

Erwartete Eisenkonzentration im Medium ( $\mu\text{M}$ )	Eingesetztes Probenvolumen ( $\mu\text{l}$ )
$\leq 100$	200
$> 100$	100
$> 200$	50
$> 800$	25

Die zur Quantifizierung der Eisenmengen nötigen Eisenstandards wurden durch Mischen von 100  $\mu\text{l}$  10 mM HCl (mit 0-30 nmol  $\text{FeCl}_3$ ) und 100  $\mu\text{l}$  50 mM NaOH hergestellt. Anschließende Behandlung mit Freisetzungs- und Detektionsreagenz führt auch hier zur Bildung des messbaren FZ- $\text{Fe}^{2+}$ -Komplexes. Abbildung 2.2.1 zeigt exemplarisch die Korrelation zwischen gemessenen Absorbanzen bei 550 nm sowie dem Eisengehalt der verwendeten  $\text{FeCl}_3$ -Standard-Lösungen.

**Abb. 2.2.1: Kalibrierungskurve der Eisenbestimmung**

Absorbanz des  $\text{Fe}^{2+}$ -Ferrozin-Komplexes mit Anstieg der Menge an  $\text{FeCl}_3$  im Probenvolumen. Die Daten zeigen Mittelwert und Standardabweichung eines repräsentativen Experimentes durchgeführt in Triplikaten. Sind keine Standardabweichungen zu erkennen, so sind diese geringer als die Symbole der Mittelwerte. Der Korrelationskoeffizient der linearen Regressionsgerade beträgt  $R^2 = 0.999$ .

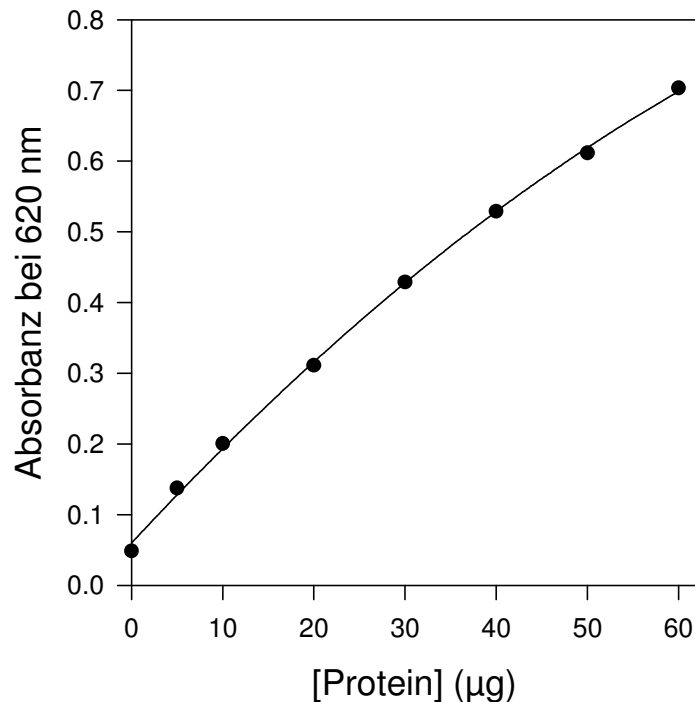
#### 2.2.4.2 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt von Zellkulturen wurde nach der Methode von Lowry *et al.* (1951) bestimmt und basiert auf der Ausbildung eines farbigen blau-violetten Komplexes von Proteinen mit Folin-Ciocalteu-Reagenz, der bei einer Wellenlänge von 620 nm photometrisch gemessen wurde. Die farbgebende Reaktion findet hierbei in zwei Schritten statt.

Der erste Schritt beruht auf der ‚Biuret-Reaktion‘, hierbei bildet sich ein leicht blau-violetter quadratischer Komplex zwischen Peptidbindungen und Kupferionen in alkalischer Lösung aus. Die oxidierende Wirkung des Kupfer-Tartrat-Komplexes, welches dem Reaktionsgemisch beige setzt wurde, begünstigt hierbei die Ausbildung der Kupfer-Protein-Komplexe. In einem zweiten Schritt wird das gelbe Folin-Ciocalteu-Reagenz (Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäure) durch die redoxaktive Wirkung der gebildeten Kupfer-Protein-Komplexe zu Molybdänblau reduziert. Hierdurch ergibt sich eine intensive Blaufärbung des gesamten Reaktionsgemisches in Abhängigkeit des initialen Proteingehaltes der untersuchten Probe.

Zur Untersuchung des Proteingehaltes von eingefrorenen 24-*well*-Zellkulturen wurden diese zunächst mit 200 µl 500 mM NaOH solubilisiert und zur vollständigen Lysis für 2 h auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Zur Vermeidung von Volumenverlusten wurden die Platten mit nassen Papier und Haushaltsfolie umwickelt. Anschließend wurden pro *well* 50 µl des Zelllysates entnommen mit 150 µl H<sub>2</sub>O verdünnt und für exakt 15 min mit jeweils 1 ml der frisch angesetzten Lowry-Reaktionsmischung (siehe Kapitel 2.1.4) bei RT inkubiert.

Für den zweiten Schritt der farbgebenden Reaktion erfolgte nun die Zugabe von 100 µl der Folin-Ciocalteu-Lösung (1:1 Mischung mit H<sub>2</sub>O) zum Reaktionsgemisch. Eine 45-minütige Inkubation bei RT zum Erreichen des Endpunktes der Reaktion der Blaufärbung schließt sich an. Für die Bestimmung der Absorption wurden je 300 µl der untersuchten Probe in eine Microtiterplatte transferiert und bei 620 nm gemessen. Standardlösung von Rinderserumalbumin (RSA) in Konzentrationen von 0-60 µg pro ml H<sub>2</sub>O wurden in gleicher Weise wie die Proben behandelt und zur Kalibrierung bzw. Quantifizierung der Proben-ergebnisse genutzt (siehe Abbildung 2.2.2).



**Abb. 2.2.2: Kalibrierungskurve der Proteinbestimmung**

Absorbanz des Folin-Ciocalteu-Reagenz bei 620 nm mit Anstieg der Menge an Protein (RSA) im Probenansatz. Die Daten zeigen die Mittelwerte eines repräsentativen Experimentes in Doppelbestimmung. Der Korrelationskoeffizient der Regressionskurve beträgt  $R^2 = 0.999$ .

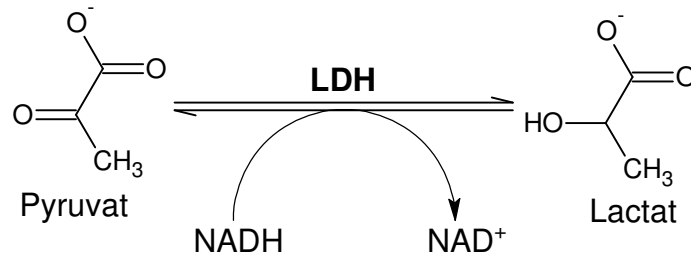
### 2.2.4.3 Zellvitalitätstest

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde die LDH-Aktivitätsbestimmung von Vassault (1983) adaptiert für Microtiterplatten nach Dringen *et al.* (1998) genutzt. Die LDH ist ein cytosolisches Enzym welches, in der Gegenwart des Elektronendonors NADH, Pyruvat zu Lactat reduziert. NADH wird hierbei zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert (siehe Abbildung 2.2.3). LDH wird von Zellen nur freigesetzt, wenn die Integrität der Zellmembran gestört ist. Extrazelluläre LDH-Aktivität kann daher als Indikator für eine verminderte Vitalität der behandelten Zellkultur angesehen werden. NADH verfügt im Gegensatz zu  $\text{NAD}^+$  über eine charakteristische Absorptionsbande bei 340 nm. Deren Abnahme über die Zeit dient zur Quantifizierung der LDH-Aktivität im Probenvolumen.

Zur Durchführung des Tests wurden pro *well* einer 96-*well*-Microtiterplatte jeweils 20 µl des zu untersuchenden Zellüberstandes mit 160 µl des LDH-Puffers vorgelegt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 180 µl LDH-Reaktionsmischung (3,56 mM Pyruvat, 0,44 mM NADH in LDH-Puffer) pro *well* gestartet und die Extinktion bei 340 nm über einen Zeitraum von 10 min verfolgt.



Durch den Vergleich mit Proben einer vollständig lysierten Zellkultur (100 % LDH-Freisetzung durch Inkubation mit 1 % Triton X-100 für 30 min bei RT) sowie einer Probe ohne LDH-Aktivität (0 % LDH-Freisetzung, Inkubationslösung ohne Kontakt zu Zellkulturen), wurde der prozentuale Anteil an freigesetzter LDH berechnet.

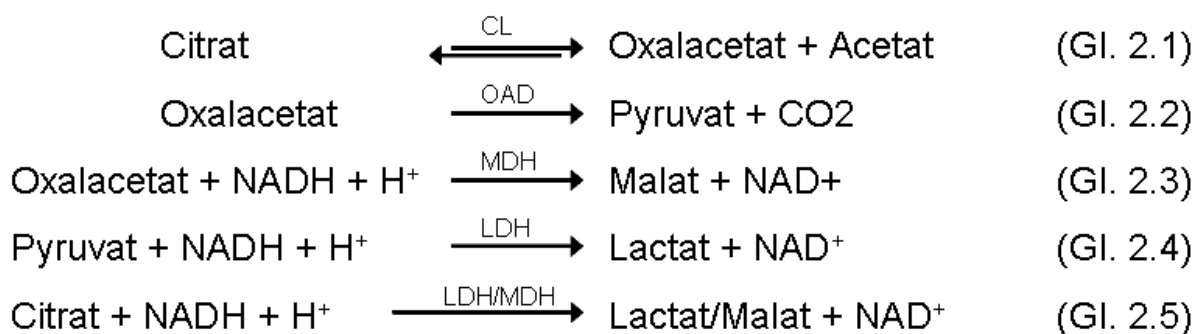


**Abbildung 2.2.3:** Reduktion von Pyruvat zu Lactat durch Lactat-Dehydrogenase. Als Elektronendonator fungiert NADH, welches zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert wird.

#### 2.2.4.4 Citratbestimmung

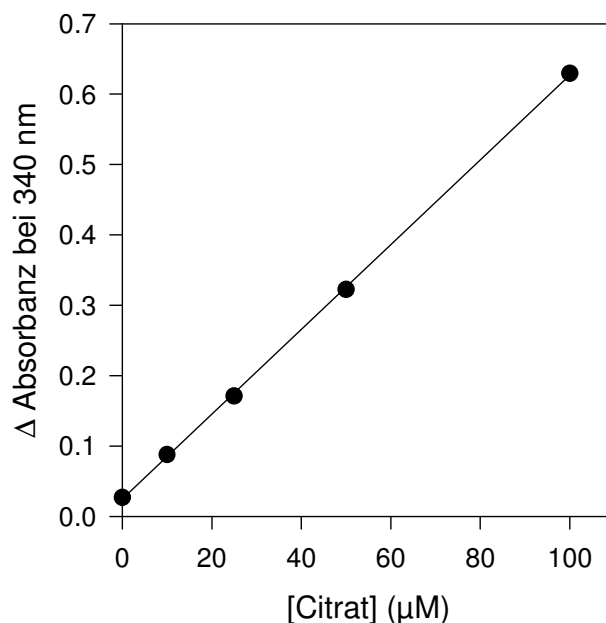
Der enzymatische Test zum Nachweis von Citrat ist eine Modifikation der von Moellering und Gruber (1966) beschriebenen Methode. Der Test beruht auf der schrittweisen Umsetzung von Citrat durch die Enzyme Citrat-Lyase (CL) und Malat-Dehydrogenase (MDH) bzw. LDH zu Malat bzw. Pyruvat (Gl. 2.5). Pro Molekül Citrat wird im Lauf der Reaktion jeweils ein Molekül  $\text{NADH}$  zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert. Die Abnahme der Absorption von  $\text{NADH}$  bei 340 nm wurde hierbei zur Quantifizierung der Citratkonzentration genutzt.

CL katalysiert das Gleichgewicht zwischen Citrat, Oxalacetat und Acetat (Gl. 2.1), als stabilisierender Co-Faktoren benötigt die CL divalente Metallionen wie  $\text{Zn}^{2+}$ . Enzympräparate von CL können Verunreinigungen von Oxalacetat-Decarboxylase (OAD) enthalten. Darüber hinaus findet auch die spontane Decarboxylierung von Oxalacetat statt (Gl. 2.2). Um sowohl das aus Citrat entstandene Oxalacetat als auch Pyruvat zu erfassen, wurden MDH und LDH als Indikatorenzyme verwendet (Gl. 2.3 und 2.4). Gleichung 2.5 repräsentiert die Bilanz der Gesamtreaktion von Citrat zu Malat und Pyruvat.



Zur Bestimmung des Citratgehaltes von FAC-haltigen Lösungen muss zunächst das Eisen aus dem Eisencitrat-Komplex eliminiert werden. Hierfür wurde die zu untersuchende Lösung mit einem 10-fachen Überschuss an Deferoxamin (DFX) – gegenüber der eingesetzten Konzentration des FAC – für 5 min bei RT vorinkubiert.

Die Citratbestimmung wurde in einem Ansatz mit einem Reaktionsvolumen von 1.0 ml durchgeführt. Hierzu wurden 500  $\mu\text{l}$  der zu untersuchenden Lösung mit 450  $\mu\text{l}$  des Reaktionsmischung (Endkonzentration in 1.0 ml von 200  $\mu\text{M}$  NADH, 28 U/ml MDH, 14 U/ml LDH, 0.2 mM  $\text{ZnCl}_2$  in 0.1 M TEA-Puffer, pH 7.6 eingestellt mit HCl) versetzt, gründlich gemischt und in eine 1.5 ml Küvette überführt. Zur Feststellung der Absorptionsdifferenz, wurde die photometrische Messung gestartet und nach Einstellung einer konstanten Absorption der Wert E1 festgehalten. Durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  CL (250 mU/ml) und sorgfältiger Mischung erfolgte die Umsetzung des Citrates im Probenansatz nach Gl. 2.5. Nach erneuter Einstellung einer konstanten Absorption, wurde der Messwert E2 festgehalten. Aus der Differenz  $\Delta E = E1 - E2$  und mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetztes wurde der Citratgehalt der Probe berechnet. Abbildung 2.2.4 zeigt exemplarisch den graphischen Zusammenhang zwischen der Differenz der Absorbanz bei 340 nm und dem Gehalt an Citrat im Probenvolumen auf.



**Abb. 2.2.4: Standardkurve der Citratbestimmung.**

Die Differenz der Absorbanz ( $\Delta E = E1 - E2$ ) bei 340 nm steht im linearen Zusammenhang zum Anstieg der Konzentration an Citrat (0-100  $\mu\text{M}$ ) im Probenvolumen. Der Korrelationskoeffizient der linearen Regressionsgeraden beträgt  $R^2 = 0.999$ .

### 3 Ergebnisse

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Zellexperimente wurden mindestens an drei unabhängigen primären Zellkulturen durchgeführt. Die Abbildungen und Tabellen der vorliegenden Arbeit fassen, sofern nicht anders angegeben, Daten aus drei unabhängigen Experimenten zusammen. In Ausnahmefällen wurden Ergebnisse repräsentativer Einzelexperimente gezeigt, die in Dreifachbestimmung an einer Kultur durchgeführt wurden. Dies ist in den betreffenden Fällen gesondert vermerkt.

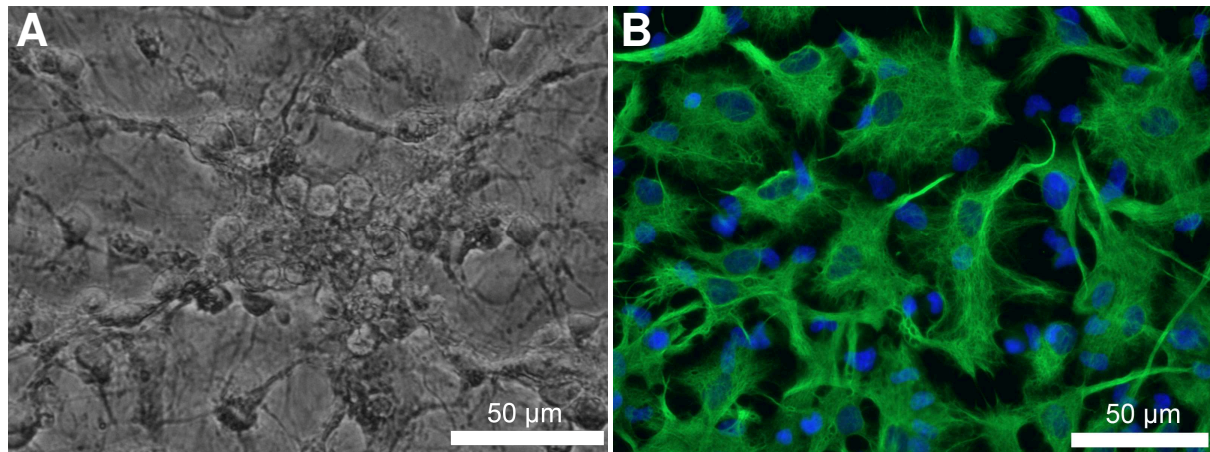
In den Diagrammen repräsentieren die Symbole den Mittelwert und die Fehlerbalken die Standardabweichung (SD). Fehlerbalken wurden nicht eingezeichnet, wenn sie kleiner waren als die Symbole, die den Mittelwert angeben. Analyse der Signifikanz von Unterschieden erfolgte durch statistischen Vergleich von Datensätzen. Im Falle von zwei Datensätzen wurde hierfür der ungepaarte *Student's t-Test*, im Falle von mehreren Datensätzen die Varianzanalyse (ANOVA; engl.: *analysis of variance*) gefolgt vom Bonferroni-Posttest durchgeführt. Signifikante Unterschiede zwischen Datensätzen wurden mit Sternen gekennzeichnet: \* $p < 0.05$  (signifikant), \*\* $p < 0.01$  (sehr signifikant), \*\*\* $p < 0.001$  (extrem signifikant).  $p > 0.05$  wurde als nicht signifikant (n.s.) gewertet. Der Eisengehalt von FAC kann zwischen einzelnen Chargen variieren. Soweit nicht anders angegeben wurde die Konzentration von FAC-Lösungen, als Endkonzentration des aus ihnen freisetzbaren Eisens angegeben.

#### 3.1 Charakterisierung Astroglia-reicher Primärkulturen als Modellsystem

##### 3.1.1 Immuncytochemische Charakterisierung

Zur Untersuchung des Eisenstoffwechsels von Astrocyten wurden APKs als Modellsystem verwendet. Abb. 3.1.1 A zeigt eine Phasenkontrastaufnahme einer 14 Tage alten APK. Die Primärkulturen bildeten nach 11 d in Kultur einen dichten Zellrasen, der nach 14 d konfluent war (Abb. 3.1.1 A).

Zur Charakterisierung der gewonnenen Primärkulturen wurde eine immuncytochemische Anfärbung mit Antikörpern gegen das Astrocyten-Markerprotein GFAP (Ghandour *et al.* 1980) durchgeführt. Die Anfärbung von APKs mit einem monoklonalen Antikörper gegen GFAP führte zu einer intensiven Färbung der Mehrzahl der Zellen der Kulturen (Abb. 3.1.1 B).



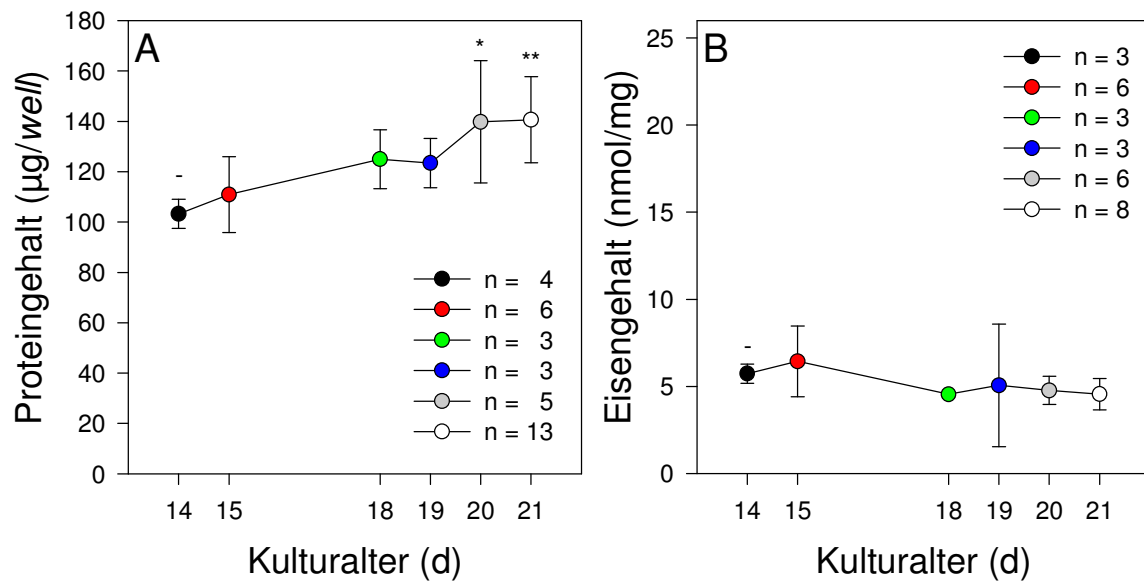
**Abb. 3.1.1: Astroglia-reiche Primärkultur**

Phasenkontrastaufnahme einer 14 d alten Kultur (A) und immuncytochemische Anfärbung einer 9 d alten APK auf GFAP (B). Die grüne Fluoreszenz ist die Färbung für GFAP. Zellkerne wurden mit dem Farbstoff DAPI (blaue Fluoreszenz) angefärbt.

Die GFAP-positiven Zellen der APKs wiesen die typische Morphologie von Astrogliazellen in Kultur auf (Reinhart *et al.* 1990). Wurde der Primäantikörper bei der Anfärbung weggelassen, so wurde keine Färbung der Zellen gefunden (Daten nicht gezeigt). Die blaue Fluoreszenz (Abb. 3.1.1 B) ist die Färbung der Zellkerne mit DAPI. Die hergestellten APKs waren stark angereichert an GFAP-positiven Zellen und können somit als geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der Eigenschaften von Astrogliazellen angesehen werden.

**3.1.2 Bestimmung der basalen Eisen- und Proteingehalte**

Zur Bestimmung der basalen Protein- und Eisengehalte wurde APKs 14 bis 21 Tage in DMEM mit 10 % FCS kultiviert. Proportional zum Alter der Kulturen war ein Anstieg des Proteingehaltes zu beobachten (Abb. 3.1.2 A). So lag der durchschnittliche Proteingehalt von APKs nach 14 Tagen bei ca. 103 µg Zellprotein/*well* einer 24-*well*-Zellkulturplatte und nach 21 Tagen bei ca. 141 µg/*well*. Ein signifikanter Unterschied der Proteingehalte konnte für 14 und 20 bzw. 21 Tage alten APKs (Abb. 3.1.2 A) sowie für 15 und 21 Tagen alten APKs ( $p < 0.05$ ) festgestellt werden. Der basale Eisengehalt von 14 bis 21 Tage alten APKs lag relativ konstant zwischen 4 und 7 nmol Eisen/mg Zellprotein. Eine signifikante Änderung des spezifischen Eisengehaltes in Abhängigkeit zum Kulturalter konnte trotz Zunahme des Proteingehaltes nicht festgestellt werden (Abb. 3.1.2 B).



**Abb. 3.1.2: Einfluss des Alters auf den basalen Eisen- und Proteingehalt von APKs**

APKs wurden 14 bis 21 Tagen in DMEM mit 10 % FCS kultiviert. Bestimmt wurde der zelluläre Proteingehalt (A) und der basale spezifische zelluläre Eisengehalt (B). Signifikant Unterschiede zu den Werten von 14 Tagen alten Kulturen wurden mit Sternen gekennzeichnet (-: Bezugswert).

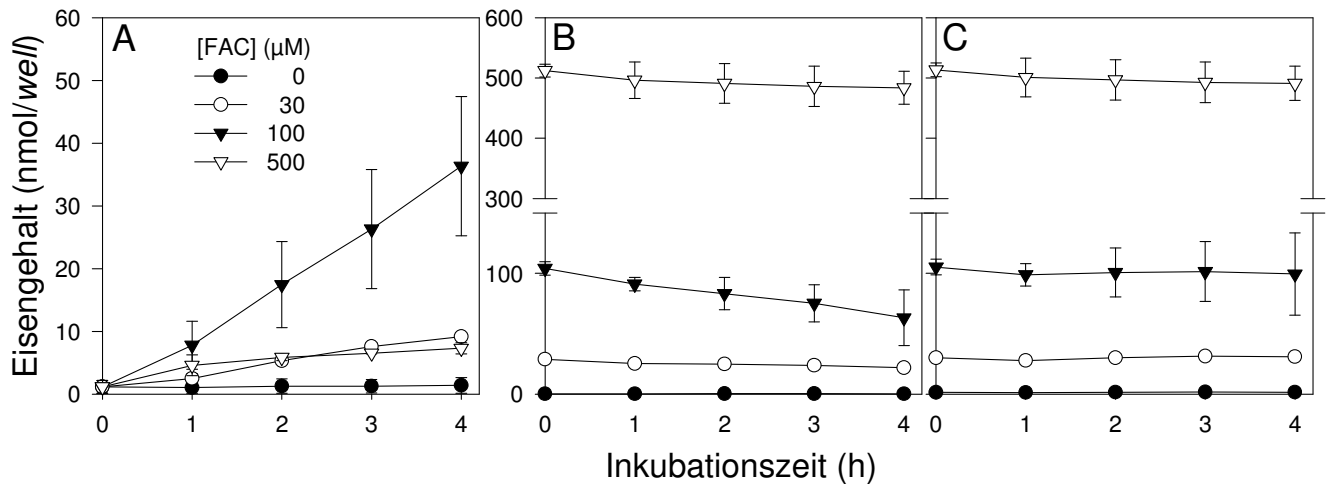
### 3.2 Eisenakkumulation in serumfreien Kulturmedien

#### 3.2.1 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Eisenakkumulation nach Gabe von Eisenammoniumcitrat in Vollmedium

In serumhaltigem Medium (DMEM mit 10 % FCS) konnte in Gegenwart von FAC eine starke Akkumulation von Eisen in APKs nachgewiesen werden (Hoepken *et al.* 2004). Da Gliazellen Eisen auch in Abwesenheit von Serum und Transferrin aufnehmen (Qian *et al.* 2000), wurde in der vorliegenden Arbeit die Aufnahme von Eisen aus FAC in serumfreien Medien untersucht. Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der Eisenaufnahme aus FAC zeigten einen deutlichen Anstieg des zellulären Eisengehaltes nach Gabe von FAC (Abb. 3.2.1). Die Geschwindigkeit der Zunahme des zellulären Eisengehaltes hing dabei stark von der eingesetzten Eisenausgangskonzentration ab (Abb. 3.2.1 A und 3.2.2 A).

Zur Überprüfung, ob die zelluläre Eisenakkumulation der Abnahme des Eisengehaltes im Inkubationsmedium entsprach, wurden exemplarisch für drei ausgewählte Eisenkonzentrationen (30, 100 und 500 µM FAC) zu den zellulären Eisengehalten zusätzlich auch die Eisengehalte der Zellüberstände bestimmt. Wie aus Abbildung 3.2.1 A und B ersichtlich, verlief die zelluläre Eisenaufnahme in APKs über 4 h proportional zur Abnahme des Eisengehaltes im Zellüberstand. Des Weiteren wird aus Abbildung 3.2.1 C deutlich, dass im Rahmen der gegebenen Abweichungen die Summe aus dem zellulären Eisengehalt und dem

Eisengehalt im Zellüberstand über den gesamten untersuchten Zeitraum nahezu konstant blieb und der initial eingesetzten Eisenkonzentration entsprach.



**Abb. 3.2.1: Zellulärer und extrazellulärer Eisengehalt von APKs nach Gabe von FAC**

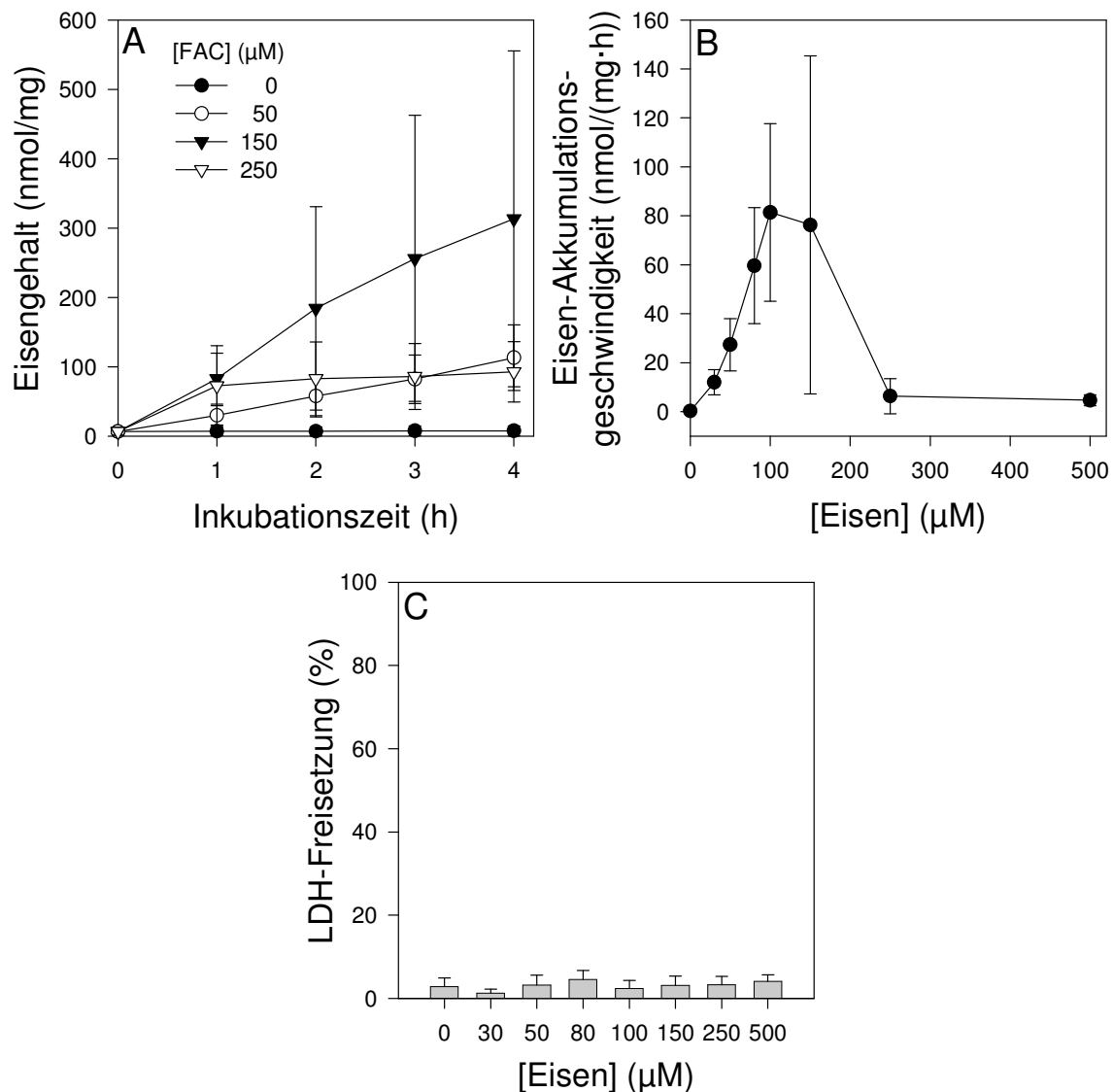
APKs wurden in DMEM mit Eisen (als FAC) in den angegebenen Konzentrationen für bis zu 4 h inkubiert. **A:** Zellulärer Eisengehalt. **B:** Eisengehalt im Zellüberstand. **C:** Summe der Eisengehalte von Zellen plus Zellüberstand.

APKs akkumulieren Eisen aus FAC-Lösungen bis zu einer Konzentration von 150  $\mu\text{M}$  über 4 h linear und proportional zunehmend mit der FAC-Ausgangskonzentration (Abb. 3.2.1 A und 3.2.2 A). Dagegen zeigten APKs inkubiert mit Eisenkonzentrationen  $\geq 250 \mu\text{M}$  nur einen deutlichen Anstieg des zellulären Eisengehaltes innerhalb der ersten Stunde der Inkubation, längere Inkubationen als 1 h führten lediglich zu einem geringen Anstieg des zellulären Eisengehaltes (Abb. 3.2.1 A und Abb. 3.2.2 A).

Mittels linearer Regression wurde aus den Kurvenverläufen der spezifischen Eisengehalte die Eisenakkumulationsgeschwindigkeiten bestimmt. Für alle eingesetzten Konzentrationen wurde der Zeitraum von 1 bis 4 h für die Berechnung der Eisenakkumulationsgeschwindigkeit gewählt, da für diesen Zeitraum bei allen eingesetzten Konzentrationen konstante lineare Steigungen vorlagen (Abb. 3.2.1 A und 3.2.2 A).

Die graphische Darstellung der Eisenakkumulationsgeschwindigkeiten aufgetragen gegen die initialen FAC-Konzentration entspricht dem Verlauf einer Glockenkurve mit einem Maximum zwischen 100 bis 150  $\mu\text{M}$  FAC (Abb. 3.2.2 B). Parallel zu den dargestellten Experimenten durchgeführte Zellvitalitätstests zeigten ausnahmslos sehr niedrige extrazelluläre LDH-Aktivitätswerte sowohl von FAC-behandelten, als auch FAC-unbehandelten Kulturen (Abb. 3.2.2 C). Die Abnahme der Eisenakkumulationsgeschwindigkeit ab 250  $\mu\text{M}$  FAC scheint daher nicht durch verminderte Zellvitalität

verursacht zu sein. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse, wurde 100  $\mu\text{M}$  FAC als Standardkonzentration für die weiteren Untersuchungen zur Eisenakkumulation in DMEM gewählt.



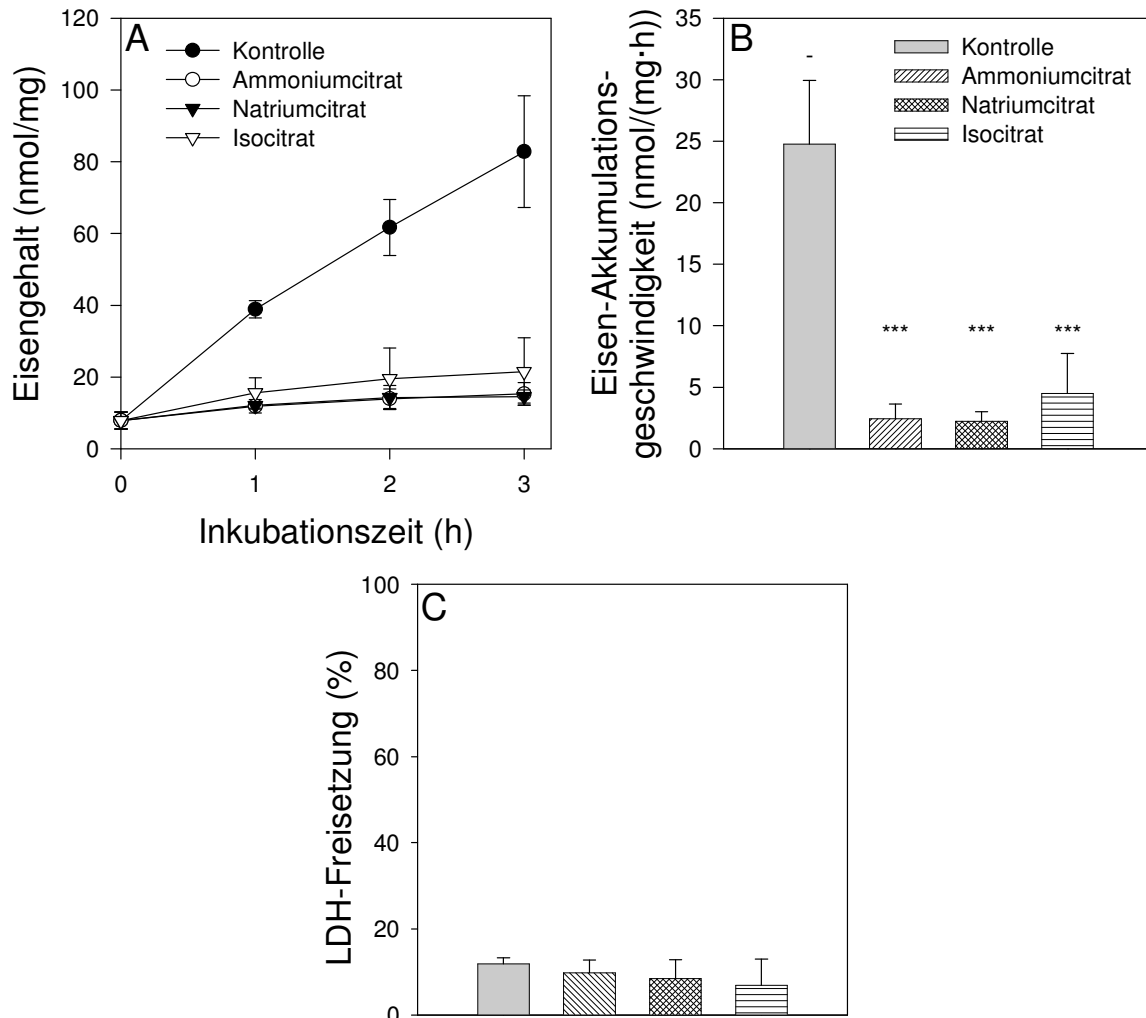
**Abb. 3.2.2: Konzentrationsabhängigkeit der Eisenakkumulation von APKs in DMEM**

APKs wurden in DMEM mit bis zu 500  $\mu\text{M}$  Eisen (als FAC) für bis zu 4 h inkubiert. **A:** Spezifische zelluläre Eisengehalte **B:** Eisenakkumulationsgeschwindigkeiten bestimmt durch lineare Regression aus dem Anstieg der spezifischen Eisengehalte zwischen 1 und 4 h. **C:** LDH-Aktivität im Zellüberstand (Freisetzung) nach 4 h Inkubation in Prozent der initialen zellulären LDH-Aktivität.

### 3.2.2 Einfluss von Citrat und Isocitrat

Zur Charakterisierung des zellulären Prozesses der Eisenakkumulation in Astrogliazellen, wurde zunächst der Einfluss von Citrat bzw. Isocitrat auf den zellulären Eisengehalt nach Gabe von Eisen als FAC experimentell untersucht. Hierzu wurden APKs mit 100  $\mu\text{M}$  FAC in Gegenwart und Abwesenheit eines 10-fachen molaren Überschusses entweder von Ammoniumcitrat, Natriumcitrat oder Natriumisocitrat für bis zu 3 h inkubiert.

Die Gabe von Ammonium- und Natriumcitrat führte zu einer nahezu vollständigen Verhinderung der Eisenakkumulation aus FAC. Nach 3 h Inkubation wurden nur 14 bis 15 nmol Eisen/mg Zellprotein (mit Citrat) statt 82.8 nmol/mg (ohne Citrat) zellulärer Eisengehalt gemessen (Abb. 3.2.3 A).



**Abb. 3.2.3: Einfluss von Citrat und Isocitrat auf die Eisenakkumulation von APKs nach Gabe von FAC**

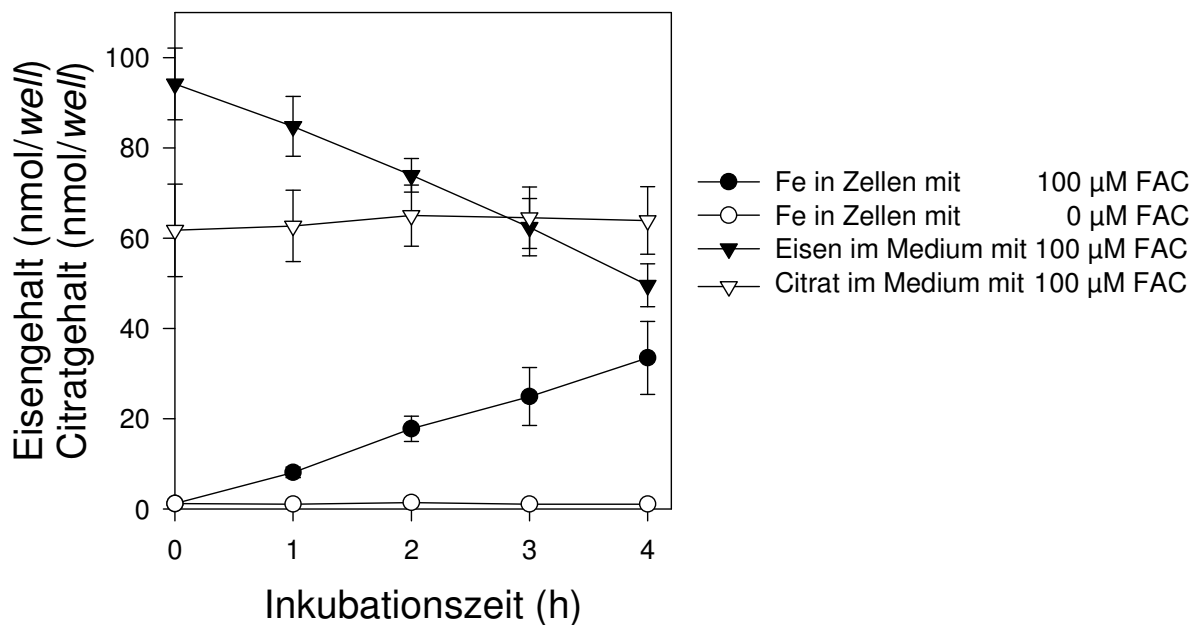
APKs wurden in DMEM mit 100  $\mu$ M FAC in Gegenwart und Abwesenheit von 1 mM Ammoniumcitrat, Natriumcitrat oder Natriumisocitrat für bis zu 3 h inkubiert. **A:** Spezifischer zellulärer Eisengehalt. **B:** Eisenakkumulationsgeschwindigkeiten, bestimmt durch lineare Regression aus dem Anstieg der spezifischen Eisengehalten zwischen 0 und 3 h. **C:** LDH-Aktivität im Zellüberstand (Freisetzung) nach 3 h Inkubation in Prozent der initialen zellulären LDH-Aktivität (Legende siehe **B**). Signifikante Unterschiede zu den Werten der Kontrolle wurden mit Sternen gekennzeichnet (-: Kontrolle).

