

# MASTERARBEIT

„Adaption des Eisenstoffwechsels nach Behandlung mit  
Erythropoietin und/oder nach chemisch induzierter Hypoxie  
in humanen Neuroblastomzellen und humanen  
Hepatokarzinomzellen“

verfasst von

Nina Prieß, Bakk.rer.nat.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt: Ernährungswissenschaften

Betreut von: Univ.-Prof. Dr. Hans Goldenberg



## **Danksagung**

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Masterarbeit durch ihre Unterstützung beigetragen haben.

Ein spezieller Dank gilt Univ.-Prof. Dr. Hans Goldenberg für die Ermöglichung meiner Masterarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich besonders bei meiner Betreuerin Univ.-Prof. Dr. Barbara Scheiber-Mojdehkar für die wertvolle und hilfreiche Unterstützung, die Beantwortung zahlreicher wissenschaftlicher Fragen und den wegweisenden konstruktiven Vorschlägen, die zur Verbesserung meiner Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Zudem bedanke ich mich bei Mag. Monika Prashberger für die immerwährende Hilfsbereitschaft, die nützlichen wissenschaftlichen Ratschläge und darüber hinaus die vielen motivierenden Worte.

Ebenfalls ein herzliches Dankeschön an alle, die zur angenehmen Arbeitsatmosphäre im Labor beigetragen haben.

Meinem Freund Jochen danke ich, dass er immer für mich da ist und mir auch bei dieser Arbeit stets motivierend zur Seite stand.

Schließlich möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern bedanken, die mich immer in allen Bereichen des Lebens unterstützen und die maßgeblich am Erfolg meines gesamten Studiums beteiligt waren.

Vielen Dank!



**Inhaltsverzeichnis**

<b>1 Einleitung und Fragestellung .....</b>	<b>17</b>
<b>2 Literaturübersicht .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Neurodegenerative Erkrankungen.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Einfluss von Eisen auf neurodegenerative Erkrankungen .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3 Zytotoxizität von Eisen.....</b>	<b>21</b>
2.3.1 Fenton/Haber-Weiss-Reaktion .....	21
2.3.2 Zytotoxizität durch Eisenüberschuss .....	22
2.3.3 Zytotoxizität durch Eisendefizit .....	22
2.3.4 Zytotoxizität durch Hypoxie.....	22
<b>2.4 Physiologie und Biochemie von Eisen .....</b>	<b>23</b>
<b>2.5 Systemische Regulation des Eisenstoffwechsels .....</b>	<b>23</b>
2.5.1 Resorption.....	24
2.5.2 Hepcidin .....	24
2.5.3 Ferroportin.....	25
2.5.4 Transferrin .....	26
<b>2.6 Zelluläre Regulation des Eisenstoffwechsels .....</b>	<b>26</b>
2.6.1 Zelluläre Eisenaufnahme .....	26
2.6.2 Eisenstoffwechsel im Gehirn.....	27
<b>2.7 Zelluläre Eisenhomöostase - IRP/IRE Regulationssystem.....</b>	<b>30</b>
2.7.1 Transferrinrezeptor .....	32
2.7.2 Ferritin .....	32
2.7.2.1 Zytoplasmatisches Ferritin .....	32
2.7.2.2 Mitochondriales Ferritin .....	33
2.7.3 Zellulärer labiler Eisenpool .....	34
<b>2.8 Hypoxie .....</b>	<b>35</b>
2.8.1 Hypoxie-induzierter Faktor .....	36
2.8.1.1 HIF-1.....	37
2.8.1.2 HIF-2.....	38
2.8.2 Prolyl-4-Hydroxylase .....	39
<b>2.9 Therapieansätze .....</b>	<b>39</b>

2.9.1	Dimethyloxallylglycin .....	40
2.9.2	Erythropoietin und Erythropoietinrezeptor .....	41
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>47</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellkultur .....</b>	<b>47</b>
3.1.1	Zelllinien .....	49
3.1.2	Zellkulturmedium .....	50
3.1.3	Mediumherstellung .....	51
3.1.4	Mediumkompelementierung .....	52
3.1.5	Mediumwechsel .....	53
3.1.6	Subkultivierung/ Passagieren der Zellen .....	54
3.1.7	Zellzählung – Bestimmung der Zellzahl .....	55
3.1.8	Kryopreservation - Einfrieren der Zellen .....	56
3.1.9	Auftauen der Zellen .....	57
3.1.10	Inkubation der Zellen .....	57
3.1.10.1	Inkubation mit Dimethyloxallylglycin .....	58
3.1.10.2	Inkubation mit Erythropoietin .....	60
3.1.10.3	Inkubation mit Dimethyloxallylglycin und Erythropoietin .....	60
3.1.11	Herstellung des Lysispuffers .....	60
3.1.12	Ernten der Zellen .....	61
<b>3.2</b>	<b>Proteinbestimmung nach Bradford .....</b>	<b>62</b>
<b>3.3</b>	<b>Anti-Calcein-Antikörper: Antikörperproduktion und -gewinnung .....</b>	<b>64</b>
<b>3.4</b>	<b>CAL-Methode - LIP-Messung .....</b>	<b>65</b>
<b>3.5</b>	<b>Ferritin Enzym-linked Immunosorbent Assay .....</b>	<b>71</b>
<b>3.6</b>	<b>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....</b>	<b>74</b>
3.6.1	Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gelen .....	74
3.6.2	Elektrophorese .....	77
<b>3.7</b>	<b>Western Blot .....</b>	<b>78</b>
3.7.1	Proteindetektion Ponceau S .....	80
3.7.2	Immunodetektion einzelner Proteine .....	82
3.7.2.1	Blockieren .....	83
3.7.2.2	Inkubation mit dem primären Antikörper .....	83
3.7.2.3	Inkubation mit dem sekundären Antikörper .....	84

3.7.2.4	Detektion – Chemilumineszenz .....	85
3.7.2.5	Strippen der Nitrozellulose-Membran .....	88
<b>3.8</b>	<b>Elektrochemiluminescence Immunoassay .....</b>	<b>88</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>93</b>
<b>5</b>	<b>Schlussbetrachtung .....</b>	<b>130</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>132</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>134</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Zusammenhang zwischen der Beeinträchtigung des Eisenstoffwechsels und neurodegenerativen Erkrankungen .....	20
<b>Abbildung 2:</b> Eisenhomoöstate auf Körperebene .....	24
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung der zellulären Eisenaufnahme und des zellulären Eisenstoffwechsels .....	27
<b>Abbildung 4:</b> Mechanismus der Eisenaufnahme über die Blut-Hirn-Schranke .....	29
<b>Abbildung 5:</b> Translationsregulation des Transferrin-Rezeptors und der Ferritinproduktion .....	31
<b>Abbildung 6:</b> HIF-1 $\alpha$ Regulation durch Prolinhydroxylierung .....	38
<b>Abbildung 7:</b> Dimethyloxalylglycin .....	40
<b>Abbildung 8:</b> Übersicht der EPO Signalwege in neuronalen Zellen .....	44
<b>Abbildung 9:</b> Klassifizierung von strukturellen und funktionellen Erythropoietin-Varianten .....	46
<b>Abbildung 10:</b> Einflussfaktoren auf <i>in vitro</i> Zellkulturen .....	48
<b>Abbildung 11:</b> SH-SY5Y Zellen .....	49
<b>Abbildung 12:</b> HepG2 Zellen .....	50
<b>Abbildung 13:</b> Fertigmedium DMEM/Ham's F-12 .....	51
<b>Abbildung 14:</b> Nalgene Cryo 1°C Freezing Container .....	56
<b>Abbildungen 15 und 16:</b> Proteinbestimmung nach Bradford in Mikrotiterplatte, VICTOR <sup>2</sup> Photometer .....	63
<b>Abbildung 17:</b> Prinzip der CAL-Methode zur Messung des LIPs .....	66
<b>Abbildungen 18 und 19:</b> Spezielle 96-Well-Mikrotiterplatte für die LIP Messung, Anthos Zenyth 3100 .....	70
<b>Abbildungen 20 und 21:</b> Ferritin Enzym-linked Immunosorbent Assay Testkit .....	71
<b>Abbildung 22:</b> Ferritin ELISA. Gecoatete Wells in der Halterung mit 20 $\mu$ l/ Well der Standards, Proben und Kontrollen und 100 $\mu$ l/Well Enzymkonjugationsreagenz .....	72
<b>Abbildungen 23, 24 und 25:</b> Ferritin ELISA. Farbreaktion nach Zugabe von 1M HCl (Stopplösung) .....	72
<b>Abbildung 26:</b> Aufbau eines „Blotsandwiches“ .....	79



<b>Abbildung 27:</b> Ponceau S .....	80
<b>Abbildung 28:</b> Gefärbte Protein-Banden (SH-SY5Y Zellen) auf Nitrozellulose-Membran. Proteinmenge 200 µg/Geltasche, gefärbt mit 0,5 %igem Ponceau S .....	81
<b>Abbildung 29:</b> Gefärbte Protein-Banden (SH-SY5Y Zellen) auf Nitrozellulose-Membran. Proteinmenge 140 µg/Geltasche, gefärbt mit 0,5 %igem Ponceau S .....	81
<b>Abbildung 30:</b> Reaktionsmechanismus Chemilumineszenz .....	86
<b>Abbildung 31:</b> Schema der Immundetektion .....	87
<b>Abbildung 32:</b> Chemilumineszenz-Detektor (Fusion Fx7 PEQLAB) .....	87
<b>Abbildung 33:</b> Schema der Elektrochemilumineszenzprozesse .....	89
<b>Abbildung 34:</b> Sector Imager 2400, MSD (Meso Scale Discovery) .....	92
<b>Abbildung 35:</b> Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf den labilen Eisenpool nach 2 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen .....	95
<b>Abbildung 36:</b> Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf den labilen Eisenpool nach 6 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen .....	96
<b>Abbildung 37:</b> Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf den labilen Eisenpool nach 24 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen .....	97
<b>Abbildung 38:</b> Zeitabhängige Effekte (2h, 6h, 24h) von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf den labilen Eisenpool in SH-SY5Y Zellen .....	98
<b>Abbildung 39:</b> Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf den labilen Eisenpool nach 2 Stunden Inkubation in HepG2 Zellen .....	100
<b>Abbildung 40:</b> Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf den labilen Eisenpool nach 6 Stunden Inkubation in HepG2 Zellen .....	101
<b>Abbildung 41:</b> Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml]	

und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf den labilen Eisenpool nach 24 Stunden Inkubation in HepG2 Zellen.....	102
<b>Abbildung 42:</b> Zeitabhängige Effekte (2h, 6h, 24h) von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf den labilen Eisenpool in HepG2 Zellen.....	
	104
<b>Abbildung 43:</b> Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von zytosolischem Ferritin nach 2 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen.....	
	108
<b>Abbildung 44:</b> Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von zytosolischem Ferritin nach 6 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen.....	
	109
<b>Abbildung 45:</b> Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von zytosolischem Ferritin nach 24 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen.....	
	110
<b>Abbildung 46:</b> Zeitabhängige Effekte (2h, 6h, 24h) von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von zytosolischem Ferritin in SH-SY5Y Zellen.....	
	111
<b>Abbildung 47:</b> Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von zytosolischem Ferritin nach 2 Stunden Inkubation in HepG2 Zellen.....	
	113
<b>Abbildung 48:</b> Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von zytosolischem Ferritin nach 6 Stunden Inkubation in HepG2 Zellen.....	
	114
<b>Abbildung 49:</b> Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml]	

auf die Expression von zytosolischem Ferritin nach 24 Stunden Inkubation in HepG2 Zellen.....	116
<b>Abbildung 50:</b> Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von mitochondrialem Ferritin nach 24 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen.....	126
<b>Abbildung 51:</b> Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von mitochondrialem Ferritin nach 24 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen und HepG2 Zellen.....	127

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Herstellungsanleitung PBS (5x).....	59
<b>Tabelle 2:</b> Pipettierschema für die Standardreihe der Proteinbestimmung.....	62
<b>Tabelle 3:</b> Pipettierschema für die Herstellung von zwei 12%igen Trenngelen und zwei 5%igen Sammelgelen.....	76
<b>Tabelle 4:</b> 2x Denaturing Sample Puffer.....	77
<b>Tabelle 5:</b> Tris/Tricin Puffer (10x).....	78
<b>Tabelle 6:</b> Elektrophoresepuffer.....	78
<b>Tabelle 7:</b> Herstellungsanleitung Tris/Glycin Puffer (10x).....	80
<b>Tabelle 8:</b> Herstellungsanleitung des Blot Puffers.....	80
<b>Tabelle 9:</b> PBS/Tween 20 (Waschpuffer).....	83
<b>Tabelle 10:</b> Blockierlösung (für 2 Blots).....	83
<b>Tabelle 11:</b> 1. Antikörper, Angaben für die Stammlösungen.....	84
<b>Tabelle 12:</b> 2. Antikörper, Angaben für die Stammlösungen.....	85
<b>Tabelle 13:</b> Mischverhältnis der Substratlösungen des Clarity Western ECL Substrate Kits.....	86
<b>Tabelle 14:</b> Herstellungsanleitung des Stripping Puffers.....	88
<b>Tabelle 15:</b> Standardreihe für den ECLIA.....	90
<b>Tabelle 16:</b> Reagenzien für den ECLIA.....	90
<b>Tabelle 17:</b> Mittelwert $\pm$ SEM Vergleich der Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf den labilen Eisenpool nach 2 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen und HepG2 Zellen.....	105
<b>Tabelle 18:</b> Mittelwert $\pm$ SEM Vergleich der Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf den labilen Eisenpool nach 6 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen und HepG2 Zellen.....	106
<b>Tabelle 19:</b> Mittelwert $\pm$ SEM Vergleich der Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml]	

auf den labilen Eisenpool nach 24 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen und HepG2 Zellen.....	106
<b>Tabelle 20:</b> Mittelwert $\pm$ SEM Vergleich der Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von zytosolischem Ferritin nach 2 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen und HepG2 Zellen.....	117
<b>Tabelle 21:</b> Mittelwert $\pm$ SEM Vergleich der Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von zytosolischem Ferritin nach 6 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen und HepG2 Zellen.....	117
<b>Tabelle 22:</b> Mittelwert $\pm$ SEM Vergleich der Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von zytosolischem Ferritin nach 24 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen und HepG2 Zellen.....	118
<b>Tabelle 23:</b> Vergleich der Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf das Verhalten des labilen Eisenpools und die Expression von zytosolischem Ferritin nach 2 Stunden Inkubation in SH-SY5Y-Zellen.....	120
<b>Tabelle 24:</b> Vergleich der Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf das Verhalten des labilen Eisenpools und die Expression von zytosolischem Ferritin nach 6 Stunden Inkubation in SH-SY5Y-Zellen.....	121
<b>Tabelle 25:</b> Vergleich der Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml]	

auf das Verhalten des labilen Eisenpools und die Expression von zytosolischem Ferritin nach 24 Stunden Inkubation in SH-SY5Y-Zellen .....	122
---	-----

**Tabelle 26:** Vergleich der Effekte

von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml]

und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml]

auf das Verhalten des labilen Eisenpools

und die Expression von zytosolischem Ferritin nach 2 Stunden Inkubation

in HepG2-Zellen .....	123
-----------------------	-----

**Tabelle 27:** Vergleich der Effekte

von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml]

und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml]

auf das Verhalten des labilen Eisenpools

und die Expression von zytosolischem Ferritin nach 6 Stunden Inkubation

in HepG2-Zellen .....	123
-----------------------	-----

**Tabelle 28:** Vergleich der Effekte

von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml]

und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml]

auf das Verhalten des labilen Eisenpools

und die Expression von zytosolischem Ferritin nach 24 Stunden Inkubation

in HepG2-Zellen .....	123
-----------------------	-----

**Abkürzungen**

APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovine Serum Albumin
CAL-AM	Calcein- Acetoxymethylester
CEPO	carbamoyliertes EPO
CPX	Ciclopiroxolamin
Dcytb	duodenale Cytochrom B Reduktase
DFO	Deferoxamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMOG	Dimethyloxalylglycin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT-1	divalenter Metalltransporter-1
DTPA	Diethylentriaminpentaacetat
ECLIA	Elektrochemiluminescence Immunoassay
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
EPO	Erythropoietin
Epo-R	Erythropoietinrezeptor
FBS	fetal bovine serum
Fpn	Ferroportin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HRE	hypoxie response element
HRP	horseradisch peroxidase
IRE	iron-regulatory element
IRP	Iron-regulatory protein
JAK2	Janus family tyrosine kinase 2
LIP	labiler Eisenpool
Nrf2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NTBI	nicht-transferringebundenes Eisen

---

PBS	phosphate buffered saline
PHD	Prolyl-4-Hydroxylase
PMSF	Phenylmethysulfonylfluorid
rhEPO	rekombinantes humanes Erythropoietin
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIH	Salicylaldehyd Isonicotinoyl Hydrazon
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tf	Transferrin
TfR	Transferrinrezeptor
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin
UTR	untranslatierte Region
VHL	Von Hippel-Lindau Protein
ZNS	zentrales Nervensystem



## 1 Einleitung und Fragestellung

Das Verständnis über die Eisenhomöostase, Details über den Transport und die Interaktion mit Biomolekülen ist essentiell für das Verständnis von normalen und pathologischen Prozessen im lebenden Organismus. [Kozlowski et al., 2012]

Die Akkumulation von Eisen im fortgeschrittenen Lebensalter und der dadurch verursachte oxidative Stress ist dabei frühes Ereignis und eine beobachtete Gemeinsamkeit in der Pathologie vieler neurodegenerativer Erkrankung. [Weinreb et al., 2010]

Das Wissen über den Eisenmetabolismus im Gehirn ist weiterhin unvollständig im Vergleich zu den Kenntnissen des systemischen Eisenstoffwechsels. [Rouault, 2013]

Die aktuellen klinischen Therapieansätze zur Behandlung von vielen neurodegenerativen Erkrankungen sind nur symptomatisch und verhindern nicht die Progression der Krankheiten. [Lee et al., 2012], [Schneider und Bhatia, 2013]

Im Rahmen dieser Masterarbeit werden die Grundlagen verschiedener Therapieansätze im Zusammenhang mit der Adaption des Eisenstoffwechsels *in vitro* untersucht.