Isocitrat führte ebenfalls zu einer verminderten Eisenaufnahme, nach 3 h Inkubation war ein spezifischer zellulärer Eisengehalt von 21 nmol/mg festzustellen. Der Mittelwert des Eisengehaltes in Gegenwart von Isocitrat ist zwar größer als in Gegenwart eines Überschusses an Citrat, ist aber unter Berücksichtigung der Standardabweichungen nicht als signifikant unterschiedlich von diesem zu bewerten.



Die beschriebenen Effekte spiegeln sich auch in den Eisenakkumulationsgeschwindigkeiten, bestimmt durch lineare Regression aus dem Anstieg der spezifischen Eisengehalte zwischen 0 und 3 h, wieder (Abb. 3.2.3 B). Auch hier ist die verminderte Eisenaufnahme nicht auf einen Verlust an Zellvitalität zurückzuführen (Abb. 3.2.3 C).

Die verminderte Eisenakkumulation durch Gabe von Citrat bzw. Isocitrat könnte auf eine Konkurrenz der zellulären Aufnahme von Eisen als FAC mit Citrat bzw. Isocitrat hindeuten. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde APKs mit 100  $\mu$ M FAC für bis zu 4 h inkubiert und sowohl der zelluläre Eisengehalt als auch der Eisen- und der Citratgehalt im Inkubationsmedium bestimmt. Wie zuvor schon unter 3.2.1 beobachtet stieg der zelluläre Eisengehalt proportional zur Abnahme des Eisengehaltes im Zellüberstand (Abb. 3.2.4). Dagegen blieb der Citratgehalt im Medium über die Zeit konstant (Abb. 3.2.4). Demzufolge war keine Akkumulation von Citrat in den Zellen nach Gabe von FAC zu beobachten.



**Abb. 3.2.4: Eisen- und Citratgehalt von APKs nach Gabe von FAC**

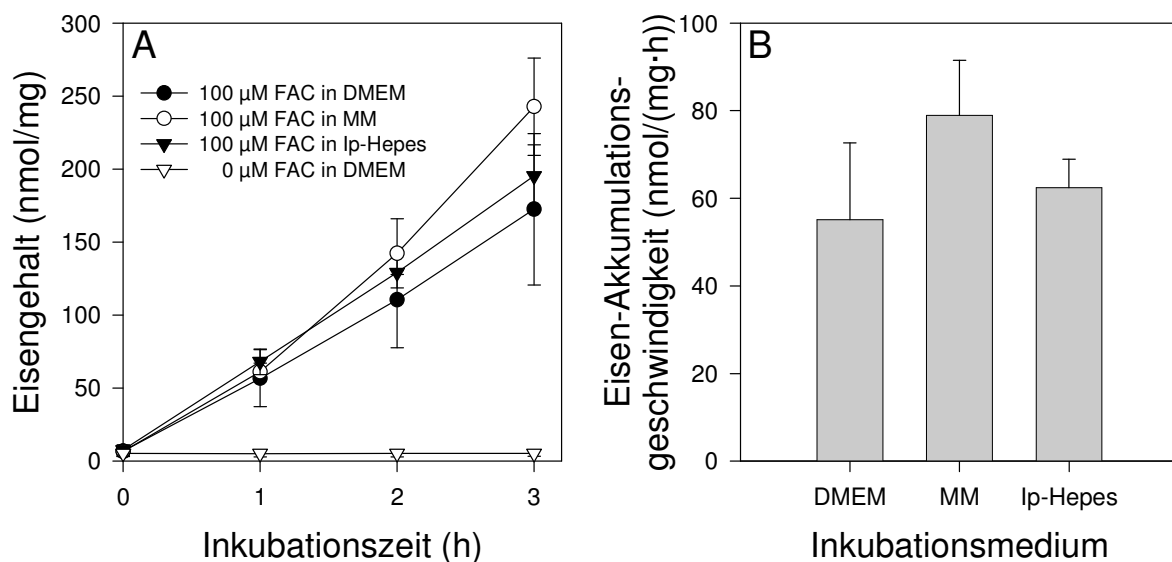
APKs wurden in DMEM mit 0 oder 100  $\mu$ M Eisen (als FAC) für bis zu 4 h inkubiert. Bestimmt wurde der Eisen- und Citratgehalt im Medium sowie der zelluläre Eisengehalt zu den angegebenen Zeitpunkten.

### 3.2.3 Abhängigkeit vom Inkubationsmedium

Das in den bisher beschriebenen Experimenten verwendete Medium (DMEM) enthält eine Vielzahl von Substanzen, wie Vitaminen und Aminosäuren, die potentiell die Akkumulation von Eisen in APKs beeinflussen könnten. Um den Einfluss der Mediumkomposition auf die Eisenakkumulation durch APKs zu untersuchen, wurden vergleichende Inkubationen mit 100  $\mu$ M FAC in DMEM, MM und Ip-Hepes als Inkubationsmedium durchgeführt. Das vitamin-

und aminosäurefreie MM wies ähnliche Salzkonzentrationen und das gleiche offene Bicarbonat/CO<sub>2</sub>-Puffersystem wie DMEM auf. Das bicarbonatfreie Ip-Hepes ist eine Variante des MM, jedoch wurde hier der pH-Wert durch HEPES/NaOH gepuffert und benötigte deshalb keine CO<sub>2</sub>-Atmosphäre während der Inkubation.

Der Vergleich der Eisenakkumulation aus FAC ergab in allen drei Medien einen linearen Anstieg des zellulären Eisengehaltes über die gesamte Inkubationszeit (Abb. 3.2.5 A). Mit ca. 79 nmol/(mg·h) wurde die höchste Eisenakkumulationsgeschwindigkeit in MM und mit ca. 55 nmol/(mg·h) die niedrigste in DMEM erreicht. Signifikante Unterschiede der Eisenakkumulationen konnten für die untersuchten Medien nicht festgestellt werden.



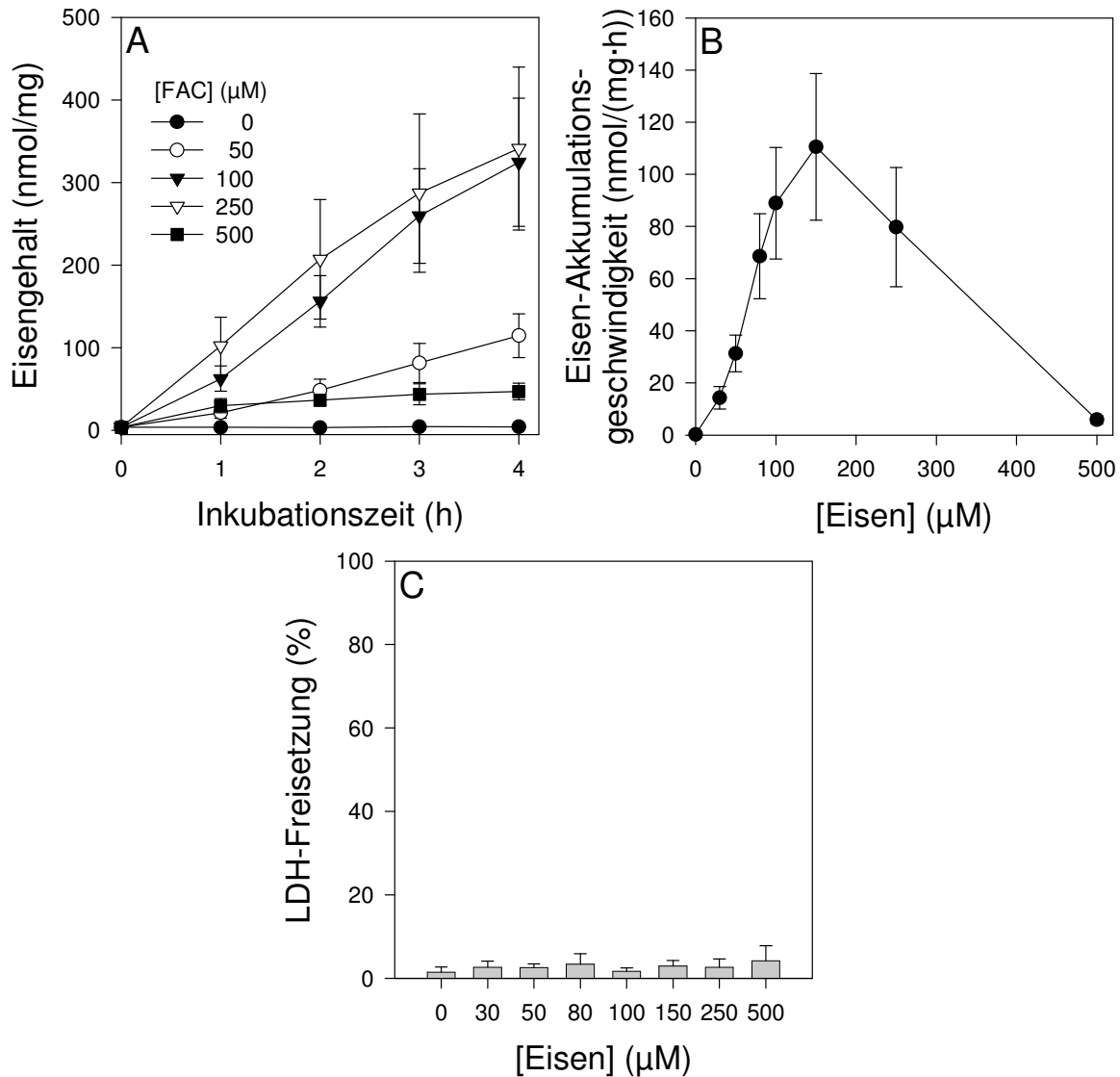
**Abb. 3.2.5: Eisenakkumulation von APKs in verschiedenen Medien**

APKs wurden in den angegebenen Medien mit 100 µM Eisen (als FAC) in Gegenwart (DMEM, MM) und Abwesenheit (Ip-Hepes) von 10 % CO<sub>2</sub> für bis zu 3 h inkubiert. **A:** Spezifischer zellulärer Eisengehalt. **B:** Eisenakkumulationsgeschwindigkeit bestimmt durch lineare Regression aus dem Anstieg der spezifischen Eisengehalte zwischen 0 und 3 h.

Wie gezeigt, unterschieden sich die Eisenaufnahmen in APKs nach Gabe von 100 µM FAC in DMEM, MM oder Ip-Hepes nicht signifikant voneinander (Abb. 3.2.5). Trotz dieser Erkenntnis ist bisher nicht geklärt, weshalb sich die Eisenakkumulationsgeschwindigkeit im DMEM bei Konzentrationen höher als 150 µM verringert und die Eisenaufnahmegeschwindigkeiten einen für zelluläre Transportprozesse untypischen Glockenkurvenverlauf beschreibt (Abb. 3.2.2 B). Deshalb wurde im Folgenden sowohl für MM als auch für Ip-Hepes die Konzentrationsabhängigkeit der Eisenakkumulation untersucht.

Abbildung 3.2.6 A zeigt den zeitlichen Verlauf des zellulären Eisengehaltes in nmol Eisen pro mg Zellprotein einiger ausgewählter FAC-Ausgangskonzentrationen in MM als Inkubations-

medium. Der zelluläre Eisengehalt nahm dabei bis zu einer Konzentration von ca. 150  $\mu\text{M}$  FAC proportional zur eingesetzten Eisenkonzentration zu, höhere FAC-Ausgangskonzentrationen (250-500  $\mu\text{M}$  FAC) führten jedoch im Vergleich zu 150  $\mu\text{M}$  FAC zu einem verminderten zellulären Eisengehalt (Abb. 3.2.6 A).



**Abb. 3.2.6: Konzentrationsabhängigkeit der Eisenakkumulation von APKs in MM**

APKs wurden in MM mit bis zu 500  $\mu\text{M}$  Eisen (als FAC) für bis zu 4 h inkubiert. **A:** Spezifischer zellulärer Eisengehalt. **B:** Eisenakkumulationsgeschwindigkeiten bestimmt durch lineare Regression aus dem Anstieg der spezifischen Eisengehalte zwischen 1 und 4 h. **C:** LDH-Aktivität im Zellüberstand (Freisetzung) nach 4 h Inkubation in Prozent der initialen zellulären LDH-Aktivität.

Die Eisenakkumulationsgeschwindigkeiten in MM zeigten innerhalb eines Konzentrationsbereichs von 150  $\mu\text{M}$  bis 250  $\mu\text{M}$  FAC deutliche Unterschiede zu den Ergebnissen in DMEM. Für MM ergaben sich hier wesentlich höhere Eisenakkumulationsgeschwindigkeiten (80 bis 110  $\text{nmol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ ), die auch die maximal erreichten Werte in DMEM (6 bis 76  $\text{nmol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ ) überstiegen (Abb. 3.2.2 B und 3.2.6 B). Des Weiteren kann insbesondere für die

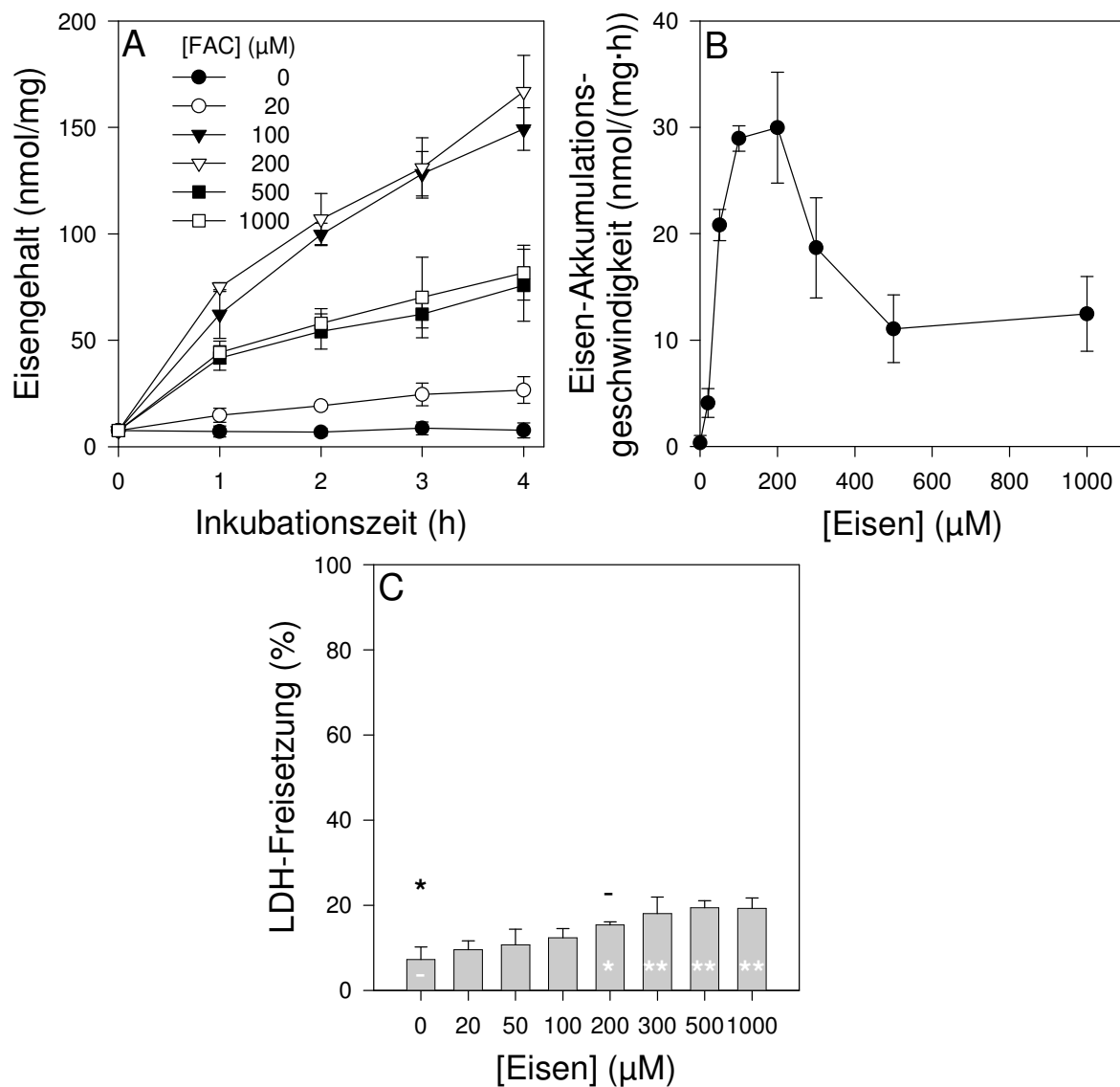
Ausgangskonzentration von 150  $\mu\text{M}$  FAC eine substantiell geringere Standardabweichung der Akkumulationsgeschwindigkeiten festgestellt werden (Abb. 3.2.2 B und Abb. 3.2.6 B). Allerdings beschreibt auch in MM die graphische Darstellung der Akkumulationsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der eingesetzten Substratkonzentration den Verlauf einer Glockenkurve (Abb. 3.2.6 B). Bei allen eingesetzten Eisenkonzentrationen konnte keine signifikante Erhöhung der extrazellulären LDH-Aktivität gegenüber der Kontrolle (0  $\mu\text{M}$  FAC) beobachtet werden (Abb. 3.2.6 C).

Abbildung 3.2.7 A zeigt den zeitlichen Verlauf des zellulären Eisengehaltes einiger ausgewählter FAC-Ausgangskonzentrationen in Ip-Hepes als Inkubationspuffer. Bis zu einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  FAC nahm der zelluläre Eisengehalt mit der eingesetzten Eisenkonzentration zu, höhere FAC-Ausgangskonzentrationen (250-1000  $\mu\text{M}$  FAC) führten jedoch zu einem verminderten zellulären Eisengehalt (Abb. 3.2.7 A).

Die graphische Darstellung der Eisenakkumulationsgeschwindigkeiten in Ip-Hepes entspricht ebenfalls dem Verlauf einer Glockenkurve (3.2.7 B). Allerdings lag die in Ip-Hepes maximal erreichte Akkumulationsgeschwindigkeit mit 30  $\text{nmol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$  deutlich unterhalb der in DMEM (81  $\text{nmol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ ) und MM (110  $\text{nmol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ ) erzielten maximalen Akkumulationsgeschwindigkeiten (Abb. 3.2.2 B und 3.2.6 B). Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen zur Abhängigkeit der Eisenakkumulation vom Inkubationsmedium (Abb. 3.2.5), da hier für die eingesetzte FAC-Konzentration von je 100  $\mu\text{M}$  kein signifikanter Unterschied der Eisenakkumulationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit zum verwendeten Inkubationsmedium festzustellen war.

Trotz des Unterschieds wurden auch für Ip-Hepes, wie zuvor schon für MM beschrieben (Abb. 3.2.6), bei Ausgangskonzentrationen von 200 bis 300  $\mu\text{M}$  FAC deutlich höhere Akkumulationsgeschwindigkeiten von 20 bis 30  $\text{nmol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$  in Ip-Hepes erzielt als in DMEM (6  $\text{nmol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$  bei 250  $\mu\text{M}$  FAC) (Abb. 3.2.2. B und 3.2.7 B). Der LDH-Vitalitätstest zeigte zwar für Inkubationen in Ip-Hepes in allen untersuchten Fällen leicht erhöhte extrazelluläre LDH-Aktivitäten von insgesamt 10 bis 19 % (Abb. 3.2.7 C). Signifikante Unterschiede der LDH-Freisetzung in Bezug zur LDH-Freisetzung bei 200  $\mu\text{M}$  FAC, der maximal beobachteten Akkumulationsgeschwindigkeit in Ip-Hepes, konnten nur für Inkubation in Abwesenheit von FAC bestimmt werden (Abb. 3.2.7 C). Womit auch hier eine

verminderte Eisenaufnahme aufgrund eines Verlustes an Zellvitalität bei Eisenkonzentrationen höher als 200  $\mu\text{M}$  FAC auszuschließen ist.

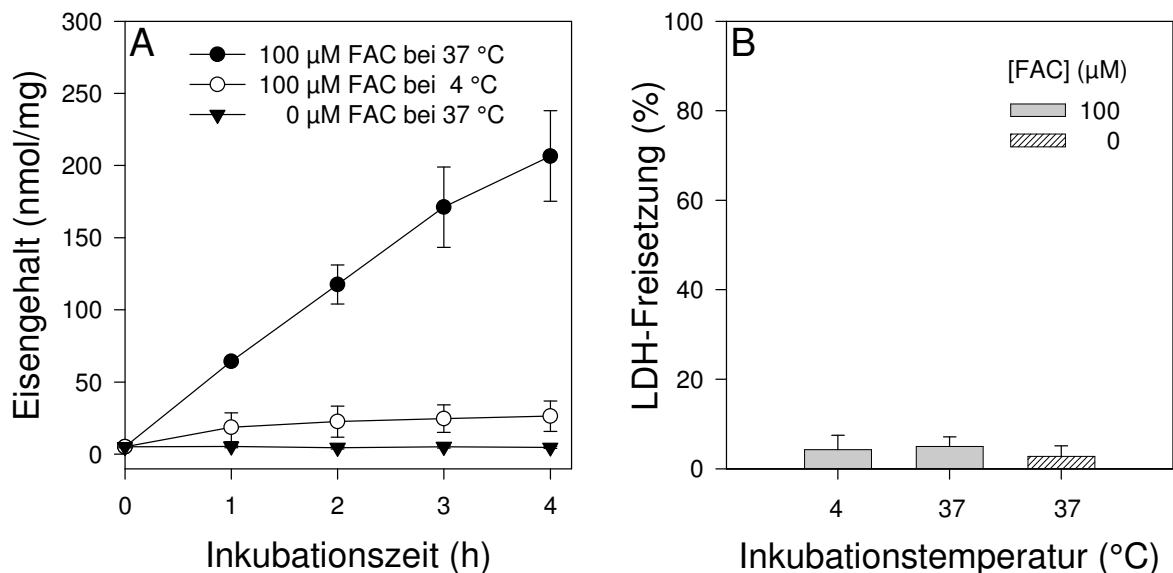


**Abb. 3.2.7: Konzentrationsabhängigkeit der Eisenakkumulation von APKs in Ip-Hepes**  
 APKs wurden in Ip-Hepes mit bis zu 1000  $\mu\text{M}$  Eisen (als FAC) für bis zu 4 h inkubiert. **A:** Spezifischer zellulärer Eisengehalt. **B:** Eisenakkumulationsgeschwindigkeiten bestimmt durch lineare Regression aus dem Anstieg der spezifischen Eisengehalte zwischen 1 und 4 h. **C:** LDH-Aktivität im Zellüberstand (Freisetzung) nach 4 h Inkubation in Prozent der initialen zellulären LDH-Aktivität. Signifikante Unterschiede zur LDH-Freisetzung bei 200  $\mu\text{M}$  FAC wurden mit Sternen oberhalb der Säulen gekennzeichnet, signifikante Unterschiede zur LDH-Freisetzung bei 0  $\mu\text{M}$  FAC wurden mit Sternen innerhalb der Säulen gekennzeichnet (-: Bezugswert).

### 3.2.4 Temperaturabhängigkeit

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zur Akkumulation von Eisen in APKs haben Hinweise auf eine mögliche Aufnahme von Eisen aus FAC ergeben. Mit der Verwendung des Hepes-gepufferten Inkubationsmedium (Ip-Hepes), ergab sich die Möglichkeit, den Einfluss der Temperatur auf die Eisenakkumulation in APKs zu untersuchen.

APKs wurden mit 100  $\mu\text{M}$  FAC bei 4 bzw. 37  $^{\circ}\text{C}$  für bis zu 4 h in Ip-Hepes inkubiert. Darüber hinaus wurde als zusätzliche Kontrolle der zelluläre Eisengehalt von Zellen ohne zusätzliche Gabe von FAC bestimmt. Die Eisenaufnahme in APKs wies eine deutliche Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur auf. Der zelluläre Eisengehalt bei 37  $^{\circ}\text{C}$  stieg linear über 4 h auf ca. 206 nmol/mg an, bei 4  $^{\circ}\text{C}$  konnte nach 4 h hingegen nur ein zellulärer Eisengehalt von ca. 26 nmol/mg bestimmt werden (Abb. 3.2.8 A). Dies ergibt eine Differenz von ca. 180 nmol/mg. Im Verhältnis zum basalen zellulären Eisengehalt von ca. 5 nmol/mg, stellte dies einen Anstieg des zellulären Eisengehaltes um mehr als den Faktor 35 innerhalb von 4 h Inkubation dar (Abb. 3.2.8). Trotz dieser starken Zunahme des zellulären Eisengehaltes konnten hinsichtlich der LDH-Freisetzung nach 4 h Inkubation keine signifikanten Unterschiede zu den Werten der FAC-unbehandelten APKs festgestellt werden (Abb. 3.2.8 B).



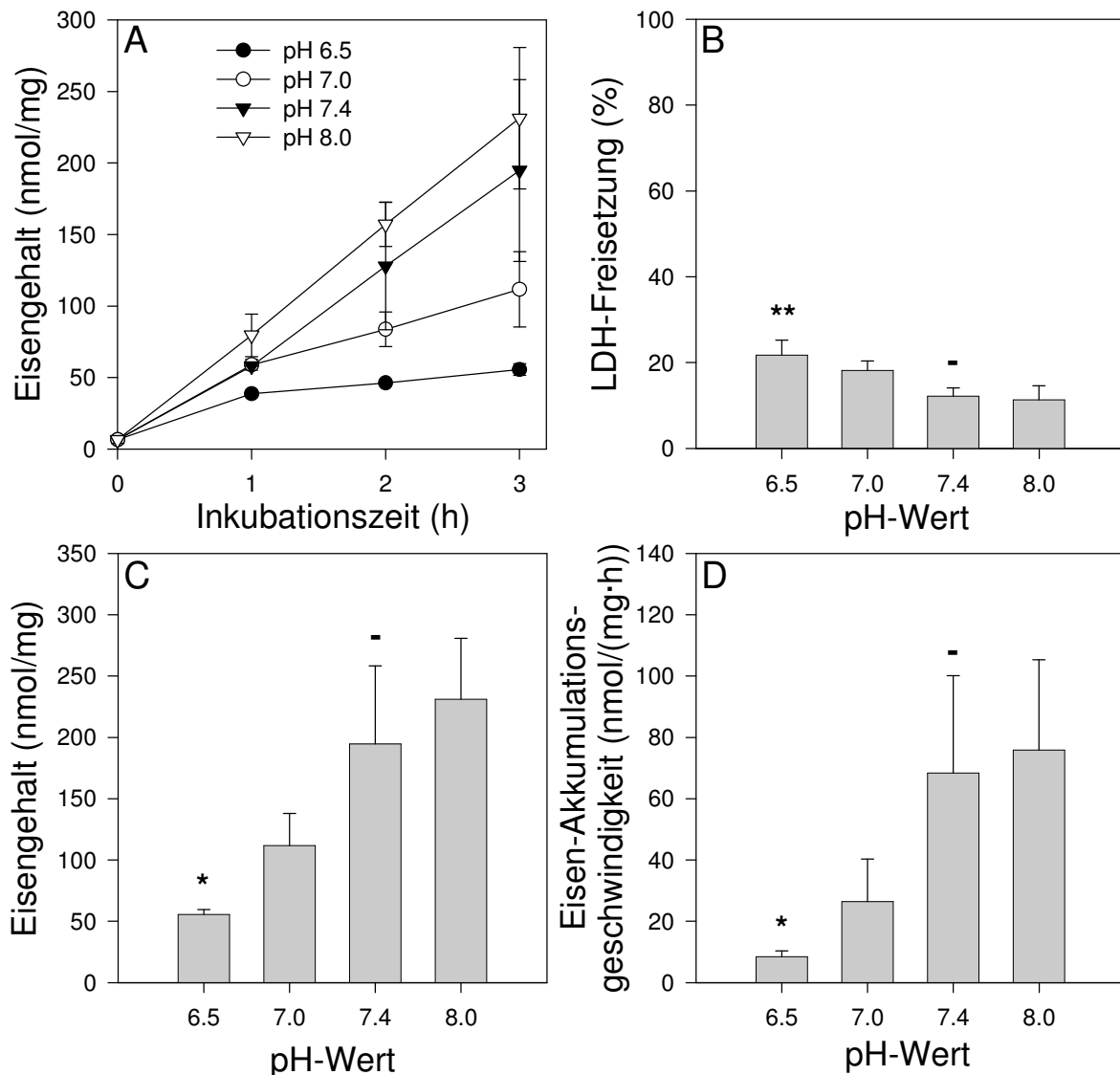
**Abb. 3.2.8: Temperaturabhängigkeit der Eisenakkumulation von APKs nach Gabe von FAC**  
 APKs wurden in Ip-Hepes bei den angegebenen Temperaturen mit 0 oder 100  $\mu\text{M}$  Eisen (als FAC) für bis zu 4 h inkubiert. **A:** Spezifischer zellulärer Eisengehalt. **B:** LDH-Aktivität im Zellüberstand (Freisetzung) nach 4 h Inkubation in Prozent der initialen zellulären LDH-Aktivität.

### 3.2.5 Abhängigkeit vom extrazellulären pH-Wert

Bei vielen Transportmechanismen spielt der pH-Wert eine große Rolle, unter anderem bei der durch DMT1 vermittelten Aufnahme von  $\text{Fe}^{2+}$  (Garrick *et al.* 2003). Um den Einfluss des extrazellulären pH-Wertes auf die Eisenaufnahme nach Gabe von FAC zu studieren, wurden APKs in Ip-Hepes bei pH-Werten von 6.5 bis 8.0 mit 100  $\mu\text{M}$  FAC für bis zu 3 h inkubiert.

Die Akkumulation von Eisen in APKs wurde stark vom pH-Wert des Inkubationspuffers beeinflusst. Bei leicht basischen pH-Werten von 7.4 und 8.0 stieg der zelluläre Eisengehalt

schnell und linear über den gesamten Inkubationszeitraum an. Im Gegensatz hierzu verlangsamte sich der Anstieg des Eisengehaltes im neutralen bzw. leicht sauren Milieu deutlich nach 1 h Inkubation (Abb. 3.2.9 A). Dies kommt zum einen durch einen signifikant niedrigeren zellulären Eisengehalt nach 3 h Inkubation (Abb. 3.2.9 C), sowie zum anderen durch eine signifikant geringere Eisenakkumulationsgeschwindigkeit bei pH 6.5 im Vergleich zur Kontrolle bei pH 7.4 zum Ausdruck (Abb. 3.2.9 D).



**Abb. 3.2.9: Einfluss des pH-Wertes auf die Eisenaufnahme von APKs nach Gabe von FAC**

APKs wurden in Ip-Hepes bei den angegebenen pH-Werten mit 100  $\mu$ M Eisen (als FAC) für bis zu 3 h inkubiert. **A:** Spezifischer zellulärer Eisengehalt. **B:** LDH-Aktivität im Zellüberstand (Freisetzung) nach 3 h Inkubation in Prozent der initialen zellulären LDH-Aktivität. **C:** Spezifischer zellulärer Eisengehalt nach 3 h. **D:** Eisenakkumulationsgeschwindigkeiten, bestimmt durch lineare Regression aus dem Anstieg der spezifischen Eisengehalte (A) zwischen 1 und 3 h. Signifikante Unterschiede zu den Werten der Kontrolle (pH 7.4) wurden in **B**, **C** und **D** mit Sternen gekennzeichnet (-: Kontrolle).

Darüber hinaus konnte für pH 6.5 eine signifikante Erhöhung der extrazellulären LDH-Aktivität im Vergleich zum pH 7.4 festgestellt werden (Abb. 3.2.9 B). Der Unterschied der

LDH-Freisetzung zwischen pH 6.5 und 7.4 entsprach allerdings nur ca. 10 % der initialen, zellulären LDH-Aktivität. Im Gegensatz hierzu verringerte sich der zelluläre Eisengehalt bei pH 6.5 im Vergleich zu pH 7.4 nach 3 h um mehr als 71 % (Abb. 3.2.9 B und C).

### 3.2.6 Einfluss von divalenten Kationen und Metallionen

Die extrazelluläre Kationenkonzentration spielt bei vielen physiologischen Prozessen eine entscheidende Rolle, wie z.B. bei der elektromechanischen Kopplung der Muskelkontraktion oder der Sekretion von Neurotransmittern (Lipscombe *et al.* 2004). Dementsprechend sind eine Reihe von selektiv durchlässigen Kationen-Transportkanäle bekannt, unter anderen Calcium-Transportkanäle (Tsien *et al.* 1987). Untersucht wurde die Abhängigkeit der Eisenaufnahme von der extrazellulären Kationenkonzentration durch Variation des Inkubationspuffers Ip-Hepes hinsichtlich der Calcium- und der Magnesiumkonzentration. Hierzu wurden APKs mit 100  $\mu$ M FAC in Abwesenheit oder in Gegenwart der einfachen und dreifachen Calcium- oder Magnesiumkonzentration für 3 h inkubiert. Keine der untersuchten Inkubationsbedingungen führte zu einer deutlichen Erhöhung der LDH-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle (Tab. 3.2.1). Der zelluläre Eisengehalt nahm in Abwesenheit von Calcium bzw. Magnesium signifikant ab, sowie bei einer dreifachen Erhöhung gegenüber der normalen Konzentration signifikant zu (Tab. 3.2.1). Im Vergleich zur Kontrolle konnte ein stärkerer Einfluss auf den zellulären Eisengehalt durch Variation der Calciumkonzentration (-76 % bis +125 %) als durch Variation der Magnesiumkonzentration (-15 % bis +32 %) beobachtet werden.

**Tab. 3.2.1: Einfluss von divalenten Kationen auf die Eisenaufnahme nach Gabe von FAC**

Divalente Kationen	Eingesetzte Konzentration (mM)	Vielfaches der $[Ca^{2+}]/[Mg^{2+}]$ zur Kontrolle	Zellulärer Eisengehalt (nmol/mg)	Signifikanz zur Kontrolle	LDH-Freisetzung (%)
Ca <sup>2+</sup>	0.0	0x	40 ± 3.5	*	19 ± 8
	1.8	1x	167 ± 34	-	12 ± 7
	5.4	3x	376 ± 61	***	10 ± 3
Mg <sup>2+</sup>	0.0	0x	125 ± 14	*	13 ± 5
	1.0	1x	167 ± 34	-	13 ± 6
	3.0	3x	221 ± 30	*	8 ± 2

APKs wurden in Ip-Hepes mit 100  $\mu$ M FAC bei den angegebenen Konzentrationen von Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> für 3 h inkubiert. Bestimmt wurde der spezifische zelluläre Eisengehalt und die LDH-Aktivität im Zellüberstand (Freisetzung) nach der Inkubation in Prozent der initialen zellulären LDH-Aktivität. Signifikant unterschiedliche Werte des zellulären Eisengehaltes zur Kontrolle wurden mit Sternen gekennzeichnet (-: Kontrolle).



Aus der Literatur ist bekannt, dass LTCCs – neben ihrer primären Funktion zum Transport von Calcium – auch die Fähigkeit zum Transport von weiteren divalenten Kationen wie  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  besitzen (Hess *et al.* 1986; Winegar *et al.* 1991; Atar *et al.* 1995; Tsushima *et al.* 1999). Darüber hinaus konnte die Expression von LTCCs für kultivierte Astrocyten demonstriert werden (Latour *et al.* 2003). Um Aufschluss über eine mögliche Beteiligung von LTCCs an der Akkumulation von Eisen in APKs zu erhalten, wurde der Einfluss einer Reihe von zweiwertigen Metallionen ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  und  $\text{Sr}^{2+}$ ), die als Substrate für LTCCs beschrieben sind (Oudit *et al.* 2006), auf die Eisenakkumulation getestet. Hierzu wurden APKs mit 100  $\mu\text{M}$  FAC in Abwesenheit oder Gegenwart eines 10-fachen Überschusses von  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  und  $\text{Sr}^{2+}$  für 1 h inkubiert. Darüber hinaus wurde der Einfluss von Cadmium auf die Eisenakkumulation getestet. Cadmium wirkt sich unter anderem auf den cytosolischen Calciumgehalt aus und wird daher zur Modifikation der Aktivität von Calciumkanälen verwendet (Inman und Wessling-Resnick 1993, Tsushima *et al.* 1999). Zur Vermeidung von ungewollten toxischen Nebenwirkungen wurde die maximale Konzentration von Cadmium auf 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  im eisenhaltigen Inkubationsmedium beschränkt. Es waren keine signifikanten Unterschiede der extrazellulären LDH-Aktivität nach 1 h im Vergleich zur Kontrolle festzustellen. Des Weiteren führte keine der Inkubationsbedingungen zu einer signifikanten Veränderung des zellulären Eisengehaltes gegenüber der Kontrollbedingung (Tab. 3.2.2). Die gewonnenen Daten zeigen also keine Inhibierung der Eisenakkumulation in APKs durch die untersuchten Metallionen.

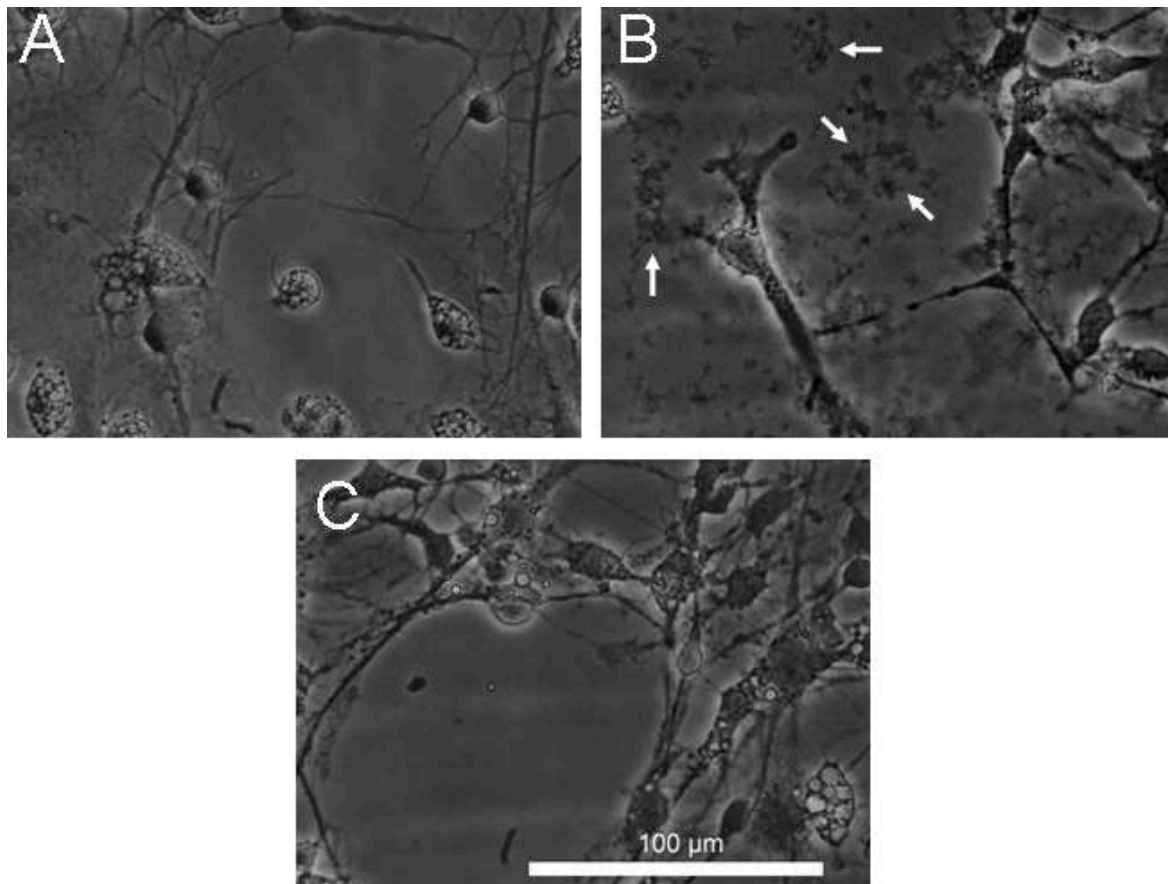
**Tab. 3.2.2: Einfluss von divalenten Metallionen auf die Eisenaufnahme nach Gabe von FAC**

Zusätzliche Divalente Metallionen	Eingesetzte Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	Molarer Überschuss zur [FAC]	Zellulärer Eisengehalt (nmol/mg)	Signifikanz zur Kontrolle	LDH-Freisetzung (%)
Kontrolle	-	-	65 ± 27	-	4 ± 1
Zn	1000	10x	52 ± 11	n.s.	2 ± 1
Ba	1000	10x	83 ± 12	n.s.	6 ± 3
Sr	1000	10x	60 ± 8	n.s.	4 ± 1
Cd	10	0.1x	32 ± 20	n.s.	18 ± 25
Cd	100	1.0x	68 ± 6	n.s.	5 ± 1

APKs wurden in Ip-Hepes mit 100  $\mu\text{M}$  FAC in Gegenwart oder Abwesenheit von verschiedenen divalenten Metallionen in den angegebenen Konzentrationen für 1 h inkubiert. Bestimmt wurde der spezifische zelluläre Eisengehalt und die LDH-Aktivität im Zellüberstand (Freisetzung) nach der Inkubation in Prozent der initialen zellulären LDH-Aktivität. Signifikant unterschiedliche zelluläre Eisengehalte zum Werte der Kontrolle konnten nicht festgestellt werden (-: Kontrolle; n.s.: nicht signifikant).