Zum einen an humanen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) als Modell für die organ- bzw. zellspezifische Modulation des Gehirns und zum anderen an humanen Hepatokarzinomzellen (HepG2) als Modellbeispiel für eine organspezifische Variation der Leber und den Einfluss der Medikation auf die systemische Eisenmodifikation.

Die Adaption und das Zusammenspiel der Eisenstoffwechselkomponenten labiler Eisenpool (LIP), zytosolisches Ferritin und mitochondriales Ferritin werden nach den zeit- und/oder konzentrationsabhängigen Behandlungen mit Dimethyloxalylglycin (DMOG), einem kompetitiven Inhibitor des sauerstoffsensitiven Enzyms Prolylhydroxylase (PHD) und Stabilisator der HIF-1 $\alpha$  Expression und in weiterer Folge neuroprotektiver Komponenten unter Normoxie, und Erythropoietin (EPO), einem

Glykoprotein, von dem angenommen wird, dass es unter anderem neuroprotektive Wirkung hat, untersucht.

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Neurodegenerative Erkrankungen**

Der Begriff neurodegenerative Erkrankungen bezieht sich auf eine Gruppe von Krankheiten, die gemeinsame Merkmale und molekulare Stoffwechselwege teilen, was drauf schließen lässt, dass die Pathologie direkt vergleichbar ist. Neurodegenerative Erkrankungen sind charakterisiert durch anormale Akkumulation von Proteinen und selektiver neuronaler Degeneration. [Kozlowski et al., 2012]

Die Anreicherung und Dysregulation von Übergangsmetallen, wie beispielsweise Kupfer, Zink und Eisen, ist ein weiteres Merkmal im Krankheitsbild von neurodegenerativen Erkrankungen. Ein Verlust oder eine anormale Eisenhomöostase kann zu verschiedenen Fehlfunktionen bis hin zum Zelltod führen und steht im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten, wie der Alzheimer-Krankheit, der Parkinson-Krankheit und der Chorea major (Huntington) sowie der amyotrophischen Lateralsklerose. [Salvador et al., 2011]

### **2.2 Einfluss von Eisen auf neurodegenerative Erkrankungen**

Eisen ist essentiell für eine Vielzahl von biologischen Vitalfunktionen, wie Sauerstofftransport, mitochondriale Energieproduktion, DNA-Synthese und -Reparatur. Im Gehirn spielt es unter anderem eine Rolle bei der Neurotransmitter- und Myelinsynthese sowie bei anderen entscheidenden Prozessen, die für eine normale Entwicklung und Funktion notwendig sind. [Johnstone und Milward, 2010]

Die höchsten Eisenkonzentrationen im Körper kommen in der Leber und einigen Regionen des Gehirns vor. Ein Eisenüberschuss in der Leber kann zur Fibrose und infolgedessen zur Zirrhose und Krebs führen. Nichtsdestoweniger besitzt die Leber eine hohe Regenerationskapazität und eine Leberfibrose ist durch geeignete Medikamente reversibel. Über die Effekte der Eisenanreicherung im Gehirn ist derzeit nur wenig bekannt, jedoch sind die schädlichen Auswirkungen wahrscheinlich weniger reversibel,

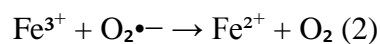
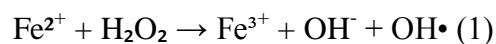


## 2.3 Zytotoxizität von Eisen

### 2.3.1 Fenton/Haber-Weiss-Reaktion

Es gibt zahlreiche Ursachen die zur Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen führen. Ein Ausgangspunkt ist die Schädigung durch oxidativen Stress mittels Fenton-Reaktion. [Friedman et al., 2011]

#### Fenton/Haber-Weiss-Reaktion



Die Fenton-Reaktion ist eine eisenabhängige Haber-Weiss-Reaktion. In Anwesenheit von Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) katalysiert Eisen die Bildung von sehr reaktiven Hydroxyradikalen ( $\text{OH}\cdot$ ). Das oxidierte Metall wird durch zelluläre Äquivalente wie Superoxid ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) reduziert, so dass es zu einem nächsten Reaktionszyklus kommen kann. Der zusammengefasste Mechanismus heißt Haber-Weiss-Reaktion, der auch ohne die Anwesenheit von Übergangsmetallionen stattfinden kann. Doch das Vorkommen von Eisen erhöht deutlich die Reaktionsrate. Die Interaktion von Hydroxyradikalen mit zellulären Komponenten führt zu einer Schädigung von Biomolekülen, z.B. DNA, RNA, Proteinen und Lipiden. [Kruszewski, 2003]

Die Alterung des Gehirns ist assoziiert mit einem progressiven Ungleichgewicht zwischen antioxidativer Abwehr und intrazellulärer Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) sowie einer niedrigeren Regenerationskapazität. [Weinreb et al., 2012], [Uttara et al., 2009] Dabei scheint das humane Gehirn auch besonders verwundbar gegenüber oxidativem Stress, da dort hohe Konzentrationen an Lipiden und ungesättigten Fettsäuren, ein relativ hoher Gehalt an Eisen im Vergleich zu der Menge an Enzymen, die fähig sind den oxidativen Stress aufzuheben, zu finden sind. [Friedman et al., 2011]

### **2.3.2 Zytotoxizität durch Eisenüberschuss**

Eisen ist ein redoxaktives Metall, das in zwei Oxidationsstufen,  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$ , vorliegen kann. [Kozlowski et al., 2012]

Überschreitet die Eisenkonzentration die Kapazität der Eisendetoxifikationssysteme (Eisentransport, Sequestrierung, Oxidation von  $\text{Fe}^{2+}$  zum weniger reaktiven  $\text{Fe}^{3+}$ ) führt dieses zu einer exzessiven Produktion an Hydroxylradikalen ( $\text{OH}\bullet$ ) als direkte Folge eines  $\text{Fe}^{2+}$  Überschusses. [Chepelev und Willmore, 2011]

### **2.3.3 Zytotoxizität durch Eisendefizit**

Auch Eisendefizite und Hypoxie können zu oxidativen Schäden führen als Folge eines erhöhten Elektronenverlustes defekter eisenabhängiger Komponenten der mitochondrialen Elektronentransportkette. [Chepelev und Willmore, 2011]

### **2.3.4 Zytotoxizität durch Hypoxie**

Ähnlich wie ein Eisenüberschuss oder –defizit kann auch Hypoxie zu einer vermehrten Bildung von ROS führen. Ungefähr 1-5% des Sauerstoffs, der für die oxidative Phosphorylierung benötigt wird, wird in Superoxid umgewandelt als Resultat einer unvollständigen Reduktion des Sauerstoffes zu Wasser in der mitochondrialen Elektronentransportkette. Superoxid wird sowohl in den Mitochondrien als auch im Zytosol zu Wasserstoffperoxid umgewandelt und aktiviert die sauerstoffabhängigen Signalwege. [Chepelev und Willmore, 2011]

## 2.4 Physiologie und Biochemie von Eisen

Der menschliche Körper enthält ca. 4 g Eisen. 2,5 g der Gesamtmenge liegen im Hämoglobin gebunden vor. 1 g wird vor allem in den Hepatozyten sowie den hepatischen Makrophagen und den Makrophagen der Milz als Ferritin gespeichert. Der Rest verteilt sich auf Myoglobin, Zytochrome und andere Eisenproteine. [Ganz und Nemeth, 2012]

Nur 1 bis 2 mg/d ( $<0,05\%/d$ ) gehen dem Körper verloren. Im steady state wird diese Menge durch intestinal absorbiertes Eisen ersetzt. [Ganz und Nemeth, 2012] Die D-A-CH Referenzwerte für die empfohlene, tägliche Eisenzufuhr liegen bei 10 mg für Männer und 15 mg für Frauen. Von dem aufgenommenen Eisen werden nur ca. 10% resorbiert. Bei einem stärkeren Eisenverlust kann die Resorption um das 20-fache ansteigen. [Ganz und Nemeth, 2012]

Die meisten Zelltypen sind in der Lage, ihre Eisenaufnahme (und –abgabe) autonom zu regeln, um die individuellen Bedürfnisse zu decken. So schützt beispielsweise die Blut-Hirn-Schranke das Gehirn vor einem systemischen, pathologischen Anstieg der Eisenkonzentration. Im Gegensatz dazu gibt es Zelltypen, die die Versorgung und Speicherung von Eisen für den gesamten Organismus übernehmen, wie die Hepatozyten und einige andere. [Ganz und Nemeth, 2012]

## 2.5 Systemische Regulation des Eisenstoffwechsels

Eisen ist essentiell für viele biologische Prozesse. Die Versorgung der Organe und Zellen mit Eisen ist daher streng geregelt.

Die systemische Eisenhomöostase umfasst die Kontrolle über die Resorption von Nahrungseisen, die Eisenkonzentration in der Extrazellulärflüssigkeit und im Blutplasma sowie die Abgabe von Eisen aus den Makrophagen und den eisenspeichernden Hepatozyten. [Ganz und Nemeth, 2012]

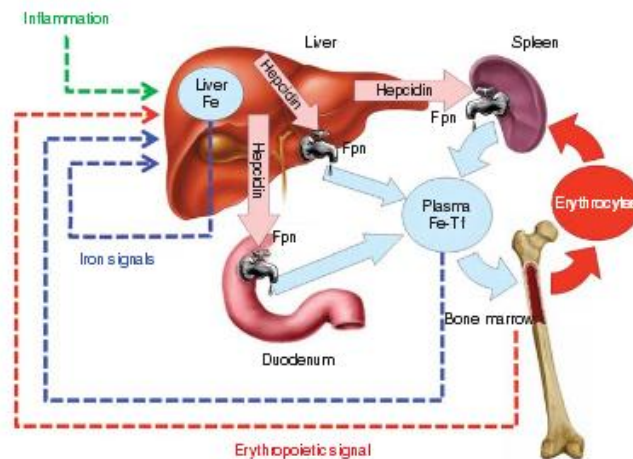


Abbildung 2: Eisenhomöostase auf Körperebene [Ganz und Nemeth, 2012]

### 2.5.1 Resorption

Die Resorption von Nahrungseisen findet im Duodenum statt. [Pantopoulos, 2004] Das Eisen liegt dort entweder als  $\text{Fe}^{3+}$  oder als Komplex mit Makromolekülen wie Ferritin, Phytaten oder in Form von Häm und hämhaltigen Proteinen vor. An der Epitheloberfläche wird  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  mit Hilfe einer oder mehrerer apikaler Eisen-III-Reduktasen, wie beispielsweise der duodenalen Zytochrom B Reduktase (Dcytb), reduziert und via apikalem Enterozytentransporter, divalenter Metalltransporter-1 (DMT-1), ins Zytoplasma transportiert. [Ganz, 2007], [Pantopoulos, 2004]

### 2.5.2 Hepcidin

Hepcidin ist eine Schlüsselkomponente der systemischen Eisenregulation. [De Domenico et al., 2008] Es ist ein kleines, zirkulierendes Peptidhormon (25 Aminosäuren), das vor allem von Hepatozyten der Leber produziert und auf Transkriptionsebene eisen- und sauerstoffsensitiv reguliert wird. [Haase, 2013], [De Domenico et al., 2008] Hepcidin regelt die Eisenresorption und Homöostase und somit unter anderem auch den Eintritt von Eisen ins Plasma. [Peyssonnaud et al., 2007], [De Domenico et al., 2008]



Die Hepcidinproduktion ist bei Eisenüberladung erhöht und bei Anämie und Hypoxie erniedrigt. [Peyssonnaud et al., 2007]

Die Hepcidin mRNA wird bei Anämie und Hypoxie gehemmt als Folge eines indirekten Effekts des Eisenbedarfes der Erythroid-Vorläuferzellen und einer gesteigerten Erythropoietinproduktion. Hepcidin inhibiert die Abgabe von Eisen ins Plasma und der Extrazellulärflüssigkeit und kontrolliert somit den Eisen-Plasmalevel. Das Hormon hemmt den Transfer von Nahrungseisen aus den duodenalen Enterozyten, die Abgabe von Eisen aus den Makrophagen und Hepatozyten ins Plasma. Auf molekularer Ebene bindet Hepcidin an Ferroportin und bewirkt dessen Endozytose und Protolyse, was eine rückläufige Eisenabgabe aus den Zellen ins Plasma und in die Extrazellulärflüssigkeit bewirkt. [Ganz und Nemeth, 2012]

### 2.5.3 Ferroportin

Humanes Ferroportin (Fpn) (571 Aminosäuren) [Chepelev und Willmore, 2011] ist ein Eisentransportprotein, das sich an der basalen Membran vieler Zellen befindet und dort als  $\text{Fe}^{2+}$ -Exporter fungiert. [Rouault und Cooperman, 2006], [Pantopoulos, 2004]

Nach dem Transport von  $\text{Fe}^{2+}$  über Ferroportin in die Zirkulation wird  $\text{Fe}^{2+}$  durch die Plasmaferroxidase Ceruloplasmin oder ihr membranassoziiertes Homolog Hephästin zu  $\text{Fe}^{3+}$  reoxidiert und an Transferrin gebunden. [Pantopoulos, 2004]

Ferroportin kommt in den meisten Zellen in geringen Konzentrationen vor. [Ganz und Nemeth, 2012] So befindet sich das Protein beispielsweise auch im ZNS. [Rouault und Cooperman, 2006] Hepatozyten besitzen intermediäre Vorkommen an Ferroportin und Eisentransportgewebe weisen höhere Gehalte des Proteins auf. [Ganz und Nemeth, 2012]

Derzeit ist Ferroportin auch der einzige bekannte Exporter der Plasmamembran, der in den neuronalen Zellen zu finden ist. [Li et al., 2011], [Chepelev und Willmore, 2011]

## 2.5.4 Transferrin

Transferrin ist ein Glykoprotein (698 Aminosäuren), der physiologische Eisentransporter im Plasma und wird hauptsächlich von den Hepatozyten abgegeben. [Chepelev und Willmore, 2011], [Ganz und Nemeth, 2012] Im Plasma sind nur 20 bis 40% der verfügbaren Bindungsstellen mit  $\text{Fe}^{3+}$  besetzt. [Ganz und Nemeth, 2012] Eisenfreies Transferrin wird als Apotransferrin bezeichnet. [Chepelev und Willmore, 2011]

Bei einer Sättigung des Transferrin von  $> 50\%$  wird Eisen als nicht-transferringebundenes Eisen (NTBI) im Plasma transportiert. [Ikuta et al., 2013] NTBI besteht aus nicht-transferringebundenem Eisen, das gebunden an andere Proteine (z.B. Laktoferrin und Melanotransferrin) vorliegt oder schwach an anorganische Trägermoleküle (z.B. Citrat, Ascorbat und ATP) assoziiert ist. [Pelizzoni et al., 2011] Physiologisch kommt weniger als 1% des Eisens in der Zirkulation in Form von NTBI vor. [Zheng und Monnot, 2012]

## 2.6 Zelluläre Regulation des Eisenstoffwechsels

### 2.6.1 Zelluläre Eisenaufnahme

Die zelluläre Aufnahme von Eisen erfolgt mittels Transferrinrezeptor (TfR1). [Ganz und Nemeth, 2012] Daher wird die Eisenaufnahme einzelner Zellen hauptsächlich durch die Veränderung der TfR1 Expression reguliert. [Rouault und Cooperman, 2006] Einige Zellen wie beispielsweise die Hepatozyten sind außerdem in der Lage, nicht-transferringebundenes Eisen (nontransferrin-bound iron, NTBI) aufzunehmen. [Ganz und Nemeth, 2012]

Nachdem das Plasmatransferrin an den Oberflächenrezeptor gebunden hat, wird der Holo-Transferrin-TfR1-Komplex per Endozytose aufgenommen. Im sauren Milieu (pH 5,5) löst sich das transferringebundene  $\text{Fe}^{3+}$  mit Hilfe der endosomale Metallreduktase STEAP3 und der Apo-Transferrin-TfR1-Komplex kehrt zur Zellmembran zurück, wo

bedingt durch den neutralen pH-Wert eine Dissoziation von Apotransferrin und TfR1 stattfindet. [Ganz und Nemeth, 2012], [Pantopoulos, 2004], [Rouault und Cooperman, 2006]