### 3.2.7 Einfluss von Endocytose-Inhibitoren

Anschließend an experimentelle Inkubationen konfluenter APKs mit FAC wurde die Morphologie der Zellen routinemäßig unter dem Mikroskop visuell begutachtet. Hierbei konnte mehrfach bei Konzentrationen bis zu 200  $\mu\text{M}$  FAC Ablagerungen bzw. Niederschläge auf den Zelloberflächen beobachten werden, die auch durch nachfolgende Waschschritten nicht gänzlich zu entfernen waren. Zur besseren Dokumentation der Niederschläge wurden deshalb pre-konfluente 7 Tage alte APKs in Ip-Hepes in Abwesenheit oder Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  oder 500  $\mu\text{M}$  FAC für 3 h bei 37 °C inkubiert. Phasenkontrastaufnahmen der behandelten pre-konfluenten APKs wiesen nach der Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  FAC Niederschläge auf (Abb. 3.2.10 B). Kontroll-Inkubationen pre-konfluenten Kulturen in Abwesenheit von FAC (Abb. 3.2.10 A) oder in Gegenwart von 500  $\mu\text{M}$  FAC (Abb. 3.2.10 C) waren frei von Niederschlägen.



**Abb. 3.2.10: Phasenkontrastaufnahme von APKs nach Gabe von FAC**

Pre-Konfluente APKs (7 Tage alt) wurden in Abwesenheit (A) oder Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  (B) oder 500  $\mu\text{M}$  FAC (C) für 1 h bei 37 °C in Ip-Hepes inkubiert. Pfeile in B deuten auf Niederschläge aus dem Inkubationsmedium hin. Die Größenangabe in C (gilt auch für A und B).

Ein Einfluss der beobachteten Niederschläge unter den beschriebenen Bedingungen auf die Akkumulation von Eisen aus FAC-haltigen Medien kann nicht ausgeschlossen werden. Eine

Möglichkeit der Eisenakkumulation könnte daher Endocytose von Eisenpartikeln in APKs sein. Zur Klärung, ob es sich bei den beobachteten Niederschlägen eventuell um eisenhaltige Präzipitate handelt, die durch Endocytose-vermittelte Aufnahme in die Zellen gelangen, wurde nachfolgend der Einfluss von Endocytose-Inhibitoren auf die Eisenakkumulation von APKs aus FAC in Ip-Hepes untersucht.

Endocytose ist die zelluläre Aufnahme von Macromolekülen bzw. Partikeln durch Membranhüllte Vesikel (Conner und Schmid 2003; Mercer *et al.* 2010; Kumari *et al.* 2010). Unter dem Oberbegriff der Endocytose sind verschiedene Arten der zellulären Partikelaufnahme zusammengefasst, die sich unter anderem in Größe und Form der ausgebildeten Vesikel sowie der beteiligten zellulären Mechanismen unterscheiden. Im Allgemeinen unterteilt man in Macroscale Endocytose (Aufnahme von Partikeln > 500 nm) durch Phagocytose und Macropinocytose sowie Microscale Endocytose (Aufnahme von Partikel < 200 nm) durch die Clathrin-vermittelte Endocytose, Caveolae-vermittelte Endocytose, Dynamin-abhängiger Endocytose sowie der Clathrin- und Dynamin-unabhängiger Endocytose Prozesse, die Vesikel in einer Größenordnung von 50 nm bis größer als 1 µm ausbilden und aufnehmen (Conner und Schmid 2003; Mercer *et al.* 2010; Kumari *et al.* 2010). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Inhibitoren wirken auf die Clathrin-vermittelte Endocytose (Chlorpromazin), auf Aktinfilament-abhängige Phagocytose und Macropinocytose (Cytochalasin D) oder verhindern durch Ansäuerung der Endosomen den enzymatischen Abbau der aufgenommenen Vesikel (Chloroquin; Huth *et al.* 2006).

Zur Hemmung der Endocytose-Aktivität wurden die APKs in Ip-Hepes entweder für 30 min mit 10 µM Cytochalasin D (Cyto D), für 60 min mit 20 µM Chlorpromazin (CPZ) oder für 60 min mit 600 bis 1000 µM Chloroquin vorbehandelt und nachfolgend mit 100 µM FAC bei 37 °C in Gegenwart des entsprechenden Endocytose-Inhibitors bzw. bei 4 °C für 2 bis 4 h inkubiert (Tab. 3.2.3). Die LDH-Aktivität im Zellüberstand war unter den aufgeführten Inkubationsbedingungen durch keinen der verwendeten Endocytose-Inhibitoren gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht (Tab. 3.2.3). Die Inhibierung der Endocytose-Aktivität der APKs führte zu signifikanten Unterschieden hinsichtlich des zellulären Eisengehaltes im Vergleich zur der jeweiligen Kontrolle (Abb. 3.2.11). So wurde mit Cytochalasin D die stärkste Reduktion der Eisenaufnahme um 44.5 % erzielt. Darüber hinaus konnte mit den Endocytose-Inhibitoren Chloroquin und Chlorpromazin eine deutliche Reduktion der Eisenaufnahme von 25 % bis 18 % festgestellt werden (Abb. 3.2.11).

Tab. 3.2.3: Einfluss von Endocytose-Inhibitoren auf die Eisenaufnahme nach Gabe von FAC

Endocytose-Inhibitor	Ein-gesetzte Konz. (µM)	Inkubationszeit Vor- Inkubation (h)	Haupt- Inkubation (h)	Zellulärer Eisen-gehalt (nmol/mg)	Signifikanz zur Kontrolle	LDH-Frei-setzung (%)
Kontrolle	-	1	2	155 ± 37	-	3 ± 1
CPZ	20	1	2	127 ± 33	**	4 ± 1
Kontrolle	-	1	2	125 ± 14	-	4 ± 3
Chloroquin	600	1	2	101 ± 15	*	4 ± 3
Chloroquin	1000	1	2	94 ± 13	*	3 ± 2
Kontrolle	-	0.5	4	311 ± 32	-	3 ± 1
Cyto D	10	0.5	4	171 ± 15	***	4 ± 5
4 °C	-	-	2	22 ± 8	***	4 ± 1
4 °C	-	-	4	26 ± 8	***	4 ± 3

APKs wurden in Ip-Hepes entweder für 30 min mit 10 µM Cytochalasin D (Cyto D), für 60 min mit 20 µM Chlorpromazin (CPZ) oder für 60 min mit 600 bis 1000 µM Chloroquin vorbehandelt und nachfolgend mit 100 µM FAC bei 37 °C in Gegenwart des entsprechenden Endocytose-Inhibitors bzw. bei 4°C für die angegebenen Zeitintervalle inkubiert. Bestimmt wurde der zelluläre Eisengehalt in Prozent der Kontrolle (100 µM FAC in Abwesenheit des Endocytose-Inhibitors) bei 37 °C. Signifikante Unterschiede zu den Werten der jeweiligen Kontrolle wurden mit Sternen gekennzeichnet.

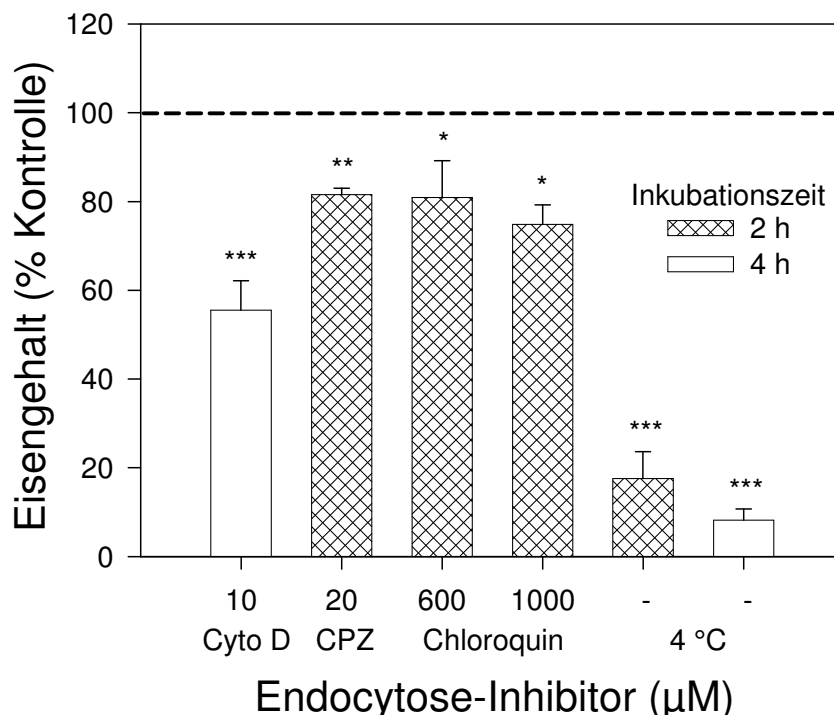


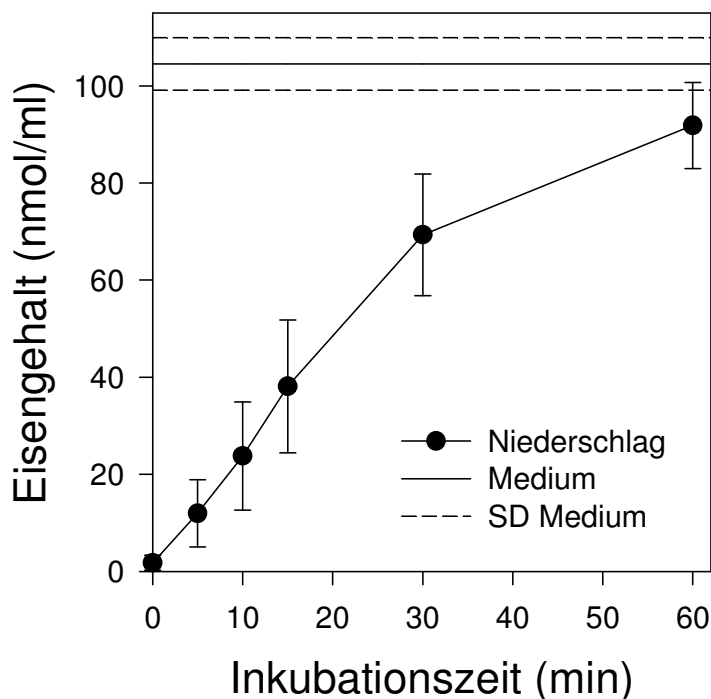
Abb. 3.2.11: Einfluss von Endocytose-Inhibitoren auf die Eisenaufnahme nach Gabe von FAC

APKs wurden mit 100 µM FAC in Ip-Hepes in An- bzw. Abwesenheit von Endocytose-Inhibitoren inkubiert. Hierzu wurden die Zellen entweder mit 10 µM Cytochalasin D (Cyto D), mit 20 µM Chlorpromazin (CPZ) oder mit 600 bzw. 1000 µM Chloroquin bzw. bei 4°C für die angegebenen Zeitintervalle behandelt. Bestimmt wurde der zelluläre Eisengehalt in Prozent der entsprechenden zugehörigen Kontrolle (gestrichelte Linie). Signifikante Unterschiede der zellulären Eisengehalte zu den Werten der Kontrollen wurden mit Sternen gekennzeichnet. Der Eisengehalt der Kontrolle (100 %) entsprach für Cyto D 311 ± 32 nmol/mg nach 4 h bei 37 °C, für Chloroquin 125 ± 14 nmol/mg nach 2 h bei 37 °C und für CPZ 155 ± 37 nmol/mg nach 2 h bei 37 °C.

### 3.3 Untersuchung zur Bildung von eisenhaltigen Niederschlägen

#### 3.3.1 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit

Eine notwendige Voraussetzung für die Eisenaufnahme durch Endocytose ist das Auftreten von Eisenpartikeln aus FAC-haltigen Lösungen. Dies erscheint aufgrund der guten Löslichkeit von FAC in wässrigen Lösungen zunächst unwahrscheinlich. Zur Untersuchung möglicher Präzipitatbildung wurden 100  $\mu\text{M}$  FAC gelöst in Ip-Hepes für bis zu 1 h bei 37 °C inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten je 1.0 ml Probe entnommen, welche nach Zentrifugation bei 12500xg für 15 min auf die Bildung eisenhaltiger Niederschläge untersucht wurden. Abbildung 3.3.1 zeigt, dass eisenhaltige Präzipitate nachgewiesen wurden, deren Anteil mit zunehmender Inkubationszeit auf bis zu 90 % der initialen Eisenmenge anstieg.



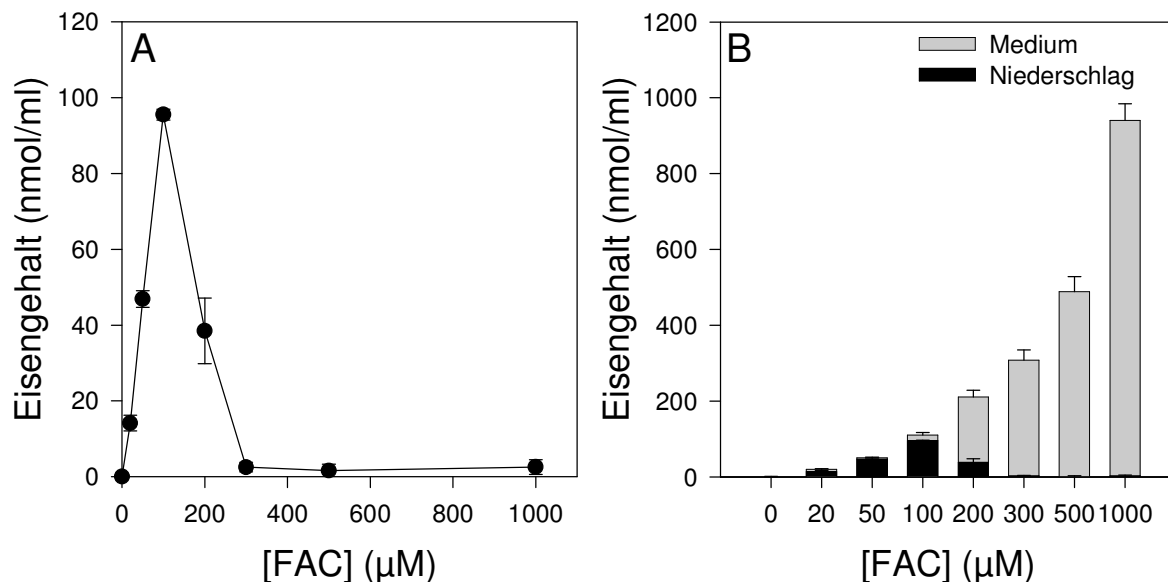
**Abb. 3.3.1: Zeitabhängigkeit der Eisenpräzipitation**

Ip-Hepes mit 100  $\mu\text{M}$  FAC wurde für bis zu 60 min bei 37 °C inkubiert. Bestimmt wurde der Eisengehalt in der Ausgangslösung (Medium) sowie der Eisengehalt im Niederschlag von 1.0 ml Probe nach Inkubation und anschließender Zentrifugation bei 12500xg für 15 min.

Um zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen der eingesetzten FAC-Konzentration und dem Auftreten von Eisenpräzipitaten festzustellen ist, wurde Ip-Hepes mit FAC-Konzentrationen bis zu 1000  $\mu\text{M}$  für 1 h bei 37 °C inkubiert und der Eisengehalt im Niederschlag nach Zentrifugation bestimmt.

Abbildung 3.3.2 A zeigt, dass in Abhängigkeit zur eingesetzten FAC-Konzentration unterschiedliche Eisengehalte im Präzipitat auftraten und nur in Ansätzen mit einer FAC-

Konzentration geringer als 300  $\mu\text{M}$  eisenhaltige Präzipitate nachweisbar waren. So konnte für Bedingungen bis zu 100  $\mu\text{M}$  FAC mit dem Anstieg der Eisenkonzentration auch eine Zunahme des Eisengehalts im Präzipitat zu verzeichnet werden (Abb. 3.3.2 A). Bis zu 90 % des initial eingesetzten Eisens lag bei 100  $\mu\text{M}$  FAC nach einstündiger Inkubation als rostbraunes Eisenpräzipitat vor. Für höhere FAC-Konzentrationen ( $> 100 \mu\text{M}$ ) war jedoch nur ein geringerer Eisengehalt im Präzipitat festzustellen. So lagen bei 200  $\mu\text{M}$  FAC lediglich 18 % des eingesetzten Eisens nach einstündiger Inkubation als Präzipitat vor (Abb. 3.3.2 A). Betrachtet man die Verlaufskurve der konzentrationsabhängigen Präzipitatbildung aus FAC-Lösungen in Ip-Hepes, so ist diese als Glockenkurve mit einem Maximum bei ca. 100  $\mu\text{M}$  FAC zu beschreiben (Abb. 3.3.2 A).

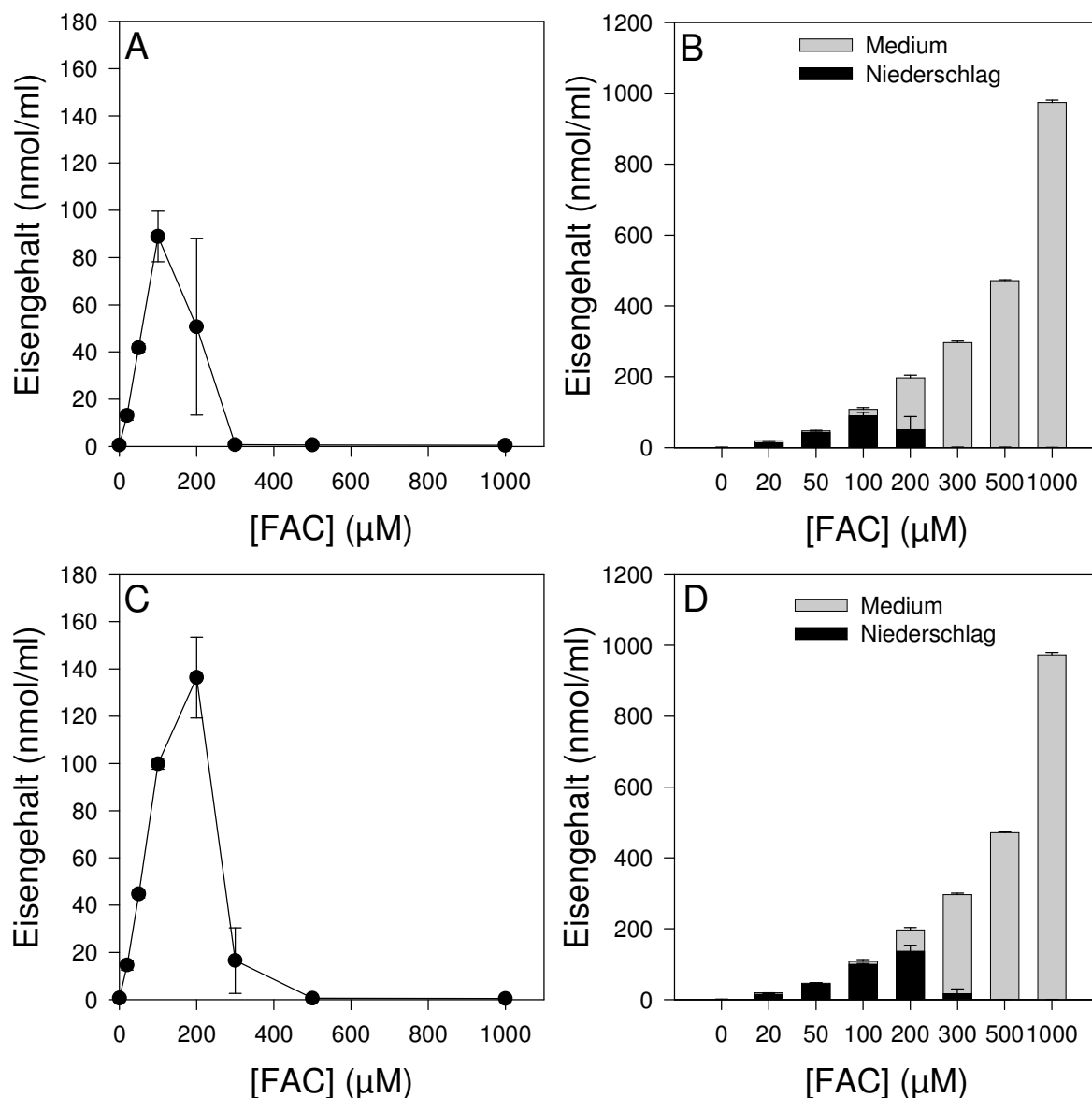


**Abb. 3.3.2: Konzentrationsabhängigkeit der Eisenpräzipitation in Ip-Hepes**

Ip-Hepes mit bis zu 1000  $\mu\text{M}$  FAC wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Eisengehalt im Niederschlag von 1.0 ml Probe wurde nach Inkubation und anschließender Zentrifugation bei 12500xg für 15 min bestimmt. **A:** Eisengehalt in den Niederschlägen. **B:** Initialer Eisengehalt im Medium im Vergleich zum Eisengehalt im Niederschlag.

Die Untersuchungen zur Bildung von Eisenniederschlägen ergaben für Ip-Hepes eine Abhängigkeit zur eingesetzten FAC-Konzentration. Dieser Zusammenhang muss allerdings nicht zwangsläufig für andere Medien gültig sein. Komplexere Medien wie DMEM enthalten eine Reihe von Substanzen, wie Aminosäuren und Vitamine, die Wechselwirkungen mit den positiv geladenen Eisenionen eingehen können und daher ein Ausfallen als Präzipitate verhindern können.

Abbildung 3.3.3 zeigt das Auftreten von eisenhaltigen Niederschlägen in Abhängigkeit zur FAC-Konzentration in DMEM. Inkubation bis zu 1 h bei 37 °C (Abb. 3.3.3 A und B) führte zu vergleichbaren Ergebnissen der Eisenniederschlagsbildung wie für Ip-Hepes gezeigt (Abb. 3.3.2). Auch hier waren eisenhaltige Präzipitate nur bei FAC-Konzentration geringer als 300  $\mu\text{M}$  FAC zu beobachten. Ein vermindertes Ausfallen von Eisen in DMEM (Abb. 3.3.3) im Vergleich zur Präzipitation von FAC in Ip-Hepes (Abb. 3.3.2) war nicht festzustellen. Es konnte lediglich eine größere Standardabweichung des Mittelwertes des Eisengehaltes in Präzipitat für 200  $\mu\text{M}$  FAC in DMEM bestimmt werden (Abb. 3.3.2 A und 3.3.3 A).



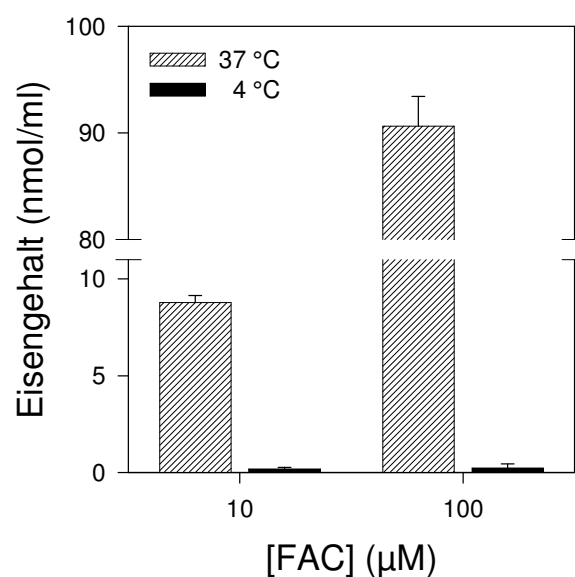
**Abb. 3.3.3: Konzentrationsabhängigkeit der Eisenpräzipitation in DMEM**

DMEM mit bis zu 1000  $\mu\text{M}$  FAC wurde für 1 h (A und B) sowie 4 h (C und D) bei 37 °C inkubiert. Der Eisengehalt im Niederschlag von 1.0 ml Probe wurde nach Zentrifugation bei 12500xg für 15 min bestimmt. A und C: Eisengehalt in den Niederschlägen nach entsprechender Inkubationszeit und anschließender Zentrifugation bei 12500xg und 15 min. B und D: Initialer Eisengehalt im Medium sowie Eisengehalt im Niederschlag nach Inkubation.

Ein verlängerte Inkubation von bis zu 4 h von gelöstem FAC in DMEM bei 37 °C führte zu einem Anstieg des Eisengehalts im Niederschlag, insbesondere für Konzentrationen größer als 100 µM FAC (vergleiche Abb. 3.3.3 A und C). Bei verlängerter Inkubation bei 37 °C folgte die Konzentrationsabhängigkeit der Eisenpräzipitation zwar weiterhin dem Verlauf einer Glockenkurve, allerdings mit einem Maximum bei ca. 200 µM statt des zuvor beobachteten Maximums bei ca. 100 µM FAC (Abb. 3.3.3 A und C). Darüber hinaus traten bei verlängerter Inkubation auch eisenhaltige Niederschläge bei höheren FAC-Konzentrationen (300 µM) auf, bei denen zuvor keine Niederschläge beobachtet wurden. Eine FAC-Konzentrationsobergrenze, ab der Eisenpräzipitate aus FAC-haltigen Lösungen unter den untersuchten Bedingungen nicht mehr entstehen, konnte nicht festgestellt werden.

### 3.3.2 Temperaturabhängigkeit

Zum besseren Verständnis der Präzipitation von Eisen aus wässrigen FAC-Lösungen, wurde im nachfolgenden sowohl die Temperatur- als auch die pH-Abhängigkeit der Bildung von eisenhaltigen Niederschlägen untersucht. Um konzentrationsbedingte Unterschiede hierbei auszuschließen, wurden Ansätze von 10 µM sowie 100 µM FAC in Ip-Hepes bei 37 oder 4 °C für 1 h inkubiert. Für beide Konzentrationen konnte durch das Herabsenken der Inkubationstemperatur auf 4 °C ein Ausfallen von Eisen aus FAC-Lösungen vollständig verhindert werden (Abb. 3.3.4). Nach 1 h Inkubation bei 37 °C lag sowohl für 10 µM als auch für 100 µM FAC ca. 90 % des eingesetzten Eisens in den FAC-Lösungen als Präzipitat vor, hingegen konnte bei 4 °C keine Niederschlagsbildung beobachtet werden (Abb. 3.3.4).



**Abb. 3.3.4: Temperaturabhängigkeit der Eisenpräzipitation**

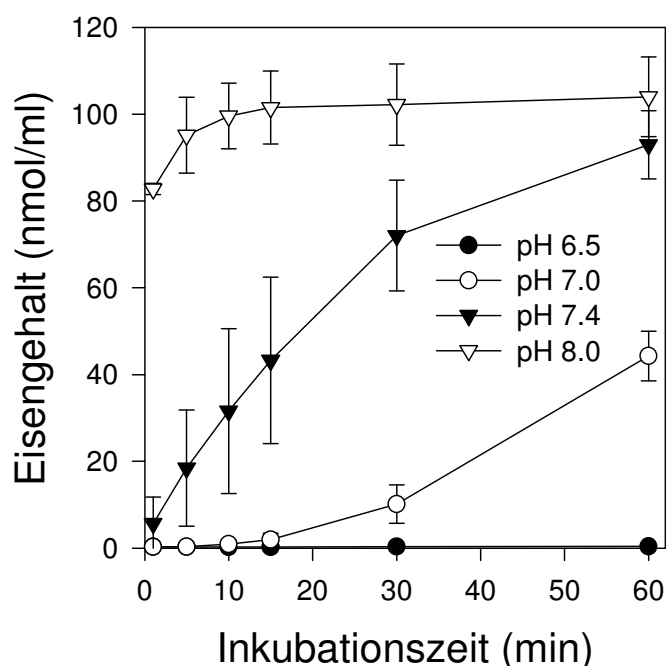
Ip-Hepes mit 10 µM oder 100 µM FAC wurde für 1 h bei 37 ° oder 4 °C inkubiert. Der Eisengehalt im Niederschlag von 1.0 ml Probe wurde nach Inkubation und anschließender Zentrifugation bei 12500xg für 15 min bestimmt.



### 3.3.3 pH-Wert-Abhängigkeit

Ähnlich substantiell wie die Abnahme der Inkubationstemperatur von 37 °C auf 4 °C, wirkte sich auch die Änderung des pH-Wertes von pH 7.4 auf pH 6.5 aus (Abb. 3.3.5). Auch hier konnte eine vollständige Verhinderung der Präzipitation von Eisen aus FAC-Lösungen nach 1 h Inkubation beobachtet werden. Darüber hinaus war für pH 7.0 und pH 8.0 im Vergleich zur Standardbedingung bei pH 7.4 ein deutlich veränderter zeitlicher Verlauf der Eisen-niederschlagsbildung innerhalb von 60 min Inkubation festzustellen. So wurde einerseits für pH 7.0 nach 60 min Inkubation ein um 52 % geringer Eisengehalt in Präzipitat als für pH 7.4 festgestellt und andererseits lag für pH 8.0 schon nach 15 min Inkubation nahezu 100 % des Eisens als Präzipitat vor (Abb. 3.3.5).

Es kann also eine Abhängigkeit der Präzipitation von Eisen aus FAC-Lösungen vom pH-Wert festgestellt werden und mit zuvor beobachteten pH-abhängigen Effekten der Eisenakkumulation in APKs korreliert werden (Abb. 3.2.9). Im nachfolgendem sollen Bedingungen etabliert werden, bei denen ein Ausfallen von Eisen aus FAC bei pH 7.4 und 37 °C ausbleibt. Die Zugabe von Citrat zum Inkubationsansatz erscheint hierbei ein möglicher Ansatz.



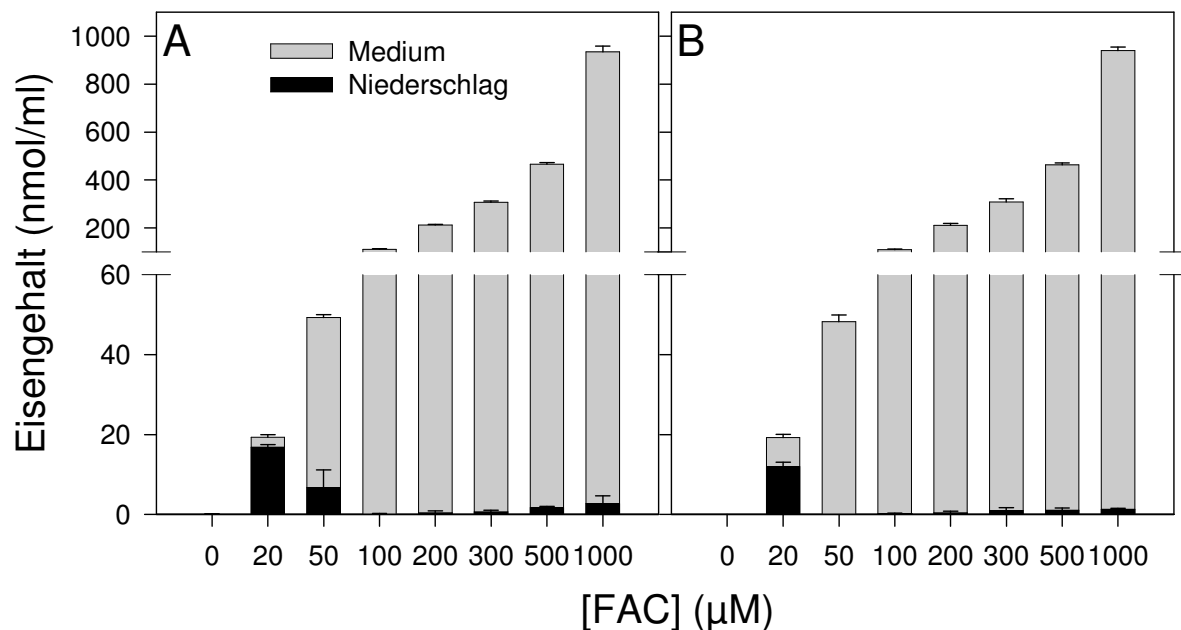
**Abb. 3.3.5: Einfluss des pH-Wertes auf die Bildung eisenhaltiger Niederschläge**

Ip-Hepes mit 100 µM FAC wurde bei den angegebenen pH-Werten für bis zu 60 min bei 37 °C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Eisengehalt im Niederschlag von 1.0 ml Probe nach Zentrifugation bei 12500xg für 15 min bestimmt.

### 3.3.4 Einfluss von Citrat

Ein Ansatz zur Vermeidung der Präzipitation von Eisen aus FAC-Lösungen stellt die Gabe von zusätzlichem Citrat zum Inkubationsansatz dar. Citrat kommt im Hirnliquor in Konzentration von bis zu 0.2 mM vor und kann die positiv geladenen Eisenionen chelatieren (Bradbury 1997). Darüber hinaus wird Citrat eine Rolle bei der zellulären Ausnahme von nicht-Tf-gebundenem Eisen zugesprochen (Gutierrez *et al.* 1997; Conrad und Umbreit 2002).

Um den Effekt von Citrat auf die Präzipitation von Eisen zu testen, wurden bis zu 1000  $\mu\text{M}$  FAC mit der equimolaren Konzentration an Natriumcitrat gemischt und anschließend für 1 h bei 37 °C inkubiert. Abbildung 3.3.6 A zeigt die Eisengehalte im Niederschlag nach der Inkubation im Vergleich zur eingesetzten Eisenkonzentration. Aus dem geschilderten Versuchsansatz geht hervor, dass eine Verminderung der Präzipitation von Eisen aus FAC-Lösungen durch Zugabe von Natriumcitrat möglich ist. Für Konzentrationen ab 100  $\mu\text{M}$  FAC konnte eine Bildung von Eisenniederschlägen komplett, sowie für 50  $\mu\text{M}$  FAC teilweise verhindert werden. Für geringere Konzentrationen als 50  $\mu\text{M}$  FAC konnte hingegen kein Verminderung der Präzipitation beobachtet werden (Abb. 3.3.6 A).



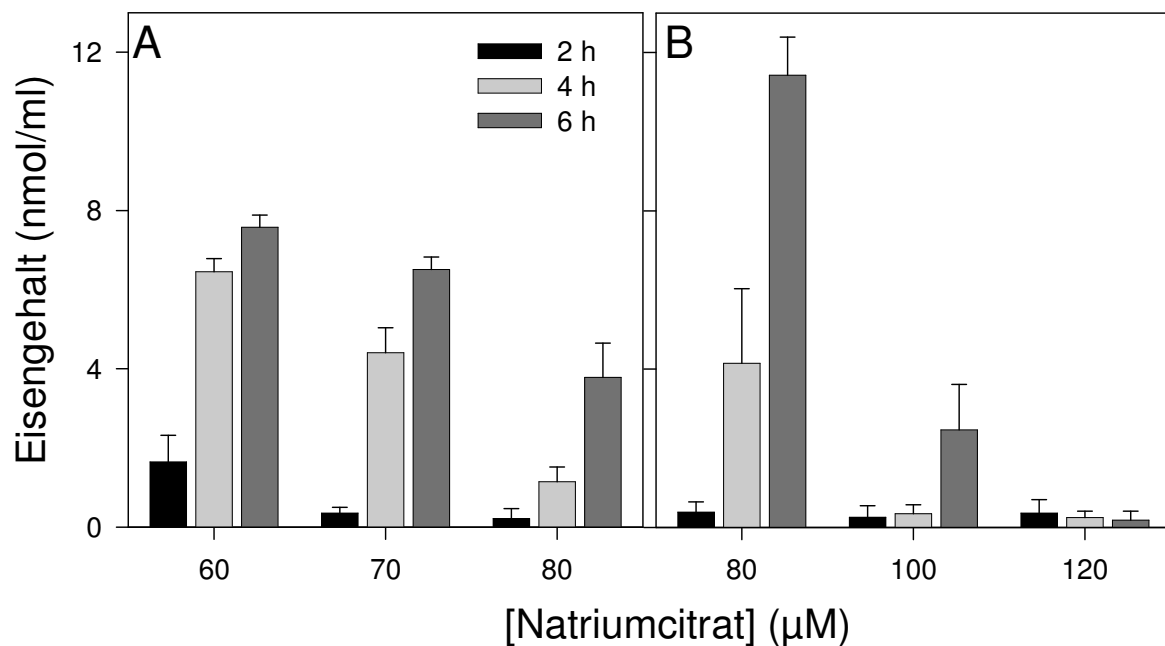
**Abb. 3.3.6: Einfluss von Citrat auf die Bildung von eisenhaltigen Niederschlägen in Ip-Hepes**

Die angegebenen Konzentrationen an FAC in Ip-Hepes wurden mit der equimolaren (A) oder der 2-fachen (B) Konzentration an Natriumcitrat gemischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Bestimmt wurde der initiale Eisengehalt im Medium sowie der Eisengehalt im Niederschlag von 1.0 ml Probe nach Inkubation und anschließender Zentrifugation bei 12500xg für 15 min.

In einem zweiten Ansatz wurde die Gabe eines 2-fachen molaren Überschusses an Natriumcitrat gegenüber der eingesetzten FAC-Konzentration untersucht. Dies führte zu

einem deutlich verringerten Eisengehalt im Präzipitat für 20  $\mu\text{M}$  FAC sowie zur Vermeidung des Niederschlags für Konzentrationen ab 50  $\mu\text{M}$  FAC (Abb. 3.3.6 B). Folglich ist also eine Abhängigkeit der Eisenpräzipitation von der Konzentration an Natriumcitrat festzustellen. Des Weiteren suggerieren die Ergebnisse, dass die Bildung von Eisenniederschlägen ab einer zu bestimmenden Mindestkonzentration an Citrat im Inkubationsansatz ausbleiben könnte.

Zur Eingrenzung und Bestimmung einer potentiellen Mindestkonzentration an Natriumcitrat, die zur Vermeidung von Eisenniederschläge aus FAC in Ip-Hepes führt, wurde die Gabe eines 4- bis 8-fachen molaren Überschusses an Natriumcitrat für 10  $\mu\text{M}$  FAC und für 20  $\mu\text{M}$  FAC getestet. Um eine Präzipitation von Eisen auch für potentiell nachfolgende Akkumulationsstudien mit APKs auszuschließen, wurden die zellfreien FAC-Lösungen für bis zu 6 h bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die erzielten Ergebnisse zeigten, erstens dass mit zunehmender Inkubationszeit ein Anstieg des Eisengehaltes im Niederschlag zu verzeichnen war (Abb. 3.3.7 A und B), mit Ausnahme des Inkubationsansatz mit 20  $\mu\text{M}$  FAC und 120  $\mu\text{M}$  *tri*-Natriumcitrat (6-facher molarer Überschuss).



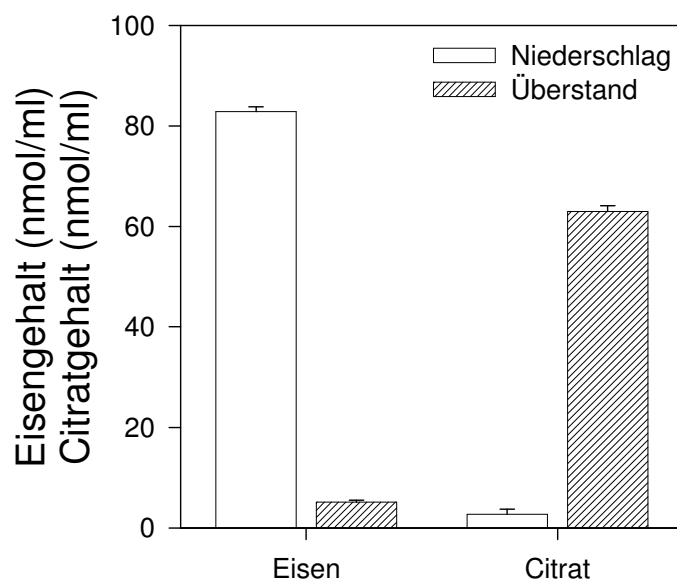
**Abb. 3.3.7: Einfluss von Citrat auf die Bildung von eisenhaltigen Niederschlägen**

Ip-Hepes mit 10  $\mu\text{M}$  FAC (A) bzw. 20  $\mu\text{M}$  FAC (B) wurde mit 6- bis 8-fachen (A) oder der 4- bis 6-fachen (B) Konzentration an Natriumcitrat gemischt und für 1 h bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Bestimmt wurde der Eisengehalt im Niederschlag von 1.0 ml Probe nach Inkubation und anschließender Zentrifugation bei 12500xg für 15 min.

Zweitens zeigte sich, dass je geringer die eingesetzte FAC-Konzentrationen ist, desto höher ein molarer Überschuss an Natriumcitrat sein muss, um ein Auftreten von Eisenpräzipitaten zu verhindern (Abb. 3.3.7 A und B). So genügte für 20  $\mu\text{M}$  FAC bereits der 6-fache molare

Überschuss an Natriumcitrat um innerhalb von 6 h Inkubationszeit bei 37 °C das Auftreten von eisenhaltigen Niederschlägen zu vermeiden (Abb. 3.3.7 B), für 10 µM FAC jedoch nicht einmal der 8-fache molare Überschuss an Natriumcitrat (Abb.3.3.7 A). Das Auftreten eisenhaltiger Niederschläge ist daher durch die Zugabe von *tri*-Natriumcitrat, nur durch die Gabe eines hohen Überschusses an *tri*-Natriumcitrat (> 8-facher molarer Überschuss), für alle zur Untersuchung der Eisenakkumulation in APKs relevanten FAC-Konzentrationen (10-1000 µM), zu verhindern. Die Anwendbarkeit eines hohen molaren *tri*-Natriumcitrat-Überschusses für die Eisenakkumulationsstudien mit APKs scheint allerdings nicht möglich, da bereits gezeigt werden konnte, dass die Gabe eines 10-fachen molaren *tri*-Natriumcitrat-Überschusses die Eisenakkumulation in APKs nahezu komplett verhindert (Abb. 3.2.3).