$\text{Fe}^{3+}$  wird durch die endosomale Metallreduktase STEAP3 zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert, wodurch sich das Eisen vom Transferrin löst, und anschließend mittels divalenten Metalltransporters-1 (DMT-1) durch die endosomale Membran ins Zytosol geschleust wird. Das intrazelluläre Eisen kann nun für die Synthese von eisenhaltigen Proteinen verwendet werden, ein Überschuss als Ferritin gespeichert oder als Bestandteil des labilen Eisenpools (LIP) dienen. [Pantopoulos, 2004]

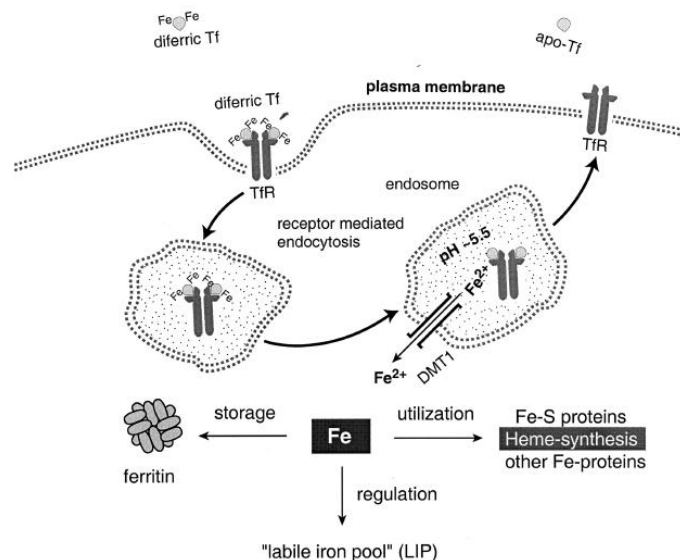


Abbildung 3: Schematische Darstellung der zellulären Eisenaufnahme und des zellulären Eisenstoffwechsels [Pantopoulos, 2004]

## 2.6.2 Eisenstoffwechsel im Gehirn

Die Eisenbalance im ZNS wird durch ein Barriersystem autonom aufrechterhalten und von der systemischen Zirkulation getrennt. Zu der Barriere gehören die Blut-Hirn-Schranke, die sich zwischen dem Blut und der interstitiellen Gehirnflüssigkeit befindet, und die Zerebrospinalflüssigkeitsbarriere, die das Blut und die zerebrospinale

Flüssigkeit trennen. [Zheng und Monnot, 2012] Die Blut-Hirn-Schranke besteht aus Endothelzellen, die von tight junctions durchzogen sind, einer Basallamina, Perizyten und astrozytischen Fortsätzen. [Rouault und Cooperman, 2006]

Wie die meisten Zellen im Körper exprimiert das Gehirn sämtliche Eisenstoffwechselproteine. Die Menge an exprimierten Proteinen variiert abhängig von Zelltyp und Eisenstatus. Oligodendrozyten synthetisieren vor allem Transferrin, die Mikroglia Ferritin, während die Neuronen eine große Anzahl an Transferrinrezeptoren besitzen. [Rouault, 2013] Die Eisenhomöostase scheint vergleichbare Proteine und Mechanismen wie die Peripherorgane zu besitzen. [Weinreb et al., 2012]

Nach der Aufnahme ins Gehirn wird Eisen auf verschiedene Bereiche verteilt. Über den Mechanismus ist derzeit nur wenig bekannt. [Rouault und Cooperman, 2006] Hohe Eisenlevel im Gehirn wurden im Globus pallidus, Putamen, Substantia nigra und Nucleus caudatus gefunden. [Rouault und Cooperman, 2006]

Die Eisenaufnahme ins Gehirn ist reguliert durch die Expression des TfR1 in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke. Die TfR1 Expression hängt wiederum vom Eisenstatus des ZNS ab. [Rouault und Cooperman, 2006]

Im Gegensatz zu den endothelialen Blutgefäßen exprimieren die endothelialen Zellen der Blut-Hirn-Schranke Rezeptoren und Proteine auf der luminalen Endothelmembranseite der systemischen Zirkulation, die sich von denen auf der abluminalen Seite unterscheiden. [Rouault und Cooperman, 2006]

Auf der luminalen Seite der Blut-Hirn-Schranke vermittelt der Transferrinrezeptor die endotheliale Eisenaufnahme. [Rouault, 2013] Der Holo-Transferrin-TfR-Komplex wird über Endozytose in die zentralen Kapillaren aufgenommen. [Zheng und Monnot, 2012] Der Eisenexporter Ferroportin kann möglicherweise Eisen die Überquerung der Abluminalenmembran und das Eintreten in die interstitielle Flüssigkeit ermöglichen. Die Astrozytenfortsätze, die mit den Endothelzellen verbunden sind, exprimieren eine membranähnliche Form der Ferroxidase Ceruloplasmin. Es ist wahrscheinlich, dass das Eisen nicht nur über die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke aufgenommen wird, sondern auch durch die Epithelzellen des Plexus choroideus unter Verwendung der

gleichen Transporter, die im Duodenum identifiziert wurden. Bei der Aufnahme in die intestinale Flüssigkeit oder Zerebrospinalflüssigkeit bindet Eisen an Transferrin, das im ZNS hauptsächlich von den Oligodendrozyten und den Zellen des Plexus choroideus synthetisiert und abgesondert wird. Das Holo-Transferrin liefert Eisen an die Zellen im ZNS, die einen TfR besitzen. [Rouault, 2013]

Der Eisentransport aus dem Endosom ist allgemein abhängig vom DMT-1. [Rouault und Cooperman, 2006] Das Vorkommen oder die Abwesenheit des DMT-1 in den endothelialen Zellen der Blut-Hirn-Schranke wird allerdings kontrovers diskutiert. [Yang et al., 2013], [Rouault und Cooperman, 2006]

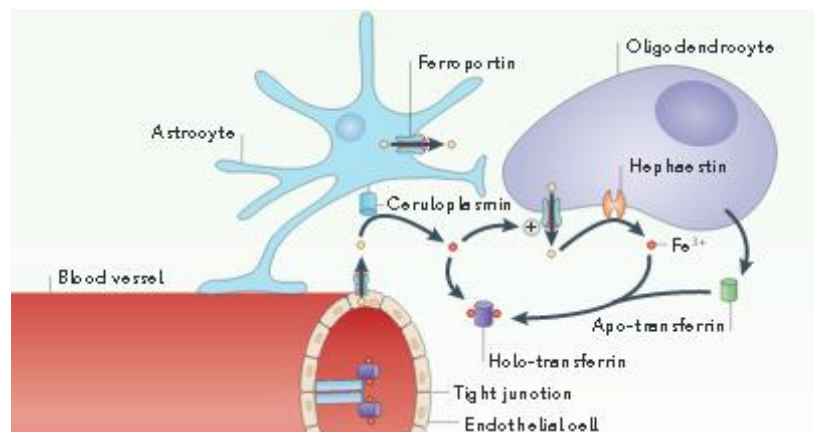


Abbildung 4: Mechanismus der Eisenaufnahme über die Blut-Hirn-Schranke [Rouault, 2013]

Ein alternativer Transportweg von Eisen über die Blut-Hirn-Schranke scheint die Aufnahme über NTBI zu sein. [Zheng und Monnot, 2012] NTBI stellt zum einen eine Eisenquelle für verschiedene Zelltypen im Gehirn wie Astrozyten und Oligodendrozyten dar, kann aber auch ein potentieller Risikofaktor sein. [Weinreb et al., 2013], [Pelizzoni et al., 2011]

Eine weitere Möglichkeit der  $\text{Fe}^{3+}$  Aufnahme über die Blut-Hirn-Schranke erfolgt möglicherweise über  $\text{Fe}^{3+}$ -haltiges Laktoferrin mittels Laktoferrinrezeptoren. [Weinreb et al., 2013], [Yang et al., 2013]

Allgemein scheint es, als wenn Eisen vor allem über die Blut-Hirn-Schranke aufgenommen und über die Zerebrospinalflüssigkeitsbarriere abgegeben wird. Die Eisenabgabe in die Zirkulation wird über die Menge an Zerebrospinalflüssigkeit und/oder Entfernungsmechanismen der Zerebrospinalflüssigkeitsbarriere kontrolliert. [Zheng und Monnot, 2012]

## **2.7 Zelluläre Eisenhomöostase - IRP/IRE Regulationssystem**

Die zelluläre Eisenhomöostase stellt eine adäquate Versorgung nach dem individuellen Bedarf sicher. Das System wird posttranskriptionell durch die Hauptregulationsfaktoren des zellulären Eisenstoffwechsels, den Iron-regulatory proteins (IRPs, IRP1 und IRP2) und der iron-regulatory elements (IREs) organisiert. [Ganz und Nemeth, 2012] IRP1 (889 Aminosäuren) und IRP2 (946 Aminosäuren) sind homologe, zytoplasmatische Polypeptide und gehören zu der Familie der Eisen-Schwefel-Cluster Isomerasen. [Pantopoulos, 2004]

Das zelluläre Eisengleichgewicht wird koordiniert durch die Expression des Transferrinrezeptors (TfR) und des Ferritin, die die Eisenaufnahme bzw. -speicherung vermitteln. [Pantopoulos, 2004]

Die Homöostase wird über die Bindung der IRPs 1 und 2 an die iron-responsive elements (IREs) aufrechterhalten. (Luo, Wang, Yu, & Zhu, 2011) Dabei binden IRP1 und IRP2 mit hoher Affinität ( $K_d \approx 10^{-12}$  M) an die IREs. [Pantopoulos, 2004]

IRP1 wird durch eine Eisen-Schwefel-Cluster Umstellung reguliert. Bei Eisensättigung liegt es gebunden an einen 4Fe-4S Cluster vor, wodurch die Bindungsfähigkeit an das IRE inhibiert wird. IRP2 wird durch die Versorgung mit Eisen und Sauerstoff reguliert. Bei Eisenmangel wird es de novo synthetisiert. Es bleibt unter Eisendepletierung und

Hypoxie stabil, wird aber bei Eisensättigung und Normoxie angebaut. [Pantopoulos, 2004]

Bei einem zellulären Eisenmangel bindet das IRP an das IRE, das sich am 5'Ende der untranslatierten Region (UTR) der mRNA befindet, wodurch es zu einer Hemmung der Ferritintranslation kommt. Zusätzlich führen die Bindungen der IRPs an die fünf IREs, die am 3'Ende der UTR der TfR und DMT-1 mRNAs liegen, zum Schutz von Degradierung der TfR- und der DMT-1-mRNA, wodurch es zu einer Hochregulierung der Eisenaufnahme durch die rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle und der interzellulären Freisetzung kommt. [Luo et al., 2011]

Im Gegensatz dazu binden die IRPs bei einer hohen intrazellulären Eisenkonzentration nicht mehr an die IREs. Die IRE-Bindungsstellen werden durch 4Fe-4S-Cluster blockiert. Dabei kommt es zum Abbau der TfR und DMT-1 mRNA und einer Translation der Ferritin und m-Aconitase mRNA. [Luo et al., 2011]

Bei einer Hypoxie hat die Reaktion der IRPs potenziell Einfluss auf die Proteinkonzentration und die mRNA-Bindungsaktivitäten. [Luo et al., 2011]

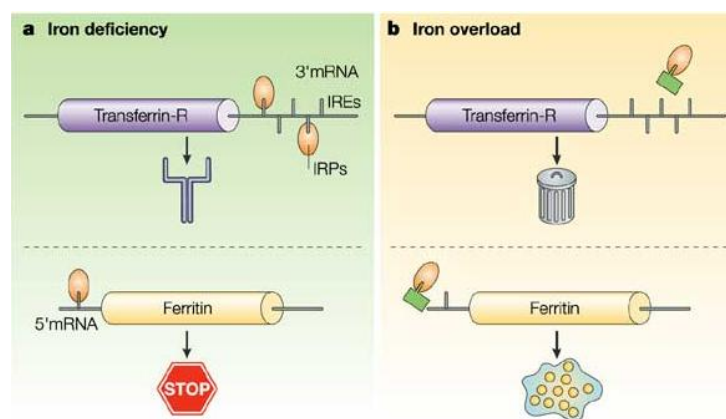


Abbildung 5: Translationsregulation des Transferrin-Rezeptors und der Ferritinproduktion. Bei Eisenmangel (a) und bei Eisenüberschuss (b) [Zecca et al., 2004]

### 2.7.1 Transferrinrezeptor

Transferrinrezeptor 1 (TfR1, 760 Aminosäure) und Transferrinrezeptor 2 (TfR2, 801 Aminosäuren) sind Proteine, die Homo- und Heterodimere formen können und zur M28 Peptidasen Proteinfamilie gehören. TfR1 bindet Transferrin mit größerer Affinität als der TfR2. Die Transferrinrezeptoren regulieren die Eisenaufnahme in die Zelle. [Chepelev und Willmore, 2011]

### 2.7.2 Ferritin

Der menschliche Körper besitzt drei funktionelle Ferritingene. Zum einen das zytosolische Ferritin als Multimer in Form von 24 Untereinheiten aus heavy oder heart chain (H-chain, 183 Aminosäuren, 21kDa) oder light oder liver chain (L-chain, 175 Aminosäuren, 19kDa), und zum anderen das mitochondriale Ferritin (22kDa). [Friedman et al., 2011], [Fisher et al., 2007], [De Domenico et al., 2008]

#### 2.7.2.1 Zytosolisches Ferritin

Ferritin ist ein Eisenspeicherprotein, das pro Molekül bis zu 4500  $\text{Fe}^{3+}$  binden kann. Es spielt eine duale Rolle bei der LIP Homöostase. [Kruszewski, 2003]

Ferritin sequestriert Eisen in eine redoxinaktive, nicht-toxische, bioverfügbare Form, dadurch werden die Zellen vor eisenabhängigen, oxidativen Schäden geschützt. Das gespeicherte Eisen kann jedoch bei Bedarf wieder freigesetzt werden. [Friedman et al., 2011], [Berg und Hochstrasser, 2006]

Das Substrat für die Speicherung ist  $\text{Fe}^{2+}$ , das zu  $\text{Fe}^{3+}$  in der Ferritinhülle oxidiert und in Ferritin gespeichert wird. [De Domenico et al., 2008]



Ferritin ist hauptsächlich ein zytosolisches Protein, das das gespeicherte Eisen vom Nukleus und anderen Organellen separiert. Ein kleiner Anteil an Ferritin ist jedoch auch im Plasma und sekretorischen Flüssigkeiten zu finden. [Arosio und Levi, 2002]

Die Ferritinexpression wird über das IRP/IRE-System geregelt. Die Ferritinsynthese wird hochreguliert, wenn viel bioverfügbares Eisen vorhanden ist, während die Eisenspeicher bei einer geringen Eisenkonzentration reduziert werden und für die Bildung eisenhaltiger Kompartimente zur Verfügung stehen. [Arosio und Levi, 2002]

Die H- und L-chain Ferritinuntereinheiten sind ubiquitär mit einer organ- bzw. zelltypspezifischen Verteilung zu finden. Die H-chain Ferritinuntereinheit kommt in höheren Konzentrationen im Gehirn und Herzen vor. Sie weist zum einen eine hohe Ferroxidaseaktivität auf, die für die Umwandlung von gelösten  $\text{Fe}^{2+}$  in die gespeicherte  $\text{Fe}^{3+}$  Form verantwortlich ist, und zum anderen verfügt sie über eine größere antioxidative Wirksamkeit. Die L-chain Ferritinuntereinheit besitzt nur geringe Ferroxidaseaktivität. L-chain reiche Organe sind beispielsweise Leber und Milz, die einen höheren Anteil an Eisen haben und durch eine vermehrte Speicherkapazität gekennzeichnet sind. [Friedman et al., 2011], [Fisher et al., 2007]

Hämosiderin ist degradiertes Ferritin, das mit unlöslichem Eisen (Eisenoxid) komplexiert vorliegt und in Patienten mit Eisenüberschusskrankheiten zu finden ist. Es verursacht oft keine symptomatischen Beschwerden, kann aber zu Organschädigung führen. [Chepelev und Willmore, 2011]

### **2.7.2.2 Mitochondriales Ferritin**

Das mitochondriale Ferritin ist strukturell und funktionell analog dem zytosolischen Ferritin. [Levi und Arosio, 2004] Es ist ein H-chain Ferritintyp und wird als Precursorprotein (30kDa) aus 242 Aminosäuren und einer Leitsequenz von 60 Aminosäuren in den Mitochondrien synthetisiert. Die Leitsequenz wird proteolytisch abgespalten und es entsteht eine Ferritin-Untereinheit (22kDa), die Ferroxidaseaktivität

besitzt und somit potentiell schädliches freies Eisen sequenzieren kann. [Drysdale et al., 2002], [Levi und Arosio, 2004]

Die Hauptaufgabe von mitochondrialem Ferritin ist die Sequestrierung von überschüssigem Eisen und somit Schutz der Mitochondrien vor oxidativen Schäden. [Levi und Arosio, 2004] Dem kommt besondere Bedeutung zu, da der Hauptfluss an Eisen in vielen Zellen in den Mitochondrien stattfindet, wo beispielsweise Häm und Eisen-Schwefel-Cluster synthetisiert werden. [Drysdale et al., 2002]

Die Expression beschränkt sich jedoch hauptsächlich auf Organe wie Gehirn, Herz, Niere, Thymus, Testis und Langerhanssche Inseln des Pankreas. [Levi und Arosio, 2004] Eisenspeicherorgane wie Leber und Milz enthalten das mitochondriale Ferritin nur in geringen Mengen. [Drysdale et al., 2002], [Yang et al., 2013] Die Verteilungsmuster lassen vermuten, dass das mitochondriale Ferritin eine funktionelle Rolle in den Organen spielt. Derzeit sind jedoch nur wenige Informationen über die Rolle von mitochondrialem Ferritin bei neurodegenerativen Erkrankungen vorhanden. [Yang et al., 2013]

Im Gegensatz zum zytosolischen Ferritin wird das mitochondriale Ferritin nicht durch die eisenabhängige Translationskontrolle reguliert, da dem mitochondrialem Ferritingen die klassischen IREs fehlen. Die mitochondrialen Verteilungsmuster der verschiedenen Gewebe lassen vermuten, dass die Expression auf transkriptionellem Level über gewebe- und zellspezifische Transkriptionsfaktoren reguliert wird. [Yang et al., 2013]

Mitochondriales Ferritin scheint die Verfügbarkeit von zytosolischem und möglicherweise mitochondrialem Eisen zu reduzieren. [Levi und Arosio, 2004]

### **2.7.3 Zellulärer labiler Eisenpool**

Der zelluläre labile Eisenpool (LIP) stellt einen Übergangspool zwischen dem zellulär benötigten Eisen, der Eisenaufnahme und –speicherung dar und ist ein kritischer Faktor bei der Produktion von Hydroxylradikalen ( $\text{OH}\bullet$ ) durch die Fenton/Haber-Weiss-

Reaktion. Um einen Überschuss an „freiem“ Eisen zu vermeiden, wird der LIP mittels Transkriptions- und Posttranskriptionskontrolle der Expression von Proteinen, die bei der Eisenhomöostase beteiligt sind, in engen Grenzen reguliert. [Kakhlon und Cabantchik, 2002], [Kruszewski, 2003]

Der LIP ist definiert als ein Pool von intrazellulärem, redoxaktivem, chelatierbarem Eisen, der beide ionische Formen ( $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$ ) umfasst, die assoziiert mit verschiedenen Liganden, die eine schwache Affinität zu Eisenionen besitzen, wie organische Anionen (Phosphate und Carboxylate), Polypeptide und Membranoberflächenkomponenten (z.B. Phospholipide), vorliegen. [Kakhlon und Cabantchik, 2002], [Kruszewski, 2003] Es wird angenommen, dass Eisen im LIP hauptsächlich als  $\text{Fe}^{3+}$  vorkommt und die  $\text{Fe}^{2+}$  Form nur einen kleinen Teil bildet. [Chepelev und Willmore, 2011] Der LIP umfasst nur eine kleine Fraktion am gesamten zellulären Eisen (3-5%). [Kakhlon und Cabantchik, 2002], [Kruszewski, 2003]

## 2.8 Hypoxie

Der Begriff Hypoxie beschreibt eine Sauerstoffkonzentration, die signifikant niedriger als der normale physiologische Level ist, dem die Zelle, das Gewebe oder das Organ normalerweise ausgesetzt ist. [Chepelev und Willmore, 2011] In den meisten adulten Geweben liegt die Sauerstoffkonzentration im Bereich von 3-5%. [Semenza, 2012]

Eine adäquate Sauerstoffversorgung ist wichtig zur Aufrechterhaltung der normalen physiologischen Funktionen.

Hypoxie stellt eine Stresssituation für die Zellen dar. Es kann in großen Höhen, während der pränatalen Entwicklung und unter einigen pathologischen Bedingungen wie beispielsweise Ischämie, kardiovaskulären und pulmonalen Erkrankungen sowie Krebs auftreten. [Chepelev und Willmore, 2011]

Viele Hypoxieadaptionsprozesse im Körper basieren auf der transkriptionalen Regulation der Hypoxie-induzierten Faktoren (hypoxie-inducible factors) HIF-1, HIF-2

und HIF-3. HIF Elemente induzieren Gene die in Stoffwechselprozessen wie der Angiogenese, der Vasomotorkontrolle, dem Energiemetabolismus, der Apoptose sowie der Erythropoese beteiligt sind. Die sauerstoffregulierte EPO Expression wird beispielsweise über HIF-1 kontrolliert. [Marti, 2004]

Bei einer systemischen Hypoxie wird die Erythrozytenproduktion hochreguliert. Verantwortlich dafür sind die HIFs, die zellspezifische Genexpressionen induzieren, die zu einer gesteigerten Erythropoietinsynthese in der Niere und Leber führen. [Haase, 2013]

Der Stoffwechselweg der Hypoxieerkennung trägt auch zur Aufrechterhaltung der zellulären Eisenhomöostase bei, da HIF Transkriptionsfaktoren nicht nur auf den Sauerstoffgehalt sondern auch auf die zelluläre Eisenkonzentration sensitiv reagieren. [Ganz und Nemeth, 2012]

### **2.8.1 Hypoxie-induzierter Faktor**

Der Hypoxie-induzierte Faktor (hypoxia-inducible-factor, HIF) ist ein Helix-Loop-Helix heterodimerer Transkriptionsfaktor und ein Schlüsselement in der Sauerstoffhomöostase auf zellulärer Ebene, in lokalem Gewebe und auf systemischem Level, der die Expression von über 60 Genen reguliert. [Salvador et al., 2011], [Speer et al., 2013], [Peyssonnaud et al., 2007], [Chepelev und Willmore, 2011], [Luo et al., 2011] Die Expression der Gene betrifft beispielsweise unter anderem den Eisenmetabolismus. [Salvador et al., 2011] HIF fördert auch die Erythropoese auf mehreren Ebenen und koordiniert die zellspezifische Hypoxieantwort. [Haase, 2013]

Drei Mitglieder der HIF Transkriptionsfamilie HIF-1, HIF-2 und HIF-3 sind bekannt. [Chateaufieux et al., 2011] HIF besteht außerdem aus einer  $\alpha$  und einer  $\beta$  Untereinheit. Es gibt drei Isoformen der Untereinheit  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$ ) und drei Isoformen der Untereinheit  $\beta$  (HIF-1 $\beta$ , HIF-2 $\beta$  und HIF-3 $\beta$ ), die alle fähig sind eine Heterodimerisierung mit einem der drei Partnerproteine einzugehen. HIF-3 $\alpha$  fungiert als

Inhibitor von HIF-1 $\alpha$ . HIF- $\beta$ s werden grundsätzlich exprimiert und dimerisiert mit einer Reihe an verschiedenen Partnern. [Chepelev und Willmore, 2011]

### **2.8.1.1 HIF-1**

HIF-1 $\alpha$  (ca. 120kDa) ist der primäre Transkriptionsfaktor bei Hypoxie. [Luo et al., 2011]

Die HIF-1 $\alpha$  Halbwertszeit wird durch sauerstoffabhängigen Abbau geregelt. [Speer et al., 2013]

Unter Normoxie liegt HIF-1 $\alpha$  an das von Hippel-Lindau (VHL) Protein gebunden vor. VHL stellt eine Ubiquitinligase bereit, die zu einem gezielten proteosomalen Abbau führt. Die VHL Bindung hängt von der Hydroxylierung an spezielle Prolinreste des HIF-1 $\alpha$  durch die Prolylhydroxylase 2 (PHD2) ab. PHD2 benötigt Sauerstoff als Substrat und ist bei Hypoxie inhibiert. [Semenza, 2012]

Der von Hippel-Lindau/hypoxia inducible transcription factor (VHL/HIF) Stoffwechselweg ist ein essentieller Link zwischen der Eisenhomöostase und der Hpcidinregulation. [Peyssonnaud et al., 2007]

Unter Hypoxie wird HIF-1 $\alpha$  nicht hydroxyliert, nicht ubiquiniert und nicht degradiert, sondern stabilisiert. HIF-1 $\alpha$  akkumuliert dadurch im Zytosol, transloziert in den Nukleus und dimerisiert dort mit HIF-1 $\beta$  (ca. 91-94 kD). Das Heterodimer bindet an das Enhancerelement hypoxie response element (HRE) und wirkt mit Hilfe des Kofaktors p300/CPB auf die Transskriptionskette der hypoxieinduzierten Gene. [Chepelev und Willmore, 2011], [Luo et al., 2011]

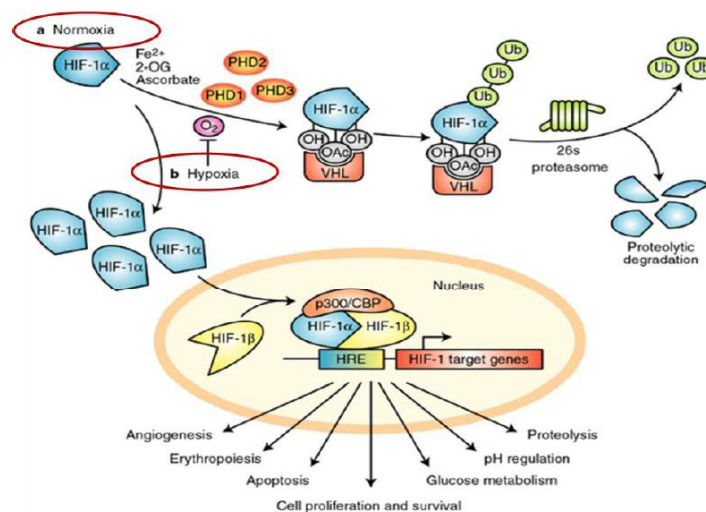


Abbildung 6: HIF-1 $\alpha$  Regulation durch Prolinhydroxylierung. Unter Normoxie (a) und unter Hypoxie (b) [Carroll und Ashcroft, 2005]

Zusätzlich zu der Stoffwechsellaage der Hypoxie kann HIF-1 $\alpha$  auch durch nicht-hypoxische Stimuli stabilisiert werden. Einige Beispiele aus der Reihe der Hypoxiemimetiks sind Deferoxamin (DFO), Ciclopiroxolamin (CPX), Cobaltdichlorid (CoCl<sub>2</sub>) und Dimethyloxalylglycin (DMOG). [Milosevic et al., 2009]

### 2.8.1.2 HIF-2

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 ist *in vitro* für die hypoxische Induktion der EPO Synthese verantwortlich, während HIF-2 als Hauptregulationsfaktor für die EPO Produktion in Leber und Niere *in vivo* identifiziert wurde und eine Rolle bei der Regulation der intestinalen Eisenaufnahme spielt. [Haase, 2013]

Während HIF-1 ubiquitär exprimiert wird, ist die Expression von HIF-2 beschränkt. [Haase, 2013] So ist beispielsweise die Expression von HIF-2 $\alpha$  begrenzt auf bestimmte Hirnregionen wie den Cortex, den Hippocampus und das Cerebellum. [Weinreb et al., 2010] In den Endothelzellen des Gehirns wird, genauso wie in den mukösen Epithelzellen, HIF-2 $\alpha$  stark exprimiert. [Rouault, 2013]

### 2.8.2 Prolyl-4-Hydroxylase

Prolyl-4-Hydroxylasen (PHD) sind hoch konservierte, eisen- und 2-oxoglutaratabhängige Dioxygenasen. PHDs sind die primären Sauerstoffsensoren, die das HIF-1 $\alpha$  Proteinlevel während Normoxie niedrig halten und bei Hypoxie schnell stabilisieren können. [Speer et al., 2013]

## 2.9 Therapieansätze

Die aktuellen, klinischen Therapieansätze zur Behandlung von vielen neurodegenerativen Erkrankungen sind nur symptomatisch und verhindern nicht die Progression der Krankheiten. [Lee et al., 2012], [Schneider und Bhatia, 2013]

Ein erfolgreiches Medikament zur Eliminierung überschüssigen Eisens bei neurodegenerative Erkrankungen sollte nicht-toxisch, lipophil und hirngängig sein. [Weinreb et al., 2010]

Zu einem potentiell vorteilhaften Therapieansatz gehört die Inhibierung der Degradierung der HIF- $\alpha$ s durch die Verwendung von PDH Inhibitoren, die meist auch als Eisenchelatoren wirken. [Chepelev und Willmore, 2011]

Ein alternativer Medikamentenkandidat für Neuroprotektion und Neuroregeneration ist Erythropoietin (EPO), bei dem direkte Effekte auf das ZNS nachgewiesen wurden. [Sargin et al., 2010]

### 2.9.1 Dimethyloxalylglycin

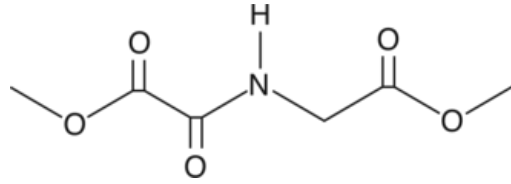


Abbildung 7: Dimethyloxalylglycin (DMOG) [„DMOG • Dimethyloxalylglycine (CAS 89464-63-1) || Cayman Chemical | Supplier“, o. J.]

N-Oxalylglycin ist ein Inhibitor der meisten 2-oxoglutaratabhängigen Oxygenasen wie auch einer Reihe anderer Enzyme. Dimethyloxalylglycin (DMOG) ist ein N-Oxalylglycinester, der schnell in die Zelle eindringt und dort nichtselektiv, alle Prolyl-4-Hydroxylasedomänen 1-3 (1-3 PHD) und somit die Hemmfaktoren für HIF inhibiert. PHDs sind Sauerstoffsensoren und bestimmen die Stabilität und Aktivität der HIF-Transkriptionsfaktoren. [Nagel et al., 2011]

DMOG agiert als Stabilisator der HIF-1 $\alpha$  Expression unter Normoxie in kultivierten Zellen in Konzentrationen zwischen 0,1 und 1 mmol/l. DMOG kann aber auch besonders in höheren Dosen zelltoxische Eigenschaften haben. [Nagel et al., 2011]

Es gibt keine Studien über die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von DMOG. [Nagel et al., 2011]

Neben der Stabilisation des HIF wurden für DMOG auch die Aktivierung der antioxidativen Genexpressionsantwort und die Adaption der Antwort auf oxidativen Stress sowie die Reduktion der Apoptose beschrieben. [Nagel et al., 2011]



### 2.9.2 Erythropoietin und Erythropoietinrezeptor

Erythropoietin (EPO) (166 Aminosäuren, 30,4 kDa) ist ein Glykoprotein und spielt eine Rolle als Hormon, Zytokin und Wachstumsfaktor. [Chateauvieux et al., 2011], [Reisi et al., 2012] Es besteht aus einem einzigen Polypeptid, das in vier  $\alpha$ -Helixes gefaltet ist. [Alnaeeli et al., 2012]

EPO wird bei Erwachsenen vorwiegend in der Niere produziert und in den Blutkreislauf abgegeben, um die Erythrozytenproduktion im Knochenmark zu regulieren. [Alnaeeli et al., 2012], [Haase, 2013] Die Induktion von EPO in der Niere wird von physiologischen Konditionen gesteuert. Hypoxie und Anämie sind dabei die Haupteinflussfaktoren der EPO Expression. [Chateauvieux et al., 2011] Es wurde ursprünglich angenommen, dass die Hypoxieinduktion von EPO in erster Linie durch HIF-1 $\alpha$  reguliert wird, aber zunehmende Hinweise zeigen, dass auch HIF-2 $\alpha$  für die EPO Induktion unter Hypoxie verantwortlich ist. [Alnaeeli et al., 2012]

Die EPO Produktion beginnt jedoch schon vor der Geburt in der fetalen Leber und wechselt erst nach der Geburt zur Niere. Die Leber eines Erwachsenen ist unter Hypoxie oder pharmakologischer HIF Aktivierung jedoch noch in der Lage, auf 20-50% der Gesamtkörper EPO mRNA Produktion anzusteigen. [Alnaeeli et al., 2012], [Haase, 2013]

Die EPO Expression ist aber nicht nur beschränkt auf Niere und Leber. EPO mRNA Expression wurde außerdem in verschiedenen Organen wie ZNS/Gehirn, Lunge, Herz, Knochenmark, Niere, Testis, Haarfollikel und Osteoblasten nachgewiesen. [Marti, 2004], [Haase, 2013]

Im Gehirn wird EPO vorwiegend durch Astrozyten produziert, aber auch in Oligodendrozyten, Endothelzellen, Neuronen und Mikroglia wurde eine Erzeugung nachgewiesen, die vor allem bei Hypoxie hochreguliert wurde. [Kumral et al., 2011] Das EPO Level im ZNS ist unabhängig von der EPO Konzentration der Zirkulation. [Alnaeeli et al., 2012] Die EPO Produktion in diesen Zelltypen ist für die lokale Verwendung bestimmt. [Haase, 2013]

Der humane Erythropoietinrezeptor (EpoR) ist ein Homodimer aus zwei Transmembranglykoproteinen (59 kDa) [Jelkmann, 2010] und Mitglied der Zytokinrezeptorfamilie. [Chepelev und Willmore, 2011]