Ein Ausfallen von Eisen aus FAC-Lösungen konnte in Inkubationsmedien in Konzentrationen bis zu 300 µM nachgewiesen werden, unklar ist bisher jedoch in welcher Form das Eisen ausfällt. Um diese Fragestellung zu klären, wurde untersucht, ob der Eisencitrat-Komplex nach der Präzipitation erhalten bleibt. Hierzu wurde der Eisen- und Citratgehalt einer 100 µM FAC-Lösung in Ip-Hepes im Niederschlag und Überstand nach der Inkubation für 1 h bei 37 °C bestimmt. Wie aus Abbildung 3.3.8 hervor geht, blieb der Eisencitrat-Komplex nach der Präzipitation des Eisens nicht erhalten. Im Präzipitat ließ sich der Hauptanteil des eingesetzten Eisens (ca. 94 %), im Überstand hingegen der überwiegende Anteil des Citrates (ca. 96 %) aus FAC nachweisen.



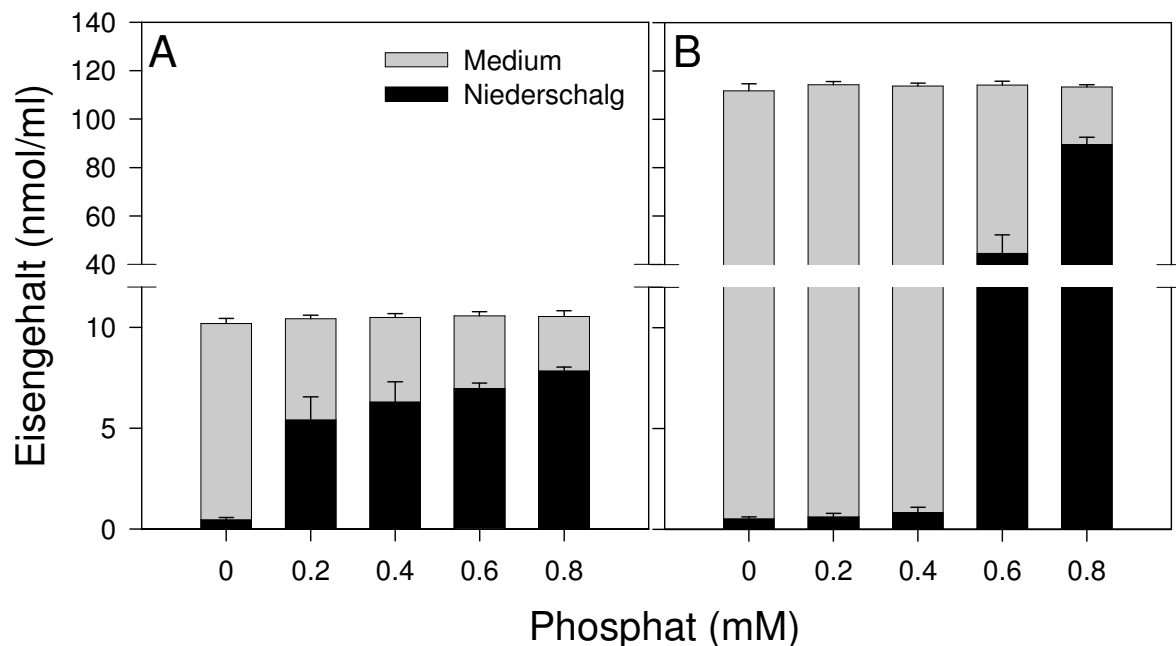
**Abb. 3.3.8: Eisen- und Citratgehalt im Überstand und Niederschlag**

Ip-Hepes mit 100 µM FAC wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Bestimmt wurden Eisen- und Citratgehalt von 1.0 ml Probe im Überstand sowie Niederschlag nach Inkubation und anschließender Zentrifugation bei 12500xg für 15 min.

### 3.3.5 Einfluss von Phosphat

Ferro-Eisen besitzt im Allgemeinen eine schlechte Löslichkeit in wässrigen Lösungen, so fällt beispielsweise in Reinstwasser gelöstes Ferro-Chlorid als Eisenhydroxid aus (Inman und Wessling-Resnick 1992; Guerinot und Yi 1994). Darüber hinaus kann Eisen in Gegenwart von Phosphat als schwerlösliches Eisenphosphat ausfallen (Galal-Gorchev und Stumm 1963). FAC wurde unter anderem aufgrund seiner guten Löslichkeit für die vorliegende Arbeit ausgewählt. Ein Einfluss von Phosphat auf die Bildung der Eisenniederschläge kann für die untersuchten Inkubationsbedingungen bisher nicht ausgeschlossen werden, zumal Ip-Hepes unter anderem 0.8 mM *di*-Natriumhydrogenphosphat enthält.

Zur Überprüfung des Einflusses von Phosphat auf die Löslichkeit von FAC, wurde Ip-Hepes mit 10  $\mu$ M oder 100  $\mu$ M FAC in Abwesenheit oder Gegenwart von bis zu 0.8 mM *di*-Natriumhydrogenphosphat für 1 h bei 37 °C inkubiert. Für beide FAC-Konzentrationen wurde in Abwesenheit von *di*-Natriumhydrogenphosphat eine Präzipitation von Eisen vermieden (Abb. 3.3.10). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass für 10  $\mu$ M FAC ab einer Konzentration von 0.2 mM *di*-Natriumhydrogenphosphat eisenhaltige Niederschläge in Ip-Hepes auftraten (Abb. 3.3.10 A). Lösungen mit 100  $\mu$ M FAC in Ip-Hepes wiesen erst ab einer Konzentration von 0.6 mM *di*-Natriumhydrogenphosphat Eisenniederschläge auf (Abb.3.3.10 B).

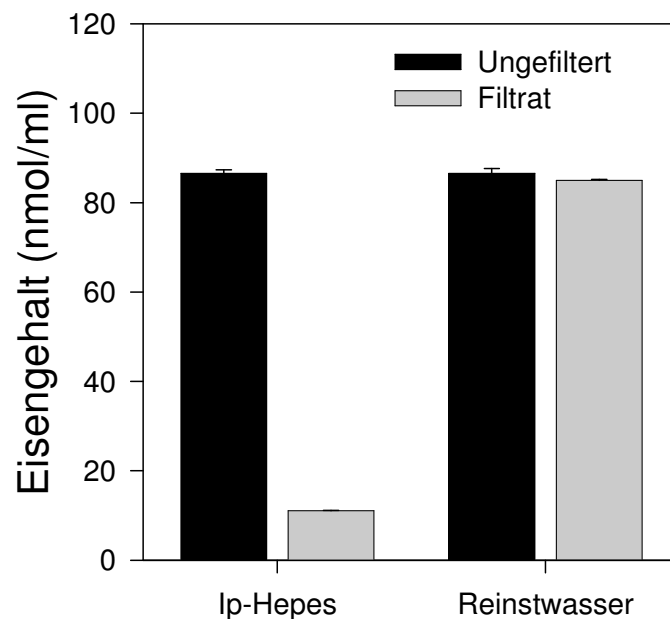


**Abb. 3.3.10: Einfluss der Phosphatkonzentration auf die Eisenpräzipitation**

Ip-Hepes mit den angegebenen Phosphatkonzentrationen wurde mit 10  $\mu$ M FAC (A) oder 100  $\mu$ M FAC (B) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Bestimmt wurde der initiale Eisengehalt im Medium und der Eisengehalt im Niederschlag von 1.0 ml Probe nach Inkubation und anschließender Zentrifugation bei 12500xg für 15 min.

### 3.3.6 Filtration der Eisenpräzipitate

Zur Abschätzung der Größe der Eisenpräzipitate aus FAC-haltigen Medien, wurden 100  $\mu\text{M}$  FAC in Ip-Hepes für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend durch einen Filter mit einer Ausschlussporengröße von 0.2  $\mu\text{m}$  gegeben. Um Anhaftungen von Eisen am Filter auszuschließen wurde 100  $\mu\text{M}$  FAC gelöst in Reinstwasser in gleicher Weise behandelt. Anschließend wurde der Eisengehalt der Filtrate sowie der Ausgangslösungen bestimmt. Das Filtrat der Eisenlösung in Ip-Hepes wies einen um 87 % verringerten Eisengehalt gegenüber der unfiltrierten Ip-Hepes Lösung auf. Dies entspricht in etwa dem verbleibenden gelösten Eisengehalt im Überstand nach Präzipitation einer 100  $\mu\text{M}$  FAC-Lösung in Ip-Hepes (Abb. 3.3.1). Die Filtration einer 100  $\mu\text{M}$  FAC-Lösung in Reinstwasser führte zu keiner signifikanten Reduktion des Eisengehaltes im Filtrat gegenüber der Ausgangslösung (Abb. 3.3.10). Demnach ist der Hauptanteil der Eisenpräzipitate aus FAC in Ip-Hepes größer als 200 nm. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Eisen aus FAC gelöst in Reinstwasser nicht ausfällt.



**Abb. 3.3.10: Filtration zur Abschätzung der Größe der Eisenpräzipitate**

100  $\mu\text{M}$  FAC in Ip-Hepes oder Reinstwasser wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend filtriert (0.2  $\mu\text{m}$  Porengröße). Bestimmt wurde der Eisengehalt von 1.0 ml Probevolumina der ungefilterten Lösung und des Filtrates.

## 3.4 Eisenakkumulation in phosphatfreiem Inkubationspuffer

### 3.4.1 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit

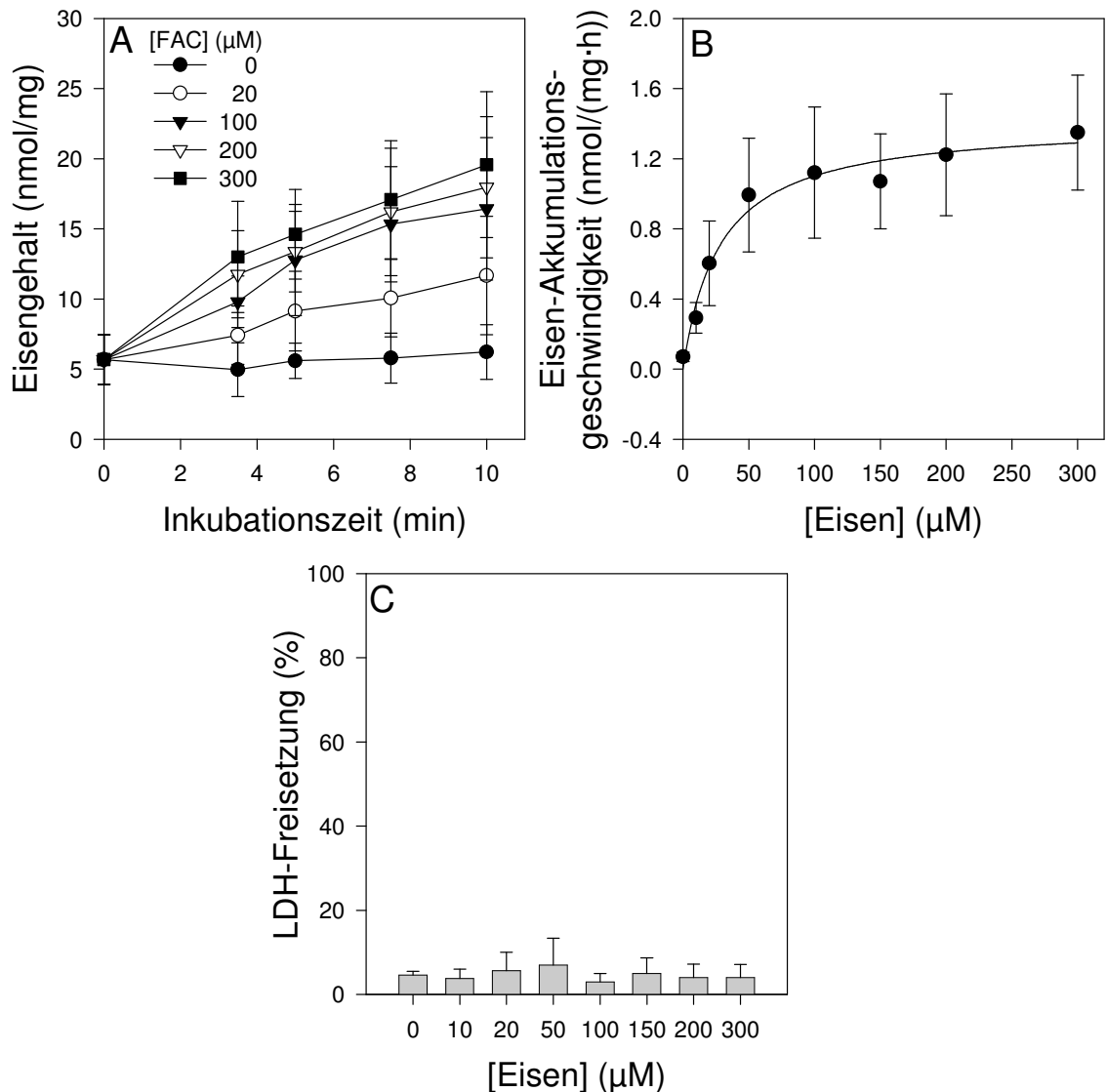
In Verlauf der bisherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Löslichkeit von Eisen bzw. FAC in Medien (DMEM) bzw. Inkubationspuffern (Ip-Hepes) problematisch sein kann (Abb. 3.3.2 und 3.3.3). Die Bildung von Eisenpräzipitaten aus FAC-haltigen Ip-Hepes-

Lösungen war allerdings in Abwesenheit von Phosphat zu vermeiden (Abb. 3.3.10). Als notwendige Voraussetzung zum weiteren Studium der Eisenakkumulation in APKs musste daher zunächst geklärt werden, ob die Abwesenheit von 0.8 mM *di*-Natriumhydrogenphosphat aus dem Inkubationspuffer Ip-Hepes zu einer verminderten Zellvitalität führt. Eine Erhöhung der extrazellulären LDH-Aktivität auf mehr als 10 % der initialen zellulären LDH-Aktivität war für Inkubationen von APKs in phosphatfreiem Ip-Hepes bis zu 1 h bei 37 °C nicht festzustellen (Daten nicht gezeigt).

Darüber hinaus muss zur Erfassung der initialen Eisenakkumulationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit zur FAC-Ausgangskonzentrationen der Anstieg des zellulären Eisengehaltes einem stetigen linearen Verlauf entsprechen. Vorversuche ergaben, dass ein substantieller Anstieg des zellulären Eisengehaltes lediglich innerhalb der ersten 1 h nach Gabe von FAC zu verzeichnen war (Daten nicht gezeigt). Zur Erfassung der initialen Eisenakkumulationsgeschwindigkeit, wurden die weiteren Untersuchungen auf einen Inkubationszeitraum von 10 min nach Gabe des FAC beschränkt.

Abbildung 3.4.1 zeigt den zeitlichen Verlauf des zellulären Eisengehaltes von APKs, die mit 0 µM bis 300 µM FAC in Ip-Hepes ohne Phosphat für bis zu 10 min bei 37 °C inkubiert wurden. Parallel durchgeführte Zellvitalitätstests zeigten ausnahmslos sehr niedrige extrazelluläre LDH-Aktivitäten (Abb. 3.4.1 C). Ein nahezu linearer Anstieg des zellulären Eisengehaltes innerhalb der ersten 10 min der Inkubation konnte für alle untersuchten FAC-Konzentrationen festgestellt werden (Abb. 3.4.1 A).

Die graphische Darstellung der Eisenakkumulationsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit zur eingesetzten Eisenkonzentration entspricht einem hyperbolischen Kurvenverlauf ( $R^2 = 0.987$ ). Hieraus ergibt sich nach der Michaelis-Menten-Gleichung eine maximale Transportgeschwindigkeit von  $V_{\max} = 1.42 \pm 0.35$  nmol/(mg·min) sowie eine Michealis-Konstante von  $K_M = 29.80 \pm 6.53$  µM ( $n = 3$ ). Konzentrationen größer als 300 µM FAC führten zu unproportional höheren initialen Eisenakkumulationsgeschwindigkeiten, die nicht mit dem beobachteten hyperbolischen Verlauf der Substrat-Kinetik zu vereinbaren waren (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.4.1: Konzentrationsabhängigkeit der Eisenakkumulation von APKs nach Gabe von FAC in phosphatfreiem Ip-Hepes**

APKs wurden in Ip-Hepes ohne Phosphat mit bis zu 300  $\mu\text{M}$  Eisen (als FAC) für bis zu 10 min inkubiert. **A:** Spezifischer zellulärer Eisengehalt. **B:** Eisenakkumulationsgeschwindigkeit bestimmt durch lineare Regression aus dem Anstieg der spezifischen Eisengehalte zwischen 0 und 10 min. **C:** LDH-Aktivität im Zellüberstand (Freisetzung) nach 10 min Inkubation in Prozent der initialen zellulären LDH-Aktivität.

Die gewählten Inkubationsbedingungen erscheinen geeignet zur Untersuchung der spezifischen Eisenakkumulation aus FAC in APKs. Für nachfolgende Experimente werden mit 20  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  FAC Konzentrationen unterhalb bzw. oberhalb des  $K_M$  verwendet. Somit ist gewährleistet, dass durch die Versuchsanordnung bedingte Veränderungen der Eisenakkumulationsgeschwindigkeiten registriert werden können.



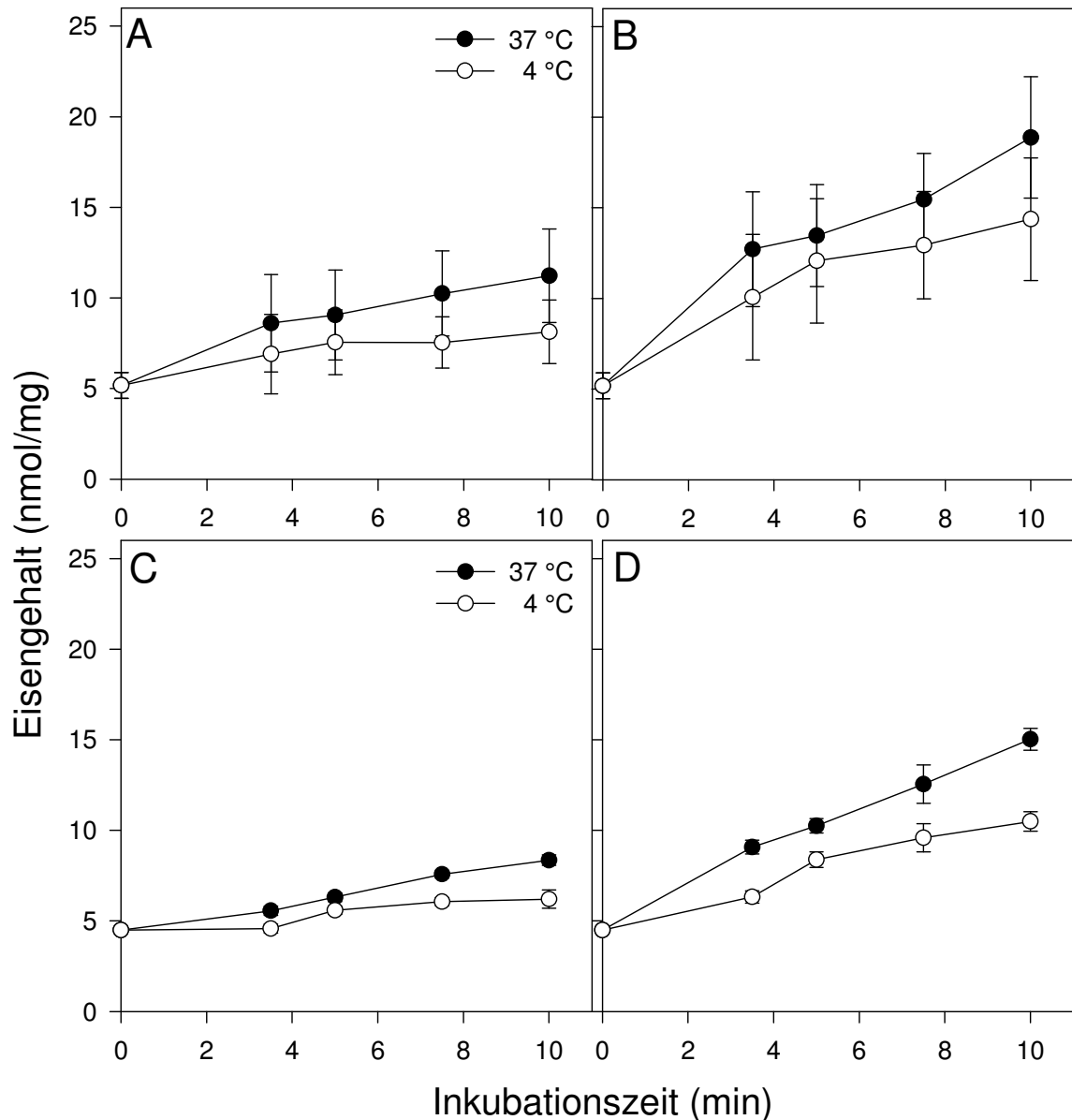
### 3.4.2 Temperaturabhängigkeit

Die Geschwindigkeit mit der biologische Prozesse ablaufen ist temperaturabhängig. Als Richtwert wird in Lehrbüchern der Biochemie angegeben, dass sich bei einer Temperaturabsenkung um 10 °C die Geschwindigkeit einer katalytischen Umsetzung in etwa halbiert (Munk 2000). Parallele Inkubationen bei 37 und 4 °C ermöglichen den Einfluss der Temperatur auf die Eisenakkumulation zu untersuchen.

APKs wurden in phosphatfreien Ip-Hepes mit 20 µM oder 200 µM FAC bei 37 und 4 °C für bis zu 10 min inkubiert. Das Herabsenken der Inkubationstemperatur von 37 auf 4°C führte zu keinen signifikanten Unterschieden der LDH-Freisetzung. Für alle untersuchten Bedingungen lag die LDH-Aktivität im Zellüberstand unterhalb von 5 % der initialen zellulären LDH-Aktivität (Daten nicht gezeigt). Die Werte des zellulären Eisengehaltes nach 10 min Inkubation bei 37 °C lagen sowohl für 20 µM als auch für 200 µM FAC deutlich oberhalb der Werte des zellulären Eisengehaltes nach 10 min Inkubation mit 20 µM bzw. 200 µM FAC bei 4 °C. Die temperaturabhängige Differenz der zellulären Eisengehalte bei identischer FAC-Konzentration war zu jeden untersuchten Zeitpunkt (3.5-10 min) positiv und nahm mit der Zeit zu. Allerdings war eine starke Überschneidung der Standardabweichungen der Mittelwerte der zellulären Eisengehalte zu den jeweiligen Zeitpunkten festzustellen (Abb. 3.4.2 A und B).

Im Gegensatz hierzu konnte bei einer Betrachtung der zugrunde liegenden Einzel-Experimente eine Überschneidung der Standardabweichungen nur im Ausnahmefall beobachtet werden. Abbildung 3.4.2 C und D zeigt exemplarisch eins von drei unabhängigen Einzel-Experimenten zur Temperaturabhängigkeit der Eisenakkumulation. Beide eingesetzten FAC-Konzentrationen zeigten einen deutlich unterschiedlichen Anstieg des zellulären Eisengehaltes in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur. So betrug die Differenz des zellulären Eisengehaltes zwischen 37 und 4 °C für das gezeigte Einzel-Experiment nach 10 min für 20 µM FAC 2.1 nmol/mg und für 200 µM FAC 4.5 nmol/mg (Abb. 3.4.2 C und D).

Es ist daher anzunehmen, dass die auftretenden starken Überschneidungen der Standardabweichungen aus Abbildung 3.4.2 A und B in erster Linie auf Unterschiede zwischen den verwendeten unabhängigen Primärkulturen, wie beispielsweise des Kulturalters (14 bis 18 Tage) oder ein stark unterschiedlicher Proteingehalt (97 bis 117 µg/well) der APKs, zurückzuführen sind.

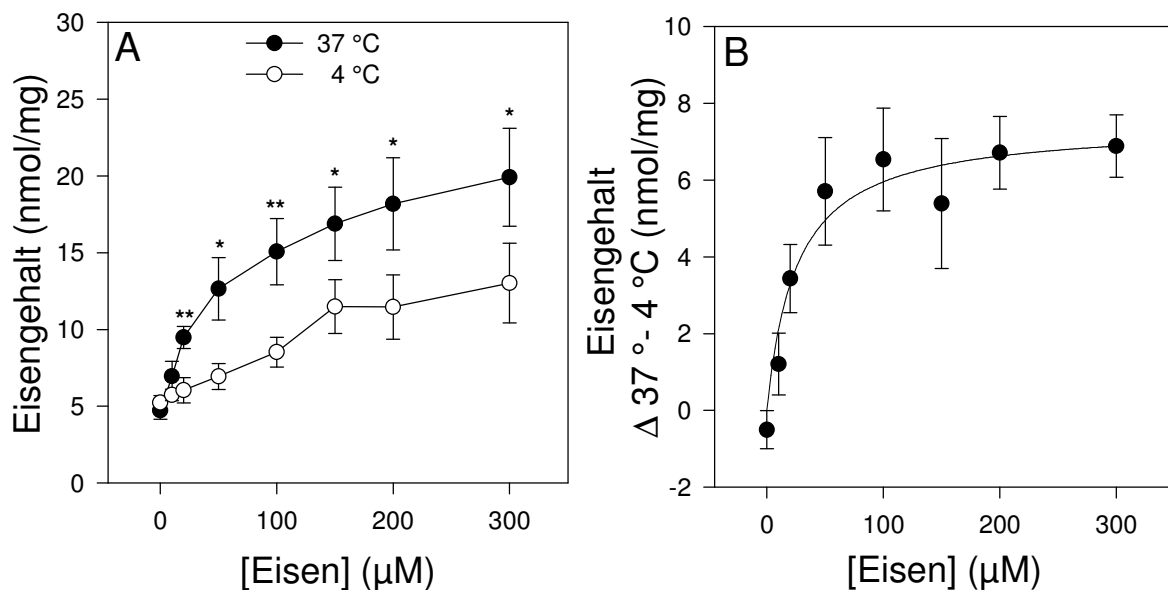


**Abb. 3.4.2: Temperaturabhängigkeit der Eisenakkumulation von APKs nach Gabe von FAC in phosphatfreiem Ip-Hepes**

APKs wurden in Ip-Hepes ohne Phosphat mit 20 (A und C) oder 200  $\mu\text{M}$  (B und D) Eisen (als FAC) bei 37 ° und 4 °C für bis zu 10 min inkubiert. Bestimmt wurde der spezifische zelluläre Eisengehalt. A und B: Mittelwert und SD der Eisenwerte dreier unabhängiger APKs in Kulturalter von 14 bis 18 Tagen. C und D: Exemplarische Darstellung eines Einzel-Experiments einer 18 Tage alten APK.

Der Unterschied der zellulären Eisengehalte nach Inkubation bei 37 °C und 4 °C ist ein entscheidender Hinweis auf eine tatsächliche Internalisierung des Eisens in die Zellen (Goddard *et al.* 1997; Trinder und Morgan 1998). Im nachfolgenden soll daher eine genauere Betrachtung der Differenz des zellulären Eisengehaltes vorgenommen werden. APKs wurden hierzu mit bis zu 300  $\mu\text{M}$  FAC bei 37 oder 4°C in Ip-Hepes ohne Phosphat für 10 min inkubiert. Abbildung 3.4.3 A zeigt den graphischen Verlauf des zellulären Eisengehaltes nach 10minütiger Inkubation mit der entsprechenden Konzentration an FAC bei 37 und 4 °C aufgetragen gegen die initiale Eisenkonzentration. Hinsichtlich des Temperaturunterschiedes

wurde ein signifikanter Unterschied der zellulären Eisengehalte nach 10minütiger Inkubation bei 37 und 4 °C ab einer Konzentration von 20 µM FAC festgestellt (Abb. 3.4.3 A). Des Weiteren ist ein deutlich unterschiedlicher Kurvenverlauf der zellulären Eisengehalte in Abhängigkeit zur Inkubationstemperatur zu erkennen. So lässt sich die Verlaufskurve für 37 °C besser durch eine hyperbolische Regressionsgerade ( $R^2 = 0.87$ ) als durch einer lineare Regressionsgerade ( $R^2 = 0.84$ ) beschreiben. Die Werte des zellulären Eisengehaltes nach 10minütiger Inkubation bei 4 °C entspricht hingegen einer linearen Regressionsgeraden ( $R^2 = 0.94$ ).



**Abb. 3.4.3: Einfluss der Temperatur und Konzentration auf die Eisenakkumulation von APKs nach Gabe von FAC in phosphatfreiem Ip-Hepes**

APKs wurden in Ip-Hepes ohne Phosphat mit bis zu 300 µM Eisen (als FAC) für 10 Minuten bei 37 oder 4 °C inkubiert. **A:** Spezifischer zellulärer Eisengehalt, signifikante Unterschiede zwischen den 37 und 4 °C Werten wurden mit Sternen gekennzeichnet. **B:** Differenz der zellulären Eisengehalte 37 minus 4 °C nach 10minütiger Inkubation bei den angegebenen FAC-Konzentrationen.

Die Abbildung 3.4.3 B zeigt den Kurvenverlauf der Differenzen der zellulären Eisengehalte 37 minus 4 °C nach 10minütiger Inkubation bei den angegebenen FAC-Konzentrationen. Der Kurvenverlauf in Abbildung 3.4.3 B entspricht mit einem Regressionsfaktor von  $R^2 = 0.94$  einem hyperbolischen Verlauf, der sich asymptotisch einem maximal Wert von 7.5 nmol/mg nähert (sowie einer halbmaximalen Kenngröße des hyperbolischen Kurvenverlaufs von 25.4 µM).

### 3.4.3 pH-Wert-Abhängigkeit

Der Einfluss des extrazellulären pH-Wertes auf die Eisenaufnahme von APKs nach Gabe von FAC wurde für pH-Werte von 6.5 bis 8.0 im Vergleich zu Standardbedingungen (pH 7.4) untersucht (Tab. 3.4.1). Für keine der untersuchten Bedingungen war ein signifikanter

Unterschied der LDH-Aktivität im Zellüberstand nach der Inkubation zu den Werten der Kontrolle festzustellen. Dies gilt auch für den zellulären Eisengehalt der untersuchten APKs im Bezug auf die Werte der Kontrolle (Tab. 3.4.1). Eine Niederschlagsbildung von Eisen aus FAC bei pH 8.0 in Abwesenheit von Phosphat war nicht zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

**Tab. 3.4.1: Einfluss des extrazellulären pH-Wertes auf die Eisenaufnahme nach Gabe von FAC in phosphatfreiem Ip-Hepes**

[FAC] ( $\mu\text{M}$ )	pH-Wert	Zellulärer Eisengehalt (nmol/mg)	Signifikanz zur Kontrolle	LDH- Freisetzung (%)
20	6.5	7.6 $\pm$ 1.2	n.s.	3 $\pm$ 2
20	7.0	8.6 $\pm$ 0.9	n.s.	3 $\pm$ 1
20	7.4	9.6 $\pm$ 1.3	-	3 $\pm$ 1
20	8.0	6.5 $\pm$ 0.8	n.s.	6 $\pm$ 2
200	6.5	19.3 $\pm$ 3.8	n.s.	2 $\pm$ 3
200	7.0	17.8 $\pm$ 2.6	n.s.	5 $\pm$ 3
200	7.4	18.3 $\pm$ 3.8	-	3 $\pm$ 2
200	8.0	20.9 $\pm$ 5.1	n.s.	2 $\pm$ 1

APKs wurden in Ip-Hepes ohne Phosphat mit 20 oder 200  $\mu\text{M}$  Eisen (als FAC) bei den angegebenen pH-Werten für 10 min inkubiert. Bestimmt wurde der spezifische zelluläre Eisengehalt und die LDH-Aktivität im Zellüberstand (Freisetzung) nach der Inkubation in Prozent der initialen zellulären LDH-Aktivität. Signifikante Unterschiede der zellulären Eisengehalte zu den Werten der Kontrolle waren nicht festzustellen (-: Kontrolle; n.s.: nicht signifikant).

#### 3.4.4 Einfluss von Plasmaproteinen

Eisen ist im Blut bzw. Blutplasma hauptsächlich an Tf gebunden (Moos und Morgan 1998). Unter den serumfreien Inkubationsbedingungen der vorliegenden Studie ist eine Tf-vermittelte Aufnahme von Eisen aus FAC in APKs zwar recht unwahrscheinlich, kann aber nicht komplett ausgeschlossen werden. Um eine Beteiligung des Tf-TfR1-Eisentransportweges auszuschließen, wurde die Eisenaufnahme nach Gabe von FAC in APKs unter Standardbedingungen im Vergleich zur Eisenaufnahme in serum-, Tf- oder RSA-haltigen Inkubationslösungen untersucht. Dem Inkubationsmedium wurde hierzu jeweils im Verhältnis Tf oder RSA in equimolaren Konzentrationen zum FAC oder 10 % FCS hinzugefügt.

In Gegenwart von 10 % FCS wurde im Inkubationspuffer eine deutlich erhöhte extrazelluläre LDH-Aktivität im Zellüberstand von 22 bis 26 % der initialen zellulären LDH-Aktivität festgestellt. Dies war auf bereits vorhandene LDH-Aktivität im FCS zurückzuführen, da der serumhaltige Inkubationsansatz bereits vor Beginn der Inkubation eine LDH-Aktivität von ca. 22 bis 26 % der initialen zellulären LDH-Aktivität aufwies (Tab. 3.4.2).

Des Weiteren konnte in Gegenwart von Serum, Tf oder Albumin jeweils ein signifikant niedrigerer zellulärer Eisengehalt im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden, der mit 3 bis 6 nmol/mg dem üblicherweise beobachteten basalen Eisengehalt von APKs (Abb. 3.1.2 B) entsprach. Für die Inkubation mit 200  $\mu$ M FAC wurde aus Kostengründen auf die Zugabe einer equimolaren Konzentration an Tf verzichtet.

**Tab. 3.4.2: Einfluss von Plasmaproteinen auf die Eisenaufnahme nach Gabe von FAC in phosphatfreiem Ip-Hepes.**

[FAC] ( $\mu$ M)	[Tf] ( $\mu$ M)	[RSA] ( $\mu$ M)	[FCS] (%)	Zellulärer Eisen- gehalt (nmol/mg)	Signifi- kanz zur Kontrolle	LDH-Freisetzung(%) unbe- handeltes Medium	Zell- über- stand
20	-	-	-	7.5 $\pm$ 1.6	-	2 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1
20	20	-	-	3.8 $\pm$ 0.5	**	3 $\pm$ 3	3 $\pm$ 2
20	-	20	-	3.3 $\pm$ 0.5	**	2 $\pm$ 1	4 $\pm$ 2
20	-	-	10	3.3 $\pm$ 0.6	**	24 $\pm$ 3	26 $\pm$ 2
200	-	-	-	16.0 $\pm$ 2.8	-	2 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0
200	-	200	-	4.7 $\pm$ 0.4	***	1 $\pm$ 1	3 $\pm$ 4
200	-	-	10	5.7 $\pm$ 0.7	***	27 $\pm$ 1	22 $\pm$ 2

APKs wurden in Ip-Hepes ohne Phosphat mit 20 oder 200  $\mu$ M Eisen (als FAC) in Gegenwart und Abwesenheit von Tf, RSA und FCS in den angegebenen Konzentrationen für 10 min inkubiert. Bestimmt wurde der spezifische zelluläre Eisengehalt und die LDH-Aktivität im Zellüberstand (Freisetzung) nach der Inkubation in Prozent der initialen zellulären LDH-Aktivität. Signifikante Unterschiede der zellulären Eisengehalte zu den Werten der Kontrolle wurden mit Sternen gekennzeichnet (-: Kontrolle).

### 3.4.5 Einfluss von Ascorbat

Ascorbat ist ein gutes Reduktionsmittel, es begünstigt die Reduktion von Fe<sup>3+</sup> zu Fe<sup>2+</sup> (Aslamkhan *et al.* 2002). Ein Vergleich der Eisenakkumulation in Gegenwart und Abwesenheit von Ascorbat sollte Aufschluss über den Oxidationszustand, in dem Eisen aus FAC in APKs aufgenommen wird, geben. Hierzu wurden APKs mit bis zu 5 mM Ascorbat unter Standardbedingungen für 10 min bei 37 °C inkubiert. Ein Verlust an Zellvitalität durch Zugabe von Ascorbat konnte nicht festgestellt werden (Tab. 3.4.3). Des Weiteren war ein erhöhter zellulärer Eisengehalt in Anwesenheit eines Überschusses an Ascorbat nicht zu beobachten. Es wurde hingegen bei einer Gabe von 200  $\mu$ M FAC in Anwesenheit von 5 mM Ascorbat ein signifikant geringerer zellulärer Eisengehalt zu den Werten der Kontrolle festgestellt (Tab. 3.4.3).

**Tab. 3.4.3: Einfluss von Ascorbat auf die Eisenaufnahme nach Gabe von FAC in phosphatfreiem Ip-Hepes.**

[FAC] ( $\mu\text{M}$ )	[Ascorbat] ( $\mu\text{M}$ )	Überschuss der [Ascorbat] zur [FAC]	Zellulärer Eisen- gehalt (nmol/mg)	Signifi- kanz zur Kontrolle	LDH- Frei- setzung (%)
20	-	-	$9.3 \pm 0.2$	-	$6 \pm 2$
20	200	10x	$9.5 \pm 0.6$	n.s.	$5 \pm 1$
20	5000	250x	$8.5 \pm 0.2$	n.s.	$2 \pm 2$
200	-	-	$17.7 \pm 1.1$	-	$4 \pm 1$
200	2000	10x	$16.5 \pm 0.5$	n.s.	$4 \pm 1$
200	5000	25x	$15.2 \pm 0.4$	*	$5 \pm 2$

APKs wurden in Ip-Hepes ohne Phosphat mit 20 oder 200  $\mu\text{M}$  Eisen (als FAC) in Gegenwart und Abwesenheit von Ascorbat in den angegebenen Konzentrationen für 10 min inkubiert. Bestimmt wurde der spezifische zelluläre Eisengehalt und die LDH-Aktivität im Zellüberstand (Freisetzung) nach der Inkubation in Prozent der initialen zellulären LDH-Aktivität. Signifikante Unterschiede der zellulären Eisengehalte zu den Werten der Kontrolle wurden mit Sternen gekennzeichnet (-: Kontrolle; n.s.: nicht signifikant).

### 3.4.6 Effekt von Eisenchelatoren

Der Gegenwart von Ascorbat im Inkubationsansatz führte zu keiner signifikanten Zunahme der Eisenakkumulation in APKs (Tab. 3.4.3). Zur Klärung des begünstigten Oxidationszustand von Eisen, welches durch APKs akkumuliert wird, wurde untersucht, ob spezifische Eisenchelatoren wie DFX, Bathophenanthrolindisulfonat (BPS) und FZ die Aufnahme von Eisen aus FAC-Lösungen in APKs beeinflussen können. Eisenchelatoren besitzen eine hohe Affinität zu Eisen in unterschiedlichen Oxidationszuständen, sie können das Eisen in der entsprechenden Oxidationsstufe spezifisch binden und potentiell unzugänglich für zelluläre Prozesse machen (Tulpule *et al.* 2010). DFX besitzt eine hohe Bindungsaffinität zu  $\text{Fe}^{3+}$  (Halliwell und Gutteridge 2007), BPS und FZ binden spezifisch an  $\text{Fe}^{2+}$  (Guo *et al.* 2007; Gorman und Clydesdale 1983). APKs wurden unter Standardbedingungen in An- und Abwesenheit eines 10-fachen molaren Überschusses der genannten Eisenchelatoren inkubiert. Eine erhöhte LDH-Freisetzung war in keinem der untersuchten Fälle festzustellen (Tab. 3.4.4). Eine Inaktivierung des Enzyms LDH durch einen der Eisenchelatoren kann ausgeschlossen werden, da Zellysate keine Verminderung der LDH-Aktivität in Gegenwart von 2 mM eines der angegeben Eisenchelatoren auswiesen (Daten nicht gezeigt).

Ein signifikant verminderter zellulärer Eisengehalt im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich für Inkubationen mit 20  $\mu\text{M}$  FAC nur in Gegenwart eines 10-fachen molaren Überschusses von DFX (Tab. 3.4.4). Hingegen konnte bei Inkubationen mit 200  $\mu\text{M}$  FAC sowohl für DFX als

auch für BPS ein signifikant verminderter zellulärer Eisengehalt in Bezug auf die Kontrolle bestimmt werden. Wobei eine stärkere Verringerung der Eisenaufnahme unter den Einfluss von DFX (6.9 nmol/mg) als durch BPS (10.8 nmol/mg) erzielt wurde. FZ hatte bei beiden Eisenkonzentrationen keinen Einfluss auf die Eisenakkumulation aus FAC (Tab. 3.4.4).

**Tab. 3.4.4: Einfluss von Eisenchelatoren auf die Eisenaufnahme nach Gabe von FAC in phosphatfreiem Ip-Hepes**

[FAC] ( $\mu\text{M}$ )	Eisenchelator			Über- schuss zur [FAC]	Zellulärer Eisen- gehalt (nmol/mg)	Signifi- kanz zur Kontrolle	LDH- Frei- setzung (%)
	[DFX] ( $\mu\text{M}$ )	[BPS] ( $\mu\text{M}$ )	[FZ] ( $\mu\text{M}$ )				
20	-	-	-	-	$8.5 \pm 0.8$	-	$4 \pm 1$
20	200	-	-	10x	$4.2 \pm 0.6$	***	$3 \pm 1$
20	-	200	-	10x	$7.8 \pm 0.8$	n.s.	$2 \pm 1$
20	-	-	200	10x	$8.0 \pm 0.7$	n.s.	$2 \pm 2$
200	-	-	-	-	$15.1 \pm 1.1$	-	$1 \pm 1$
200	2000	-	-	10x	$6.9 \pm 0.7$	***	$2 \pm 1$
200	-	2000	-	10x	$10.8 \pm 0.7$	***	$2 \pm 1$
200	-	-	2000	10x	$14.2 \pm 0.7$	n.s.	$2 \pm 1$

APKs wurden in Ip-Hepes ohne Phosphat mit 20 oder 200  $\mu\text{M}$  Eisen (als FAC) in Gegenwart oder Abwesenheit von DFX, BPS oder FZ in den angegebenen Konzentrationen für 10 min inkubiert. Bestimmt wurde der spezifische zelluläre Eisengehalt und die LDH-Aktivität im Zellüberstand (Freisetzung) nach der Inkubation in Prozent der initialen LDH-Aktivität. Signifikante Unterschiede der zellulären Eisengehalte zu den Werten der Kontrolle wurden mit Sternen gekennzeichnet (-: Kontrolle; n.s.: nicht signifikant). Die Experimente wurden an vier unabhängigen APKs durchgeführt.

### 3.4.7 Einfluss von Citrat

In Gegenwart von Phosphat im Inkubationspuffer wies ein 10-facher molarer Überschuss an Citrat bzw. Isocitrat eine inhibierende Wirkung auf die Eisenaufnahme in APKs auf (Abb. 3.2.3). Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, dass die Inhibierung der zellulären Eisenakkumulation in Gegenwart von Phosphat auf eine Verhinderung der Präzipitation von Eisen aus FAC zurückzuführen ist (Abb. 3.3.6). Zur Untersuchung des Einflusses von Citrat bzw. Isocitrat auf die Eisenakkumulation unter Ausschluss von Eisenniederschlägen, wurden APKs in Ip-Hepes ohne Phosphat mit 20  $\mu\text{M}$  oder 200  $\mu\text{M}$  FAC in Gegenwart und Abwesenheit eines 10-fachen molaren Überschusses von Natriumcitrat, Ammoniumcitrat oder Natriumisocitrat bei 37 °C für 10 min inkubiert. Wie aus Tabelle 3.4.5 ersichtlich, zeigten die durchgeführten Zellvitalitätstests ausnahmslos sehr niedrige extrazelluläre LDH-Aktivitätswerte von ca. 3 bis 4 % der initialen zellulären LDH-Aktivität. Darüber hinaus kam es in Gegenwart eines 10-fachen molaren Überschusses an Citrat für 20  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  FAC zu einer signifikanten Verminderung des zellulären Eisengehaltes im Vergleich zu den

Werten der Kontrolle. Ein Überschuss an Isocitrat führte hingegen nur für 200  $\mu\text{M}$  FAC zu einer signifikant reduzierten Eisenaufnahme, für 20  $\mu\text{M}$  FAC war lediglich ein leicht verminderter zellulärer Eisengehalt zu beobachten. Die gefundenen Ergebnisse könnten auf eine citratabhängige Akkumulation von Eisen aus FAC in APKs hindeuten. Dies soll unter anderen durch die nachfolgenden Untersuchungen geklärt werden.

**Tab. 3.4.5: Einfluss von Citrat/Isocitrat auf die Eisenaufnahme nach Gabe von FAC in phosphatfreiem Ip-Hepes.**

[FAC] ( $\mu\text{M}$ )	Citrat / Isocitrat			Über- schuss zur [FAC]	Zellulärer Eisen- gehalt (nmol/mg)	Signifi- kanz zur Kontrolle	LDH- Frei- setzung (%)
	Na <sub>3</sub> - Citrat ( $\mu\text{M}$ )	(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> - Citrat ( $\mu\text{M}$ )	D-Iso- ( $\mu\text{M}$ )				
20	-	-	-	-	6.5 ± 0.6	-	3 ± 1
20	200	-	-	10x	3.8 ± 0.8	**	4 ± 1
20	-	200	-	10x	3.3 ± 1.1	**	4 ± 2
20	-	-	200	10x	5.5 ± 0.4	n.s.	3 ± 1
200	-	-	-	-	16.5 ± 2.5	-	3 ± 1
200	2000	-	-	10x	9.1 ± 1.2	**	3 ± 1
200	-	2000	-	10x	8.8 ± 0.9	**	4 ± 1
200	-	-	2000	10x	9.3 ± 1.7	**	3 ± 1

APKs wurden in Ip-Hepes ohne Phosphat mit 20 oder 200  $\mu\text{M}$  Eisen (als FAC) in Gegenwart und Abwesenheit von Natriumcitrat, Ammoniumcitrat oder Natriumisocitrat in den angegebenen Konzentrationen für 10 min inkubiert. Bestimmt wurde der spezifische zelluläre Eisengehalt und die LDH-Aktivität im Zellüberstand (Freisetzung) nach der Inkubation in Prozent der initialen LDH-Aktivität. Signifikante Unterschiede der zellulären Eisengehalte zu den Werten der Kontrolle wurden mit Sternen gekennzeichnet (-: Kontrolle; n.s.: nicht signifikant).

### 3.4.8 Einfluss weiterer Medienkomponenten

Die Expression von Natrium-gekoppelten Carbonsäure-Transportern (NaCs) bzw. Natrium-gekoppelte Citrat-Transportern (NaCTs) wurde für Astrocyten nachgewiesen (Inoue *et al.* 2002; Yodoya *et al.* 2006). NaCs/NaCTs sind für den Transport und die Aufnahme von *di*- und *tri*-Carbonsäuren, wie Bersteinsäure oder Zitronensäure, in Säugetierzellen verantwortlich (Mycielska *et al.* 2009). Darüber hinaus wurde für primäre Astrocyten-Kulturen bereits gezeigt, dass in Abwesenheit von extrazellulärem Natrium keine Aufnahme von Citrat statt-findet (Westergaard *et al.* 1994; Yodoya *et al.* 2006). Natriumchlorid ist mit 145 mM eine nicht zu vernachlässigende Komponente von Ip-Hepes. Daher wurde für Eisenakkumulationsstudien in Abwesenheit von Natriumionen zur Aufrechterhaltung des osmotischen Druckes Natriumchlorid in Ip-Hepes durch 145 mM Cholinchlorid ersetzt. Für APKs konnte sowohl für 20  $\mu\text{M}$  FAC als auch für 200  $\mu\text{M}$  FAC in Abwesenheit von



Natriumionen kein signifikanter Unterschied des zellulären Eisengehaltes zu den Werten der Kontrolle festgestellt werden. Ein Verlust an Zellvitalität war ebenfalls nicht zu beobachten (Tab. 3.4.6).

**Tab. 3.4.6: Behandlungen von APKs ohne signifikanten Einfluss auf die Eisenaufnahme nach Gabe von FAC**

<b>Eingesetzte [FAC] (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Untersuchte Abhängigkeit hinsichtlich</b>	<b>Umgesetzt durch Variation von Ip-Hepes</b>	<b>Signifikanz zur Kontrolle</b>	<b>LDH-Freisetzung (%)</b>
20/200	Natriumionen	145 mM Cholinchlorid statt 145 mM NaCl	n.s.	2 bis 3
20/200	Kaliumionen	20 bis 75 mM $\text{K}^+$ statt 5.4 mM $\text{K}^+$	n.s.	4 bis 5
20/200	Glucose	0 mM Glucose statt 5.0 mM Glucose	n.s.	1 bis 3

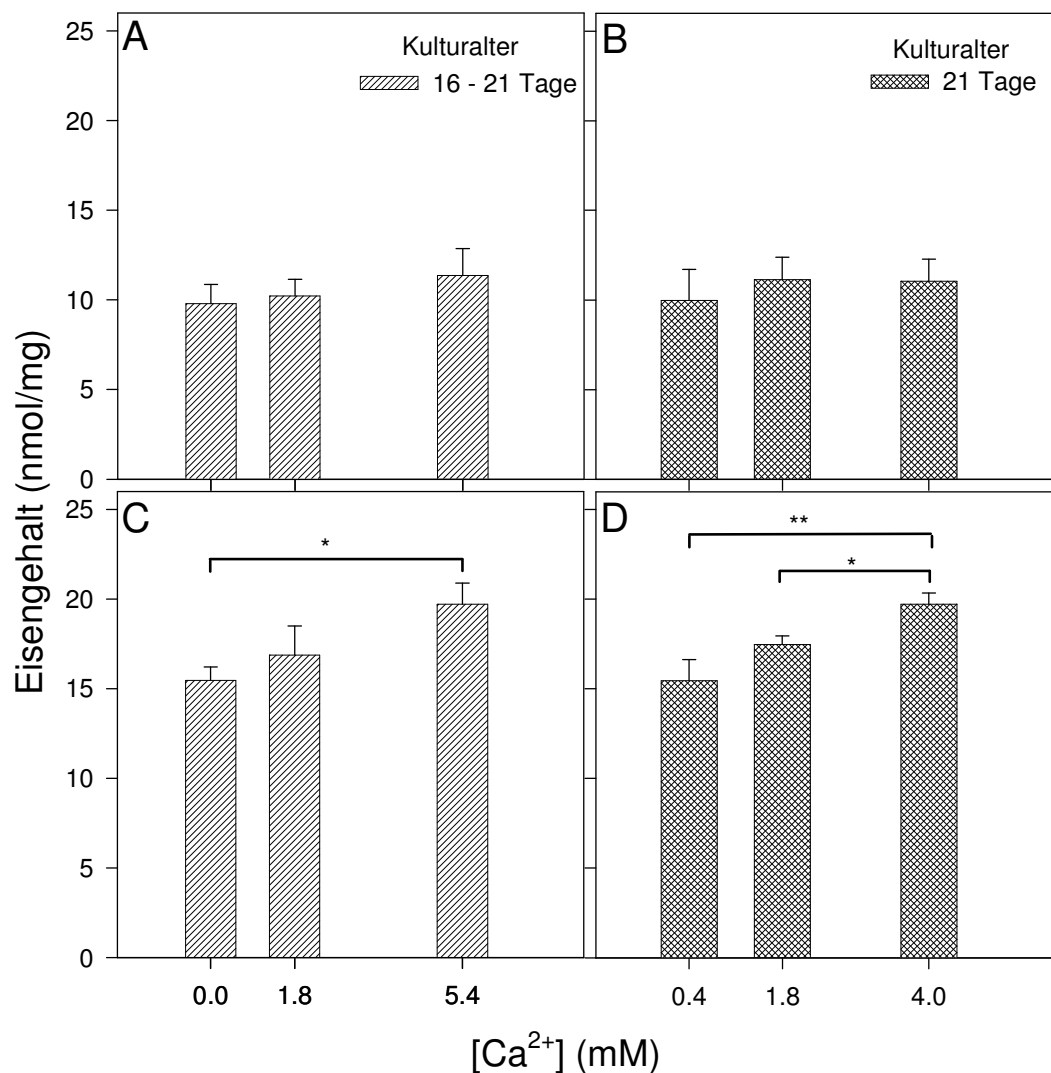
APKs in Ip-Hepes ohne Phosphat wurden für 10 min bei 37 °C mit 20 oder 200  $\mu\text{M}$  Eisen (als FAC) in Abhängigkeit der angegebenen Substanzen inkubiert. Bestimmt wurde die Signifikanz der Differenz zwischen den Proben- und Kontrollwerten des zellulären Eisengehaltes sowie die Werte der LDH-Aktivität im Zellüberstand (Freisetzung) nach der Inkubation in Prozent der initialen zellulären LDH-Aktivität (n.s: nicht signifikant).

Erhöhte extrazelluläre Konzentrationen von 20 mM bis zu 75 mM Kaliumchlorid sind geeignet um zelluläre Plasmamembranen zu depolarisieren und eine Reihe von spannungsabhängigen Membrankanälen zu öffnen (Musilkova und Kovar 2001). Eine gesteigerte Aufnahme von Eisen aus FAC-Lösungen in APKs konnte durch einen Stimulus von bis zu 75 mM Kaliumchlorid im extrazellulären Medium (Ip-Hepes) nicht nachgewiesen werden (Tab. 3.4.6). Die erhöhte Kaliumchlorid-Konzentration in Ip-Hepes wurde durch eine entsprechende Reduktion des Natriumchloridgehaltes kompensiert. Ein Verlust an Zellvitalität wurde nicht verzeichnet (Tab. 3.4.6). Des Weiteren konnte eine Abhängigkeit der Eisenakkumulation aus FAC in APKs von der Gegenwart von Glucose ebenfalls nicht beobachtet werden. Die Abwesenheit von 5 mM Glucose aus dem Inkubationspuffer hatte über die Dauer von 10 min keine negativen Auswirkungen auf die Zellvitalität (Tab. 3.4.6).

### 3.4.9 Einfluss der extrazellulären divalenten Kationenkonzentration

In Gegenwart von 0.8 mM *di*-Natriumhydrogenphosphat in Ip-Hepes konnte eine starke Abhängigkeit der Eisenakkumulation von der Kationenkonzentration festgestellt werden. Zur Klärung des Einflusses der extrazellulären Kationenkonzentration auf die Eisenakkumulation, wurden die Eisenaufnahme von APKs in Ip-Hepes ohne Phosphat in Abhängigkeit zur

Calcium- und Magnesiumkonzentration untersucht. Zunächst wurden APKs unter Standardbedingungen in Ip-Hepes mit 0 bis 5.4 mM CaCl<sub>2</sub> inkubiert, die verwendeten Kulturen waren zwischen 16 und 21 Tagen alt. Unter den angegebenen Versuchsbedingungen lag die LDH-Freisetzung in allen Fällen im Bereich von 2 bis 6 % der initialen zellulären LDH-Aktivität. In Abhängigkeit zur Calciumkonzentration war für 20 µM FAC kein signifikanter Anstieg des zellulären Eisengehaltes zu beobachten (Abb. 3.4.4 A). Hingegen war für 200 µM FAC ein signifikanter Unterschied des zellulären Eisengehaltes zwischen 0 mM und 5.4 mM Calcium zu belegen (Abb. 3.4.4 C). Dieser Befund gibt Anlass zu Spekulation über einen Einfluss der Calciumionenkonzentration auf die Eisenakkumulation von APKs.



**Abb. 3.4.4: Einfluss der extrazellulären Calciumionenkonzentration auf die Eisenaufnahme nach Gabe von FAC in phosphatfreiem Ip-Hepes.**

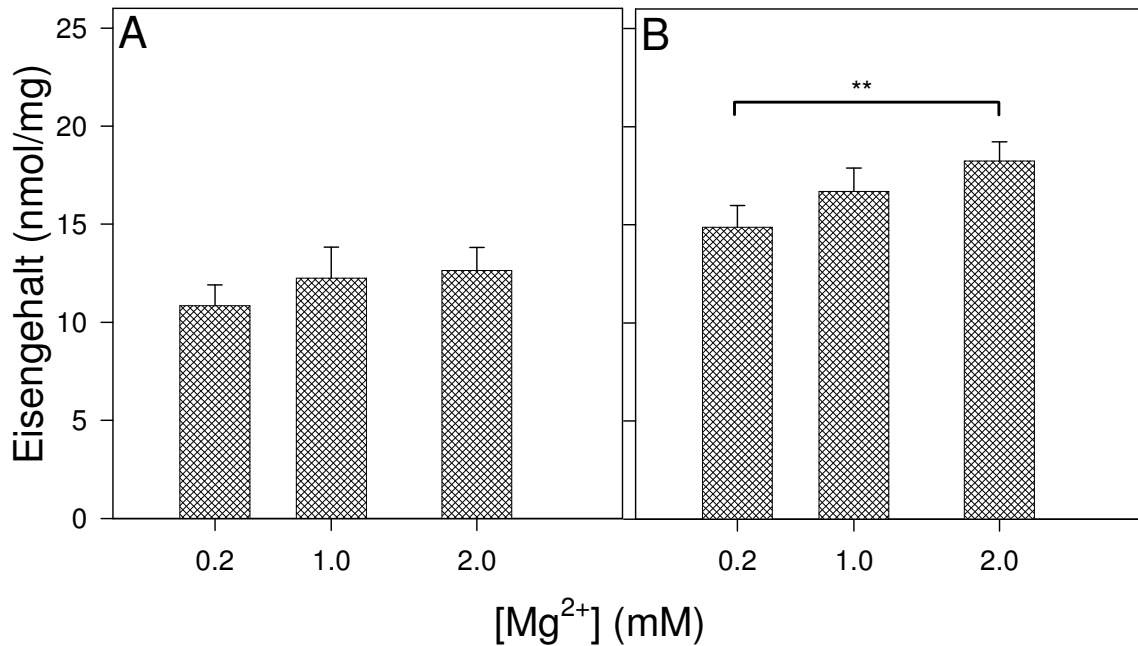
APKs wurden in Ip-Hepes ohne Phosphat mit 20 µM (A und B) oder 200 µM (C und D) Eisen (als FAC) bei einer extrazellulären Konzentration von 0.0 bis 5.0 mM CaCl<sub>2</sub> (A und C) oder 0.4 bis 4.0 mM Ca<sup>2+</sup> (B und D) für 10 min inkubiert. Bestimmt wurde der spezifische zelluläre Eisengehalt. Signifikant unterschiedliche zelluläre Eisengehalte wurden mit Sternen gekennzeichnet.

In einem zweiten Ansatz sollten ein möglicher Einfluss des Alters der Kultur auf den Ausgang des Experimentes vermieden werden. Es wurde daher nur APKs im identischen Kulturalter (21 d) verwendet. Darüber hinaus wurden nur Konzentrationen von 0.4 bis 4.0 mM Calcium zur Inkubation eingesetzt, um extrem unphysiologische Bedingungen zu vermeiden. Die LDH-Freisetzung war auch unter diesen Bedingungen ausnahmslos sehr niedrig, 3 bis 5 % der initialen zellulären LDH-Aktivität (Daten nicht gezeigt).

Wie schon zuvor beobachtet, konnte mit dem Anstieg der Calciumionenkonzentration für 20  $\mu$ M FAC keine signifikante Differenz zwischen den zellulären Eisengehalten festgestellt werden (Abb. 3.4.4 B). Allerdings konnte für 200  $\mu$ M FAC sowohl ein deutlicher Anstieg des zellulären Eisengehaltes mit zunehmender Calciumionenkonzentration, als auch signifikante Unterschiede zwischen den zellulären Eisengehalten nach Inkubationen mit 0.4 mM und 4.0 mM Calcium sowie mit 1.8 und 4.0 mM Calcium beobachtet werden (Abb. 3.4.4 D). Eine Abhängigkeit der Eisenakkumulation unter Bedingungen nahe der Maximalgeschwindigkeit bei 200  $\mu$ M FAC konnte für Calcium gezeigt werden.

Nachdem eine Abhängigkeit der Eisenaufnahme von der Calciumionenkonzentration festgestellt werden konnte, sollte die Abhängigkeit der Eisenakkumulation von der Magnesiumionenkonzentration, dem zweiten divalenten Kation in Ip-Hepes, untersucht werden. APKs wurden unter Standardbedingungen mit 0.2 bis 2.0 mM Magnesium in Ip-Hepes ohne Phosphat inkubiert. Ähnlich wie zuvor für Calciumionen beobachtet, konnte mit dem Anstieg der extrazellulären Magnesiumionenkonzentration für 20  $\mu$ M FAC kein signifikanter Anstieg des zellulären Eisengehaltes festgestellt werden (Abb. 3.4.5 A). Allerdings führte die Gabe von 200  $\mu$ M FAC zu einem signifikanten Unterschied zwischen den Werten des zellulären Eisengehaltes für 0.2 mM und 2.0 mM Magnesiumchlorid (Abb. 3.4.5 B).

Trotz ausschließlicher Verwendung von APKs in Kulturalter von 21 Tagen war jedoch im Bezug auf die Werte der Kontrolle (1.0 mM Magnesiumchlorid) kein signifikanter Unterschied festzustellen. Ein Anstieg der extrazellulären LDH-Aktivität nach der Inkubation über Werte von 6 % der initialen zellulären LDH-Aktivität wurde für keine der untersuchten Bedingungen festgestellt (Daten nicht gezeigt).



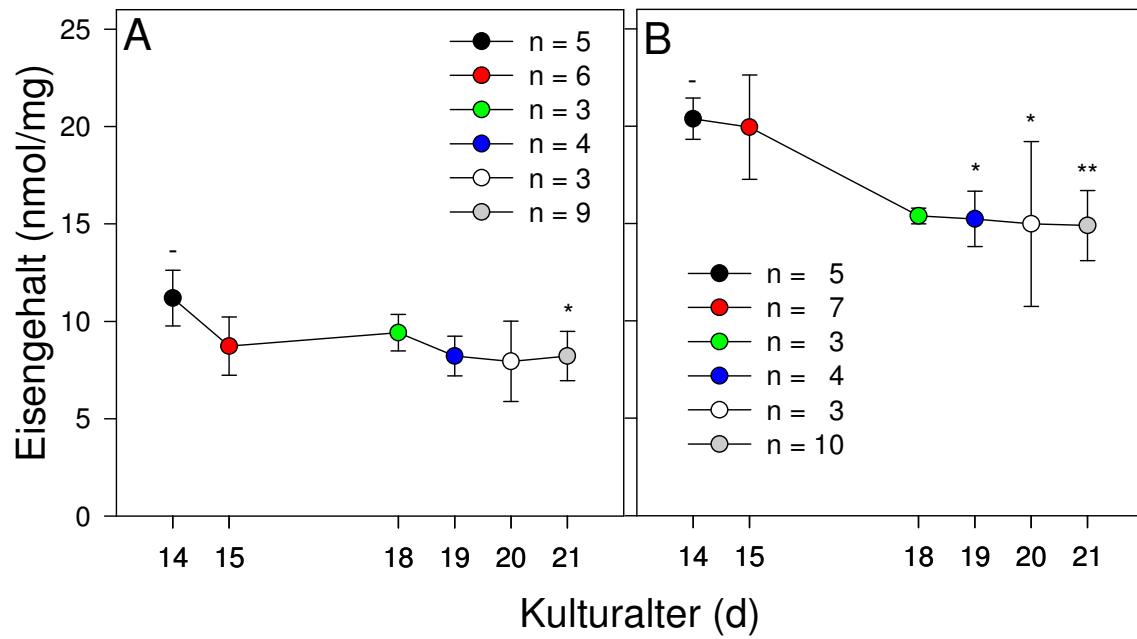
**Abb. 3.4.5: Einfluss der extrazellulären Magnesiumionenkonzentration auf die Eisenaufnahme nach Gabe von FAC in phosphatfreiem Ip-Hepes**

APKs eines Kulturalters von 21 Tagen wurden in Ip-Hepes ohne Phosphat mit 20 µM (A) oder 200 µM (B) Eisen (als FAC) bei einer extrazellulären Magnesiumchlorid-Konzentration von 0.2 bis 2.0 mM für 10 min inkubiert. Bestimmt wurde der spezifische zelluläre Eisengehalt. Signifikante Unterschiede der zellulären Eisengehalte wurden mit Sternen gekennzeichnet.

### 3.4.10 Abhängigkeit der Eisenakkumulation vom Kulturalter

Die vorliegenden Daten zur Eisenakkumulation aus FAC-Lösungen in APKs unter Ausschluss von Eisenniederschlägen wurden retrospektiv auf einen Einfluss des Kulturalters analysiert. Für die Inkubation der Zellen für 10 min mit Standardkonzentrationen von 20 µM (Abb. 3.4.6 A) und 200 µM FAC (Abb. 3.4.6 B) wurde mit zunehmenden Kulturalter ein geringerer zellulärer Eisengehalt festgestellt.

Dieser Zusammenhang war deutlicher für 200 µM FAC ausgeprägt und führte hier zu signifikanten Unterschieden des Eisengehaltes zwischen 14 Tage alten Kulturen gegenüber 19 bis 21 Tage alten Primärkulturen (Abb. 3.4.6 B) sowie 15 Tage alten APKs gegenüber 19 Tage ( $p < 0.05$ ), 20 Tage ( $p < 0.05$ ) und 21 Tage ( $p < 0.001$ ) alten APKs. Hingegen konnte nach Gabe von 20 µM FAC lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen 14 und 21 Tage alten Kulturen bestimmt werden (Abb. 3.4.6 A). Somit kann eine Abhängigkeit der Eisenakkumulation zum Kulturalter bestätigt werden.



**Abb. 3.4.6: Einfluss des Kulturalters auf die Eisenaufnahme nach Gabe von FAC in phosphatfreiem Ip-Hepes**

APKs in einem Kulturalter von 14 bis 21 Tagen wurden in Ip-Hepes ohne Phosphat mit 20 μM (A) oder 200 μM (B) Eisen (als FAC) für 10 min inkubiert. Bestimmt wurde der spezifische zelluläre Eisengehalt. Signifikante Unterschiede des zellulären Eisengehaltes zu den Werten von 14 Tage alten Kulturen wurden mit Sternen gekennzeichnet (-: Bezugswert).

## **4 Diskussion**

### **4.1 Astroglia-reiche Primärkulturen als Modellsystem**

Zur Untersuchung des Eisenstoffwechsels von Astrocyten wurden in der vorliegenden Arbeit Astroglia-reiche Primärkulturen aus Hirnen neonataler Wistar-Ratten als Modellsystem verwendet. Diese Zellkulturen wurden nach der Methode von Hamprecht und Löffler (1985) gewonnen und zur Charakterisierung immunocytochemisch gegen das astroglia-spezifische Markerprotein GFAP (Bock *et al.* 1977) gefärbt. Die Anfärbung der Zellen gegen GFAP zeigte, dass die Kulturen stark mit Astrogliazellen angereichert waren. Dieser Befund bestätigt bereits publizierte Ergebnisse zur immunocytochemischen Charakterisierung der verwendeten Kulturen (Reinhart *et al.* 1990; Gutterer *et al.* 1999). APKs können daher als geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der Funktionen von Astrocyten angesehen werden.

Der basale Eisengehalt von APKs betrug  $5.0 \pm 1.6$  nmol Eisen/mg Zellprotein und stimmt damit sehr gut mit bereits veröffentlichten Daten zum basalen Eisengehalt von APKs (Hoepken *et al.* 2004; Riemer *et al.* 2004) sowie dem Gehalt anderer Astroglia-kulturen überein (Xu *et al.* 1999). Eine signifikante Abhängigkeit des basalen Eisengehaltes der APKs von Kulturalter (14 bis 21 Tage) war nicht festzustellen. Hingegen konnte für kultivierte APKs im Alter von 14 bis 21 Tagen ein signifikanter Anstieg des zellulären Proteingehaltes mit zunehmendem Kulturalter beobachtet werden. Da aber der spezifische zelluläre Eisengehalt der APKs, über den für die Zellexperimente relevanten Kultivierungszeitraum (14 bis 21 Tage) konstant bleibt, können APKs im Alter von 14 bis 21 Tagen als ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der Akkumulation von Eisen in Astrogliazellen angesehen werden.

### **4.2 Eisenakkumulation in phosphathaltigen Kulturmedien**

Die Aufnahme von Eisen in Astrocyten wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben, Astrocyten sind sowohl in der Lage Tf-gebundenes Eisen (Swaiman und Machen 1986; Qian *et al.* 1999, 2000) als auch Tf-ungebundenes Eisen aufzunehmen (Takeda *et al.* 1998; Oshiro *et al.* 1998, 2000; Qian *et al.* 2000; Jeong und David 2003; Hoepken *et al.* 2004; Korten 2004; Riemer *et al.* 2004; Bishop *et al.* 2010, 2011; Keenan *et al.* 2010; Tulpule *et al.* 2010; Lane *et al.* 2010; Du *et al.* 2011). Die Aufnahme von Tf-gebundenem Eisen über den Tf-TfR1-Zyklus ist mit der zellulären Expression des Rezeptors TfR1 verbunden, der von kultivierten Astrocyten exprimiert wird (Qian *et al.* 1999).

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Eisenakkumulation von Astrocyten aus FAC-Lösungen unter serum- und Tf-freien Inkubationsbedingungen. Eine Beteiligung von Tf an der gefundenen Eisenakkumulation unter diesen Bedingungen erscheint daher unwahrscheinlich. Dies gilt auch für die Beteiligung anderer Protein-Eisenkomplexe wie z.B. Eisen-MTf oder Eisen-Lf.

FAC wurde bereits mehrfach in Studien als Eisenquelle verwendet (Parkes *et al.* 1995; Bishop und Robinson 2001; Hirsh *et al.* 2002; Korten 2004; Tulpule *et al.* 2010; Bishop *et al.* 2011). Die niedermolekulare Eisenkonzentration in der Cerebrospinalflüssigkeit beträgt ca. 0.4-1.2  $\mu\text{M}$  (Gaasch *et al.* 2007). Im cerebralen Cortex lassen sich Konzentrationen von bis zu 650  $\mu\text{M}$  Eisen nachweisen und bei der Alzheimerschen Krankheit treten neuritische Plaques mit einer Eisenkonzentration von bis zu 1 mM auf, welche im unmittelbaren Kontakt zu Astrocyten sind (Lovell *et al.* 1998). Darüber hinaus enthält Vollblut – dem Astrocyten in Folge einer Gehirnblutung ausgesetzt sein können – einschließlich der Erythrocyten bis zu 8.5 mM Eisen (Bishop und Robinson 2001). Zur Untersuchung der nicht Tf-gebundenen Eisenakkumulation von APKs wurden daher FAC-Lösungen in Konzentrationen von bis zu 1 mM Eisen verwendet.

Nach der Gabe von Eisen als FAC war eine Zunahme des zellulären Eisengehaltes von APKs festzustellen, die stark von der initial eingesetzten FAC-Konzentration abhing. Die Summe der Eisengehalte von Zellen und Medium stimmte mit der initial eingesetzten Eisenmenge überein, so dass davon auszugehen ist, dass während der erfolgten Waschschrte zur Beendigung der Inkubation keine substantiellen Mengen an Eisen verloren gingen. Folglich sollte die Fraktion des ‚zellulären Eisens‘ als intrazelluläres Eisen oder zumindest als zellassoziiertes Eisen vorliegen. Dies steht im Einklang mit der Studie von Korten (2004) zur Eisenakkumulation durch Astrocyten unter Verwendung von FAC als Eisenquelle.

Die Eisenakkumulation von APKs in DMEM aus FAC als Eisenquelle folgt einem biphasischen Verlauf. Die graphische Darstellung der Eisenaufnahmegeschwindigkeit in Abhängigkeit zur initialen Eisenkonzentration beschreibt in DMEM einen Glockenkurvenverlauf, dessen Maximum zwischen 100-200  $\mu\text{M}$  FAC lag. Dieser Verlauf entspricht nicht dem erwarteten Verlauf einer Substrat-Sättigungskurve eines Transportprozesses (Müller-Esterl 2009), steht allerdings im Einklang mit vorherigen Untersuchungen zur Eisenakkumulation durch APKs aus FAC (Korten 2004). Ein Verlust an Zellvitalität, als

Ursache einer verminderten Eisenakkumulation bei höheren Eisenkonzentrationen, konnte für Inkubationen in DMEM ausgeschlossen werden.

Aufgrund des beschriebenen Glockenkurvenverlauf der Substratkinetik könnte angenommen werden, dass Astrocyten möglicherweise in der Lage sind, hohe extrazelluläre Eisenkonzentrationen ( $> 150 \mu\text{M}$ ) wahrzunehmen und daraufhin die Eisenakkumulationsgeschwindigkeit zu reduzieren. Dies könnte über eine Verminderung der Eisenaufnahme oder über eine Erhöhung des Eisenexportes erfolgen. Eine Konzentrationsabhängigkeit des Exportes konnte für Kupferionen bei kultivierten Astrocyten bereits belegt werden (Scheiber *et al.* 2011).

Die Eisenakkumulation von APKs aus FAC gelöst in DMEM konnte durch einen 10-fachen molaren Überschuss an Citrat bzw. Isocitrat stark vermindert werden. Dies steht im Einklang mit Literaturangaben zur Inhibierung der Eisenakkumulation kultivierte Astrocyten durch Gabe eines 3- bis 30-fachen molaren Überschusses an Citrat bzw. anderen Carbonsäuren wie Tartrat, Malat oder  $\alpha$ -Ketoglutarat (Korten 2004; Keenan *et al.* 2010). Als eine mögliche Ursache für die verminderte Eisenakkumulation in Gegenwart eines molaren Überschusses an Citrat erscheint eine Kompetition der Aufnahme von Eisencitrat durch Citrat in APKs denkbar. Allerdings zeigten Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, dass im Verlauf der Eisenakkumulation aus FAC-Lösungen zwar der Eisengehalt – jedoch nicht der Citratgehalt – im Zellüberstand abnimmt. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass eine Trennung des Eisencitrat-Komplexes in Eisen und Citrat vor oder während der zellulären Akkumulation stattfinden muss. Ein Co-Transport von Eisen und Citrat, ist aber trotz des konstanten Citratgehalts im Zellüberstand nicht völlig auszuschließen. Kultivierte primäre Astrocyten sind in der Lage extrazelluläres Citrat aufzunehmen (Westergaard *et al.* 1994). Allerdings müssten Astrocyten unter dieser Annahme auch Citrat exportieren, um den Verlust an Citrat im Zellüberstand auszugleichen. Ein Export von Citrat aus Astrogliakulturen wurde bereits nachgewiesen (Westergaard *et al.* 1994).

Eine andere Erklärung für die gefundene Inhibierung der Eisenaufnahme durch einen molaren Überschuss an Citrat könnte die Bildung eines stöchiometrisch höheren Eisencitrat-Komplexes sein. Citrat kann viele unterschiedliche Komplexe mit Eisen bilden (Dhar *et al.* 1979; Francis und Dodge 1993; Bino *et al.* 1998; Matzapetakis *et al.* 1998; Gautier-Luneau *et al.* 2001; Hao *et al.* 2001; Engelmann *et al.* 2003) und die Art des gebildeten Eisencitrat-



Komplexes bestimmt die Bioverfügbarkeit des Eisens (Francis und Dodge 1993). Durch die Gabe eines 10-fachen molaren Überschusses an Citrat, könnte also das Eisen des FAC-Komplexes unzugänglich für eine zelluläre Aufnahme geworden sein. Die nur unvollständig erzielte Inhibierung der Eisenakkumulation durch Isocitrat wäre demzufolge durch eine verminderte Komplexbildung zwischen Eisen und Isocitrat zu erklären.

Untersuchungen zum Einfluss der Medienzusammensetzung auf die Eisenakkumulation zeigten keine signifikante Abhängigkeit der Eisenakkumulationsgeschwindigkeit bei 100  $\mu\text{M}$  FAC von der Medienkomposition, obgleich sich die untersuchten Medien (DMEM, MM und Ip-Hepes) wesentlich in ihrer Zusammensetzung voneinander unterscheiden. Dies steht im Widerspruch zu Literaturangaben (Korten 2004). Das MM kann als stark vereinfachte Variante des DMEM angesehen werden. Das MM verfügt zwar über eine ähnliche Salzkonzentration und das gleiche offene Bikarbonat/ $\text{CO}_2$ -Puffersystem wie das DMEM, ist aber frei von Vitaminen und Aminosäuren. Der Inkubationspuffer Ip-Hepes unterscheidet sich zum MM im Wesentlichen durch die Abwesenheit des Bikarbonats und verfügt stattdessen über ein geschlossenes Hepes-Puffersystem. Bikarbonat spielt bei vielen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle, wie beispielsweise der Einstellung des Natriumgradienten entlang der Plasmamembran und bei der Regulation des intrazellulären pH-Wertes (Deitmer 2002). Trotz der beschriebenen Unterschiede war für 100  $\mu\text{M}$  FAC keine Abhängigkeit der Eisenakkumulation von der Inkubationslösung zu beobachten.

Die konzentrationsabhängige Eisenakkumulation durch vitale APKs, beschrieb in MM und Ip-Hepes – eben wie in DMEM – eine Glockenkurve mit einem Maximum zwischen 100 und 200  $\mu\text{M}$  FAC. Die erreichten Maximalwerte der Eisenakkumulationsgeschwindigkeit in DMEM, MM und Ip-Hepes unterschieden sich allerdings deutlich voneinander. Die Anwesenheit von bestimmten Vitaminen und Aminosäuren in DMEM (z.B. Aspartat, Glutamat etc.), die Wechselwirkungen mit den positiv geladenen Eisenionen eingehen können, kann eine Ursache für die gefundenen Unterschiede der Eisenakkumulationsgeschwindigkeiten in Vergleich zu MM und Ip-Hepes darstellen. Als Konsequenz würde hieraus im Fall von MM und Ip-Hepes, mehr ‚freies‘ Eisen zur Aufnahme in APKs zur Verfügung stehen, wodurch sich die Eisenakkumulationsgeschwindigkeiten erhöhen könnten. Allerdings lässt sich dadurch nicht erklären, warum solch ein Effekt bei Inkubationen in Ip-Hepes nur für FAC-Konzentrationen größer als 150  $\mu\text{M}$  FAC auftrat.

Zur Charakterisierung der Eisenakkumulation wurden daher die weiteren Untersuchungen ausschließlich in Ip-Hepes bei 100  $\mu$ M FAC durchgeführt. Dies ermöglichte einige Untersuchungen, die in einem offenen Puffersystem mit CO<sub>2</sub>-Begasung, nur schwer zu realisieren gewesen wären, z.B. die Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf die Eisenakkumulation.

Für die Gabe von 100  $\mu$ M FAC konnte eine signifikante Temperaturabhängigkeit der Eisenakkumulation aus FAC in APKs nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit Angaben zur temperaturabhängigen Eisenakkumulation durch kultivierte Astrocyten (Qian *et al.* 2000; Oshiro *et al.* 2000; Tulpule *et al.* 2010) und andere Zelltypen (Goddard *et al.* 1997; Trinder und Morgan 1998; Garrick *et al.* 2006). Versteht man die Differenz des zellulären Eisengehaltes zwischen 37 und 4 °C als den internalisierten Eisengehalt der APKs, so wurden ca. 180 nmol Eisen pro mg Zellprotein in 4 h Inkubation von den Zellen aufgenommen. Bei einem cytosolischen Volumen von ca. 4.1  $\mu$ l pro mg Zellprotein für APKs (Dringen und Hamprecht 1998) ergibt sich daraus eine intrazelluläre Eisenkonzentration von ca. 44 mM, ein Anstieg auf das 35-fache im Vergleich zum basalen Eisengehalt von APKs (ca. 5 nmol/mg oder ca. 1.2 mM intrazelluläres Eisen).

Diese starke Zunahme des zellulären Eisengehaltes geht einher mit einer unverminderten hohen Vitalität der Zellen, so dass davon auszugehen ist, dass das internalisierte Eisen in redoxinaktiver und hochmolekularer Form vorliegen muss. Freies Eisen in redoxaktiver Form würde zu verstärktem oxidativen Stress führen (Crichton 2002; Engelmann *et al.* 2003; Hoepken *et al.* 2004) und die Zellen osmotisch schädigen. Eine Beteiligung von Ferritin, an der sicheren Lagerung von niedermolekularem Eisen (Harrison und Arosio 1996; Torti und Torti 2002) erscheint deshalb wahrscheinlich. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass der basale Gehalt an Ferritin in APKs gering ist und ein nachweisbarer Anstieg des zellulären Ferritingehaltes für APKs unter vergleichbaren Bedingungen erst nach 8 h Inkubation nachgewiesen wurde (Hoepken *et al.* 2004). Es muss daher angenommen werden, dass das akkumulierte Eisen nicht ausschließlich in Ferritin gespeichert wurde.

Die Abhängigkeit der Eisenakkumulation von extrazellulärem pH-Wert spricht gegen eine Beteiligung von DMT1 an der Eisenakkumulation aus FAC-Lösungen, da DMT1 als ein Symporter von H<sup>+</sup>-Ionen und divalenten Metallionen bekannt ist (Gunshin *et al.* 1997; Garrick *et al.* 2006), mit zunehmendem pH-Wert aber ein Anstieg der Eisen-

akkumulationsgeschwindigkeit festzustellen war. Eine Zunahme der Eisenakkumulation durch APKs aus FAC als Eisenquelle wurde auch von Korten (2004) nachgewiesen. Das Ausbleiben einer Verringerung der Eisenakkumulation durch  $Zn^{2+}$  und  $Cd^{2+}$ , die bekannte DMT1-Substrate sind (Gunshin *et al.* 1997), spricht ebenfalls gegen eine Beteiligung von DMT1 an der Eisenakkumulation durch APKs. Da die Löslichkeit von Eisensalzen (z.B. Eisenhydroxid, Eisenchlorid) und Eisenkomplexen stark von dem pH-Wert der Inkubationslösung abhängt (Conrad und Umbreit 2002; Jander *et al.* 2006), könnte sich der pH auch auf die Bioverfügbarkeit des Eisencitrat-Komplexes FAC auswirken.

Im Rahmen der Charakterisierung der Eisenakkumulation in APKs konnte gezeigt werden, dass die Eisenakkumulation aus FAC-Lösungen in Ip-Hepes abhängig von der extrazellulären Konzentration an  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  war. Der Prozess der Tf-unabhängigen Eisenakkumulation ist für einige Zelltypen als calciumabhängig beschrieben worden (Kaplan *et al.* 1991; Musilkova und Kovar 2001; Oudit *et al.* 2006). Darüber hinaus wurden Calcium-Transportkanälen – wie etwa LTCCs – als Ferro-Eisentransporter beschrieben (Tsushima *et al.* 1999). Da die Expression von LTCCs für kultivierte Astrocyten von Latour und Kollegen (2003) demonstriert wurde, könnte die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Calciumabhängigkeit der Eisenakkumulation durch APKs eine Calciumkanal-vermittelte Eisenakkumulation sein, bei der eine Magnesiumabhängigkeit als Nebeneffekt auftritt. Gegen diese Hypothese spricht jedoch, dass andere divalente Metallionen ( $Zn^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ) die als Substrat für LTCCs beschrieben sind (Oudit *et al.* 2006), die Akkumulation von Eisen aus FAC-Lösungen in APKs nicht beeinflussten.