EpoR wird in einem hohen Ausmaß in Erythrozyten-Vorläuferzellen exprimiert, kommt aber auch in Organen wie Gehirn und Herz vor. Die Rezeptorexpression im Gehirn wurde beispielsweise für Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten, Gliazellen, Endothelzellen und andere Zelltypen nachgewiesen. [Alnaeeli et al., 2012], [Marti, 2004], [Chateauvieux et al., 2011]

EPO und EpoR werden in spezifischen Regionen im Gehirn des Embryonen und Erwachsenen exprimiert. EPO wird vornehmlich von den Astrozyten exprimiert, während der EpoR vermehrt in den Neuronen vorhanden ist. [Chateauvieux et al., 2011]

Das Vorkommen von EPO und EpoR bei der Entstehung des Gehirns im Embryonen und im Hirn des Erwachsenen kann auf eine mögliche Beteiligung bei der Entwicklung des Nervensystems und der Neuroprotektion hindeuten. [Alnaeeli et al., 2012]

Die neuronale Expression von EPO und EpoR erreicht während der Gehirnentwicklung seinen Höhepunkt und wird im Gehirn des Erwachsenen bei Hypoxie, akutem metabolischem Stress und nach Verletzung hochreguliert. [Sirén et al., 2009]

Abhängig vom Schweregrad der Hypoxie kann das EPO mRNA Level im Gehirn um das 2 bis 20-fache steigen, während im Vergleich dazu sich die Konzentration in der Niere um das 200-fache erhöhen kann. Des Weiteren sinkt der EPO Gehalt in verschiedenen Organen nach unterschiedlichen Zeitpannen wieder ab, somit besteht ein gewebespezifischer Regulierungsgrad. [Rabie und Marti, 2008]

Die EPO Produktion wird vorwiegend auf Transkriptionsebene geregelt. [Alnaeeli et al., 2012] Die Hauptaufgabe von EPO ist die Aufrechterhaltung der myeloischen Erythropoese durch Verhinderung der Apoptose, Stimulation der Proliferation und Differenzierung von Erythrozyten-Vorläuferzellen. [Jelkmann, 2010]

Es wird angenommen, dass die EPO Produktion im Gehirn zur Neuroprotektion beiträgt. [Reisi et al., 2012] So wurde gezeigt, dass EPO eine Vielzahl von

Zellantworten im Gehirn besitzt, die auf den Schutz und die Reparatur von Gewebe ausgerichtet sind. Zu den neuroprotektiven Mechanismen zählen die Inhibition der neuronalen Apoptose, Stimulation des Zellüberlebens und der Zelldifferenzierung, antiinflammatorische Effekte (vermutlich als indirekte Auswirkung der neuronalen Apoptosehemmung), antioxidative Wirkung durch die Aktivierung von zytosolischen antioxidativen Enzymen, Angiogenese, antiepileptische Wirkung und neurotrophische Wirksamkeit. [Kumral et al., 2011], [Alnaeeli et al., 2012]

Durch die Bindung von endogenem wie auch von exogenem EPO an den EpoR kann eine neuroprotektive Wirkung vermittelt werden. *In vitro* und *in vivo* Studien zeigten, dass dabei eine Erhöhung der Genexpression des EpoR in einigen Gehirnregionen den neuroprotektiven Effekt von EPO erhöhen kann. Nicht in allen Gehirnregionen wird der Rezeptor gleich stark exprimiert. Es wird angenommen, dass die Induktion des EpoR eine gewebesetzende Antwort auf eine Schädigung darstellt. *In vitro* Studien zeigen, dass sich die Genexpression von EpoR bei Hypoxie in kultivierten Zellen erhöht. Eine einmalige Hypoxiebehandlung im Tiermodell (Maus) führte zu keiner Expressionssteigerung des EpoR. Jedoch zeigt sich bei einer Wiederholung von Hypoxie im Tierversuch (Ratten) ein Anstieg des EpoR Genexpression vor allem in Neuron der ventralen, limbischen Region. [Sanchez et al., 2009]

Das Ausmaß der EpoR Expression an der Zelloberfläche bestimmt die EPO vermittelte Antwort. Die EpoR Expression und daher die EPO Signalkette im Gehirn sinkt mit dem Entwicklungsprozess beim Menschen. [Alnaeeli et al., 2012]

Die Bindung von EPO an den EpoR führt zur Induktion des erythropoietischen Stoffwechselweges. Die Affinität zum Rezeptor ist allgemein hoch. [Chateauvieux et al., 2011] EPO hat zwei Bindungsstellen für den EpoR. Eine Bindungsstellen 1, die mit hoher Affinität bindet ( $K_d \approx 1\text{nM}$ ) und eine Bindungsstelle 2, die mit niedrigerer Affinität bindet ( $K_d \approx 1\mu\text{M}$ ). Hämatopoetische Wirksamkeit erfordert die Bindung beider Bindungsstellen. Mutationen einer Bindungsstelle verhindert die hämatopoetische Wirkung von EPO. [Um et al., 2007] Es wird vermutet, dass noch ein weiterer EPO-Rezeptor mit einer geringeren Affinität existiert. [Chateauvieux et al., 2011] Dieser heteromere Rezeptor besteht aus demselben EpoR Monomer, jedoch

komplexiert mit einem common  $\beta$ -Rezeptor. [Brines, 2010] Die Existenz eines weiteren Rezeptors ist jedoch umstritten. [Sirén et al., 2009]

Nach der Bindung von EPO an den EpoR kommt es zu einer Konformationsänderung durch die eine Aktivierung der Janus family tyrosine kinase 2 (JAK2) Moleküle stimuliert wird. Durch EPO/JAK2 werden downstream mehrere Signaltransduktionswege aktiviert. [Sirén et al., 2009]

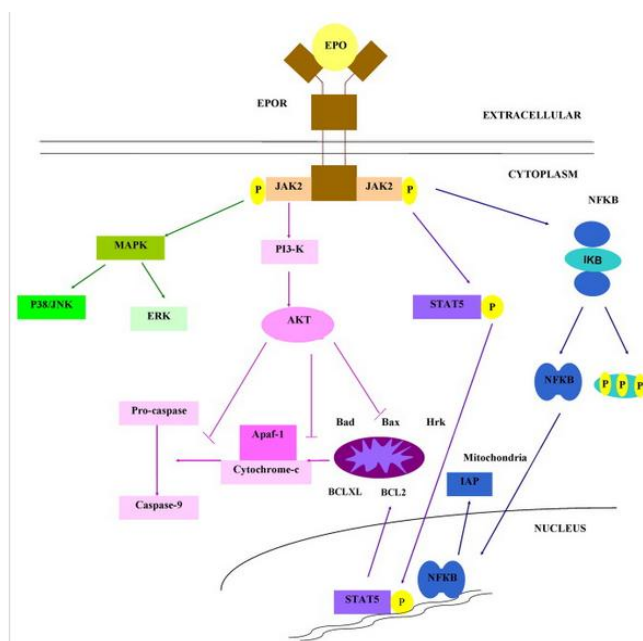


Abbildung 8: Übersicht der EPO Signalwege in neuronalen Zelle [Kumral et al., 2011]

EPO ist ein großes, hochglykosyliertes Molekül. [Sirén et al., 2009] Dennoch passiert EPO die Blut-Hirn-Schranke. [Sytkowski, 2011] Durch sein hohes Molekulargewicht überschreitet jedoch nur ein geringer Teil (ca. 1%) einer hohen intravenösen Dosis die Blut-Hirn-Schranke, wodurch hohe Dosen für eine neuroprotektive Wirkung erforderlich sind. Daher können die effektiven injizierten Gehirnkonzentrationen auch mit negativen Nebenwirkungen assoziiert sein. [Chateauvieux et al., 2011], [Sirén et al., 2009]

Das humane rekombinante EPO (rhEPO) besitzt die gleichen Eigenschaften wie das native EPO. [Chateauvieux et al., 2011] Bei peripherer Verabreichung passieren das rhEPO und einige EPO Derivate die Blut-Hirn-Schranke, stimulieren die Neurogenese und neuronale Differenzierung sowie die Aktivierung von neurotrophen, antiapoptotischen, antioxidativen und antiinflammatorischen Signalwegen. Durch diese Wirkungsweisen wird ein neuroprotektiver Effekt hervorgerufen. [Sirén et al., 2009]

Das rhEPO wird seit mehr als zwei Dekaden zur klinischen Behandlung von Anämie unter anderem ausgelöst durch chronische Nierenerkrankungen, antiviraler HIV-Therapie und Chemotherapie bei Krebspatienten eingesetzt. [Alnaeeli et al., 2012]

Die Sicherheit und Effizienz der Behandlung von verschiedenen neurologischen Erkrankungen mit EPO wird zurzeit in klinischen Studien an Patientenpopulationen vom Neugeborenen bis zum Erwachsenen getestet. Mehr Informationen für die optimale Behandlungsmethode (Dosis, Dosishäufigkeit und Dauer der Behandlung) mit EPO werden benötigt. [Kumral et al., 2011]

Um eine neuroprotektive Wirkung zu erzielen, muss EPO die Blut-Hirn-Schranke überschreiten, deshalb werden EPO Derivate entwickelt, die diese leichter passieren, mit reduzierten Nebenwirkungen und keiner hämatopoetischen Aktivität. [Chateauvieux et al., 2011] Eine modifizierte EPO Variante ist beispielsweise das CEPO (carbamoyleiertes EPO). CEPO ist ähnlich wie das rhEPO in Bezug auf die Halbwertszeit (ca. 4h nach intravenöser Gabe) und der biologischen Aktivität in Bezug auf den Gewebeschutz, jedoch ohne erythropoetische Wirkung. [Brines, 2010]

Die protektiven Effekte von EPO können von stimulierender Wirkung auf die Hämatopoese separiert werden. Dafür wurden EPO Derivate und Mimetika, wie asialo-EPO und carbamoyleiertes EPO, entwickelt, die derzeit in klinischen und vorklinischen Studien getestet werden. [Brines, 2010], [Sirén et al., 2009]

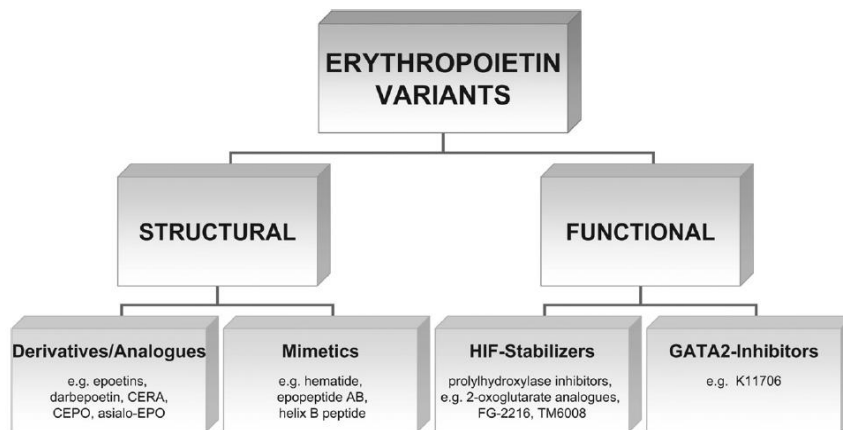


Abbildung 9: Klassifizierung von strukturellen und funktionellen Erythropoietin (EPO) Varianten [Sirén et al., 2009]

Neben den positiven Eigenschaften von EPO, werden auch negative Effekte beschrieben, so wird der EpoR in vielen Krebszelltypen exprimiert und auch eine Aktivierung der Tumorzellproliferation durch EPO wird diskutiert. Des Weiteren kann die Aufnahme von EPO eine Erhöhung von kardiovaskulären und thrombotischen Ereignissen auslösen. [Chateaufvieux et al., 2011]

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Zellkultur

Als Zellkultur wird die Kultivierung tierischer oder humaner Zellen, die aus einem Gewebeverband *in vivo* isoliert wurden, *in vitro* in einem geeigneten Nährmedium bezeichnet. [Gstraunthaler und Lindl, 2013] Die Zellen stammen aus einer Gewebeart, meist Tumorgewebe. Dieser Zelltyp kann in der Zellkultur unbegrenzt wachsen. Es werden allgemein immortalisierte Zelllinien wie auch primäre Zellen (Primärkultur, nicht immortalisierte Zellen, die direkt aus einem Gewebe gewonnen werden) verwendet. Außerdem unterscheidet man zwischen adhärenenten, semiadhärenenten und suspendierenden (nicht adhärenenten) Zelllinien.

Zell- und Gewebekulturen finden Anwendung in den verschiedensten Bereichen wie beispielsweise der Grundlagenforschung, der Medizin, der Biotechnologie, *in-vitro*-Toxizitätstests sowie der Isolierung und Kultivierung von Stammzellen. [Gstraunthaler und Lindl, 2013]

Besonders wichtig bei der Arbeit mit Zellkulturen ist die Eliminierung von potentiellen Kontaminationen durch Mikroorganismen wie beispielsweise Bakterien, Pilzen und Viren. Aus diesem Grund wird ausschließlich unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Zu den aseptischen Techniken gehören sterile Arbeitsbedingungen, Personenhygiene, sterile Geräte und Reagenzien sowie Zellkulturmedien.

Die Arbeit mit den Zelllinien findet in einem Sterilbereich, der sterilen Werkbank - Laminar Flow (SafeFAST Elite; FASTER), statt. Alle Gegenstände, die in diesem Bereich verwendet werden, die Arbeitsfläche sowie die getragenen Handschuhe, werden oberflächlich mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Thermostabile Materialien wie mit Watte gestopfte Glaspipetten, Pasteurpipetten und Glasflaschen werden bei einer Temperatur von 160°C für mindestens 8 Stunden bei trockener Hitze sterilisiert (WTB Binder). Pipettenspitzen und destilliertes Wasser werden autoklaviert (Certoclav) mit feuchter Hitze im gespannten, gesättigten Wasserdampf bei einer Temperatur von 120-140°C und einem Druck von 2 bar für ca. 50 Minuten.

Die Sterilfiltration durch verschiedene Einmalfiltereinheiten, z.B. Spritzenfilter mit einer Porengröße von  $0,22\mu\text{m}$  (Rotilabo) und  $0,20\mu\text{m}$  Druckfilter (Sartolab P plus, Sartorius), ermöglicht sterile Voraussetzung bei Reagenzien und Kulturmedium, die in direkte Berührung mit der Zellkultur kommen.

Bei der *in vitro* Züchtung von humanen und tierischen Zelllinien kommt es außerdem auf die Umgebungsbedingungen an, die denen *in vivo* möglichst nahe kommen sollten. Sie werden zum einen durch das die Zellen umgebende Medium simuliert und zum anderen durch die Konditionen im Brutschrank. In Abbildung 10 sind einige weitere Einflussfaktoren auf die *in vitro* Zellkultur aufgelistet.

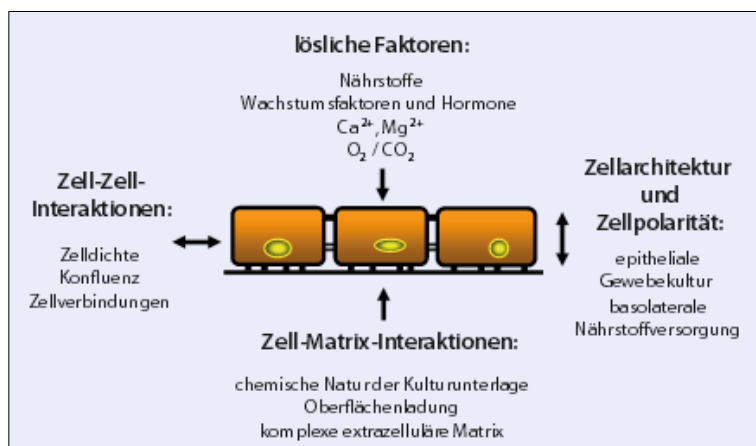


Abbildung 10: Einflussfaktoren auf *in vitro* Zellkulturen

Die Kultivierung der im Rahmen dieser Masterarbeit verwendeten Zelllinien erfolgt in  $12\text{ cm}^2$  sowie  $25\text{ cm}^2$  sterilen Kulturflaschen (Greiner Bio-One) in einem Brutschrank (Binder, New Brunswick Galaxy 170S) bei einer konstanten Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  und einer 5%igen  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre in sterilen Kulturflaschen. Für einen adäquaten Gasaustausch werden die Verschlüsse der Kulturflaschen um eine halbe Drehung offengelassen.



### 3.1.1 Zelllinien

Im Rahmen dieser Masterarbeit werden die zwei Zelllinien, SH-SY5Y und HepG2, verwendet.

#### SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y Zellen sind humane Neuroblastomzellen, ein Modell eingesetzt für humane Neuronalzellen. Der verwendete Zelltyp SH-SY5Y besteht aus einer Mischung aus Suspensions- und adhärenenten Zellen. Die Zellen wachsen als Cluster mit mehreren, kurzen, feinen Zellfortsätzen (Neuriten). Sie aggregieren, bilden Klumpen und schwimmende Zellen. SH-SY5Y Zellen sind eine der drei isolierten, geklonten Sublinien (SH-SY, SH-SY5, SH-SY5Y) der Zelllinie SK-N-SH, die 1970 durch Knochenmarksbiopsie eines 4-jährigen Mädchens mit Neuroblastom abgeleitet wurde. (Ross, Spengler, & Biedler, 1983) SH-SY5Y-Zellen haben eine Sättigungsdichte über  $1 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup>. Der Zelltyp hat Dopamin- $\beta$ -Hydroxylaseaktivität und kann Glutamat in den Neurotransmitter  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) umwandeln. Der Verlust von neuronalen Eigenschaften wird mit zunehmender Zahl an Passagen beschrieben, daher wird empfohlen mit der Zelllinie nicht über Passage 20 hinaus zu arbeiten. [„SH-SY5Y Cell Line human Neuroblast from neural tissue. | Sigma-Aldrich“, o. J.], [„Cell Lines | Life Technologies“, o. J.], [„SH-SY5Y ATCC ® CRL-2266™ Homo sapiens bone marrow neuroblast“, o. J.]

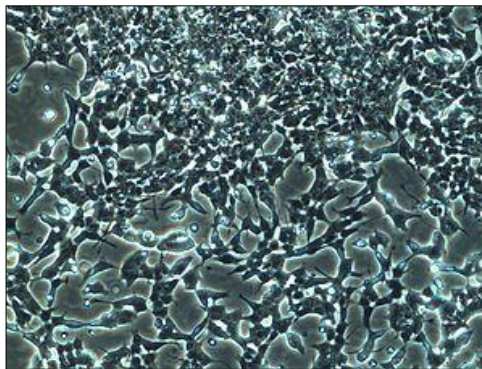


Abbildung 11: SH-SY5Y Zellen [„File:ReidoffringaSH-SY5Y1.jpg - Wikipedia, the free encyclopedia“, o. J.]

### HepG2-Zellen

HepG2 Zellen sind eine humane, hepatozelluläre Karzinomzelllinie. Sie sind adhärente, epithelähnliche Zellen und wachsen als Monolayer. Die HepG2 Zelllinie wurde aus dem Lebergewebe einer 15-jährigen, europäischstämmigen, männlichen Person mit einem differenzierten, hepatozellulären Karzinom gewonnen. HepG2 Zellen sezernieren Plasmaproteine wie Albumin, Transferrin, Fibrinogen,  $\alpha$ -2-Makroglobulin und Plasminogen. [„HepG2 (liver hepatocellular carcinoma): cell culture and transfection protocol“, o. J., S. 2]

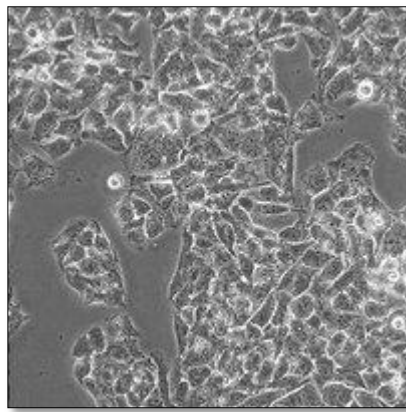


Abbildung 12: HepG2 Zellen [„CELL SEARCH SYSTEM“, o. J.]

### **3.1.2 Zellkulturmedium**

Das Kulturmedium ist der wichtigste Einzelfaktor bei der Züchtung von Zellen. Es besteht meist aus einem sogenannten Basalmedium, dem je nach Bedarf zusätzliche Faktoren, wie Serum oder Gewebeextrakte, Wachstumsfaktoren und Hormone, Vitamine und Spurenelemente oder weitere Aminosäuren und Nährstoffe hinzugefügt werden. Die Basalmedien sind auf der Grundlage einer isotonen Salzlösung (Balanced Salt Solution, BSS) aufgebaut. [Gstraunthaler und Lindl, 2013]

### **Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)**

Das DMEM Medium ist eine Modifizierung des Basalmediums nach Eagle (eines der ersten synthetischen Zellkulturmedien). DMEM enthält eine im Vergleich zum Basal Medium Eagle (BME) bis zu vierfache Konzentration an Aminosäuren und Vitaminen sowie anderen Zusatzkomponenten. [Gstraunthaler und Lindl, 2013]

### **DMEM/Ham's F-12**

Ham's F-12 (Ham, 1963) ist eine Weiterentwicklung von Ham's F-10. Der Gehalt an einigen Aminosäuren und an Zinksulfat ist erhöht. Außerdem wurden Putrescin und Linolsäure hinzugefügt. [Gstraunthaler und Lindl, 2013]

SH-SY5Y Zellen werden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/Ham's F-12 und HepG2 Zellen in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) jeweils samt der entsprechenden Zusätzen kultiviert.

### **3.1.3 Mediumherstellung**

Im Rahmen dieser Masterarbeit werden sowohl Fertigmedien (PAA Laboratories GmbH) als auch selbsthergestellte Medien aus einer Pulvermischung (Powdered Cell Culture Medium, PAA Laboratories GmbH) verwendet.



Abbildung 13: Fertigmedium DMEM/Ham's F-12 (PAA Laboratories GmbH)

Das Trockenmedium (Powdered Cell Culture Medium, PAA Laboratories GmbH) wird in ca. 80% des Endvolumens, dies entspricht etwa 8 Liter, destilliertem Wasser bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren auf dem Magnetrührer (IKA RCT basics) für ca. 1h vollständig gelöst. 12g  $\text{NaHCO}_3$  (1,2 g/l) werden dabei hinzugefügt. Danach wird der pH-Wert durch Zugabe von 1,2 M HCl auf 7,2-7,3 eingestellt (Lab 850, Schrott Instruments). Die Lösung wird auf ein Endvolumen von 10 Liter mit destilliertem Wasser aufgefüllt und erneut durchmischt. Unter sterilen Bedingungen wird das Medium mit Hilfe einer Schlauchpumpe (Masterflex, Cole Parmer Instrument Co.) durch einen 0,20µm Sterilfilter (Sartolab P plus, Sartorius) zu je 500ml in autoklavierte Glasflaschen abgefüllt. Die Lagerung erfolgt unter Lichtausschluss bei 4°C.

### 3.1.4 Mediumkompelementierung

Um ein optimales Wachstum der Zellen zu gewährleisten und eine mögliche Bakterienentwicklung zu verhindern, wird das Medium vor der Verwendung in der Zellkultur komplementiert.

Zu 450 ml Medium (DMEM/Ham's F-12; DMEM) werden unter sterilen Bedingungen folgende aliquote Zusätze zugegeben:

- 50 ml FBS (fetal bovine serum), nicht hitzeinaktiviert, (Biochrom)
- 5 ml L-Glutamin (2mM), (PAA Laboratories GmbH)
- 0,5 ml Gentamycin (50mg/ml), (GERBU Biotechnik GmbH)

Gentamycin ist ein Antibiotikum, das gegen gramnegative wie auch grampositive Bakterien wirksam ist. Bei Bedarf kann dem Medium Amphotericin B-Lösung (PAA Laboratories GmbH) in einer Konzentration von 2,5µg/ml (5ml/500ml Medium) zugefügt werden. Es ist effektiv gegen Pilzbefall und wird nur bei gefährdeten Kulturen eingesetzt. Die Verwendung von Antibiotika/Antimykotika hat jedoch einige Nachteile, wie beispielsweise Vernachlässigung der Steriltechnik, Bildung und Ausbreitung von Resistenzen, Verminderung der Aussagekraft der Versuchsergebnisse und zytotoxische Auswirkungen bei einer Verwendung von zwei oder mehr Antibiotika in Kombination.

Es wird empfohlen komplementiertes Medium innerhalb von vier Wochen zu verbrauchen, da Komponenten wie L-Glutamin in Lösung nicht stabil sind und mit der Zeit zerfallen und dadurch keine optimalen Wachstumsbedingungen mehr gegeben sind. [Gstraunthaler und Lindl, 2013]

### **3.1.5 Mediumwechsel**

Um das Wachstum und die Vitalerhaltung der Zellen zu gewährleisten, wird das Medium in regelmäßigen Abständen gewechselt, da Bestandteile des Mediums von den Zellen metabolisiert werden und dadurch die Konzentration an Nährstoffen sinkt und gleichzeitig der Gehalt an Stoffwechselendprodukten zunimmt. Des Weiteren gibt es Mediumkomponenten die im Brutschrank bei 37°C mit der Zeit zerfallen. Die Medien enthalten zusätzlich auch einen pH-Indikator (Methylrot), wodurch die Stoffwechselaktivität durch die pH-Wertänderung und somit die Verfärbung des Mediums von rötlich zu orange/gelb sichtbar wird.

Das Medium wird im Rahmen dieser Masterarbeit jeden zweiten bzw. dritten Tag gewechselt (Montag – Mittwoch – Freitag – Montag).

Vor dem Mediumwechsel wird das frische Medium von 4°C Lagertemperatur im Wasserbad auf ca. 37°C erwärmt. Danach wird die Mediumflasche mit 70%igem Ethanol abgewischt und trocken in den Laminar-Flow gestellt.

#### Mediumwechsel SH-SY5Y Zellen

Der Zelltyp SH-SY5Y besteht aus einer Mischung aus Suspensions- und adhärenenten Zellen. Beim Mediumwechsel wird deshalb nur die Hälfte des alten Mediums abgesaugt und wieder mit frischem, erwärmtem Medium aufgefüllt.

#### Mediumwechsel HepG2 Zellen

Bei den adhärenenten HepG2 Zellen wird das verbrauchte Medium komplett abgesaugt und frisches, erwärmtes Medium unmittelbar zugegeben.

### 3.1.6 Subkultivierung/ Passagieren der Zellen

Ist der gesamte Boden der Kulturflasche mit Zellen bedeckt, bezeichnet man diesen Zustand als Konfluenz. [Gstraunthaler und Lindl, 2013] In diesem Stadium besteht eine dichteabhängige Proliferationshemmung (Kontaktinhibition). Das regelmäßige Passagieren ist notwendig, damit die Zellen in einem teilungsfähigen Zustand bleiben und weiterhin ein logarithmisches Wachstum gegeben ist.

Für die Trypsinisierung, also das Lösen der Zellen von der Unterlage mit Hilfe von Trypsin oder Trypsin/EDTA – Lösung, werden alle verwendeten Substanzen im Wasserbad auf ca. 37°C erwärmt. Ganz allgemein löst Trypsin dabei die Zell-Matrix-Verbindung, während der Chelator EDTA die Zell-Zell-Verbindungen auflöst. [Gstraunthaler und Lindl, 2013] Unter sterilen Bedingungen wird zunächst das komplette Medium abgesaugt. Danach werden die Zellen mit ca. 2ml Trypsin/EDTA – Lösung (1x), (0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA) (PAA Laboratories GmbH) bedeckt und die Lösung vorsichtig verteilt, um restliches Medium wegzuwaschen und die Wirksamkeit der Trypsin/EDTA – Lösung (1x) zu erhöhen. Sofort danach wird die Trypsin/EDTA – Lösung (1x) entfernt und erneut werden ca. 2ml Trypsin/EDTA – Lösung (1x) auf die Zellen pipettiert. Unmittelbar darauffolgend werden die Kulturflaschen für das Lösen der Zellen vom Boden in den Inkubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) gestellt. Dabei sollte die Einwirkzeit möglichst kurz gehalten werden. Längerer Kontakt mit Trypsin/EDTA – Lösung (1x) kann die Zellen irreversibel schädigen. [Gstraunthaler und Lindl, 2013] Für die sich leicht lösenden SH-SY5Y Zellen ist eine Einwirkzeit von zwei bis vier Minuten ausreichend. Die HepG2 Zellen haften fester am Flaschenboden und benötigen eine Inkubationsdauer von ca. zehn Minuten. Hartnäckig festsitzende Zellen können durch direktes daraufpipettieren mit Trypsin/EDTA – Lösung (1x) abgetrennt werden. Nachdem sich alle Zellen abgelöst haben, wird die Trypsinisierungsreaktion durch Zugabe von frischem Medium gestoppt und neutralisiert. Um die Zellen zu vereinzeln und Klumpenbildung zu vermeiden, kann das Medium mit den Zellen mehrmals auf- und abgesaugt werden. Anschließend werden die Zellen gezählt und durch Zugabe von frischem Medium wird die gewünschte Zelldichte eingestellt. Nun können die Zellen in einer neuen Kulturflasche weitergezüchtet oder für die Versuche ausgesetzt werden.

Bei den SH-SY5Y Zellen wird eine Subkultivierung in einem Verhältnis von 1:20 bis 1:50 ab einer Zellkonzentration von  $8 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> empfohlen. [„SH-SY5Y ATCC ® CRL-2266™ Homo sapiens bone marrow neuroblast“, o. J.]

Bei der Zelllinie HepG2 wird geraten im Verhältnis 1:4 alle drei Tage zu splitten oder im Verhältnis 1:8 alle sechs Tage. [„HepG2 (liver hepatocellular carcinoma): cell culture and transfection protocol“, o. J.]

### **3.1.7 Zellzählung – Bestimmung der Zellzahl**

Die Zellzahl spielt bei der Wachstumsgeschwindigkeit von adhärennten Zellen eine große Rolle. Bei einer zu dünnen Zelldichte wachsen die Zellen nur sehr langsam, während zu dicht ausgesetzte Zellen sofort wieder Konfluenz erreichen. [Gstraunthaler und Lindl, 2013] Auch für die Aussagekraft und Vergleichbarkeit der Experimente ist es notwendig immer eine konstante Zelldichte auszusetzen. Deshalb werden alle Zellen, die zuvor in Suspension gebracht werden, mittels des automatischen Mikrozellzähler CC-108 (Sysmex) gezählt.

Für die Zellzählung wird in der Sterilwerkbank ca. 1 ml der Zellsuspension in ein Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf) pipettiert. Die Zellzählung erfolgt unter nicht-sterilen Bedingungen, indem 200 µl der Zellsuspension in ein spezielles Zellzählergefäß pipettiert und mit 9,8ml Zellzählerflüssigkeit (Cellpack PK-30, Sysmex) vermischt werden. Die automatische Zellzahlbestimmung erfolgt zweimal in direkt aufeinanderfolgenden Messungen. Die Zellzahl wird in Millionen Zellen/ ml angegeben.

### 3.1.8 Kryopreservation - Einfrieren der Zellen

Zellen können bei schonendem Einfrieren in flüssigem Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) nahezu unbegrenzt gelagert und bei Bedarf jederzeit wieder aufgetaut werden. [Gstraunthaler und Lindl, 2013] Die Lagerung bewahrt die Zellen beispielsweise vor Kontamination und Alterung, somit ist auch gewährleistet, dass es immer Zellen auf Vorrat gibt.

Für die Kryopreservation werden zu Beginn die benötigten Kryoröhrchen (Cryovial) für 15 Min. im Kühlschrank oder auf Eis gekühlt. Die Zellen werden nach dem Trypsinisieren und der Zellzählung bei  $250 \times g$  für 5 Min. bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415 R). Der Überstand wird unter sterilen Bedingungen abgesaugt und das Zellpellet wird im kryoprotektiven, komplementiertem Medium (komplementiertes DMEM/Ham's F-12 oder DMEM + 10% (v/v) DMSO (Sigma Aldrich)) resuspendiert. DMSO (Dimethylsulfoxid) dient dabei als Frostschutzmittel, indem es das Zellwasser bindet oder ersetzt, wird die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zellen sowie die teilweise Dehydration des Zytoplasmas verhindert. (Gstraunthaler & Lindl, 2013) Die Zellen werden auf eine Dichte von ca. 2 Millionen Zellen/ml eingestellt. 1-1,5 ml der Zellsuspension werden in jedes gekühlte Kryoröhrchen transferiert, um anschließend die Kryoröhrchen in einen speziellen mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter zu platzieren (Nalgene Cryo  $1^{\circ}\text{C}$  Freezing Container). Dieser bewirkt ein langsames Herunterkühlen der Temperatur von  $-1^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$  im  $-80^{\circ}\text{C}$  Tiefkühler. Nach 80 Stunden können die Kryoröhrchen in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  zur weiteren Lagerung transferiert werden.



Abbildung 14: Nalgene Cryo  $1^{\circ}\text{C}$  Freezing Container



### 3.1.9 Auftauen der Zellen

Im Gegensatz zum Einfrieren sollte das Auftauen schnell erfolgen. Die Kryoröhrchen werden dem Stickstoffbehälter entnommen und 1-2 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und unmittelbar danach in einem 37°C Wasserbad erwärmt bis die Zellsuspension vollständig aufgetaut ist. Danach wird die Suspension unter sterilen Bedingungen in einer Zellkulturflasche mit 10ml komplementiertem Medium verdünnt. Nun gibt es zwei Möglichkeiten. Zum einen können die Zellen sofort in den Inkubator platziert werden. Am darauffolgenden Tag wird das Medium gewechselt, um das Kryomedium noch weiter zu verdünnen. Zum anderen kann die verdünnte Zellsuspension in einem 15ml Röhrchen bei 250 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert werden. Der Überstand wird danach abgesaugt und das Zellpellet wird mit frischem, komplementiertem Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche transferiert und im Brutschrank platziert. Dadurch ist gewährleistet, dass das Kryomedium vollständig entfernt wird, jedoch kann es auch zu einem Verlust an Zellen kommen.