Die Unabhängigkeit der Eisenakkumulation von APKs aus FAC-Lösungen von der Gegenwart eines 10-fachen molaren Überschusses an  $ZnCl_2$ , widerspricht der von Bishop und Kollegen (2010) beschriebenen synergetischen Akkumulation von Eisen und Zink durch kultivierte Astrocyten. Obgleich Bishop und Kollegen (2010) vergleichbare Eisenakkumulationsgeschwindigkeiten für 100  $\mu M$   $FeCl_3$  anstatt FAC als Eisenquelle für kultivierte Astrocyten belegen, konnten sie eine stimulierende Wirkung eines 2- bis 2,5-fachen Überschusses von Zinkacetat auf die Eisenakkumulation innerhalb einer halbstündigen Inkubation nachweisen. Die unterschiedlichen Befunde zur Zinkabhängigkeit der Eisenakkumulation durch Astrocyten könnten worden durch Unterschiede in den eingesetzten Zinkkonzentrationen bzw. Zinkquellen verursacht sein. Interessanterweise führten jedoch

längere Inkubationen (2 h) in Gegenwart von Zinkacetat zu einer Nivellierung der stimulierenden Wirkung von Zink auf die Eisenakkumulation von APKs (Bishop *et al.* 2010).

Zip14 wird in der Literatur als Transporter beschrieben, der die Tf-unabhängige Eisenaufnahme in Säugetierzellen vermitteln kann (Liuzzi *et al.* 2006). Die Expression auf mRNA-Ebene des Zip14-Transporters ist für kultivierte Astrocyten belegt (Bishop *et al.* 2010). Zip-Proteine gehören zur Familie der ‚ZRT-(Zink-regulierter Transporter) und IRT-(Eisen-regulierter Transporter) ähnlichen Transportproteine‘ (Zip), deren Expression in Abhängigkeit zum Zink- bzw. Eisengehalt der Zellen reguliert wird (Zaoh und Eide 1996a; Zaoh und Eide 1996b; Grotz *et al.* 1998). Zip-Transporter sind in erster Linie für die Aufnahme von divalenten Zinkionen bekannt, können aber auch andere divalente Metalle wie etwa  $\text{Fe}^{2+}$  oder  $\text{Mn}^{2+}$  transportieren (Kambe *et al.* 2004; Eide 2006). Die in der vorliegenden Arbeit gefundene ausbleibende Inhibierung der Eisenakkumulation durch Gabe eines molaren Überschusses an Zinkchlorid spricht gegen eine Aufnahme von Eisen in APKs durch Zip-Transporter.

Die bis hier diskutierten Resultate haben gezeigt, dass die zeitabhängige Eisenakkumulation aus FAC-Lösungen in APKs einer biphasischen Konzentrationsabhängigkeit folgt, eine beschleunigte Eisenakkumulation bei erhöhten pH-Werten zeigt und abhängig von der extrazellulären divalenten Kationenkonzentration ist. Allerdings konnte die Ursache für die biphasische Konzentrationsabhängigkeit der Eisenakkumulation bisher nicht geklärt werden. Ein Ansatzpunkt zur Erklärung dieses Phänomens könnte die visuelle Beobachtung von Niederschlägen auf den Oberflächen der Kulturgefäße nach Gabe von FAC in Konzentrationen bis zu 200  $\mu\text{M}$  sein. Eine Änderung des Aggregatzustandes des Eisens aus der FAC-Lösung könnte eine Ursache für den beobachteten Glockenkurvenverlauf der Konzentrationsabhängigkeit der Eisenakkumulation darstellen. FAC wurde zwar als ein gut löslicher Eisencitrat-Komplex beschrieben (Bishop und Robinson 2001; Hoepken *et al.* 2004), jedoch ist bekannt, dass die Löslichkeit von freien Eisenionen in wässrigen Lösungen gering ist (Guerinot und Yi 1994).

Zur Klärung eines Zusammenhangs zwischen den beobachteten Niederschlägen und der Eisenakkumulation wurde der Einfluss von Endocytose-Inhibitoren bei Gabe von 100  $\mu\text{M}$  FAC in Ip-Hepes untersucht. Endocytose ist die zelluläre Aufnahme von Macromolekülen bzw. Partikeln in Membran-umhüllte Vesikel. Es sind verschiedene Arten der zellulären

Endocytose bekannt, die sich einerseits durch die Beschaffenheit sowie Form und Größe der Partikel und andererseits durch den zellulären Mechanismus der Vesikelausbildung unterscheiden (Mercer *et al.* 2010; Kumari *et al.* 2010).

Endocytose-Aktivität konnte für Astrogliazellen bereits gezeigt werden (Pickard *et al.* 2010; Luther *et al.* 2011). Es gibt eine Vielzahl an Substanzen, die eine inhibierende Wirkung auf die Endocytose-Aktivität von Zellen haben (Huth *et al.* 2006; Ivanov *et al.* 2008). Die zugrunde liegenden zellulären Mechanismen der verschiedenen Endocytose-Arten sind recht divers, weshalb es keinen universellen Endocytose-Inhibitor gibt (Huth *et al.* 2006; Ivanov *et al.* 2008; Kumari *et al.* 2010). Des Weiteren hängt der Grad der zu erreichenden Inhibierung stark von der Endocytose-Aktivität des untersuchten Zelltyps, der Inkubationszeit sowie der maximal zu tolerierenden InhibitorKonzentration ab (Huth *et al.* 2006). Als Folge einer zu intensiven Inkubation mit Endocytose-Inhibitoren kann der Zellstoffwechsels und somit die Vitalität der Zellen irreversibel beeinträchtigt werden (Huth *et al.* 2006).

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Inhibitoren (Cytochalasin D, Chlorpromazin und Chloroquin) sind als Endocytose-Inhibitoren bekannt sowie in ihrer Wirkungsweise charakterisiert und beschrieben (Wang *et al.* 1993; Isobe *et al.* 1999; Torgersen *et al.* 2001; Thomsen *et al.* 2002; Park *et al.* 2004; Orellana *et al.* 2006; Blitzer und Nusse 2006; Huth *et al.* 2006). Keiner der verwendeten Endocytose-Inhibitoren führte unter den angegebenen Inkubationsbedingungen zu einer Verminderung der Zellvitalität. Eine signifikante Reduzierung des zellulären Eisengehaltes im Bezug auf die entsprechende Kontrolle, wurde durch die in dieser Arbeit verwendeten Endocytose-Inhibitoren erzielt. Allerdings führten die eingesetzten Inhibitoren zu einer unterschiedlich starken Verminderung des zellulären Eisengehaltes. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass bei Gabe von 100  $\mu$ M FAC in Ip-Hepes ein Teil des akkumulierten Eisens durch Endocytose in APKs aufgenommen wird.

### **4.3 Entstehung von eisenhaltigen Niederschlägen**

Das Auftreten von Niederschlägen aus FAC-haltigen Inkubationsmedien und die Verminderung der Eisenakkumulation in Astrogliazellen durch Endocytose-Inhibitoren deutet darauf hin, dass die in Kapitel 4.2 diskutierten Ergebnisse zur Eisenakkumulation von APKs aus FAC-Lösungen, zum Teil durch das Auftreten von eisenhaltigen Präzipitaten verursacht sein könnten. Zellfreie Zentrifugationsexperimente bestätigten, dass Eisen aus FAC-Lösungen in Konzentrationen bis zu 200  $\mu$ M FAC innerhalb einer einstündigen Inkubation bei 37 °C in

Ip-Hepes als rost-braunes Präzipitat ausfällt. Der Prozess der Präzipitatbildung verlangsamte sich mit zunehmender Zeit. Die Konzentrationsabhängigkeit der Präzipitatbildung folgte einer Glockenkurve mit einem Maximum bei ca. 100  $\mu\text{M}$  FAC. Dieser Kurvenverlauf entsprach der Verlaufskurve der konzentrationsabhängigen Eisenakkumulation von APKs aus FAC-Lösungen in Ip-Hepes. Dieser Befund ist reziprok zur Niederschlagsbildung eines schwerlöslichen Salzes, das ausfällt, sobald dessen maximale Löslichkeit überschritten ist (Jander *et al.* 2006). Außerdem lässt sich die Löslichkeit von Salzen gewöhnlich nicht durch eine Erhöhung der eingesetzten Konzentrationen ( $> 100 \mu\text{M}$  FAC weniger Präzipitate) steigern.

Das Auftreten von Präzipitaten aus FAC-Lösungen war abhängig von der Inkubationstemperatur. Mit Zunahme der Inkubationstemperatur wurde eine Erhöhung des Eisengehaltes im Präzipitat festgestellt. Dies war unerwartet, da die Löslichkeit chemischer Substanzen üblicherweise mit Zunahme der Inkubationstemperatur ansteigt. Ebenso traten Präzipitate aus FAC-Lösungen auch bei Inkubationen in DMEM auf. DMEM enthält im Gegensatz zum Inkubationspuffer (Ip-Hepes) eine Reihe von Vitaminen und Aminosäuren, die sich möglicherweise positiv auf die Löslichkeit von Eisen aus FAC-Lösungen hätten auswirken können.

Komplexverbindungen wie FAC sind Kollektive aus mehreren einzelnen Komponenten (hier  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen, Citrat sowie Ammonium), die in Lösung gebracht in einem Dissoziationsgleichgewicht zueinander stehen (Jander *et al.* 2006). Nur bei sehr starken Komplexen wie zum Beispiel bei Cyanokomplexen (z.B.: Kalium-Hexacyanoferrat(II);  $K = 1 \cdot 10^{35}$ ), findet man in Lösung einheitliche Komplexe vor (Holleman und Wieberg 1995), bei schwächeren Komplexen wie Eisencitrat-Komplexen, treten auch die Komponenten der stufenweisen Dissoziation auf (Jander *et al.* 2006). Dies wird durch die thermodynamischen Eigenschaften eines Komplexes bestimmt und kommt in der Komplexbindungskonstante (K) zu Ausdruck, für Eisencitrat liegt diese bei  $K = 1 \cdot 10^{11.5}$  (Martell *et al.* 1992).

Die Komplexbindungskonstante ist als Reziprokwert der Dissoziationskonstante definiert und kann damit auch als Maß für die Dissoziation eines Komplexes verstanden werden (Jander *et al.* 2006). Für Eisencitrat-Komplexe ist deshalb davon auszugehen, dass in Lösung ein geringer Teil des Eisens auch als freies Eisen oder in diesem Fall als nicht Citrat-gebundenes Eisen vorliegt (Francis und Dodge 1993, Engelmann *et al.* 2003). Dieses freie Eisen kann an

einen anderen Liganden binden und als Niederschlag ausfallen (Jander *et al.* 2006). Das scheint in Ip-Hepes der Fall zu sein, da im Eisenniederschlag nahezu kein Citrat nachzuweisen war.

Die Kinetik des Ligandenaustauschs ist maßgeblich für die Bildung eines möglichen Niederschlags (Jander *et al.* 2006). Aufgrund des beobachteten zeitlichen Verlaufs der Eisenpräzipitation ist für die Präzipitation aus FAC-Lösungen von einem langsamen Ligandenaustauschprozess auszugehen. Wie in der Literatur beschrieben, ist die Bildung von Eisenhydroxid aus Eisencitrat-Komplexen in der Tat ein sehr langsamer Prozess (Engelmann *et al.* 2003).

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Temperaturabhängigkeit der Eisenniederschlagsbildung, deutet darauf hin, dass sich die Stabilität des Eisencitrat-Komplexes bei einer verminderten Inkubationstemperatur verbessert. Eine Präzipitation von Eisen aus FAC-Lösungen wurde jedoch mit sehr starker zeitlicher Verzögerung (+ 24 h) bei 4 °C beobachtet (Daten nicht gezeigt), was der beschriebenen Abhängigkeit des Ligandenaustauschs in Komplexverbindungen von der Inkubationstemperatur entspricht (Jander *et al.* 2006).

Durch die Gabe eines molaren Überschusses an Natriumcitrat zur FAC-Lösung wird die Konzentration an Citrat im Inkubationsansatz erhöht und die Konzentration der freien Eisenionen verringert, beziehungsweise erfolgt eine Verschiebung des Komplexbildungsgleichgewichtes zugunsten des Eisencitrat-Komplexes und zuungunsten des Anteils an freiem Eisen aus FAC-Lösungen (siehe Gleichung 4.1). Dies führte zu einer Verminderung (für FAC-Konz. < 50 µM) bzw. eine Vermeidung (für FAC-Konz. > 50 µM) der Eisenpräzipitation aus FAC in Ip-Hepes.

$$K = \frac{[\text{Fe(III)Citrat Komplex}]}{[\text{Fe(III)}] \cdot [\text{Citrat}]} \quad (\text{Gl. 4.1})$$

mit K: Komplexbildungskonstante für Fe<sup>3+</sup>-Citrat-Komplexe (~1·10<sup>11.5</sup>)

[Fe(III)Citrat Komplex]: Konzentration des Fe<sup>3+</sup>-Citrat-Komplexes in Lösung

[Fe(III)]: Konzentration der freien Fe<sup>3+</sup>-Ionen in Lösung

[Citrat]: Konzentration an nicht komplexiertem Citrat in Lösung

Da die Konzentration an freien Eisenionen entscheidend für die Entstehung des Eisenniederschlags ist, kann nur Citrat-ungebundenes Eisen in einer FAC-Lösung mit einem anderen Liganden eine schwerlösliche Verbindung eingehen. Als mögliche schwerlösliche Salze kommen für Ip-Hepes Eisen(III)hydroxid ( $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ) und Eisen(III)phosphat, ( $\text{FePO}_4$ ) in Frage. Deren Löslichkeitsprodukte werden mit  $1 \cdot 10^{-38} \text{ mol}^4/\text{l}^4$  für Eisen(III)hydroxid (Guerinot und Yi 1994) und  $1 \cdot 10^{-25} \text{ mol}^2/\text{l}^2$  für Eisen(III)phosphat (Galal-Gorchev und Stumm 1963) angegeben.

Die Berechnung der Löslichkeit von Eisen(III)hydroxid ergibt bei pH 7.4 eine maximale Löslichkeit von  $[\text{Fe}^{3+}] \approx 6 \cdot 10^{-19} \text{ mol/l}$  für freie  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen. Die Löslichkeit von Eisen(III)phosphat bei pH 7.4 sowie in Gegenwart von 0.8 mM *di*-Natriumhydrogenphosphat ergibt eine ungefähre maximale Löslichkeit für  $\text{Fe}^{3+}$  von  $[\text{Fe}^{3+}] \approx 1 \cdot 10^{-17} \text{ mol/l}$ . Demzufolge ist die Löslichkeit von Eisen(III)hydroxid geringer als die von Eisen(III)phosphat. Eisen wird somit aus FAC-Lösungen eher als Eisen(III)hydroxid ausfallen. Hierfür spricht auch die Farbe des rost-braunen Niederschlags, die ein Charakteristikum für Eisen(III)hydroxid ist, während reines Eisen(III)phosphat hingegen einen weißen Niederschlag bildet (Galal-Gorchev und Stumm 1963).

Darüber hinaus sollte aber berücksichtigt werden, dass die praktische Bedeutung des Löslichkeitsproduktes für Verbindungen, die aus mehr als drei Komponenten bestehen, wie beispielsweise Eisen(III)hydroxid ( $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ), nur eine eingeschränkt Gültigkeit besitzt (Jander *et al.* 2006), da diese Verbindungen ebenfalls in einer stufenweisen Dissoziation bzw. Assoziation vorliegen und somit die Voraussetzungen der Berechnungsgrundlage für das Löslichkeitsprodukt nicht vollständig erfüllen (Jander *et al.* 2006). Tatsächlich konnte in Abwesenheit von Phosphat sowohl in Ip-Hepes als auch in Reinstwasser keine Präzipitation von Eisen aus FAC-Lösungen beobachtet werden. Es ist daher anzunehmen, dass die tatsächliche Löslichkeit von Eisen(III)hydroxid in Ip-Hepes bei pH 7.4 größer ist als die theoretisch bestimmte.

Des Weiteren ist aus Untersuchungen zum Löslichkeitsprodukt von Eisen(III)phosphat bekannt, dass sich lösliche Eisenphosphat-Komplexe vom Typ  $\text{Fe}(\text{H}_n\text{PO}_4)_x$  sowie so genannte lösliche, polynukleare Phosphato-Eisen-Komplexe bilden können, die zusammengenommen die Löslichkeit von Eisen in Gegenwart von Phosphat erhöhen können (Galal-Gorchev und Stumm 1963). Dies kann dazu führen, dass  $\text{Fe}^{3+}$  bei pH-Werten oberhalb von pH 4 erst nach



dem Überschreiten des Löslichkeitsprodukts von Eisen(III)phosphat als Gemisch basischer Eisenphosphate vom Typ  $\text{Fe}(\text{OH})_x(\text{PO}_4)_y$  ausfällt. Der Eisenniederschlag änderte dabei abhängig vom pH-Wert seine Farbe von weiß über gelblich zu rot-braun (Galal-Gorchev und Stumm 1963; Jander *et al.* 2006).

Darüber hinaus stellt auch die erleichtere Präzipitation von Eisen aus FAC-Lösungen bei zunehmendem pH-Wert keinen definitiven Beweis für das Ausfallen von Eisen(III)hydroxid dar. Zwar treten im zunehmend basischen Milieu mehr Hydroxidionen ( $\text{OH}^-$ ) auf, allerdings führt die Erhöhung des pH-Wertes auch nach der Definition des Dissoziationsgleichgewichtes zur Erhöhung der Phosphationenkonzentration ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) aus *di*-Natriumhydrogenphosphat. Aufgrund dessen erscheint es wahrscheinlich, dass Eisen aus FAC-Lösung bei pH 7.4 als ein Gemisch aus Eisen(III)phosphat und -hydroxid ausfällt, sobald die Konzentration an freien  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen die Löslichkeit von Eisen(III)phosphat überschreitet.

Da das Auftreten von Eisenpräzipitaten in erster Linie von der Konzentration der freien Eisenionen abhängt, ist abschließend zu dem Phänomen der erleichterten Präzipitation von Eisen bei geringeren FAC-Konzentrationen ( $< 300 \mu\text{M}$ ) zu erwähnen, dass bei geringeren FAC-Konzentrationen mehr freie Eisenionen vorliegen müssen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist vermutlich mit einer wechselseitig stabilisierenden Wirkung des Eisencitrat-Komplexes bei höheren Konzentrationen zu begründen. So treten bei stöchiometrisch gleichwertigen (1:1) Eisencitrat-Komplexen in wässrigen Lösungen so genannte Hydroxyl-Eisencitrat-Polymere auf (Spiro *et al.* 1967), die ein Ausfallen des Eisens verhindern können. Diese Polymere kommen aber vermutlich bei Lösungen mit geringen FAC-Konzentrationen nicht vor, weshalb dann in Gegenwart von Phosphat Eisenpräzipitate auftreten.

#### **4.4 Eisenakkumulation in phosphatfreiem Inkubationspuffer**

In den vorangegangenen Abschnitte der Diskussion wurde dargelegt, dass in der vorliegenden Arbeit ein Teil der bis hier diskutierten Resultate zur Untersuchung der Eisenakkumulation aus FAC-Lösungen in Astroglia-reichen primären Zellkulturen, durch die Bildung von Eisenfeststoffen beeinflusst bzw. überlagert war. Die unter Kapitel 4.3 geschilderten theoretischen Überlegungen führten zu der Vermutung, dass es sich bei den Eisenpräzipitaten um ein Gemisch basischer Eisen(III)phosphate handelt. Es konnte aufgezeigt werden, dass Eisen aus FAC-Lösungen zur Niederschlagsbildung neigt, die in Abwesenheit von Phosphat vermieden wird. Dementsprechend wurden die Ergebnisse der im Nachfolgenden diskutierten

Experimente, zur Charakterisierung der Eisenakkumulation aus FAC-Lösungen in APKs unter Vermeidung von Präzipitaten in phosphatfreiem Ip-Hepes gewonnen.

Erste Vorversuche in phosphatfreiem Ip-Hepes zeigten, dass eine substantielle Zunahme des zellulären Eisengehaltes nur innerhalb der ersten Stunde nach Gabe von FAC bei 37 °C zu verzeichnen war (Daten nicht gezeigt). Die Untersuchungen zur Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der Eisenakkumulation von APKs aus FAC-Lösungen wurde auf ein Zeitintervall bis zu 10 min beschränkt, da lediglich die initialen Eisenakkumulationsgeschwindigkeiten für die kinetische Analyse von Relevanz sind. Für alle eingesetzten FAC-Konzentrationen (0-300 µM) konnte ein linearer Anstieg des zellulären Eisengehaltes für diesen Zeitraum beobachtet werden.

Die graphische Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit der Eisenakkumulation von APKs entspricht dem Verlauf einer Michaelis-Menten-Kinetik mit  $V_{\max} \approx 1.4 \text{ nmol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$  und  $K_M \approx 30 \text{ }\mu\text{M}$ , wie es für einen sättigbaren Transportprozess zu erwarten ist (Inman und Wessling-Resnick 1993; Randell *et al.* 1994; Scheiber *et al.* 2010), aber in dieser Form für die Eisenakkumulation durch Astrocyten mit einer extrazellulären Ferri-Eisenquelle bisher noch nicht beschrieben wurde. So wurde zwar in einigen Studien von einem Prozess der nicht sättigbaren Eisenakkumulation durch Astrocyten berichtet (Riemer *et al.* 2004; Tulpule *et al.* 2010; Bishop *et al.* 2010, 2011), dies allerdings für die Gegenwart von Phosphat im Inkubationsansatz. Hingegen berichten lediglich Qian und Kollegen (2000) von einem im Bereich von wenigen Micromolar sättigbaren Prozess der Ferro-Eisenakkumulation, der aber anscheinend unabhängig von der Ferri-Eisenakkumulation durch Astrocyten ist (Lane *et al.* 2010).

Wie andere enzymatische Reaktionen sind auch Transportprozesse temperaturabhängig. Es konnte gezeigt werden, dass sich der Transport von Eisen über die Zellmembran stark durch die Inkubationstemperatur beeinflussen lässt (Qian *et al.* 2000; Garrick *et al.* 2006; Tulpule *et al.* 2010). Ein Herabsenken der Inkubationstemperatur von 37 auf 4 °C führte für initiale FAC-Konzentrationen  $> 10 \text{ }\mu\text{M}$  zu einer signifikanten Verringerung des zellulären Eisengehaltes um ca. 17 bis 45 % nach 10minütiger Inkubation. In Abhängigkeit zur Inkubationstemperatur ergeben sich deutlich unterschiedliche Verlaufskurven der konzentrationsabhängigen Eisenakkumulation von APKs. Die Werte des zellulären Eisengehaltes bei 37 °C beschreiben mit steigender FAC-Konzentration einen hyperbolen

Kurvenverlauf. Die Werte des zellulären Eisengehaltes bei 4 °C beschreiben hingegen – mit Ausnahme des Messwertes bei 150 µM FAC – einen linear ansteigenden, nicht-sättigbaren Verlauf, ähnlich des konzentrationsabhängigen Verlaufs der unspezifischen Bindung von Citrat an die Zellmembran von kultivierten Hepatocyten (Graham *et al.* 1998). Daher könnte der in der vorliegenden Arbeit beobachtete, nicht-sättigbare Prozess bei 4 °C, der Assoziation des Eisencitrat-Komplexes an die äußere Zellmembran der APKs entsprechen.

Der hyperbole Verlauf und damit die Sättigung der Eisenakkumulation mit zunehmender FAC-Konzentration, wird durch eine Darstellung der Differenz der zellulären Eisengehalte (37 minus 4 °C) hervorgehoben. Die Differenz der zellulären Eisengehalte (37 minus 4 °C) entspricht einen hyperbolischen Kurvenverlauf, der sich asymptotisch einem Maximalwert von ca. 7.5 nmol Eisen/mg Zellprotein annähert. Versteht man darüber hinaus die Differenz der zellulären Eisengehalte (37 minus 4 °C) als den Anteil des intrazellulären Eisens, so sind die erwähnten Resultate als ein deutlicher Hinweis auf eine zelluläre Aufnahme von Eisen aus FAC-Lösungen in APKs zu verstehen. Geht man ferner davon aus – wie zuvor gezeigt – dass die Eisenakkumulation von APKs aus FAC-Lösungen für den initialen Inkubationszeitraum von 10 min mit einer konstanten Geschwindigkeit abläuft. So ergibt sich aus der unter Abb. 3.4.1 B gezeigten Verlaufskurve eine maximale Eisenaufnahmegeschwindigkeit von  $V_{\max} = 0.75 \text{ nmol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$  sowie ein  $K_M = 25.4 \text{ }\mu\text{M}$ .

Der in der vorliegenden Arbeit gefundene  $K_M$ -Wert liegt im Bereich der Literaturangaben ( $K_M \approx 0.5$  bis  $30 \text{ }\mu\text{M}$ ) für die Akkumulation von nicht Tf-gebundenen Eisen durch verschiedene Zelltypen (Basset *et al.* 1986; Wright *et al.* 1986; Sturrock *et al.* 1990; Inman und Wessling-Resnick 1993; Randell *et al.* 1994; Gutierrez *et al.* 1998; Attieh *et al.* 1999). In den zumeist älteren Studien wurde der zugehörige  $V_{\max}$ -Wert lediglich in Relation zur eingesetzten Zellzahl anstatt zum zellulären Proteingehalt angegeben (Basset *et al.* 1986; Inman und Wessling-Resnick 1993; Gutierrez *et al.* 1998; Attieh *et al.* 1999). Lediglich für HepG2- und HeLa-Zellen wurden  $V_{\max}$ -Wert mit 3-55 pmol/(mg·min) angegeben (Sturrock *et al.* 1990; Randell *et al.* 1994). Die Diskrepanz dieser Literaturangaben zum  $V_{\max}$ -Wert der vorliegenden Arbeit kann zum einen in den unterschiedlichen Inkubationsbedingungen (wie z.B. verschiedene Inkubationsmedien bzw. extrazelluläre Eisenquelle) begründet sein und/oder auf zellspezifische Unterschiede im Vergleich zu Astrocyten zurückzuführen sein.

Ebenso liegen die bis *dato* aus der Literatur bekannten  $K_M$ -Werte der in Tabelle 4.4.1 aufgeführten bekannten Eisen-Transporter im Bereich von wenigen Micromolar (0.1-2  $\mu\text{M}$ ; Frost und Rosenberg 1973; Lim und Morgan 1984; Attieh *et al.* 1999; Garrick *et al.* 2006; Pinilla-Tenas *et al.* 2011). Eine substantielle Beteiligung der betreffenden Transporter (TfR1, DMT1, FecA; Trivalenter Kationtransporter; Zip14) an der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Eisenaufnahme durch APKs erscheint daher unwahrscheinlich. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass an der Tf-unabhängigen Eisenakkumulation durch kultivierte Astrocyten – wie bereits von mehreren Autoren postuliert (Qian *et al.* 2000; Tulpule *et al.* 2010; Lane *et al.* 2010, Mills *et al.* 2010) – mehrere unabhängige Transportmechanismen beteiligt sein könnten.

Des Weiteren konnte gezeigt werden (siehe Kapitel 3.4), dass sich die Eisenakkumulation von APKs durch die Variation der extrazellulären Konzentration an divalenten Kationen ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) beeinflussen lässt. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass die Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  nicht limitierend für die beobachtete Eisenakkumulation ist. Außerdem war die Eisenakkumulation nicht durch den extrazellulären pH-Wert der Inkubationslösung zu beeinflussen und unabhängig von der extrazellulären Natrium-, Kalium- sowie Glucosekonzentration. Außerdem wirkte sich die Gabe von Plasmaproteinen (Tf, Albumin, FCS) sowie Carbonsäuren (wie Citrat bzw. Isocitrat) inhibierend auf die Eisenakkumulation aus.

Die Eisenakkumulation von APKs aus dem FAC-Komplexen konnte durch Eisenchelatoren verringert werden. Hierbei war die durch  $\text{Fe}^{3+}$ -Chelatoren erzielte Verminderung des zellulären Eisengehaltes ausgeprägter, als die durch  $\text{Fe}^{2+}$ -Chelatoren hervorgerufene Verminderung. Unter der Berücksichtigung der geringen Ferrireduktionsaktivität von kultivierten Astrocyten, die in der Literatur für 100  $\mu\text{M}$  FAC mit ca. 0.05  $\text{nmol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$  angegeben wird (Tulpule *et al.* 2010) und der Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit für 100  $\mu\text{M}$  FAC eine Eisenakkumulationsgeschwindigkeit von ca. 1.2  $\text{nmol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$  festgestellt wurde, kann – sofern die angegebene Ferrireduktionsaktivität für APKs zutreffend ist – lediglich ein Anteil von ca. 4 % des Eisens in APKs als  $\text{Fe}^{2+}$  akkumuliert worden sein. Im Zusammenhang mit der beobachteten erschwerten Eisenakkumulation in Gegenwart von extrazellulärem Ascorbat, erscheint daher für die eingesetzten Inkubationsbedingungen eine Akkumulation des Eisens als  $\text{Fe}^{2+}$ -Spezies unwahrscheinlich.

In Tabelle 4.4.1 sind eine Reihe von Schlussfolgerungen dargestellt, die eine Einschätzung der Wahrscheinlichkeit einer Beteiligung der aus der Literatur bekannten Eisen-Transportproteine bzw. Transportwege an der Eisenakkumulation aus FAC-Lösungen in APKs ermöglichen.

**Tab. 4.4.1:** Einschätzung der Wahrscheinlichkeit einer Beteiligung bekannter Eisen-Transporter bzw. Transportwege an der Eisenaufnahme aus FAC in APKs.

Transporter / Transportweg	Wahrscheinlichkeit	Begründung	Referenz / experimentelle Daten
Tf-TfR1-Zyklus	Ausgeschlossen	Tf-Inhibierung der Eisenaufnahme; $K_M \approx 0.24-0.8 \mu\text{M}$	Tab. 3.4.2 Lim & Morgan 1984
DMT1	Unwahrscheinlich	Geringe Ferrireduktionsaktivität von APKs, Unabhängigkeit von Ascorbat sowie des pH-Wertes. $K_M \approx 1.6-3.6 \mu\text{M}$	Garrick <i>et al.</i> 2006 Tulpule <i>et al.</i> 2010 Lane <i>et al.</i> 2010 Tab. 3.4.1/3.4.3
LTCCs/TTCCs	Unwahrscheinlich	Keine Stimulanz durch Ascorbat; Unabhängigkeit vom Kaliumgradienten	Tab. 3.4.3 Tab. 3.4.6
FecA	Möglich	Transportiert <i>di</i> -Ferri- <i>di</i> -Citrat; bis <i>dato</i> nur für Gram-negative Bakterien bekannt; $K_M \approx 0.2 \mu\text{M}$	Frost & Rosenberg 1973 Yue <i>et al.</i> 2003
Ferroportin	Unwahrscheinlich	Transportiert $\text{Fe}^{2+}$ ; Nachweislich am Eisenefflux von Astrocyten beteiligt	Abboud & Haile 2000 Jeong & David 2003 McKie & Barlow 2004
IMP-Weg	Unwahrscheinlich	Inhibierung durch Plasmaproteine; Kaum bis gar kein Mobilferrin in Zellüberstand	Tab. 3.4.2 Simovich <i>et al.</i> 2003
NaCs/NaCT	Ausgeschlossen	Keine Abhängigkeit vom Natriumgradienten	Tab. 3.4.6
Trivalenter Kationen Transporter	Möglich	Transportiert trivalente Metalle; bis <i>dato</i> nicht für Säugetierzellen nachgewiesen (Ftr1p/Fip1p); $K_M \approx 0.5-2.0 \mu\text{M}$	Kaplan & O'Halloran 1996; Attieh <i>et al.</i> 1999
TRPC6	Unwahrscheinlich	Keine Stimulanz durch Ascorbat; Keine Abhängigkeit vom Natriumgradienten.	Tab. 3.4.3 Tab. 3.4.6
Zip14	Unwahrscheinlich	Keine Stimulanz durch Ascorbat; Transportiert $\text{Fe}^{2+}$ ; $K_M \approx 2 \mu\text{M}$	Tab. 3.4.3 Liuzzi <i>et al.</i> 2006 Pinilla-Tenas <i>et al.</i> 2011

Wie bereits erwähnt ist unter den serum- und transferrinfreien Inkubationsbedingungen der vorliegenden Arbeit eine Tf-abhängige Eisenaufnahme unwahrscheinlich. Da kultivierte Astrocyten aber intrazelluläres Tf nach vollzogenem Tf-TfR1-Zyklus wieder entlassen können (Hentze *et al.* 2004), wäre zumindest eine partielle Beteiligung des Tf-TfR1-Zyklus an der Eisenaufnahme durch APKs vorstellbar. Die starke Verringerung der Eisenakkumulation aus FAC-Lösungen durch Serumproteine wie Tf zeigt jedoch, dass die Eisenakkumulation von APKs Tf-unabhängig ist. Unwahrscheinlich ist somit auch eine

Beteiligung anderer Protein-Eisenkomplexe, wie z.B. Eisen-Melanotransferrin oder Eisen-Laktoferrin, deren Rezeptoren nachweislich von Zellen des Gehirns exprimiert werden (Faucheux *et al.* 1995; Leveugle *et al.* 1996; Rothenberger *et al.* 1996; Fillebeen *et al.* 1999; Yamada *et al.* 1999). Des Weiteren erscheint auch eine Eisenakkumulation über den so genannten IMP-Weg unwahrscheinlich, der beispielsweise von den Darmepithelzellen zur spezifischen Bindung und Aufnahme von  $\text{Fe}^{3+}$  aus der Nahrung genutzt wird (Simovich *et al.* 2003).

Der optimale pH-Wert zur Akkumulation von Tf-ungebundenen Eisen wird für kultivierte Astrocyten mit pH 6.5 angegeben (Qian *et al.* 2000). Außerdem zeigten Lane und Kollegen (2010), dass die Eisenakkumulation von kultivierten Astrocyten signifikant durch einen molaren Überschuss an Ascorbat gesteigert sowie durch den DMT1-Inhibitor Ferristatin vermindert werden kann. Diese Literaturangaben sprechen für eine partielle Beteiligung von DMT1 an der in der vorliegenden Arbeit gefundenen Eisenaufnahme in kultivierte Astrocyten. Unter Bedingungen (pH-Wert 6.5, Gegenwart von Ascorbat) die eine DMT1-vermittelte Eisenakkumulation durch APKs begünstigen, konnte jedoch keine Erhöhung des zellulären Eisengehaltes im Vergleich zu Kontrollbedingungen festgestellt werden.

Die Akkumulation von nicht Tf-gebundenen Eisen wurde in einer Reihe von Untersuchungen an Säugetierzellen als calciumabhängig beschrieben (Kaplan *et al.* 1991; Inman und Wessling-Resnick 1993; Randell *et al.* 1994; Baker *et al.* 1998; Tsushima *et al.* 1999; Musilkova und Kovar 2001). Unter den bekannten Calcium-Membrankanälen, wurden sowohl die spannungsabhängigen L-Typ- und T-Typ-Calcium-Kanäle (LTCCs/TTCCs) sowie die so genannten ‚Transiente-Rezeptor-Potentiale-Kation-Kanälen‘ (TRPCs) als Ferro-Eisentransporter beschrieben (Mwanjewe und Grover 2004; Oudit *et al.* 2006; Kumfu *et al.* 2011). Die Expression von LTCCs, TTCCs und TRPC6 ist für Astrocyten belegt (Latour *et al.* 2003; Beskina *et al.* 2007), allerdings wird als limitierender Schritt bei der Eisenakkumulation durch LTCCs, TTCCs und TRPC6 die Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  angesehen (Tsushima *et al.* 1999; Mills *et al.* 2010; Kumfu *et al.* 2011). Darüber hinaus ist die Aktivität von LTCCs und TTCCs spannungsabhängig und wird somit durch die Polarisierung der Plasmamembran beeinflusst (Tsien *et al.* 1988; McCleskey 1994). Eine Abhängigkeit der Eisenakkumulation von der extrazellulären Kaliumkonzentration blieb in der vorliegenden Arbeit jedoch aus. Der TRPC6-Kanal ist neben Calcium auch für Natrium permeabel (Beskina *et al.* 2007), in Abwesenheit von extrazellulärem Natrium war keine signifikante

Änderung der Eisenakkumulation festzustellen. Diese Befunde sprechen gegen die Beteiligung eines der erwähnten Calcium-Kanäle an der Eisenaufnahme in APKs.

Eine Ursache für den beobachteten Einfluss der extrazellulären Calciumkonzentration auf die Eisenaufnahme durch APKs, könnte eine mögliche Interaktion von divalenten Kationen mit dem Eisencitrat-Komplex sein. Dies konnte für Ferro-Eisen-Komplexe bereits belegt werden (Mwanjewe *et al.* 2000). Studien zur Akkumulation von Tf-ungebundenem Eisen an HeLa- und K562-Zellen kommen zu dem Schluss, dass von extrazellulärem Calcium *per se* eine Stimulierung der Eisenakkumulation ausgeht (Musilkova und Kovar 2001). Hieraus würde sich auch der stimulierende Einfluss von Magnesium auf die Eisenakkumulation ableiten lassen. Allerdings ist auch eine direkte Interaktion der divalenten Kationen (beispielsweise als Co-Faktor) mit einem bisher unbekanntem Eisentransporter nicht ausgeschlossen.

Die zelluläre Aufnahme von Citrat findet bei primären Astrocyten entlang eines einwärts gerichteten Natrium-Konzentrationsgradienten über Natrium-gekoppelte Carbonsäure-Transporter (NaCs) oder Natrium-gekoppelte Citrat-Transporter (NaCTs) statt (Westergaard *et al.* 1994; Inoue *et al.* 2002; Markovich und Murer 2004; Yodoya *et al.* 2006). Eine Co-Aufnahme des Citrat-gebundenen Eisens des FAC-Komplexes über NaCs bzw. NaCTs in APKs ist aufgrund der bereits erwähnten Unabhängigkeit der Eisenakkumulation vom extrazellulären Natriumgehalt jedoch ausgeschlossen.

Eine mögliche Erklärung für die beobachtete Inhibierung der Eisenakkumulation durch einen molaren Überschuss an Citrat, könnte die Verschiebung des Komplexbildungsgleichgewichtes von FAC zu ungunsten der Dissoziation der Einzelkomponenten des Komplexes sein (siehe hierzu Kapitel 4.3 sowie Gleichung 4.1). Damit wären weniger freie Eisenionen vorhanden. Dies würde in einer verminderten Eisenakkumulation resultiert, da die zelluläre Eisenakkumulation vermutlich von der Konzentration an freien bzw. nicht Citrat-gebundenen Eisenionen abhängt. Musilkova und Kollegen (1998) postulieren für ihre Untersuchungen zur Tf-unabhängigen Eisenakkumulation in Säugetierzellen, dass der Aufnahme von Eisen aus Ferri-Citrat-Komplexen eine spezifische Bindung des Komplexes an die Plasmamembran vorausgeht. Darüber hinaus wurde bei Untersuchungen an *E.coli* ein zellulärer Mechanismus (FecA-Transporter) zur Bindung von *di*-Citrat- und *di*-Ferri-*di*-Citrat-Komplexen entdeckt, der allerdings nur zum spezifischen Transport und Aufnahme des *di*-Ferri-*di*-Citrat-Komplexes dient (Yue *et al.* 2003). Eine verminderte Eisenakkumulation durch

Erhöhung der Citratkonzentration, wäre demzufolge durch eine Konkurrenz von *di*-Citrat-Komplexen mit dem *di*-Ferri-*di*-Citrat-Komplex um die Bindung an die Membran-Bindungsstelle des FecA-Transporters zu erklären. Demzufolge ist also eine Aufnahme des Eisencitrat-Komplexes aus FAC-Lösungen für APKs nicht auszuschließen.

Sollten APKs lediglich Citrat-ungebundenes Eisen akkumulieren, könnten Zip-Transporter am Transport von Eisen beteiligt sein (Gaither und Eide 2000). Insbesondere Zip14 wird in der Literatur als Transporter beschrieben, der die Tf-unabhängige Eisenaufnahme in Säugetierzellen vermittelt (Liuzzi *et al.* 2006). Zip-Transporter sind in erster Linie für die Aufnahme von divalenten Zinkionen bekannt, können aber auch andere divalente Metalle wie etwa Fe<sup>2+</sup> oder Mangan(II) transportieren (Kambe *et al.* 2004; Eide 2006). Sowohl die geringe Ferrireduktionsaktivität von APKs als auch die ausbleibende Stimulanz von Ascorbat auf die Eisenakkumulation, sprechen jedoch gegen eine Akkumulation von Eisen aus FAC-Lösungen durch Zip-Transporter.

#### **4.5 Ausblick**

Der Prozess der Tf-unabhängigen Eisenaufnahme durch Astrogliazellen könnte eine wichtige Rolle bei der Versorgung des Gehirns mit Eisen spielen. Da Störungen der neuronalen Eisenhomöostase zu einer Eisenüberladung des Gehirns führen und schwerwiegende neurodegenerative Erkrankungen verursachen können (siehe Kapitel 1.2.4), könnte die Identifikation der beteiligten Eisen-Transportproteine bzw. Eisen-Transportwege an der Tf-unabhängigen Eisenaufnahme in Astrocyten, ein wichtiger Beitrag zur Therapie betroffener Patienten darstellen. Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurde eine solide Grundlage zur Aufklärung des Prozesses der Tf-unabhängigen Eisenakkumulation in APKs geschaffen. Ausgehend von den gewonnenen neuen Erkenntnissen und der im Kapitel 4.5 skizzierten Strategie zur weiteren Untersuchung des Prozesses, erscheint es nun durchaus möglich zielgerichtet auf die Identifikation des verantwortlichen Transportweges zur Aufnahme von Eisen aus Eisencitrat-Komplexen in Astrogliazellen hinzuwirken. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass an der Tf-unabhängigen Eisenakkumulation durch kultivierte Astrocyten mehrere unabhängige Transportmechanismen beteiligt sein könnten, deren Aktivitäten sich möglicherweise wechselseitig beeinflussen. Ist diese Hypothese zutreffend, so wäre es schwieriger – aber nicht unmöglich – die einzelnen Fraktionen des gesamten akkumulierten Eisens zu bestimmen und zu charakterisieren.



Zur Verifizierung bzw. Falsifizierung einer potentiellen Beteiligung der in Tabelle 4.4.1 aufgeführten Eisen-Transporter bzw. Transportwege an der Eisenakkumulation aus FAC-Lösungen in APKs, sind eine Reihe von Experimenten denkbar, die in Tabelle 4.4.2 zusammengefasst sind.

**Tab. 4.4.2:** Mögliche experimentelle Ansätze zur Verifizierung / Falsifizierung einer Beteiligung der diskutierten Transporter bzw. Transportwege an der Eisenakkumulation aus FAC-Lösungen in APKs.

Transporter / Transportweg	Verifizierung / Falsifizierung der Beteiligung an der Eisenaufnahme in APKs aus FAC	Referenz
DMT1	Einfluss von divalenten Metallen ( $Mn^{2+}$ oder $Co^{2+}$ ); Stimulierung durch defizitären zellulären Fe-Gehalt (DFX) Inhibierung via Ferristatin	Qian <i>et al.</i> 2000 Gunshin <i>et al.</i> 2001 Buckett und Wessling-Resnick 2009
FecA	Einfluss von Fe-NTA-Komplexen	Inman & Wessling-Resnick 1993
Ferroportin	Manipulation der Expression durch Fe-Entzug (DFX)	McKie & Barlow 2004
IMP-Weg	Einfluss von Mobilferrin auf die Fe-Aufnahme	Simovich <i>et al.</i> 2003
LTCCs / TTCCs	Manipulation des cytosolischen $Ca^{2+}$ Gehaltes ( $Cd^{2+}$ oder EGTA); Inhibierung der LTCC- / TTCC-Aktivität durch Bay K (+) 8644 bzw. Efonidipin	Inman & Wessling-Resnick 1993 Bannon <i>et al.</i> 1995 Vassort <i>et al.</i> 2006
Trivalenter Kationen Transporter	Einfluss von trivalenten Metallen; Inhibierung der Cp-Aktivität durch Kupfer-Entzug (Thiomolybdat)	Chidambaram <i>et al.</i> 1984 Attieh <i>et al.</i> 1999
TRPC6	Inhibierung durch ‚SKF 96365‘ sowie $La^{3+}$ ; Stimulierung durch Diacylglycerol	Inoue <i>et al.</i> 2001 Mwanjewe & Grover 2004
Zip	Inhibierung durch Zink; Manipulation der Expression durch Zn-Entzug/Beladung	Zhao & Eide 1996a,b Liuzzi <i>et al.</i> 2006

So sollte eine durch DMT1-vermittelte Eisenakkumulation durch die Gegenwart von zusätzlichen divalenten Metallionen wie Mangan oder Kobalt zu inhibieren sein, da diese Metallionen auch als Substrat für einen durch DMT1-vermittelten Transport bekannt sind (Gunshin *et al.* 1997). Darüber hinaus lässt sich die Eisenaufnahme via DMT1 pharmakologisch mittels Ferristatin inhibieren (Buckett und Wessling-Resnick 2009). Außerdem ist die Expression der Eisen-Transport-Proteine wie DMT1 und Ferroportin über so genannte ‚Iron-responsive-elements‘ (IRE) auf mRNA-Basis durch den zellulären Eisengehalt beeinflussbar (Gunshin *et al.* 2001; Hentze *et al.* 2004). Daher sollte eine Aufnahme von Eisen via DMT1 oder Ferroportin durch vorherigen zellulären Eisenentzug mittels Eisenchelatoren wie DFX stimulierbar sein.

Hingegen ist die Expression von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen (wie LTCCs und TTCCs) unabhängig vom zellulären Eisengehalt (Tsushima *et al.* 1999; Oudit *et al.* 2004). spannungsabhängige Calcium-Kanäle sind in erster Linie permeabel für Calciumionen (Oudit *et al.* 2006). Daher sollte eine durch sie vermittelte Eisenaufnahme in APKs durch eine

Manipulation des cytosolischen Calciumgehaltes zu beeinflussen sein. Dies könnte durch eine Behandlung der Zellen mit Cadmiumionen oder durch die Gabe eines Calciumchelators wie etwa EGTA experimentell vollzogen werden (Tsushima *et al.* 1999, Inman und Wessling-Resnick 1993). Darüber hinaus sind die Antagonisten Bay K (+) 8644 bzw. Efonidipin als potente Hemmstoffe der Permeabilität von LTCCs bzw. TTCCs bekannt (Bannon *et al.* 1995; Vassort *et al.* 2006). Die durch den Calcium-Kanal TRPC6-vermittelte Eisenaufnahme sollte sich einerseits durch die zusätzliche Gabe von Diacylglycerol stimulieren lassen (Mwanjewe und Grover 2004) und kann andererseits durch den Antagonisten ‚SKF 96365‘ sowie  $\text{La}^{3+}$  inhibiert werden (Inoue *et al.* 2001).

Zink stellt ein Substrat der Zip-Transporter dar (Kambe *et al.* 2004; Eide 2006). Demzufolge sollte die Eisenaufnahme via Zip-Transporter durch Zink zu inhibieren sein (Liuzzi *et al.* 2006). Des Weiteren wird die Expression von Proteinen der Zip-Familie unter anderem durch den zellulären Zinkgehalt reguliert (Zhao und Eide 1996a; Zhao und Eide 1996b). Dieser ließe sich durch eine Vorbehandlung der APKs mit Zinkchelatoren wie etwa EDTA (Lavoie *et al.* 2007) oder einer Beladung der Zellen mit Zink manipulieren.

Der hauptsächlich für Darmepithelzellen beobachtete IMP-Eisentransportweg ist abhängig von dem Protein Mobilferrin, welches von den Darmepithelzellen sezerniert und nach Eisenbeladung reabsorbiert wird (Simovich *et al.* 2003). Um zu einer definitiven Aussage über die potentielle Beteiligung von Mobilferrin an der Eisenaufnahme aus Eisencitrat-Komplexen in APKs zu gelangen, sollte der Einfluss von Mobilferrin durch Zugabe dieses Proteins zum Inkubationsansatz untersucht werden.

Eine spezifische Aufnahme von Eisencitrat-Komplexen und damit eine Abhängigkeit der Aufnahme vom Eisenliganden Citrat lässt sich durch die Analyse der Eisenakkumulation anderer Eisen-Komplexen wie etwa Fe-NTA in APKs untersuchen (Inman und Wessling-Resnick 1993). Sollte keine Akkumulation bzw. Eisenaufnahme aus Fe-NTA in APKs festzustellen sein, wäre eine spezifische Aufnahme von Eisencitrat-Komplexen wahrscheinlich. Dies würde die Hypothese der Eisenaufnahme durch ein humanes Homolog zum Transportprotein FecA, welches bisher nur für Gram-negative Bakterien (z.B.: *E.coli*) bekannt ist, unterstützen (Yue *et al.* 2003).

Im Falle eines Transportes von Eisen aus FAC-Lösungen durch einen trivalenten Kationentransporter (Kaplan und O'Halloran 1996) ließe sich dessen Beteiligung an der Eisenaufnahme in APKs durch eine kompetitive Akkumulation von trivalenten Kationen wie Aluminium-, Chrom- oder Galliumionen belegen (Attieh *et al.* 1999). Darüber hinaus wird der Transport durch den für Säugetierzellen postulierten trivalenten Kationentransporter als abhängig von der Cp-Aktivität beschrieben (Attieh *et al.* 1999). Cp ist eine kupferhaltige Ferroxidase (Osaki *et al.* 1966), deren Aktivität durch den Entzug von Kupfer mittels Kupferchelatoren (z.B.: Thiomolybdat) gehemmt werden kann (Chidambaram *et al.* 1984).

Darüber hinaus könnten ergänzend zu den bisher vorgeschlagenen Untersuchungen, Eisenaufnahmestudien mit radioaktiv markierten Eisencitrat-Komplexen (wie z.B.:  $^{55}\text{Fe}$ -Citrat) durchgeführt werden (Baker *et al.* 1998; Musilkova und Kovar 2001; Lane *et al.* 2010). Die Analyse des Zelllysates mittels Gelelektrophorese und anschließender autoradiographischer Detektion könnte dabei die Isolierung und Identifikation von Proteinbanden ermöglichen, welche an der Eisenaufnahme aus Eisencitrat-Komplexen in APKs beteiligt sind (Vyoral und Petrak 1998). Außerdem könnte unter Verwendung von  $^{14}\text{C}$  markiertem, radioaktivem Citrat geklärt werden, ob APKs freies nicht Citrat-gebundenes Eisen oder durch Citrat komplexiertes Eisen aufnehmen (Graham *et al.* 1998). Dieses Experiment müsste allerdings in einem Inkubationspuffer in Abwesenheit von Natrium durchgeführt werden, um eine Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Citrat nach extrazellulärer Abspaltung vom Eisencitrat-Komplex durch NaCs bzw. NaCTs zu vermeiden. Außerdem müsste das Auftreten von radioaktiv markierten  $^{14}\text{CO}_2$  bei der Bilanzierung des Citratgehaltes berücksichtigt werden. Dies gelingt jedoch unter der Verwendung von  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  imprägnierten Zellkulturluftfiltern (Tabor *et al.* 1983).

Um Aufschluss über die Valenz des aus dem FAC-Komplex durch APKs aufgenommenen Eisens zu bekommen, können primäre Zellen – wie von Lane und Kollegen (2010) gezeigt – mit dem für Eisen sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM (Acetoxymethylester) beladen werden. Intrazelluläres freies Calcein ist sowohl sensitiv gegenüber Ferri- als auch an Ferro-Eisen. Durch die Bindung von Eisen vermindert sich die Fluoreszenz des Calcein (Thomas *et al.* 1999). Dieser Effekt kann durch Membran-permeable Valenz-spezifische Eisenchelatoren – wie z.B.: 2,2'-Dipyridyl ( $\text{Fe}^{2+}$ -Chelator) oder Pyridoxal-Isonicotinsäure-Hydrazon (PIH;  $\text{Fe}^{3+}$ -Chelator) – aufgehoben werden. Der Anstieg der intrazellulären Calcein-Fluoreszenz gilt

dabei als Maß für die Menge der jeweiligen Eisenspezies (Cabantchik *et al.* 1996; Lane *et al.* 2010).

Des Weiteren gibt es die Möglichkeit zur gentechnischen Manipulation von primären astroglialen Zellkulturen. Hierzu eignet sich insbesondere die so genannte RNA-Interferenz (kurz RNAi), bei der Zellen mit kurzen ‚genspezifischen‘ doppelsträngigen RNA-Abschnitten (19-25 Basenpaare) transfiziert werden (Mahmood-ur-Rahman *et al.* 2008). Dies führt zu einer natürlichen Abwehrreaktion der transfizierten Zelle, die zu einer transienten Verminderung der Expression des Zielproteins führt. Hierdurch lassen sich zielgerichtet Eisentransportproteine ausschalten und somit deren Einfluss auf die Eisenaufnahme analysieren.

Ein weiteres strukturiertes experimentelles Vorgehen im geschilderten Sinne führt möglicherweise zu Erkenntnissen, die eindeutige Schlussfolgerungen hinsichtlich der erwähnten Eisentransportwege ermöglichen.

## 5 Referenzen

- Abbott, N.J. (2002) Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat*, **200**, 629-638.
- Abboud, S. & Haile, D.J. (2000) A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem*, **275**, 19906-19912.
- Aisen, P. (1998) Transferrin, the transferrin receptor, and the uptake of iron by cells. *Met Ions Biol Syst*, **35**, 585-631.
- Aisen, P. (2004) Transferrin receptor 1. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 2137-2143.
- Aisen, P., Leibman, A. & Zweier, J. (1978) Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J Biol Chem*, **253**, 1930-1937.
- Allen, N.J. & Barres, B.A. (2009) Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*, **457**, 675-677.
- Anderson, C.M. & Swanson, R.A. (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*, **32**, 1-14.
- Anderson, G.J. & Vulpe, C.D. (2009) Mammalian iron transport. *Cell Mol Life Sci*, **66**, 3241-3261.
- Andrews, N.C. (1999) Disorders of Iron Metabolism. *N Engl J Med*, **341**, 1986-1995.
- Andrews, N.C. (2000) Iron metabolism: iron deficiency and iron overload. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, **1**, 75-98.
- Aslamkhan, A.G., Aslamkhan, A. & Ahearn, G.A. (2002) Preparation of metal ion buffers for biological experimentation: a methods approach with emphasis on iron and zinc. *J Exp Zool*, **292**, 507-522.
- Atar, D., Backx, P.H., Appel, M.M., Gao, W.D. & Marban, E. (1995) Excitation-transcription coupling mediated by zinc influx through voltage-dependent calcium channels. *J Biol Chem*, **270**, 2473-2477.
- Attieh, Z.K., Mukhopadhyay, C.K., Seshadri, V., Tripoulas, N.A. & Fox, P.L. (1999) Ceruloplasmin ferroxidase activity stimulates cellular iron uptake by a trivalent cation-specific transport mechanism. *J Biol Chem*, **274**, 1116-1123.
- Aziz, N. & Munro, H.N. (1987) Iron regulates ferritin mRNA translation through a segment of its 5' untranslated region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 8478-8482.
- Bailey, S., Evans, R.W., Garratt, R.C., Gorinsky, B., Hasnain, S., Horsburgh, C., Jhoti, H., Lindley, P.F., Mydin, A., Sarra, R. & et al. (1988) Molecular structure of serum transferrin at 3.3-Å resolution. *Biochemistry*, **27**, 5804-5812.

- Baker, E., Baker, S.M. & Morgan, E.H. (1998) Characterisation of non-transferrin-bound iron (ferric citrate) uptake by rat hepatocytes in culture. *Biochim Biophys Acta*, **1380**, 21-30.
- Bannon, A.W., Gunther, K.L., Decker, M.W. & Arneric, S.P. (1995) The influence of Bay K 8644 treatment on (+/-)-epibatidine-induced analgesia. *Brain Res*, **678**, 244-250.
- Barisani, D. & Conte, D. (2002) Transferrin receptor 1 (TfR1) and putative stimulator of Fe transport (SFT) expression in iron deficiency and overload: an overview. *Blood Cells Mol Dis*, **29**, 498-505.
- Barres, B.A. (2008) The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron*, **60**, 430-440.
- Barreto, G.E., Gonzalez, J., Torres, Y. & Morales, L. (2011) Astrocytic-neuronal crosstalk: implications for neuroprotection from brain injury. *Neurosci Res*, **71**, 107-113.
- Basset, P., Quesneau, Y. & Zwiller, J. (1986) Iron-induced L1210 cell growth: evidence of a transferrin-independent iron transport. *Cancer Res*, **46**, 1644-1647.
- Bauer, H., Bauer, H.C., Haseloff, R.F. & Blasig, I.E. (2005) The role of glia in the formation and function of the blood-brain barrier. In Kettenmann, H., Ransom, B.R. *Neuroglia*. Oxford University Press, New York, 325-333.
- Baumann, N. & Pham-Dinh, D. (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev*, **81**, 871-927.
- Bauminger, E.R., Harrison, P.M., Hechel, D., Hodson, N.W., Nowik, I., Treffry, A. & Yewdall, S.J. (1993) Iron (II) oxidation and early intermediates of iron-core formation in recombinant human H-chain ferritin. *Biochem J*, **296 ( Pt 3)**, 709-719.
- Beal, M.F. (1998) Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta*, **1366**, 211-223.
- Benarroch, E.E. (2005) Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clin Proc*, **80**, 1326-1338.
- Benkovic, S.A. & Connor, J.R. (1993) Ferritin, transferrin, and iron in selected regions of the adult and aged rat brain. *J Comp Neurol*, **338**, 97-113.
- Bennett, M.V., Contreras, J.E., Bukauskas, F.F. & Saez, J.C. (2003) New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci*, **26**, 610-617.
- Beskina, O., Miller, A., Mazzocco-Spezia, A., Pulina, M.V. & Golovina, V.A. (2007) Mechanisms of interleukin-1beta-induced Ca<sup>2+</sup> signals in mouse cortical astrocytes: roles of store- and receptor-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Am J Physiol Cell Physiol*, **293**, C1103-1111.
- Bhatt, D.H., Zhang, S. & Gan, W.B. (2009) Dendritic spine dynamics. *Annu Rev Physiol*, **71**, 261-282.

- Bino, A., Shweky, I., Cohen, S., Bauminger, E.R. & Lippard, S.J. (1998) A Novel Nonairon(III) Citrate Complex: A "Ferric Triple-Decker". *Inorg Chem*, **37**, 5168-5172.
- Bishop, G.M. & Robinson, S.R. (2001) Quantitative analysis of cell death and ferritin expression in response to cortical iron: implications for hypoxia-ischemia and stroke. *Brain Res*, **907**, 175-187.
- Bishop, G.M., Scheiber, I.F., Dringen, R. & Robinson, S.R. (2010) Synergistic accumulation of iron and zinc by cultured astrocytes. *J Neural Transm*, **117**, 809-817.
- Bishop, G.M., Dang, T.N., Dringen, R. & Robinson, S.R. (2011) Accumulation of non-transferrin-bound iron by neurons, astrocytes, and microglia. *Neurotox Res*, **19**, 443-451.
- Blitzer, J.T. & Nusse, R. (2006) A critical role for endocytosis in Wnt signaling. *BMC Cell Biol*, **7**, 28.
- Bloch, B., Popovici, T., Levin, M.J., Tuil, D. & Kahn, A. (1985) Transferrin gene expression visualized in oligodendrocytes of the rat brain by using in situ hybridization and immunohistochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 6706-6710.
- Bloch, B., Popovici, T., Chouham, S., Levin, M.J., Tuil, D. & Kahn, A. (1987) Transferrin gene expression in choroid plexus of the adult rat brain. *Brain Res Bull*, **18**, 573-576.
- Bock, E., Moller, M., Nissen, C. & Sensenbrenner, M. (1977) Glial fibrillary acidic protein in primary astroglial cell cultures derived from newborn rat brain. *FEBS Lett*, **83**, 207-211.
- Bothwell, T.H. & Finch, C.A. (1962) *Iron metabolism*. Little Brown, Bosten.
- Boulet, M. (1997) Micronutrient deficiencies. Reports from the field -- Africa. *Glob Impacts*, **13**, 110-122.
- Bradbury, M.W. (1997) Transport of iron in the blood-brain-cerebrospinal fluid system. *J Neurochem*, **69**, 443-454.
- Buckett, P.D. & Wessling-Resnick, M. (2009) Small molecule inhibitors of divalent metal transporter-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **296**, G798-804.
- Burdo, J.R., Menzies, S.L., Simpson, I.A., Garrick, L.M., Garrick, M.D., Dolan, K.G., Haile, D.J., Beard, J.L. & Connor, J.R. (2001) Distribution of divalent metal transporter 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat. *J Neurosci Res*, **66**, 1198-1207.
- Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z. & Ellisman, M.H. (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci*, **22**, 183-192.
- Butt, A.M. (2005) Structure and function of oligodendrocytes. In Kettenmann, H., Ransom, B.R. *Neuroglia*. Oxford University Press, New York, 48-59.

- Cabantchik, Z.I., Glickstein, H., Milgram, P. & Breuer, W. (1996) A fluorescence assay for assessing chelation of intracellular iron in a membrane model system and in mammalian cells. *Anal Biochem*, **233**, 221-227.
- Carpenter, C.E. & Mahoney, A.W. (1992) Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **31**, 333-367.
- Castro, M.A., Beltran, F.A., Brauchi, S. & Concha, II (2009) A metabolic switch in brain: glucose and lactate metabolism modulation by ascorbic acid. *J Neurochem*, **110**, 423-440.
- Chasteen, N.D. & Harrison, P.M. (1999) Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *J Struct Biol*, **126**, 182-194.
- Chen, T.T., Li, L., Chung, D.H., Allen, C.D., Torti, S.V., Torti, F.M., Cyster, J.G., Chen, C.Y., Brodsky, F.M., Niemi, E.C., Nakamura, M.C., Seaman, W.E. & Daws, M.R. (2005) TIM-2 is expressed on B cells and in liver and kidney and is a receptor for H-ferritin endocytosis. *J Exp Med*, **202**, 955-965.
- Cheng, Y., Zak, O., Aisen, P., Harrison, S.C. & Walz, T. (2004) Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell*, **116**, 565-576.
- Chidambaram, M.V., Barnes, G. & Frieden, E. (1984) Inhibition of ceruloplasmin and other copper oxidases by thiomolybdate. *J Inorg Biochem*, **22**, 231-239.
- Christopherson, K.S., Ullian, E.M., Stokes, C.C., Mallowney, C.E., Hell, J.W., Agah, A., Lawler, J., Mosher, D.F., Bornstein, P. & Barres, B.A. (2005) Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*, **120**, 421-433.
- Clarke, D.D. & Sokoloff, L. (1999) Circulation and energy metabolism. In Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., Fisher, S.K., Usher, M.D. *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Lippincott Williams und Wilkins, Philadelphia, USA, 637-670.
- Conner, S.D. & Schmid, S.L. (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, **422**, 37-44.
- Connor, J.R. & Menzies, S.L. (1990) Altered cellular distribution of iron in the central nervous system of myelin deficient rats. *Neuroscience*, **34**, 265-271.
- Connor, J.R., Menzies, S.L., St Martin, S.M. & Mufson, E.J. (1990) Cellular distribution of transferrin, ferritin, and iron in normal and aged human brains. *J Neurosci Res*, **27**, 595-611.
- Connor, J.R., Pavlick, G., Karli, D., Menzies, S.L. & Palmer, C. (1995) A histochemical study of iron-positive cells in the developing rat brain. *J Comp Neurol*, **355**, 111-123.
- Connor, J.R., Menzies, S.L., Burdo, J.R. & Boyer, P.J. (2001) Iron and iron management proteins in neurobiology. *Pediatr Neurol*, **25**, 118-129.



- Conrad, M.E. & Umbreit, J.N. (2000) Iron absorption and transport-an update. *Am J Hematol*, **64**, 287-298.
- Conrad, M.E. & Umbreit, J.N. (2002) Pathways of iron absorption. *Blood Cells Mol Dis*, **29**, 336-355.
- Corsi, B., Cozzi, A., Arosio, P., Drysdale, J., Santambrogio, P., Campanella, A., Biasiotto, G., Albertini, A. & Levi, S. (2002) Human mitochondrial ferritin expressed in HeLa cells incorporates iron and affects cellular iron metabolism. *J Biol Chem*, **277**, 22430-22437.
- Crichton, R.R. (2001) *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism*. John Wiley Sons, New York.
- Crichton, R.R., Wilmet, S., Legssyer, R. & Ward, R.J. (2002) Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J Inorg Biochem*, **91**, 9-18.
- Crowe, A. & Morgan, E.H. (1992) Iron and transferrin uptake by brain and cerebrospinal fluid in the rat. *Brain Res*, **592**, 8-16.
- Curtis, A.R., Fey, C., Morris, C.M., Bindoff, L.A., Ince, P.G., Chinnery, P.F., Coulthard, A., Jackson, M.J., Jackson, A.P., McHale, D.P., Hay, D., Barker, W.A., Markham, A.F., Bates, D., Curtis, A. & Burn, J. (2001) Mutation in the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease. *Nat Genet*, **28**, 350-354.
- Daimon, M., Kato, T., Kawanami, T., Tominaga, M., Igarashi, M., Yamatani, K. & Sasaki, H. (1995) A nonsense mutation of the ceruloplasmin gene in hereditary ceruloplasmin deficiency with diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun*, **217**, 89-95.
- Dallman, P.R., Siimes, M.A. & Manies, E.C. (1975) Brain iron: persistent deficiency following short-term iron deprivation in the young rat. *Br J Haematol*, **31**, 209-215.
- Dang, T.N., Bishop, G.M., Dringen, R. & Robinson, S.R. (2010) The putative heme transporter HCP1 is expressed in cultured astrocytes and contributes to the uptake of heme. *Glia*, **58**, 55-65.
- Dang, T.N., Bishop, G.M., Dringen, R. & Robinson, S.R. (2011) The metabolism and toxicity of heme in astrocytes. *Glia*, **59**, 1540-1550.
- Deitmer, J.W. (2002) A role for CO<sub>2</sub> and bicarbonate transporters in metabolic exchanges in the brain. *J Neurochem*, **80**, 721-726.
- Demeuse, P., Kerkhofs, A., Struys-Ponsar, C., Knoop, B., Remacle, C. & van den Bosch de Aguilar, P. (2002) Compartmentalized coculture of rat brain endothelial cells and astrocytes: a syngenic model to study the blood-brain barrier. *J Neurosci Methods*, **121**, 21-31.
- Dhar, S.K. & Srichak Jr, S. (1979) Structure of sodium ferric citrate. *J Inorg Nucl Chem*, **41**, 126-127.

- Doetsch, F. (2003) The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci*, **6**, 1127-1134.
- Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S.J., Moynihan, J., Paw, B.H., Drejer, A., Barut, B., Zapata, A., Law, T.C., Brugnara, C., Lux, S.E., Pinkus, G.S., Pinkus, J.L., Kingsley, P.D., Palis, J., Fleming, M.D., Andrews, N.C. & Zon, L.I. (2000) Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*, **403**, 776-781.
- Dringen, R. (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol*, **62**, 649-671.
- Dringen, R. (2005) Oxidative and antioxidative potential of brain microglial cells. *Antioxid Redox Signal*, **7**, 1223-1233.
- Dringen, R. & Hamprecht, B. (1998) Glutathione restoration as indicator for cellular metabolism of astroglial cells. *Dev Neurosci*, **20**, 401-407.
- Dringen, R., Kussmaul, L. & Hamprecht, B. (1998) Detoxification of exogenous hydrogen peroxide and organic hydroperoxides by cultured astroglial cells assessed by microtiter plate assay. *Brain Res Brain Res Protoc*, **2**, 223-228.
- Dringen, R., Gutterer, J.M. & Hirrlinger, J. (2000) Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem*, **267**, 4912-4916.
- Dringen, R., Pawlowski, P.G. & Hirrlinger, J. (2005) Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res*, **79**, 157-165.
- Dringen, R., Bishop, G.M., Koeppe, M., Dang, T.N. & Robinson, S.R. (2007) The pivotal role of astrocytes in the metabolism of iron in the brain. *Neurochem Res*, **32**, 1884-1890.
- Du, F., Qian, C., Qian, Z.M., Wu, X.M., Xie, H., Yung, W.H. & Ke, Y. (2011) Hepcidin directly inhibits transferrin receptor 1 expression in astrocytes via a cyclic AMP-protein kinase a pathway. *Glia*, **59**, 936-945.
- Dunn, L.L., Rahmanto, Y.S. & Richardson, D.R. (2007) Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol*, **17**, 93-100.
- Eide, D.J. (2006) Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim Biophys Acta*, **1763**, 711-722.
- Eisenstein, R.S. (2000) Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu Rev Nutr*, **20**, 627-662.
- Engelmann, M.D., Bobier, R.T., Hiatt, T. & Cheng, I.F. (2003) Variability of the Fenton reaction characteristics of the EDTA, DTPA, and citrate complexes of iron. *Biometals*, **16**, 519-527.
- Erikson, K.M. & Aschner, M. (2006) Increased manganese uptake by primary astrocyte cultures with altered iron status is mediated primarily by divalent metal transporter. *Neurotoxicology*, **27**, 125-130.

- Faucheux, B.A., Nillesse, N., Damier, P., Spik, G., Mouatt-Prigent, A., Pierce, A., Leveugle, B., Kubis, N., Hauw, J.J., Agid, Y. & et al. (1995) Expression of lactoferrin receptors is increased in the mesencephalon of patients with Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9603-9607.
- Fellin, T. & Carmignoto, G. (2004) Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J Physiol*, **559**, 3-15.
- Felt, B.T. & Lozoff, B. (1996) Brain iron and behavior of rats are not normalized by treatment of iron deficiency anemia during early development. *J Nutr*, **126**, 693-701.
- Fillebeen, C., Mitchell, V., Dexter, D., Benaissa, M., Beauvillain, J., Spik, G. & Pierce, A. (1999) Lactoferrin is synthesized by mouse brain tissue and its expression is enhanced after MPTP treatment. *Brain Res Mol Brain Res*, **72**, 183-194.
- Fish, W.W. (1988) Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods Enzymol*, **158**, 357-364.
- Fleming, J. & Joshi, J.G. (1987) Ferritin: isolation of aluminum-ferritin complex from brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 7866-7870.
- Fleming, M.D., Trenor, C.C., 3rd, Su, M.A., Foernzler, D., Beier, D.R., Dietrich, W.F. & Andrews, N.C. (1997) Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet*, **16**, 383-386.
- Fleming, M.D., Romano, M.A., Su, M.A., Garrick, L.M., Garrick, M.D. & 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 U S A*, **95**, 1148-1153.
- Francis, A.J. & Dodge, C.J. (1993) Influence of complex structure on the biodegradation of iron-citrate complexes. *Appl Environ Microbiol*, **59**, 109-113.
- Frost, G.E. & Rosenberg, H. (1973) The inducible citrate-dependent iron transport system in *Escherichia coli* K12. *Biochim Biophys Acta*, **330**, 90-101.
- Gaasch, J.A., Lockman, P.R., Geldenhuys, W.J., Allen, D.D. & Van der Schyf, C.J. (2007) Brain iron toxicity: differential responses of astrocytes, neurons, and endothelial cells. *Neurochem Res*, **32**, 1196-1208.
- Gaither, L.A. & Eide, D.J. (2000) Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. *J Biol Chem*, **275**, 5560-5564.
- Galal-Gorchev, H. & Stumm, W. (1963) The reaction of ferric iron with ortho-phosphate. *J Inorg Nucl Chem*, **25**, 567-574.
- Ganz, T. (2005) Cellular iron: ferroportin is the only way out. *Cell Metab*, **1**, 155-157.
- Garrick, M.D. & Garrick, L.M. (2009) Cellular iron transport. *Biochim Biophys Acta*, **1790**, 309-325.

- Garrick, M.D., Dolan, K.G., Horbinski, C., Ghio, A.J., Higgins, D., Porubcin, M., Moore, E.G., Hainsworth, L.N., Umbreit, J.N., Conrad, M.E., Feng, L., Lis, A., Roth, J.A., Singleton, S. & Garrick, L.M. (2003) DMT1: a mammalian transporter for multiple metals. *Biometals*, **16**, 41-54.
- Garrick, M.D., Kuo, H.C., Vargas, F., Singleton, S., Zhao, L., Smith, J.J., Paradkar, P., Roth, J.A. & Garrick, L.M. (2006) Comparison of mammalian cell lines expressing distinct isoforms of divalent metal transporter 1 in a tetracycline-regulated fashion. *Biochem J*, **398**, 539-546.
- Gautier-Luneau, I., Fouquard, C., Merle, C., Pierre, J.-L. & Luneau, D. (2001) Synthesis, structure and magnetic properties of a novel octairon(III) citrate complex. *Dalton Trans*, 2127-2131.
- Gelman, B.B. (1995) Iron in CNS disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, **54**, 477-486.
- Gerber, M.R. & Connor, J.R. (1989) Do oligodendrocytes mediate iron regulation in the human brain? *Ann Neurol*, **26**, 95-98.
- Ghandour, M.S., Vincendon, G. & Gombos, G. (1980) Astrocyte and oligodendrocyte distribution in adult rat cerebellum: an immunohistological study. *J Neurocytol*, **9**, 637-646.
- Goddard, W.P., Coupland, K., Smith, J.A. & Long, R.G. (1997) Iron uptake by isolated human enterocyte suspensions in vitro is dependent on body iron stores and inhibited by other metal cations. *J Nutrition*, **127**, 177-183.
- Gorman, J.E. & Clydesdale, F.M. (1983) The behavior and stability of iron-ascorbate complexes in solution. *J Food Sci*, **48**, 1217-1220.
- Graham, R.M., Morgan, E.H. & Baker, E. (1998) Characterisation of citrate and iron citrate uptake by cultured rat hepatocytes. *J Hepatol*, **29**, 603-613.
- Graham, R.M., Reutens, G.M., Herbison, C.E., Delima, R.D., Chua, A.C., Olynyk, J.K. & Trinder, D. (2008) Transferrin receptor 2 mediates uptake of transferrin-bound and non-transferrin-bound iron. *J Hepatol*, **48**, 327-334.
- Gregory, A. & Hayflick, S.J. (2005) Neurodegeneration with brain iron accumulation. *Folia Neuropathol*, **43**, 286-296.
- Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M.L. & Eide, D. (1998) Identification of a family of zinc transporter genes from Arabidopsis that respond to zinc deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7220-7224.
- Guerinot, M.L. & Yi, Y. (1994) Iron: Nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol*, **104**, 815-820.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L. & Hediger, M.A. (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, **388**, 482-488.

- Gunshin, H., Allerson, C.R., Polycarpou-Schwarz, M., Rofts, A., Rogers, J.T., Kishi, F., Hentze, M.W., Rouault, T.A., Andrews, N.C. & Hediger, M.A. (2001) Iron-dependent regulation of the divalent metal ion transporter. *FEBS Lett*, **509**, 309-316.
- Guo, B., Yu, Y. & Leibold, E.A. (1994) Iron regulates cytoplasmic levels of a novel iron-responsive element-binding protein without aconitase activity. *J Biol Chem*, **269**, 24252-24260.
- Guo, B., Phillips, J.D., Yu, Y. & Leibold, E.A. (1995) Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. *J Biol Chem*, **270**, 21645-21651.
- Guo, M., Perez, C., Wei, Y., Rapoza, E., Su, G., Bou-Abdallah, F. & Chasteen, N.D. (2007) Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects. *Dalton Trans*, 4951-4961.
- Guthrie, P.B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M.V., Charles, A.C. & Kater, S.B. (1999) ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci*, **19**, 520-528.
- Gutierrez, J.A., Yu, J., Rivera, S. & Wessling-Resnick, M. (1997) Functional expression cloning and characterization of SFT, a stimulator of Fe transport. *J Cell Biol*, **139**, 895-905.
- Gutierrez, J.A., Inman, R.S., Akompong, T., Yu, J. & Wessling-Resnick, M. (1998) Metabolic depletion inhibits the uptake of nontransferrin-bound iron by K562 cells. *J Cell Physiol*, **177**, 585-592.
- Gutterer, J.M., Dringen, R., Hirrlinger, J. & Hamprecht, B. (1999) Purification of glutathione reductase from bovine brain, generation of an antiserum, and immunocytochemical localization of the enzyme in neural cells. *J Neurochem*, **73**, 1422-1430.
- Hallgren, B. & Sourander, P. (1958) The effect of age on the non-haemin iron in the human brain. *J Neurochem*, **3**, 41-51.
- Halliwell, B. (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*, **59**, 1609-1623.
- Halliwell, B. (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*, **18**, 685-716.
- Halliwell, B. (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*, **97**, 1634-1658.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Ham, D. & Schipper, H.M. (2000) Heme oxygenase-1 induction and mitochondrial iron sequestration in astroglia exposed to amyloid peptides. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **46**, 587-596.

- Hamm, S., Dehouck, B., Kraus, J., Wolburg-Buchholz, K., Wolburg, H., Risau, W., Cecchelli, R., Engelhardt, B. & Dehouck, M.P. (2004) Astrocyte mediated modulation of blood-brain barrier permeability does not correlate with a loss of tight junction proteins from the cellular contacts. *Cell Tissue Res*, **315**, 157-166.
- Hamprecht, B. & Loffler, F. (1985) Primary glial cultures as a model for studying hormone action. *Methods Enzymol*, **109**, 341-345.
- Hansen, T.M., Nielsen, H., Bernth, N. & Moos, T. (1999) Expression of ferritin protein and subunit mRNAs in normal and iron deficient rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, **65**, 186-197.
- Hao, X., Wei, Y. & Zhang, S. (2001) Synthesis, crystal structure and magnetic property of a binuclear iron(III) citrate complex. *Transition Met Chem*, **26**, 384-387.
- Harris, Z.L. (2003) Aceruloplasminemia. *J Neurol Sci*, **207**, 108-109.
- Harris, Z.L., Migas, M.C., Hughes, A.E., Logan, J.I. & Gitlin, J.D. (1996) Familial dementia due to a frameshift mutation in the caeruloplasmin gene. *Q J Med*, **89**, 355-360.
- Harrison, P.M. & Arosio, P. (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta*, **1275**, 161-203.
- Harrison, P.M., Hempstead, P.D., Artymiuk, P.J. & Andrews, S.C. (1998) Structure-function relationships in the ferritins. *Met Ions Biol Syst*, **35**, 435-477.
- Haseloff, R.F., Blasig, I.E., Bauer, H.C. & Bauer, H. (2005) In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol*, **25**, 25-39.
- Haydon, P.G. & Carmignoto, G. (2006) Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev*, **86**, 1009-1031.
- Hayflick, S.J. (2003) Unraveling the Hallervorden-Spatz syndrome: pantothenate kinase-associated neurodegeneration is the name. *Curr Opin Pediatr*, **15**, 572-577.
- He, F. & Sun, Y.E. (2007) Glial cells more than support cells? *Int J Biochem Cell Biol*, **39**, 661-665.
- Hellman, N.E., Kono, S., Miyajima, H. & Gitlin, J.D. (2002) Biochemical analysis of a missense mutation in aceruloplasminemia. *J Biol Chem*, **277**, 1375-1380.
- Henderson, B.R., Seiser, C. & Kuhn, L.C. (1993) Characterization of a second RNA-binding protein in rodents with specificity for iron-responsive elements. *J Biol Chem*, **268**, 27327-27334.
- Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U. & Andrews, N.C. (2004) Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*, **117**, 285-297.

- Hess, P., Lansman, J.B. & Tsien, R.W. (1986) Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations. Voltage and concentration dependence of single channel current in ventricular heart cells. *J Gen Physiol*, **88**, 293-319.
- Hirling, H., Henderson, B.R. & Kuhn, L.C. (1994) Mutational analysis of the [4Fe-4S]-cluster converting iron regulatory factor from its RNA-binding form to cytoplasmic aconitase. *EMBO J*, **13**, 453-461.
- Hirsh, M., Konijn, A.M. & Iancu, T.C. (2002) Acquisition, storage and release of iron by cultured human hepatoma cells. *J Hepatol*, **36**, 30-38.
- Hoepken, H.H., Korten, T., Robinson, S.R. & Dringen, R. (2004) Iron accumulation, iron-mediated toxicity and altered levels of ferritin and transferrin receptor in cultured astrocytes during incubation with ferric ammonium citrate. *J Neurochem*, **88**, 1194-1202.
- Holleman, A.F. & Wiberg, E. (1995) *Lehrbuch der anorganischen Chemie*. Walter de Gruyter, Berlin.
- Huidobro-Toro, J.P., Lorca, R.A. & Coddou, C. (2008) Trace metals in the brain: allosteric modulators of ligand-gated receptor channels, the case of ATP-gated P2X receptors. *Eur Biophys J*, **37**, 301-314.
- Huth, U.S., Schubert, R. & Peschka-Suss, R. (2006) Investigating the uptake and intracellular fate of pH-sensitive liposomes by flow cytometry and spectral bio-imaging. *J Control Release*, **110**, 490-504.
- Inman, R.S. & Wessling-Resnick, M. (1993) Characterization of transferrin-independent iron transport in K562 cells. Unique properties provide evidence for multiple pathways of iron uptake. *J Biol Chem*, **268**, 8521-8528.
- Inoue, R., Okada, T., Onoue, H., Hara, Y., Shimizu, S., Naitoh, S., Ito, Y. & Mori, Y. (2001) The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular alpha(1)-adrenoceptor-activated Ca<sup>2+</sup>-permeable cation channel. *Circ Res*, **88**, 325-332.
- Inoue, K., Zhuang, L., Maddox, D.M., Smith, S.B. & Ganapathy, V. (2002) Structure, function, and expression pattern of a novel sodium-coupled citrate transporter (NaCT) cloned from mammalian brain. *J Biol Chem*, **277**, 39469-39476.
- Inoue, M., Sato, E.F., Nishikawa, M., Park, A.M., Kira, Y., Imada, I. & Utsumi, K. (2003) Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem*, **10**, 2495-2505.
- Irace, C., Scorziello, A., Maffettone, C., Pignataro, G., Matrone, C., Adornetto, A., Santamaria, R., Annunziato, L. & Colonna, A. (2005) Divergent modulation of iron regulatory proteins and ferritin biosynthesis by hypoxia/reoxygenation in neurones and glial cells. *J Neurochem*, **95**, 1321-1331.