### 3.1.10 Inkubation der Zellen

Für die Inkubation werden die in Zellkulturflaschen kultivierten Zellen zunächst trypsinisiert, gezählt und auf eine Zellzahl von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Die Zellen werden für die verschiedenen Versuche unterschiedlich ausgesetzt.

Für die LIP-Messung werden 200µl/Well der Zellsuspension in spezielle sterile 96-Wellplatten pipettiert, um eine Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/Well zu erreichen. Die HepG2 Zellen werden ausschließlich auf ungecoatete Platten ausgesetzt. Für die SH-SY5Y Zellen werden sowohl ungecoatete Platten als auch für einen festeren Halt auf dem Plattenboden mit 0,1% Gelatine gecoatete Platten verwendet. Dazu verdünnt man 1%ige Gelatine mit destilliertem Wasser auf 0,1%. 150µl/Well der 0,1%igen Gelatine werden verwendet und nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur abgesaugt. Anschließend können die Zellen in die gecoateten Platten ausgesetzt werden.

Für den Ferritin-ELISA werden 2 ml/Well der Zellsuspension in 6-Well-Platten (Sigma-Aldrich GmbH) verwendet, um eine Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/Well einzustellen.

Die ausgesetzten Zellen werden 24 bis 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5%-iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Alle Arbeitsschritte werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Vor der Inkubation mit den Reagenzien wird das Medium abgesaugt und anschließend wird auf die Zellen Kontrollemidum bzw. Inkubationsmedium mit den Versuchssubstanzen (DMOG [1mM], DMOG [0,5 mM], EPO [3,3 U/ml], DMOG [1mM] + EPO [3,3 U/ml]) pipettiert. Danach erfolgen je nach Versuch unterschiedliche Inkubationsperioden (3 Stunden, 6 Stunden, 24 Stunden) im Brutschrank bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

Vor der Inkubation mit den vorbereiteten Substanzen wird bei den zuvor in spezielle 96-Well-Platten oder 6-Wellplatten ausgesetzten Zellen unter sterilen Bedingungen das Medium abgesaugt. Unmittelbar danach werden die Zellen mit 1ml/Well (6-Well-Platte) der verschiedenen Inkubationslösungen behandelt und erneut bei 37°C und 5%-iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre für 2h, 6h oder 24h inkubiert.

### **3.1.10.1 Inkubation mit Dimethyloxalylglycin**

Dimethyloxalylglycin (DMOG) (Cayman Chemicals) ist ein zelldurchlässiger, kompetitiver Inhibitor des sauerstoffsensitiven Enzyms HIF-1 $\alpha$  Prolylhydroxylase (HIF-PHD) und stabilisiert somit die HIF-1 $\alpha$  Expression bei normalem Sauerstoffgehalt in Zellkulturen in Konzentrationen zwischen 0,1mM und 1mM. [„DMOG • Dimethyloxalyl Glycine (CAS 89464-63-1) || Cayman Chemical | Supplier“, o. J.]

DMOG (MW 175,1 g/mol) wird als kristalliner Feststoff geliefert und für die biologischen Experimente in PBS (1x) (pH 7,3) (phosphate buffered saline) gelöst. Die Lösung wird sofort verwendet. Die Lagerung von DMOG als Feststoff erfolgt bei -20°C.

Herstellung von PBS (5x) PBS (1x), (pH 7,3)

NaCl (Carl Roth GmbH + Co. KG)	80 g
KCl (Merck)	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck)	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O (Merck)	30 g
H <sub>2</sub> O dest.	Ergänzung auf 2 Liter
pH Wert einstellen	7,3

Tabelle 1: Herstellungsanleitung PBS (5x), pH 7,3

Für die Herstellung des PBS (1x) wird PBS (5x) (pH 7,3) mit destilliertem Wasser 1:5 verdünnt. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

Im Rahmen dieser Masterarbeit wird das in PBS (1x) gelöste DMOG in Konzentrationen von 1mM und 0,5mM verwendet.

Stammlösung →	2mg DMOG gelöst in 200µl PBS (1x)
DMOG [1mM] →	9,83ml Medium (DMEM/Ham's F-12 oder DMEM) + 170µl Stammlösung (DMOG in PBS (1x)), sterile Filtration durch 0,22µm Einmalfilter
DMOG [0,5mM] →	1:2 Verdünnung von DMOG [1mM] mit Medium (DMEM/Ham's F-12 oder DMEM), 5ml DMOG [1mM] + 5ml Medium (DMEM/Ham's F-12 oder DMEM)

### 3.1.10.2 Inkubation mit Erythropoietin

Die Lieferung von Erythropoietin (EPO) erfolgt als 0,3ml-Injektion (2000U) (NeoRecormon). Für die Versuche wird eine Konzentration von 3,3U/ml verwendet. EPO wird bei 4°C gelagert.

Stammlösung	2000U/300µl
→	6,66U/µl
→	19,9U/6ml
→	3,3U/ml
	3µl EPO (2000U) + 6ml Medium
	(DMEM/Ham's F-12 oder DMEM)

### 3.1.10.3 Inkubation mit Dimethyloxallylglycin und Erythropoietin

Außerdem werden die Zellen mit der Kombination aus DMOG [0,5mM] und EPO [3,3U/ml] inkubiert.

DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml]	3µl EPO (2000U) + 12ml Medium (DMEM/Ham's F-12 oder DMEM)
------------------------------	---

### 3.1.11 Herstellung des Lysispuffers

Der NP40 Lysispuffer wird zur Ablösung der Zellen vom Wellboden eingesetzt. Die Komplementierung des NP40 Puffers erfolgt durch die Zugabe des Protease-Inhibitors Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF). Dafür wird auf dem Magnetrührer (IKA RCT basic) bei einer Geschwindigkeit von ca. 300 U/min. bei Raumtemperatur 10µl PMSF in 10ml NP40 Puffer pipettiert, um eine Suspension zu erhalten.

### 3.1.12 Ernten der Zellen

Alle Schritte werden beim Ernten der Zellen auf Eis durchgeführt, um abbauende Enzyme wie Proteasen und den Zellstoffwechsel zu verlangsamen. Dabei kann unter nicht-sterilen Bedingungen gearbeitet werden.

Nach Ablauf der vorgesehenen Inkubationszeit (2h, 6h oder 24h) werden die 6-Well-Platten auf Eis gestellt und das Medium abgesaugt. In jedes Well wird nun langsam, seitlich 1ml PBS (1x) pipettiert, um die Inkubationslösungen und extrazelluläres Ferritin zu entfernen. Nach Wegsaugen des PBS (1x) wird 50µl/Well des zuvor komplementierten NP40 Lysispuffer hinzugegeben. Während der Einwirkzeit des Lysispuffers kann man die eisgekühlten Wells zur besseren Ablösung der Zellen zusätzlich auf einen Belly Dancer (Stovall Life Science INC) kreisförmig bewegen. Nachdem sich die Zellen vom Boden abgetrennt haben, wird der Lysispuffer von einem Duplikatwell in ein anderes Well mit gleicher Behandlung pipettiert, so dass man ein Endvolumen von 100µl erhält. Die Zellen können zusätzlich mit einem speziellen Zellschaber (Greiner Bio-One) vom Well-Boden abgetrennt werden. Die jeweils 100µl/Well Zellsuspension werden danach in vorher vorbereitete und gekühlte 1,5ml Eppendorftubes transferiert. Zum Zellaufschluss, also dem Lysieren der Zellen und Freisetzung innerer Komponenten, wird die Zellsuspension wenige Sekunden Ultraschall (Branson Sonic Power Company) ausgesetzt. Im Anschluss werden die Zellsuspensionen bei 10000 x g bei 4°C für 12 min. zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415 R). Der Überstand wird drauf in ein 1,5ml Eppendorftube überführt und daraus werden drei 20µl Aliquote entnommen und in neue Eppendorfgefäße transferiert, um sie für kurze Zeit bei -20°C und über einen längeren Zeitraum bei -80°C zu lagern.

### 3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration wässriger Lösungen erfolgt photometrisch nach der Methode von Bradford (1976) basierend auf dem Prinzip der Protein-Farbstoffbindung.

Die Methode basiert auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G-250 an die Seitenketten von Aminosäuren/Aminogruppen in Proteinen. In saurem Milieu kommt es als Folge der Komplexbildung zu einem Farbumschlag von braun nach blau-braun bzw. blau und einer messbaren Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm (oder 600 nm). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm wird photometrisch detektiert. [Bradford, 1976]

Die Proteinkonzentration wird anhand einer mit Bovine Serum Albumin (BSA) erstellten Eichkurve (Konzentrationsbereich von 2 µg/ml bis 10 µg/ml) ermittelt. Zunächst verdünnt man die BSA Stammlösung (1mg BSA/ml) im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser (100µl BSA Stammlösung + 900µl H<sub>2</sub>O dest.). Als Leerwert wird destilliertes Wasser verwendet. Die Durchführung erfolgt im Doppelansatz.

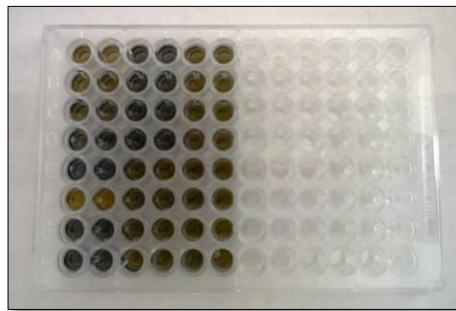
BSA Lösung (1:10 Verdünnung)	H <sub>2</sub> O dest.	Konzentration
20 µl	780 µl	2 µg/ml
40 µl	760 µl	4 µg/ml
60 µl	740 µl	6 µg/ml
80 µl	720 µl	8 µg/ml
100 µl	700 µl	10 µg/ml

Leerwert	800 µl H <sub>2</sub> O dest.
----------	-------------------------------

Tabelle 2: Pipettierschema für die Standardreihe der Proteinbestimmung

Die eingesetzten Proben (Zelllysate je nach Proteingehalt 2-2,5µl) werden mit destilliertem Wasser auf 800µl aufgefüllt. Die Standards, Leerwerte und Proben werden

für den Start der Farbreaktion mit 200µl Bradford-Reagenz versetzt. Je 200µl der Standards, Leerwerte und Proben werden innerhalb von 20 Minuten (maximal 40 Minuten) bei Raumtemperatur (18-25°C) in eine 96-Wellplatte transferiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm (oder 600 nm) photometrisch (VICTOR<sup>2</sup>) gemessen.



Abbildungen 15 und 16: Proteinbestimmung nach Bradford in Mikrotiterplatte, VICTOR<sup>2</sup> Photometer

### Auswertung

Die Proteinkonzentrationen der unbekannten Proben werden anhand der Standardkurve mittels GraphPadPrism Version 5 berechnet. Das Ergebnis wird in µg Protein der Probe/eingesetzte µl Zelllysate angegeben.

### 3.3 Anti-Calcein-Antikörper: Antikörperproduktion und -gewinnung

Um einen Antikörper gegen Calcein zu produzieren wird Calcein-Thyroglobulin-Konjugat als Antigen verwendet.

Die Induktion der Antikörperbildung in einem Kaninchen erfolgt durch wiederholte subkutane Injektion des Calcein-Thyroglobulin-Konjugates nach folgendem Schema:

1. Injektion: 0,5ml Calcein-Thyroglobulin + 0,5ml komplettes Adjuvans
2. Injektion: 0,5ml Calcein-Thyroglobulin + 0,5ml unvollständiges Adjuvans (zwei Wochen nach der ersten Injektion)
3. Injektion: 0,5ml Calcein-Thyroglobulin + 0,5ml unvollständiges Adjuvans (zwei Wochen nach der zweiten Injektion)

Die erste Blutung wird 10-14 Tage nach der dritten Injektion durchgeführt.

#### Fraktionierung des Antikörpers aus dem Serum

Die Fraktionierung von IgG aus dem Serum erfolgt mit Hilfe von 20ml 77,7%igem gesättigtem Ammoniumsulfat (25g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/50\text{ml H}_2\text{O}$ , pH-Wert mit verdünntem  $\text{NH}_3$  auf 7,2-7,4 eingestellt), das zu 30ml Serum dazugegeben und unter ständiger Bewegung auf dem Belly Dancer (Stovall Life Science Inc) bei Raumtemperatur für mindestens eine Stunde inkubiert wird. Anschließend wird die Lösung für 20-30 Minuten bei 22°C und 5000 x g (Eppendorf Zentrifuge 5415 R) zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Proteinpellet in 300µl PBS (1x) resuspendiert und gevortext bis es sich aufgelöst hat. Danach wird die Lösung in einen vorgequollenen Dialyseschlauch (Spectrum Laboratories Inc) transferiert und gegen zwei Liter PBS (1x) für drei Tage unter ständiger Bewegung bei 4°C dialysiert, um das Ammoniumsulfat zu entfernen. Nach jeweils 24 Stunden muss das PBS (1x) erneuert werden. Anschließend wird das Dialysat (ca. 7ml) mit bereits vorhandenem Antikörper in Bezug auf die Fähigkeit die Fluoreszenz von Calcein zu quenchen, verglichen (mittels Funktionstest des Anti-Calcein-Antikörpers, siehe unten) und falls nötig mit PBS (1x) verdünnt. Für



die Aufbewahrung werden ca. 35µl 0,02% NaN<sub>3</sub> dazugegeben. Die Lagerung des Antikörpers erfolgt bei 4°C.

### **Funktionstest des Anti-Calcein Antikörpers**

Für den Funktionstest des frisch hergestellten Anti-Calcein Antikörpers werden zu 4µl der IgG Fraktion 1ml Calcein-Puffer [0,1nM] dazugemischt (also ca. 5µl AK/ml Calcein-Puffer), um die Auslöschung der Fluoreszenz zu testen (Perkin Elmer LS 50B – Excitation wavelength: 488nm / Emission wavelength: 517nm / Excitation and Emission slit: 10nm).

Um Calcein-HBS-Puffer [0,1nM] zu erhalten werden 31,125mg Calcein (Sigma) in 5ml HBS-Puffer (HEPES buffered saline, 20mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (Merck) und 150mM NaCl (Carl Roth GmbH + Co.KG, pH 7.4) gelöst und mit 5%igem Serdolit CHE (Serva) behandelt, um eine eisenfreie Lösung zu erhalten.

## **3.4 CAL-Methode - LIP-Messung**

Die CAL-Methode ist ein fluoreszenzspektroskopisches Verfahren zur Quantifizierung des labilen Eisenpools (LIP).

Die Methode verwendet einen sensitiven, fluoreszierenden Eisenchelator als Indikator für die intrazelluläre Eisenkonzentration. Sie ist wenig invasiv und ermöglicht die Messung in lebenden, intakten Zellen. (Kruszewski, 2003)

Das Verfahren besteht aus zwei Messschritten.

1. Die Zellen werden mit dem nicht-fluoreszierenden und membranpermeablen Calcein-Acetoxymethylester (CAL-AM), einem Calceinderivat, beladen. Erst nach Aufnahme in die Zelle wird der Ester gespalten und es entsteht das fluoreszierende Calcein (CAL),

ein Fluorescein konjugiert mit einer EDTA-ähnliche Einheit (Ethylendiamintetraacetat). Das vorhandene Eisen bindet an das fluoreszierende CAL, wodurch dessen Fluoreszenz gequencht wird. Die Bildung des CAL-Eisen-Komplexes und damit das Quenching der Fluoreszenz ist direkt proportional zur intrazellulären LIP Konzentration. Anti-Calcein Antikörper werden hinzugefügt, um extrazelluläres CAL zu binden und sicherzugehen, dass die Reaktion nur intrazellulär stattfindet. Anschließend erfolgt die erste Fluoreszenzmessung.

2. Im zweiten Schritt wird der Eisenchelator Salicylaldehydisonicotinoylhydrazon (SIH) hinzugefügt um das an CAL gebunden Eisen zu binden, wodurch CAL wieder freigesetzt wird und es zu einer Zunahme der Fluoreszenz kommt. Somit kann durch die Zugabe von SIH die Menge an zellassoziiertem CAL-Eisen-Komplex ermittelt werden. Unmittelbar danach wird die zweite Fluoreszenzmessung durchgeführt.