- Isobe, I., Michikawa, M. & Yanagisawa, K. (1999) Enhancement of MTT, a tetrazolium salt, exocytosis by amyloid beta-protein and chloroquine in cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett*, **266**, 129-132.
- Ivanov, A.I. (2008) Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? *Methods Mol Biol*, **440**, 15-33.
- Iwai, K., Klausner, R.D. & Rouault, T.A. (1995) Requirements for iron-regulated degradation of the RNA binding protein, iron regulatory protein 2. *EMBO J*, **14**, 5350-5357.
- Jander, G., Blasius, E., Strähle, J., Schweda, E. & Rossi, R. (2006) *Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie*. Hirzel, Stuttgart.
- Jefferies, W.A., Brandon, M.R., Hunt, S.V., Williams, A.F., Gatter, K.C. & Mason, D.Y. (1984) Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature*, **312**, 162-163.
- Jeong, S.Y. & David, S. (2003) Glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is required for iron efflux from cells in the central nervous system. *J Biol Chem*, **278**, 27144-27148.
- Jeong, S.Y. & David, S. (2006) Age-related changes in iron homeostasis and cell death in the cerebellum of ceruloplasmin-deficient mice. *J Neurosci*, **26**, 9810-9819.
- Jing, S.Q. & Trowbridge, I.S. (1987) Identification of the intermolecular disulfide bonds of the human transferrin receptor and its lipid-attachment site. *EMBO J*, **6**, 327-331.
- Johnson, M.A., Kuo, Y.M., Westaway, S.K., Parker, S.M., Ching, K.H., Gitschier, J. & Hayflick, S.J. (2004) Mitochondrial localization of human PANK2 and hypotheses of secondary iron accumulation in pantothenate kinase-associated neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*, **1012**, 282-298.
- Kaltenbach, J.P., Kaltenbach, M.H. & Lyons, W.B. (1958) Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. *Exp Cell Res*, **15**, 112-117.
- Kambe, T., Yamaguchi-Iwai, Y., Sasaki, R. & Nagao, M. (2004) Overview of mammalian zinc transporters. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 49-68.
- Kandel, E., Schwartz, J. & Jessell, T. (2000) *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill, New York.
- Kaneko, K., Nakamura, A., Yoshida, K., Kametani, F., Higuchi, K. & Ikeda, S. (2002a) Glial fibrillary acidic protein is greatly modified by oxidative stress in aceruloplasminemia brain. *Free Radic Res*, **36**, 303-306.
- Kaneko, K., Yoshida, K., Arima, K., Ohara, S., Miyajima, H., Kato, T., Ohta, M. & Ikeda, S.I. (2002b) Astrocytic deformity and globular structures are characteristic of the brains of patients with aceruloplasminemia. *J Neuropathol Exp Neurol*, **61**, 1069-1077.
- Kaplan, J., Jordan, I. & Sturrock, A. (1991) Regulation of the transferrin-independent iron transport system in cultured cells. *J Biol Chem*, **266**, 2997-3004.



- Kaplan, J. & O'Halloran, T.V. (1996) Iron metabolism in eukaryotes: Mars and Venus at it again. *Science*, **271**, 1510-1512.
- Katz, J.H. (1961) Iron and protein kinetics studied by means of doubly labeled human crystalline transferrin. *J Clin Invest*, **40**, 2143-2152.
- Ke, Y. & Theil, E.C. (2002) An mRNA loop/bulge in the ferritin iron-responsive element forms in vivo and was detected by radical probing with Cu-1,10-phenanthroline and iron regulatory protein footprinting. *J Biol Chem*, **277**, 2373-2376.
- Keel, S.B., Doty, R.T., Yang, Z., Quigley, J.G., Chen, J., Knoblauch, S., Kingsley, P.D., De Domenico, I., Vaughn, M.B., Kaplan, J., Palis, J. & Abkowitz, J.L. (2008) A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science*, **319**, 825-828.
- Keenan, B.M., Robinson, S.R. & Bishop, G.M. (2010) Effects of carboxylic acids on the uptake of non-transferrin-bound iron by astrocytes. *Neurochem Int*, **56**, 843-849.
- Kettenmann, H. & Ransom, B.R. (2005) *Neuroglia*. Oxford University Press, New York.
- Kirchhoff, F., Dringen, R. & Giaume, C. (2001) Pathways of neuron-astrocyte interactions and their possible role in neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, **251**, 159-169.
- Knutson, M. & Wessling-Resnick, M. (2003) Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **38**, 61-88.
- Knutson, M.D., Oukka, M., Koss, L.M., Aydemir, F. & Wessling-Resnick, M. (2005) Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 1324-1328.
- Koeppen, A.H. (1995) The history of iron in the brain. *J Neurol Sci*, **134 Suppl**, 1-9.
- Kohno, S., Miyajima, H., Takahashi, Y., Suzuki, H. & Hishida, A. (2000) Defective electron transfer in complexes I and IV in patients with aceruloplasminemia. *J Neurol Sci*, **182**, 57-60.
- Korten, T. (2004) *Untersuchung zum Eisenstoffwechsel in Astrogliazellen*. Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Tübingen.
- Korshunov, S.S., Skulachev, V.P. & Starkov, A.A. (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett*, **416**, 15-18.
- Kudin, A.P., Debska-Vielhaber, G. & Kunz, W.S. (2005) Characterization of superoxide production sites in isolated rat brain and skeletal muscle mitochondria. *Biomed Pharmacother*, **59**, 163-168.
- Kuffler, S.W. & Nicholls, J.G. (1966) The physiology of neuroglial cells. *Ergeb Physiol*, **57**, 1-90.

- Kumari, S., Mg, S. & Mayor, S. (2010) Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res*, **20**, 256-275.
- Kumfu, S., Chattipakorn, S., Srichairatanakool, S., Settakorn, J., Fucharoen, S. & Chattipakorn, N. (2011) T-type calcium channel as a portal of iron uptake into cardiomyocytes of beta-thalassemic mice. *Eur J Haematol*, **86**, 156-166.
- Kurosinski, P. & Gotz, J. (2002) Glial cells under physiologic and pathologic conditions. *Arch Neurol*, **59**, 1524-1528.
- Lane, D.J., Robinson, S.R., Czerwinska, H., Bishop, G.M. & Lawen, A. (2010) Two routes of iron accumulation in astrocytes: ascorbate-dependent ferrous iron uptake via the divalent metal transporter (DMT1) plus an independent route for ferric iron. *Biochem J*, **432**, 123-132.
- Lash, A. & Saleem, A. (1995) Iron metabolism and its regulation. A review. *Ann Clin Lab Sci*, **25**, 20-30.
- Latour, I., Hamid, J., Beedle, A.M., Zamponi, G.W. & Macvicar, B.A. (2003) Expression of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel subtypes in cultured astrocytes. *Glia*, **41**, 347-353.
- Latunde-Dada, G.O., Simpson, R.J. & McKie, A.T. (2006) Recent advances in mammalian haem transport. *Trends Biochem Sci*, **31**, 182-188.
- Lavoie, N., Peralta, M.R., 3rd, Chiasson, M., Lafortune, K., Pellegrini, L., Seress, L. & Toth, K. (2007) Extracellular chelation of zinc does not affect hippocampal excitability and seizure-induced cell death in rats. *J Physiol*, **578**, 275-289.
- Le, N.T. & Richardson, D.R. (2002) Ferroportin1: a new iron export molecule? *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 103-108.
- Leoni, V., Strittmatter, L., Zorzi, G., Zibordi, F., Dusi, S., Garavaglia, B., Venco, P., Caccia, C., Souza, A.L., Deik, A., Clish, C.B., Rimoldi, M., Ciusani, E., Bertini, E., Nardocci, N., Mootha, V.K. & Tiranti, V. (2011) Metabolic consequences of mitochondrial coenzyme A deficiency in patients with PANK2 mutations. *Mol Genet Metab*. In Press
- Lesbordes-Brion, J.C., Viatte, L., Bennoun, M., Lou, D.Q., Ramey, G., Houbron, C., Hamard, G., Kahn, A. & Vaulont, S. (2006) Targeted disruption of the hepcidin 1 gene results in severe hemochromatosis. *Blood*, **108**, 1402-1405.
- Leveugle, B., Faucheux, B.A., Bouras, C., Nillesse, N., Spik, G., Hirsch, E.C., Agid, Y. & Hof, P.R. (1996) Cellular distribution of the iron-binding protein lactotransferrin in the mesencephalon of Parkinson's disease cases. *Acta Neuropathol*, **91**, 566-572.
- Li, J.Y., Paragas, N., Ned, R.M., Qiu, A., Viltard, M., Leete, T., Drexler, I.R., Chen, X., Sanna-Cherchi, S., Mohammed, F., Williams, D., Lin, C.S., Schmidt-Ott, K.M., Andrews, N.C. & Barasch, J. (2009) Scara5 is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery. *Dev Cell*, **16**, 35-46.

- Li, L., Fang, C.J., Ryan, J.C., Niemi, E.C., Lebron, J.A., Bjorkman, P.J., Arase, H., Torti, F.M., Torti, S.V., Nakamura, M.C. & Seaman, W.E. (2010) Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 3505-3510.
- Lim, B.C. & Morgan, E.H. (1984) Transferrin endocytosis and the mechanism of iron uptake by reticulocytes in the toad (*Bufo marinus*). *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, **79**, 317-323.
- Lipschitz, D.A., Cook, J.D. & Finch, C.A. (1974) A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores. *N Engl J Med*, **290**, 1213-1216.
- Lipscombe, D., Helton, T.D. & Xu, W. (2004) L-type calcium channels: the low down. *J Neurophysiol*, **92**, 2633-2641.
- Liuzzi, J.P., Aydemir, F., Nam, H., Knutson, M.D. & Cousins, R.J. (2006) Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 13612-13617.
- Lovell, M.A., Robertson, J.D., Teesdale, W.J., Campbell, J.L. & Markesbery, W.R. (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci*, **158**, 47-52.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-275.
- Lozoff, B. (2000) Perinatal iron deficiency and the developing brain. *Pediatr Res*, **48**, 137-139.
- Luther, E.M., Koehler, Y., Diendorf, J., Epple, M. & Dringen, R. (2011) Accumulation of silver nanoparticles by cultured primary brain astrocytes. *Nanotechnology*, **22**, 375101.
- Magistretti, P.J. (2009) Role of glutamate in neuron-glia metabolic coupling. *Am J Clin Nutr*, **90**, 875S-880S.
- Magistretti, P.J. (2011) Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *Exp Physiol*, **96**, 407-410.
- Mahmood ur, R., Ali, I., Husnain, T. & Riazuddin, S. (2008) RNA interference: the story of gene silencing in plants and humans. *Biotechnol Adv*, **26**, 202-209.
- Markiewicz, I. & Lukomska, B. (2006) The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, **66**, 343-358.
- Markovich, D. & Murer, H. (2004) The SLC13 gene family of sodium sulphate/carboxylate cotransporters. *Pflugers Arch*, **447**, 594-602.
- Martell, A.E. & Motekaitis, R.J. (1992) *The determination and use of stability constants*.
- Martini, L.A., Tchack, L. & Wood, R.J. (2002) Iron treatment downregulates DMT1 and IREG1 mRNA expression in Caco-2 cells. *J Nutr*, **132**, 693-696.

- Matzapetakis, M., Raptopoulou, C.P., Tsohos, A., Papaefthymiou, V., Moon, N. & Salifoglou, A. (1998) Synthesis, Spectroscopic and Structural Characterization of the First Mononuclear, Water Soluble Iron–Citrate Complex,  $(\text{NH}_4)_5\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . *J Am Chem Soc*, **120**, 13266-13267.
- McClelland, A., Kuhn, L.C. & Ruddle, F.H. (1984) The human transferrin receptor gene: genomic organization, and the complete primary structure of the receptor deduced from a cDNA sequence. *Cell*, **39**, 267-274.
- McCleskey, E.W. (1994) Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms. *Curr Opin Neurobiol*, **4**, 304-312.
- McKie, A.T. & Barlow, D.J. (2004) The SLC40 basolateral iron transporter family (IREG1/ferroportin/MTP1). *Pflugers Arch*, **447**, 801-806.
- McKie, A.T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T.J., Farzaneh, F., Hediger, M.A., Hentze, M.W. & Simpson, R.J. (2000) A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell*, **5**, 299-309.
- Mena, N.P., Esparza, A.L. & Nunez, M.T. (2006) Regulation of transepithelial transport of iron by hepcidin. *Biol Res*, **39**, 191-193.
- Mercer, J., Schelhaas, M. & Helenius, A. (2010) Virus entry by endocytosis. *Annu Rev Biochem*, **79**, 803-833.
- Mills, E., Dong, X.P., Wang, F. & Xu, H. (2010) Mechanisms of brain iron transport: insight into neurodegeneration and CNS disorders. *Future Med Chem*, **2**, 51-64.
- Miyajima, H., Nishimura, Y., Mizoguchi, K., Sakamoto, M., Shimizu, T. & Honda, N. (1987) Familial apoceruloplasmin deficiency associated with blepharospasm and retinal degeneration. *Neurology*, **37**, 761-767.
- Miyajima, H., Takahashi, Y., Serizawa, M., Kaneko, E. & Gitlin, J.D. (1996) Increased plasma lipid peroxidation in patients with aceruloplasminemia. *Free Radic Biol Med*, **20**, 757-760.
- Mizutani, A., Sanuki, R., Kakimoto, K., Kojo, S. & Taketani, S. (2007) Involvement of 101F6, a homologue of cytochrome b561, in the reduction of ferric ions. *J Biochem*, **142**, 699-705.
- Moellering, H. & Gruber, W. (1966) Determination of citrate with citrate lyase. *Anal Biochem*, **17**, 369-376.
- Montana, V., Malarkey, E.B., Verderio, C., Matteoli, M. & Parpura, V. (2006) Vesicular transmitter release from astrocytes. *Glia*, **54**, 700-715.
- Moos, T. (1996) Immunohistochemical localization of intraneuronal transferrin receptor immunoreactivity in the adult mouse central nervous system. *J Comp Neurol*, **375**, 675-692.

- Moos, T. & Morgan, E.H. (1998) Evidence for low molecular weight, non-transferrin-bound iron in rat brain and cerebrospinal fluid. *J Neurosci Res*, **54**, 486-494.
- Moos, T. & Morgan, E.H. (2004) The metabolism of neuronal iron and its pathogenic role in neurological disease: review. *Ann N Y Acad Sci*, **1012**, 14-26.
- Moos, T., Oates, P.S. & Morgan, E.H. (1999) Iron-independent neuronal expression of transferrin receptor mRNA in the rat. *Brain Res Mol Brain Res*, **72**, 231-234.
- Moos, T., Trinder, D. & Morgan, E.H. (2000) Cellular distribution of ferric iron, ferritin, transferrin and divalent metal transporter 1 (DMT1) in substantia nigra and basal ganglia of normal and beta2-microglobulin deficient mouse brain. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **46**, 549-561.
- Moos, T., Rosengren Nielsen, T., Skjorringe, T. & Morgan, E.H. (2007) Iron trafficking inside the brain. *J Neurochem*, **103**, 1730-1740.
- Morath, D.J. & Mayer-Proschel, M. (2001) Iron modulates the differentiation of a distinct population of glial precursor cells into oligodendrocytes. *Dev Biol*, **237**, 232-243.
- Morita, H., Ikeda, S., Yamamoto, K., Morita, S., Yoshida, K., Nomoto, S., Kato, M. & Yanagisawa, N. (1995) Hereditary ceruloplasmin deficiency with hemosiderosis: a clinicopathological study of a Japanese family. *Ann Neurol*, **37**, 646-656.
- Moroo, I., Ujiie, M., Walker, B.L., Tiong, J.W., Vitalis, T.Z., Karkan, D., Gabathuler, R., Moise, A.R. & Jefferies, W.A. (2003) Identification of a novel route of iron transcytosis across the mammalian blood-brain barrier. *Microcirculation*, **10**, 457-462.
- Morris, C.M., Candy, J.M., Keith, A.B., Oakley, A.E., Taylor, G.A., Pullen, R.G., Bloxham, C.A., Gocht, A. & Edwardson, J.A. (1992) Brain iron homeostasis. *J Inorg Biochem*, **47**, 257-265.
- Muckenthaler, M.U., Rodrigues, P., Macedo, M.G., Minana, B., Brennan, K., Cardoso, E.M., Hentze, M.W. & de Sousa, M. (2004) Molecular analysis of iron overload in beta2-microglobulin-deficient mice. *Blood Cells Mol Dis*, **33**, 125-131.
- Müller-Esterl, W. (2011) *Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Mullner, E.W., Rothenberger, S., Muller, A.M. & Kuhn, L.C. (1992) In vivo and in vitro modulation of the mRNA-binding activity of iron-regulatory factor. Tissue distribution and effects of cell proliferation, iron levels and redox state. *Eur J Biochem*, **208**, 597-605.
- Munk, K. (2000) *Grundstudium Biologie: Biochemie, Zellbiologie, Ökologie, Evolution*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Murphy, V.A. & Rapoport, S.I. (1992) Brain transfer coefficients for <sup>67</sup>Ga: comparison to <sup>55</sup>Fe and effect of calcium deficiency. *J Neurochem*, **58**, 898-902.

- Musilkova, J. & Kovar, J. (2001) Additive stimulatory effect of extracellular calcium and potassium on non-transferrin ferric iron uptake by HeLa and K562 cells. *Biochim Biophys Acta*, **1514**, 117-126.
- Musilkova, J., Kriegerbeckova, K., Krusek, J. & Kovar, J. (1998) Specific binding to plasma membrane is the first step in the uptake of non-transferrin iron by cultured cells. *Biochim Biophys Acta*, **1369**, 103-108.
- Mwanjewe, J. & Grover, A.K. (2004) Role of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) in non-transferrin-bound iron uptake in neuronal phenotype PC12 cells. *Biochem J*, **378**, 975-982.
- Mwanjewe, J., Martinez, R., Agrawal, P., Samson, S.E., Coughlin, M.D., Brassard, P. & Grover, A.K. (2000) On the Ca<sup>2+</sup> dependence of non-transferrin-bound iron uptake in PC12 cells. *J Biol Chem*, **275**, 33512-33515.
- Mycielska, M.E., Patel, A., Rizaner, N., Mazurek, M.P., Keun, H., Ganapathy, V. & Djamgoz, M.B. (2009) Citrate transport and metabolism in mammalian cells: prostate epithelial cells and prostate cancer. *Bioessays*, **31**, 10-20.
- Nedergaard, M., Ransom, B. & Goldman, S.A. (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci*, **26**, 523-530.
- Nemeth, E., Tuttle, M.S., Powelson, J., Vaughn, M.B., Donovan, A., Ward, D.M., Ganz, T. & Kaplan, J. (2004) Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, **306**, 2090-2093.
- Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, I., Beaumont, C., Grandchamp, B., Kahn, A. & Vaulont, S. (2001) Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 8780-8785.
- Nicolas, G., Bennoun, M., Porteu, A., Mativet, S., Beaumont, C., Grandchamp, B., Sirtito, M., Sawadogo, M., Kahn, A. & Vaulont, S. (2002a) Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 4596-4601.
- Nicolas, G., Viatte, L., Bennoun, M., Beaumont, C., Kahn, A. & Vaulont, S. (2002b) Hepcidin, a new iron regulatory peptide. *Blood Cells Mol Dis*, **29**, 327-335.
- Ohgami, R.S., Campagna, D.R., Greer, E.L., Antiochos, B., McDonald, A., Chen, J., Sharp, J.J., Fujiwara, Y., Barker, J.E. & Fleming, M.D. (2005) Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet*, **37**, 1264-1269.
- Okamoto, N., Wada, S., Oga, T., Kawabata, Y., Baba, Y., Habu, D., Takeda, Z. & Wada, Y. (1996) Hereditary ceruloplasmin deficiency with hemosiderosis. *Hum Genet*, **97**, 755-758.
- Orellana, J.A., Palacios-Prado, N. & Saez, J.C. (2006) Chlorpromazine reduces the intercellular communication via gap junctions in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, **213**, 187-197.

- Osaki, S., Johnson, D.A. & Frieden, E. (1966) The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum. *J Biol Chem*, **241**, 2746-2751.
- Oshiro, S., Nozawa, K., Cai, Y., Hori, M. & Kitajima, S. (1998) Characterization of a transferrin-independent iron uptake system in rat primary cultured cortical cells. *J Med Dent Sci*, **45**, 171-176.
- Oshiro, S., Kawahara, M., Kuroda, Y., Zhang, C., Cai, Y., Kitajima, S. & Shirao, M. (2000) Glial cells contribute more to iron and aluminum accumulation but are more resistant to oxidative stress than neuronal cells. *Biochim Biophys Acta*, **1502**, 405-414.
- Oudit, G.Y., Trivieri, M.G., Khaper, N., Husain, T., Wilson, G.J., Liu, P., Sole, M.J. & Backx, P.H. (2004) Taurine supplementation reduces oxidative stress and improves cardiovascular function in an iron-overload murine model. *Circulation*, **109**, 1877-1885.
- Oudit, G.Y., Trivieri, M.G., Khaper, N., Liu, P.P. & Backx, P.H. (2006) Role of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in iron transport and iron-overload cardiomyopathy. *J Mol Med*, **84**, 349-364.
- Pantopoulos, K. (2004) Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann NY Acad Sci*, **1012**, 1-13.
- Papadopoulos, M.C., Koumenis, I.L., Yuan, T.Y. & Giffard, R.G. (1998) Increasing vulnerability of astrocytes to oxidative injury with age despite constant antioxidant defenses. *Neuroscience*, **82**, 915-925.
- Park, C.H., Valore, E.V., Waring, A.J. & Ganz, T. (2001) Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*, **276**, 7806-7810.
- Park, J., Choi, K., Jeong, E., Kwon, D., Benveniste, E.N. & Choi, C. (2004) Reactive oxygen species mediate chloroquine-induced expression of chemokines by human astroglial cells. *Glia*, **47**, 9-20.
- Parkes, J.G., Randell, E.W., Olivieri, N.F. & Templeton, D.M. (1995) Modulation by iron loading and chelation of the uptake of non-transferrin-bound iron by human liver cells. *Biochim Biophys Acta*, **1243**, 373-380.
- Parmley, R.T., Barton, J.C. & Conrad, M.E. (1985) Ultrastructural localization of transferrin, transferrin receptor, and iron-binding sites on human placental and duodenal microvilli. *Br J Haematol*, **60**, 81-89.
- Patel, B.N. & David, S. (1997) A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes. *J Biol Chem*, **272**, 20185-20190.
- Pellerin, L., Bouzier-Sore, A.K., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R. & Magistretti, P.J. (2007) Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia*, **55**, 1251-1262.

- Perry, T.L., Norman, M.G., Yong, V.W., Whiting, S., Crichton, J.U., Hansen, S. & Kish, S.J. (1985) Hallervorden-Spatz disease: cysteine accumulation and cysteine dioxygenase deficiency in the globus pallidus. *Ann Neurol*, **18**, 482-489.
- Petrat, F., de Groot, H. & Rauen, U. (2000) Determination of the chelatable iron pool of single intact cells by laser scanning microscopy. *Arch Biochem Biophys*, **376**, 74-81.
- Pfrieger, F.W. (2010) Role of glial cells in the formation and maintenance of synapses. *Brain Res Rev*, **63**, 39-46.
- Pfrieger, F.W. & Barres, B.A. (1996) New views on synapse-glia interactions. *Curr Opin Neurobiol*, **6**, 615-621.
- Pickard, M.R., Jenkins, S.I., Koller, C.J., Furness, D.N. & Chari, D.M. (2010) Magnetic Nanoparticle Labeling of Astrocytes Derived for Neural Transplantation. *Tissue Eng Part C Methods*.
- Pietrangolo, A., Rocchi, E., Casalgrandi, G., Rigo, G., Ferrari, A., Perini, M., Ventura, E. & Cairo, G. (1992) Regulation of transferrin, transferrin receptor, and ferritin genes in human duodenum. *Gastroenterology*, **102**, 802-809.
- Pinilla-Tenas, J.J., Sparkman, B.K., Shawki, A., Illing, A.C., Mitchell, C.J., Zhao, N., Liuzzi, J.P., Cousins, R.J., Knutson, M.D. & Mackenzie, B. (2011) Zip14 is a complex broad-scope metal-ion transporter whose functional properties support roles in the cellular uptake of zinc and nontransferrin-bound iron. *Am J Physiol Cell Physiol*, **301**, C862-871.
- Ponka, P. (2004) Hereditary causes of disturbed iron homeostasis in the central nervous system. *Ann NY Acad Sci*, **1012**, 267-281.
- Qian, Z.M., To, Y., Tang, P.L. & Feng, Y.M. (1999) Transferrin receptors on the plasma membrane of cultured rat astrocytes. *Exp Brain Res*, **129**, 473-476.
- Qian, Z.M., Liao, Q.K., To, Y., Ke, Y., Tsoi, Y.K., Wang, G.F. & Ho, K.P. (2000) Transferrin-bound and transferrin free iron uptake by cultured rat astrocytes. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **46**, 541-548.
- Qiu, A., Jansen, M., Sakaris, A., Min, S.H., Chattopadhyay, S., Tsai, E., Sandoval, C., Zhao, R., Akabas, M.H. & Goldman, I.D. (2006) Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell*, **127**, 917-928.
- Quigley, J.G., Yang, Z., Worthington, M.T., Phillips, J.D., Sabo, K.M., Sabath, D.E., Berg, C.L., Sassa, S., Wood, B.L. & Abkowitz, J.L. (2004) Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. *Cell*, **118**, 757-766.
- Randell, E.W., Parkes, J.G., Olivieri, N.F. & Templeton, D.M. (1994) Uptake of non-transferrin-bound iron by both reductive and nonreductive processes is modulated by intracellular iron. *J Biol Chem*, **269**, 16046-16053.



- Ransom, B.R. & Ye, Z.-C. (2005) Gap junctions and hemichannels. In Kettenmann, H., Ransom, B.R. *Neuroglia*. Oxford University Press, New York, 177-189.
- Rao, R. & Georgieff, M.K. (2002) Perinatal aspects of iron metabolism. *Acta Paediatr Suppl*, **91**, 124-129.
- Raub, T.J. & Newton, C.R. (1991) Recycling kinetics and transcytosis of transferrin in primary cultures of bovine brain microvessel endothelial cells. *J Cell Physiol*, **149**, 141-151.
- Reddy, A., Caler, E.V. & Andrews, N.W. (2001) Plasma membrane repair is mediated by Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell*, **106**, 157-169.
- Regan, R.F., Kumar, N., Gao, F. & Guo, Y. (2002) Ferritin induction protects cortical astrocytes from heme-mediated oxidative injury. *Neuroscience*, **113**, 985-994.
- Reinhart, P.H., Pfeiffer, B., Spengler, S. & Hamprecht, B. (1990) Purification of glycogen phosphorylase from bovine brain and immunocytochemical examination of rat glial primary cultures using monoclonal antibodies raised against this enzyme. *J Neurochem*, **54**, 1474-1483.
- Richardson, D.R. (2000) The role of the membrane-bound tumour antigen, melanotransferrin (p97), in iron uptake by the human malignant melanoma cell. *Eur J Biochem*, **267**, 1290-1298.
- Richter, G.W. (1978) The iron-loaded cell--the cytopathology of iron storage. A review. *Am J Pathol*, **91**, 362-404.
- Riedel, H.D., Remus, A.J., Fitscher, B.A. & Stremmel, W. (1995) Characterization and partial purification of a ferrireductase from human duodenal microvillus membranes. *Biochem J*, **309** ( Pt 3), 745-748.
- Riemer, J., Hoepken, H.H., Czerwinska, H., Robinson, S.R. & Dringen, R. (2004) Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Anal Biochem*, **331**, 370-375.
- Rothenberger, S., Food, M.R., Gabathuler, R., Kennard, M.L., Yamada, T., Yasuhara, O., McGeer, P.L. & Jefferies, W.A. (1996) Coincident expression and distribution of melanotransferrin and transferrin receptor in human brain capillary endothelium. *Brain Res*, **712**, 117-121.
- Rouault, T.A. & Tong, W.H. (2005) Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 345-351.
- Rouault, T.A. & Cooperman, S. (2006) Brain iron metabolism. *Semin Pediatr Neurol*, **13**, 142-148.
- Rubin, L.L. & Staddon, J.M. (1999) The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci*, **22**, 11-28.

- Samaniego, F., Chin, J., Iwai, K., Rouault, T.A. & Klausner, R.D. (1994) Molecular characterization of a second iron-responsive element binding protein, iron regulatory protein 2. Structure, function, and post-translational regulation. *J Biol Chem*, **269**, 30904-30910.
- Sauvageot, C.M. & Stiles, C.D. (2002) Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr Opin Neurobiol*, **12**, 244-249.
- Scheiber, I.F., Schmidt, M.M. & Dringen, R. (2011) Copper export from cultured astrocytes. *Neurochem Int*, **60**, 292-300.
- Scheiber, I.F., Mercer, J.F. & Dringen, R. (2010) Copper accumulation by cultured astrocytes. *Neurochem Int*, **56**, 451-460.
- Schenck, J.F. & Zimmerman, E.A. (2004) High-field magnetic resonance imaging of brain iron: birth of a biomarker? *NMR Biomed*, **17**, 433-445.
- Schneider, C., Owen, M.J., Banville, D. & Williams, J.G. (1984) Primary structure of human transferrin receptor deduced from the mRNA sequence. *Nature*, **311**, 675-678.
- Schröder, I., Johnson, E. & de Vries, S. (2003) Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiol Rev*, **27**, 427-447.
- Sekyere, E.O., Dunn, L.L., Rahmanto, Y.S. & Richardson, D.R. (2006) Role of melanotransferrin in iron metabolism: studies using targeted gene disruption in vivo. *Blood*, **107**, 2599-2601.
- Shayeghi, M., Latunde-Dada, G.O., Oakhill, J.S., Laftah, A.H., Takeuchi, K., Halliday, N., Khan, Y., Warley, A., McCann, F.E., Hider, R.C., Frazer, D.M., Anderson, G.J., Vulpe, C.D., Simpson, R.J. & McKie, A.T. (2005) Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*, **122**, 789-801.
- Shoden, A., Gabrio, B.W. & Finch, C.A. (1953) The relationship between ferritin and hemosiderin in rabbits and man. *J Biol Chem*, **204**, 823-830.
- Sibille, J.C., Kondo, H. & Aisen, P. (1988) Interactions between isolated hepatocytes and Kupffer cells in iron metabolism: a possible role for ferritin as an iron carrier protein. *Hepatology*, **8**, 296-301.
- Simard, M., Arcuino, G., Takano, T., Liu, Q.S. & Nedergaard, M. (2003) Signaling at the gliovascular interface. *J Neurosci*, **23**, 9254-9262.
- Simovich, M., Hainsworth, L.N., Fields, P.A., Umbreit, J.N. & Conrad, M.E. (2003) Localization of the iron transport proteins Mobilferrin and DMT-1 in the duodenum: the surprising role of mucin. *Am J Hematol*, **74**, 32-45.
- Simpson, R.J., Mohamad-Ghaffer, A. & Khan, R. (1998) Glutathione and duodenal reduction and absorption of iron. *Biochem Soc Trans*, **26**, S352.

- Slemmer, J.E., Shacka, J.J., Sweeney, M.I. & Weber, J.T. (2008) Antioxidants and free radical scavengers for the treatment of stroke, traumatic brain injury and aging. *Curr Med Chem*, **15**, 404-414.
- Somjen, G.G. (1988) Nervenkit: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia*, **1**, 2-9.
- Sonnewald, U., Westergaard, N., Krane, J., Unsgard, G., Petersen, S.B. & Schousboe, A. (1991) First direct demonstration of preferential release of citrate from astrocytes using [<sup>13</sup>C]NMR spectroscopy of cultured neurons and astrocytes. *Neurosci Lett*, **128**, 235-239.
- Spiro, T.G., Pape, L. & Saltman, P. (1967) Hydrolytic polymerization of ferric citrate. I. Chemistry of the polymer. *J Am Chem Soc*, **89**, 5555-5559.
- Sturrock, A., Alexander, J., Lamb, J., Craven, C.M. & Kaplan, J. (1990) Characterization of a transferrin-independent uptake system for iron in HeLa cells. *J Biol Chem*, **265**, 3139-3145.
- Su, M.A., Trenor, C.C., Fleming, J.C., Fleming, M.D. & Andrews, N.C. (1998) The G185R mutation disrupts function of the iron transporter Nramp2. *Blood*, **92**, 2157-2163.
- Sun, Y.E., Martinowich, K. & Ge, W. (2003) Making and repairing the mammalian brain--signaling toward neurogenesis and gliogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, **14**, 161-168.
- Swaiman, K.F. & Machen, V.L. (1985) Iron uptake by glial cells. *Neurochem Res*, **10**, 1635-1644.
- Swaiman, K.F. & Machen, V.L. (1986) Transferrin binding by mammalian cortical cells. *Neurochem Res*, **11**, 1241-1248.
- Tabor, C.W., Tabor, H. & Hafner, E.H. (1983) Mass screening for mutants in the biosynthetic pathway for polyamines in *Escherichia coli*: a general method for mutants in enzymatic reactions producing CO<sub>2</sub>. *Methods Enzymol*, **94**, 83-91.
- Takeda, A., Devenyi, A. & Connor, J.R. (1998) Evidence for non-transferrin-mediated uptake and release of iron and manganese in glial cell cultures from hypotransferrinemic mice. *J Neurosci Res*, **51**, 454-462.
- Thomas, F., Serratrice, G., Beguin, C., Aman, E.S., Pierre, J.L., Fontecave, M. & Laulhere, J.P. (1999) Calcein as a fluorescent probe for ferric iron. Application to iron nutrition in plant cells. *J Biol Chem*, **274**, 13375-13383.
- Thomsen, P., Roepstorff, K., Stahlhut, M. & van Deurs, B. (2002) Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol Biol Cell*, **13**, 238-250.
- Thorburne, S.K. & Juurlink, B.H. (1996) Low glutathione and high iron govern the susceptibility of oligodendroglial precursors to oxidative stress. *J Neurochem*, **67**, 1014-1022.

- Tiffany-Castiglioni, E. & Qian, Y. (2001) Astroglia as metal depots: molecular mechanisms for metal accumulation, storage and release. *Neurotoxicology*, **22**, 577-592.
- Todorich, B., Pasquini, J.M., Garcia, C.I., Paez, P.M. & Connor, J.R. (2009) Oligodendrocytes and myelination: the role of iron. *Glia*, **57**, 467-478.
- Torgersen, M.L., Skretting, G., van Deurs, B. & Sandvig, K. (2001) Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. *J Cell Sci*, **114**, 3737-3747.
- Torti, F.M. & Torti, S.V. (2002) Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*, **99**, 3505-3516.
- Treffry, A., Zhao, Z., Quail, M.A., Guest, J.R. & Harrison, P.M. (1995) Iron(II) oxidation by H chain ferritin: evidence from site-directed mutagenesis that a transient blue species is formed at the dinuclear iron center. *Biochemistry*, **34**, 15204-15213.
- Trinder, D. & Morgan, E. (1998) Mechanisms of ferric citrate uptake by human hepatoma cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **275**, G279-G286.
- Tsien, R.W., Hess, P., McCleskey, E.W. & Rosenberg, R.L. (1987) Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation, and block. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, **16**, 265-290.
- Tsien, R.W., Lipscombe, D., Madison, D.V., Bley, K.R. & Fox, A.P. (1988) Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci*, **11**, 431-438.
- Tsunoo, H. & Sussman, H.H. (1983) Characterization of transferrin binding and specificity of the placental transferrin receptor. *Arch Biochem Biophys*, **225**, 42-54.
- Tsushima, R.G., Wickenden, A.D., Bouchard, R.A., Oudit, G.Y., Liu, P.P. & Backx, P.H. (1999) Modulation of iron uptake in heart by L-type Ca<sup>2+</sup> channel modifiers: possible implications in iron overload. *Circ Res*, **84**, 1302-1309.
- Tulpule, K., Robinson, S.R., Bishop, G.M. & Dringen, R. (2010) Uptake of ferrous iron by cultured rat astrocytes. *J Neurosci Res*, **88**, 563-571.
- Ueda, F., Raja, K.B., Simpson, R.J., Trowbridge, I.S. & Bradbury, M.W. (1993) Rate of <sup>59</sup>Fe uptake into brain and cerebrospinal fluid and the influence thereon of antibodies against the transferrin receptor. *J Neurochem*, **60**, 106-113.
- van Campen, D. (1972) Effect of histidine and ascorbic acid on the absorption and retention of <sup>59</sup>Fe by iron-depleted rats. *J Nutr*, **102**, 165-170.
- Vargas, J.D., Herpers, B., McKie, A.T., Gledhill, S., McDonnell, J., van den Heuvel, M., Davies, K.E. & Ponting, C.P. (2003) Stromal cell-derived receptor 2 and cytochrome b561 are functional ferric reductases. *Biochim Biophys Acta*, **1651**, 116-123.
- Vassault, A. (1983) Lactate dehydrogenase: UV method with pyruvate and NADH. In Bergmeyer, H.V., Bergmeyer, J., Grabl, M. *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim FRG Verlag Chemie, Weinheim, 118-126.

- Vassort, G., Talavera, K. & Alvarez, J.L. (2006) Role of T-type Ca<sup>2+</sup> channels in the heart. *Cell Calcium*, **40**, 205-220.
- Viatte, L., Lesbordes-Brion, J.C., Lou, D.Q., Bennoun, M., Nicolas, G., Kahn, A., Canonne-Hergaux, F. & Vaulont, S. (2005) Deregulation of proteins involved in iron metabolism in hepcidin-deficient mice. *Blood*, **105**, 4861-4864.
- Visser, C.C., Voorwinden, L.H., Crommelin, D.J., Danhof, M. & de Boer, A.G. (2004) Characterization and modulation of the transferrin receptor on brain capillary endothelial cells. *Pharm Res*, **21**, 761-769.
- Vulpe, C.D., Kuo, Y.M., Murphy, T.L., Cowley, L., Askwith, C., Libina, N., Gitschier, J. & Anderson, G.J. (1999) Hephastin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet*, **21**, 195-199.
- Vyoral, D. & Petrak, J. (1998) Iron transport in K562 cells: a kinetic study using native gel electrophoresis and <sup>59</sup>Fe autoradiography. *Biochim Biophys Acta*, **1403**, 179-188.
- Wallace, D.F., Summerville, L., Lusby, P.E. & Subramaniam, V.N. (2005) First phenotypic description of transferrin receptor 2 knockout mouse, and the role of hepcidin. *Gut*, **54**, 980-986.
- Walz, W. (2000) Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int*, **36**, 291-300.
- Wang, L.H., Rothberg, K.G. & Anderson, R.G. (1993) Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol*, **123**, 1107-1117.
- Wang, X.S., Ong, W.Y. & Connor, J.R. (2001) A light and electron microscopic study of the iron transporter protein DMT-1 in the monkey cerebral neocortex and hippocampus. *J Neurocytol*, **30**, 353-360.
- Ward, P.P., Mendoza-Meneses, M., Cunningham, G.A. & Conneely, O.M. (2003) Iron status in mice carrying a targeted disruption of lactoferrin. *Mol Cell Biol*, **23**, 178-185.
- Westergaard, N., Sonnewald, U., Unsgard, G., Peng, L., Hertz, L. & Schousboe, A. (1994) Uptake, release, and metabolism of citrate in neurons and astrocytes in primary cultures. *J Neurochem*, **62**, 1727-1733.
- Winegar, B.D., Kelly, R. & Lansman, J.B. (1991) Block of current through single calcium channels by Fe, Co, and Ni. Location of the transition metal binding site in the pore. *J Gen Physiol*, **97**, 351-367.
- Wolburg, H., Neuhaus, J., Kniesel, U., Krauss, B., Schmid, E.M., Ocalan, M., Farrell, C. & Risau, W. (1994) Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci*, **107** ( Pt 5), 1347-1357.
- Wright, T.L., Brissot, P., Ma, W.L. & Weisiger, R.A. (1986) Characterization of non-transferrin-bound iron clearance by rat liver. *J Biol Chem*, **261**, 10909-10914.

- Wu, L.J., Leenders, A.G., Cooperman, S., Meyron-Holtz, E., Smith, S., Land, W., Tsai, R.Y., Berger, U.V., Sheng, Z.H. & Rouault, T.A. (2004) Expression of the iron transporter ferroportin in synaptic vesicles and the blood-brain barrier. *Brain Res*, **1001**, 108-117.
- Xu, L., Koumenis, I.L., Tilly, J.L. & Giffard, R.G. (1999) Overexpression of bcl-xL protects astrocytes from glucose deprivation and is associated with higher glutathione, ferritin, and iron levels. *Anesthesiology*, **91**, 1036-1046.
- Yamada, T., Tsujioka, Y., Taguchi, J., Takahashi, M., Tsuboi, Y., Moroo, I., Yang, J. & Jefferies, W.A. (1999) Melanotransferrin is produced by senile plaque-associated reactive microglia in Alzheimer's disease. *Brain Res*, **845**, 1-5.
- Yodoya, E., Wada, M., Shimada, A., Katsukawa, H., Okada, N., Yamamoto, A., Ganapathy, V. & Fujita, T. (2006) Functional and molecular identification of sodium-coupled dicarboxylate transporters in rat primary cultured cerebrocortical astrocytes and neurons. *J Neurochem*, **97**, 162-173.
- Yoon, S.J., Koh, Y.H., Floyd, R.A. & Park, J.W. (2000) Copper, zinc superoxide dismutase enhances DNA damage and mutagenicity induced by cysteine/iron. *Mutat Res*, **448**, 97-104.
- Yoshida, K., Furihata, K., Takeda, S., Nakamura, A., Yamamoto, K., Morita, H., Hiyamuta, S., Ikeda, S., Shimizu, N. & Yanagisawa, N. (1995) A mutation in the ceruloplasmin gene is associated with systemic hemosiderosis in humans. *Nat Genet*, **9**, 267-272.
- Yoshida, K., Kaneko, K., Miyajima, H., Tokuda, T., Nakamura, A., Kato, M. & Ikeda, S. (2000) Increased lipid peroxidation in the brains of aceruloplasminemia patients. *J Neurol Sci*, **175**, 91-95.
- Youdim, M.B., Ben-Shachar, D., Yehuda, S. & Riederer, P. (1990) The role of iron in the basal ganglion. *Adv Neurol*, **53**, 155-162.
- Yue, W.W., Grizot, S. & Buchanan, S.K. (2003) Structural evidence for iron-free citrate and ferric citrate binding to the TonB-dependent outer membrane transporter FecA. *J Mol Biol*, **332**, 353-368.
- Zecca, L., Youdim, M.B., Riederer, P., Connor, J.R. & Crichton, R.R. (2004) Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*, **5**, 863-873.
- Zhao, H. & Eide, D. (1996a) The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 2454-2458.
- Zhao, H. & Eide, D. (1996b) The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **271**, 23203-23210.
- Zhou, B., Westaway, S.K., Levinson, B., Johnson, M.A., Gitschier, J. & Hayflick, S.J. (2001) A novel pantothenate kinase gene (PANK2) is defective in Hallervorden-Spatz syndrome. *Nat Genet*, **28**, 345-349.

Zlokovic, B.V. (2008) The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, **57**, 178-201.