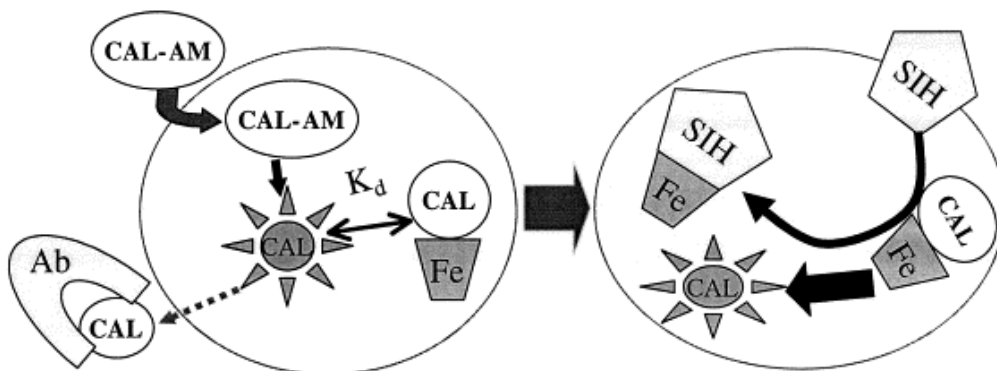


Abbildung 17: Prinzip der CAL-Methode zur Messung des LIPs [Kakhlon und Cabantchik, 2002]

Metalle wie Calcium (Ca) oder Magnesium (Mg) beeinflussen die CAL-Fluoreszenz nicht. Kupfer (Cu) (1+, 2+) kommt in der Zelle nicht in labiler Form vor und wird im Zusammenhang mit dem Fluoreszenz-Assay kaum von der Zelle durch SIH mobilisiert. Somit beeinflusst Cu, das bei geschädigten Zellen vermehrt freigesetzt wird, nicht die LIP Messung. Auch pH-Werte im Bereich von 6,5 – 7,5 haben nur einen geringen Einfluss auf die CAL-Fluoreszenz. [Kakhlon und Cabantchik, 2002]

## Vorbereitung der Versuchslösungen

Für die LIP-Messungen mit SH-SY5Y Zellen wird DMEM/Ham's F12 „0 Medium“ und für die Versuche mit HepG2 Zellen DMEM „0 Medium“ verwendet.

### Verwendete Stammlösungen:

#### 1. 2-[4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl]-ethansulfonsäure - HEPES (400 mM, pH 7,3)

- für 100 ml: 9,5 g HEPES in destilliertem Wasser lösen
- pH 7,3 einstellen
- auf 100 ml mit destilliertem Wasser auffüllen
- steril filtrieren
- bei 4°C lagern

#### 2. Diethylentriaminpentaessigsäure - DTPA (5 mM, pH 7,3)

- für 100 ml: 197 mg DTPA in destilliertem Wasser lösen
- pH 7,3 einstellen
- auf 100 ml mit destilliertem Wasser auffüllen
- steril filtrieren
- bei 4°C lagern

#### 3. Salicylaldehyd Isonicotinoyl Hydrazon - SIH (2,5 mM)

- 21 mg SIH-Pulver in 18 ml DMSO (Dimethylsulfoxid) und 22 ml destilliertem Wasser lösen
- bei -20°C lagern

**Substanzen für den Versuch mit SH-SY5Y Zellen:****1. DMEM/Ham's F12 „0 Medium“ mit 20 mM HEPES**

- je ml DMEM/Ham's F12 „0 Medium“ werden 50 µl HEPES (Stammlösung: HEPES 400 mM, pH 7,3) zugesetzt
- für eine vollbesetzte 96 Wellplatte:
  - 30 ml DMEM/Ham's F12 „0 Medium“ mit 1,5 ml HEPES (Stammlösung: HEPES 400 mM, pH 7,3) versetzen

**2. DMEM/Ham's F12 „0 Medium“ mit 50 µM DTPA**

- je ml DMEM/Ham's F12 „0 Medium“ werden 10 µl DTPA (Stammlösung: DTPA 5 mM, pH 7,3) zugesetzt
- für eine vollbesetzte 96 Wellplatte:
  - 20 ml DMEM/Ham's F12 „0 Medium“ mit 200 µl DTPA (Stammlösung: DTPA 5 mM, pH 7,3) versetzen

**3. SIH 100 µM**

- 1:10 Verdünnung 10 µl SIH (2,5 mM) in 240 µl DMEM/Ham's F12 „0 Medium“/HEPES lösen
- für eine vollbesetzte 96 Wellplatte:
  - 1 ml DMEM/Ham's F12 „0 Medium“/HEPES mit 41 µl SIH (Stammlösung: SIH 2,5 mM) versetzen

**4. Calcein- Acetoxymethylester – CAL-AM (0,25 µM)**

- 50 µg Pulver in 100 µM DMSO (Sigma Glasphiole, wasserfrei) lösen, lichtgeschützt arbeiten und gut vortexen
- 10 µl in Eppendorftubes abfüllen
- licht- und feuchtigkeitsgeschützt bei -20°C lagern
- für den Versuch: 1:4 Verdünnung CAL-AM mit HEPES
- für eine vollbesetzte 96 Wellplatte
  - 16 ml DMEM/Ham's F12/HEPES mit 8 µl CAL-AM

### 5. Anti-Calcein Antikörper (AK) (3.Blutung)

- je ml DMEM/Ham's F12 „0 Medium“/HEPES werden 10 µl Anti-Calcein-AK (fraktioniert durch Ammoniumsulfatfällung, 3.Blutung) verwendet
- für eine vollbesetzte 96 Wellplatte:
  - 10 ml DMEM/Ham's F12 „0 Medium“/HEPES mit 100 µl Anti-Calcein-AK

### **Versuchsaufbau und -durchführung**

SH-SY5Y Zellen werden in komplementiertem DMEM/Ham's F 12 (10% FBS nicht hitzeinaktiviert, 1% L-Glutamin (200 mM), 0,1 % Gentamycin (50 mg/ml)) kultiviert, trypsinisiert mit Trypsin (1x, 0,25% in PBS), auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen eingestellt und 200 µl/Well in eine sterile, schwarze 96-Well-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One) ausgesetzt. Nach 48 Stunden werden die Zellen mit DMOG [1 mM], DMOG [0,5 mM], EPO [3,3 U/ml] sowie DMOG [0,5 mM] + EPO [3,3U/ml] für 2 Stunden, 6 Stunden und 24 Stunden inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wird das Medium entfernt und die Zellen einmal mit 150 µl DTPA (50 µM, pH 7,3)/ DMEM/Ham's F 12 „0 Medium“ für 5 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) behandelt. Danach folgen zwei Waschschrte mit 200 µl DMEM/Ham's F 12 „0 Medium“. Anschließend werden 100 µl CaAM (0,25 µM) pro Well pipettiert und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Darauf folgend werden die Zellen erneut einmal mit 100 µl DMEM/Ham's F 12 „0 Medium“ gewaschen. Im nächsten Schritt werden die Zellen mit 100 µl HEPES (20 mM, pH 7,3)/ DMEM/Ham's F 12 „0 Medium“ + Anti-Calcein AK (3.Blutung) inkubiert.

Als nächstes folgt die erste Messung der Calceinfloureszenz in vier aufeinanderfolgenden Zyklen (vierfach Kinetik) bei 37°C (Anthos Zenyth 3100/ excitation 485 nm, emission 535 nm).

Nun werden 10 µl vorverdünnte SIH-Lösung zu den 100 µl/Well zugesetzt und nach 3 Minuten bei 37°C erneut die Caceinfloureszenz im zweiten Messschritt in vier

aufeinanderfolgenden Zyklen (vierfach Kinetik, Anthos Zenyth 3100/ excitation 485 nm, emission 535 nm) bestimmt.



Abbildungen 18 und 19: Spezielle 96-Well-Mikrotiterplatte (schwarz mit transparentem Boden) für die LIP Messung, Anthos Zenyth 3100

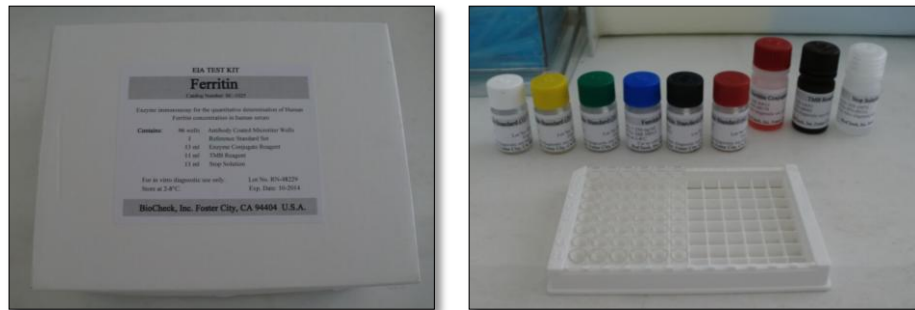
Das Ausmaß der Fluoreszenzänderung zwischen den zwei Messschritten ermöglicht eine Berechnung des gesamten zellulären, calceingebunden Eisens und somit eine Quantifizierung des LIP.

### Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgt mittels Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft Office) und dem Statistikprogramm GraphPadPrism Version 5. Die Differenz zwischen zweiter und erster Fluoreszenzmessung wird berechnet und der Mittelwert der unbehandelten Kontrollen auf 100% normiert. Um signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen und den behandelten Zellen zu bestimmen, wird der ungepaarte t-Test verwendet. Signifikante Unterschiede werden angegeben mit \*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ) und \*\*\*( $p < 0,001$ ).

### 3.5 Ferritin Enzym-linked Immunosorbent Assay

Der Ferritin Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) (BioCheck, Inc.) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren für die quantitative Bestimmung von humanem Ferritin.

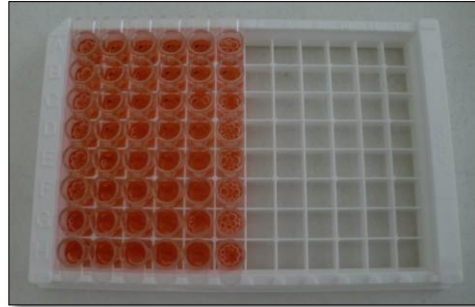


Abbildungen 20 und 21: Ferritin Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Testkit (BioCheck, Inc.)

Das verwendete Testkit bietet eine schnelle, sensitive und zuverlässige Quantifizierung einer minimalen humanen Ferritinkonzentration von bis zu 5,0 ng/ml und einer minimalen Kreuzreaktion mit humanem Serumalbumin, Alpha-Fetoprotein, humanem Hämoglobin, humanem Transferrin und Eisenchlorid. Bei Nichtgebrauch wird das Test Kit bei 2-8°C gelagert. Vor der Verwendung des Tests sollten alle Reagenzien Raumtemperatur (18-25°C) erreichen und durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Proben, bei denen Werte über 1000 ng/ml zu erwarten sind, sollten vorher mit dem Nullstandard (destilliertes Wasser) verdünnt werden. Eine Anfangsverdünnung von 1:10 wird empfohlen.

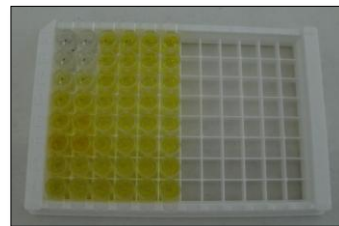
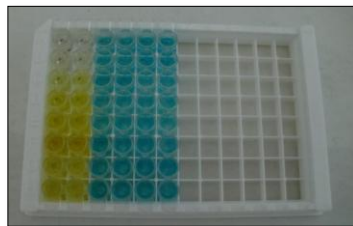
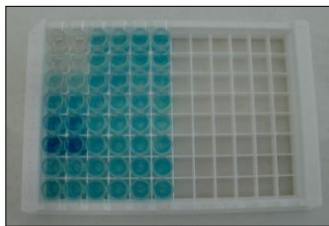
Das Prinzip des Tests basiert auf der Grundlage des Sandwich-ELISAs. Es werden zwei Antikörper verwendet, die spezifisch an das nachzuweisende Ferritin binden. Dafür wird bei diesem Test Kaninchen Anti-Ferritin als feste Phase (Mikrotiterplatte mit 96-Wells) und Maus monoklonal Anti-Ferritin in der Antikörper-Enzym (Meerrettichperoxidase) Konjugationslösung benutzt. Die Probe reagiert mit den Antikörpern, so dass die Ferritinmoleküle zwischen der festen Phase und den Enzymgekoppelten Antikörpern gebunden werden. Es entsteht ein Sandwich. Vor Beginn des Tests wird die benötigte Anzahl an gecoateten Wells in der Halterung

befestigt. 20  $\mu$ l/ Well der Standards, Proben und Kontrollen werden benötigt und anschließend 100  $\mu$ l/Well Enzymkonjugationsreagenz hinzupipettiert. Anschließend wird vorsichtig für 30 Sekunden gemischt. Es folgt eine Inkubationsphase von 45 Minuten bei Raumtemperatur(18-25°C).



Abbildungung 22: Ferritin ELISA. Gecoatete Wells in der Halterung mit 20  $\mu$ l/ Well der Standards, Proben und Kontrollen und 100  $\mu$ l/Well Enzymkonjugationsreagenz

Danach wird der flüssige Inhalt der Wells durch Umschwenken in einen geeigneten Abfallbehälter entsorgt und die Wells fünfmal mit destilliertem Wasser gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Restliche Wassertropfen in den Wells werden durch Schlagen auf Absorbanzpapier vollständig entfernt. Eine 3, 3',5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Lösung wird hinzugefügt, für 5 Sekunden gemischt und 20 Minuten im Dunkeln inkubiert.



Abbildungen 23, 24 und 25: Ferritin ELISA. Farbreaktion nach Zugabe von 1M HCl (Stopplösung)

Dabei entwickelt sich eine blaue Färbung, die durch das Zugeben von 100  $\mu$ l 1M HCl (Stopplösung) und fünfsekündigem mischen blockiert wird und sofort in eine gelbe Verfärbung umschlägt. Nun wird innerhalb von 15 Minuten bei 450 nm photometrisch gemessen. Die Ferritinkonzentration ist direkt proportional zur Farbintensität der



Proben. Für den quantitativen Nachweis wird eine Serie mit bekannter Ferritinkonzentration (Standardreihe) gemessen, um eine Kalibrationskurve zu erhalten.

### **Reagenzien und Materialien des Test Kits**

1. Antikörper gecoatete Wells (1 Platte, 96 Wells)

Mikrotiter Wells gecoatet mit Kaninchen Anti-Ferritin

2. Enzymkonjugationsreagenz (13 ml)

Maus monoklonal Anti-Ferritin konjugiert mit Meerrettichperoxidase

3. Referenz Standardset (0,5 ml/vial)

0, 15, 80, 250, 500, 1000 ng/ml humanes Leber oder Milz Ferritin

4. TMB Reagenz (1 Flasche, 11 ml)

3, 3', 5, 5' Tetramethylbenzidin (TMB) in Pufferlösung

5. Stopplösung (1 M HCl) (1 Flasche, 11 ml)

verdünnte Salzsäure

### **Auswertung**

Die Auswertung erfolgt mittels Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft Office) und dem Statistikprogramm GraphPad Prism Version 5. Für die statistische Auswertung der Ergebnisse werden die Mittelwerte der Absorptionsmessung ( $OD_{450}$ ) für jedes Paar Standards, Proben und Kontrollen ausgerechnet. Die Standardkurve zeigt die Mittelwerte der Absorption jedes Standards (y-Achse) gegen die Konzentration in ng/ml (x-Achse). Aus der Standardkurve können die entsprechenden Konzentrationen der Proben in ng/ml ermittelt werden. Für die verdünnten Proben muss der Verdünnungsfaktor mitgerechnet werden. Zur Bestimmung der Signifikanz wird der ungepaarte t-Test verwendet. Signifikante Unterschiede werden angegeben mit  $^*(p < 0,05)$ ,  $^{**}(p < 0,01)$  und  $^{***}(p < 0,001)$ .

### 3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine analytische Methode um verschiedene Arten von Molekülen im elektrischen Feld aufzutrennen. Im Rahmen dieser Masterarbeit wird das Verfahren zur Auftrennung von Proteingemischen und anschließend zur Identifizierung des mitochondrialen Ferritins in SH-SY5Y und HepG2 Zellen verwendet.

Elektrophorese ist die Wanderung elektrisch geladener Teilchen in einem elektrisch geladenen Feld. Der Denaturing Sample Puffer enthält das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS), dadurch werden die Proteine zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen. Die denaturierten Proteine liegen nun als Anionen vor und wandern unter elektrischer Spannung von der Kathode zur Anode, wodurch eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgt, da die Menge an gebundenem SDS proportional zum Molekulargewicht ist und das Gel nach Größe trennt. Durch die Verwendung einer Molekulargewichtsleiter mit bekannten Molekulargewichten als Marker, kann das Molekulargewicht des gesuchten Proteins abgeschätzt werden.

#### 3.6.1 Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Glasplatten (10,1cm x 7,3 cm x & 10,1cm x 8,2 cm), Spacer (1,5 mm) und die 10-Well-Kämme werden zu Beginn mit Ethanol (70%) gereinigt, um Fettreste zu entfernen und das korrekte Laufen der Proteine im elektrischen Feld zu gewährleisten, und anschließend getrocknet. Bevor die Glasplatten im Gelgießstand fixiert werden, wird die Dichtung mit einem Parafilm noch weiter abgedichtet, um das Auslaufen des Gels zu verhindern.

Nach dem Aufbau der Gelapparatur wird das 12%ige SDS-Polyacrylamid-Trenngel im Abzug hergestellt, da Acrylamid giftig ist. Dafür werden alle Komponenten nach dem Pipettierschema zunächst in ein sauberes 50ml Falcon Röhrchen (Becton Dickinson Labware) zusammenvermengt. Durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalbilder und N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator zur Acrylamidlösung wird die Polymerisation gestartet und eine Kettenreaktion in Gang

gesetzt. Acrylamid wird dabei vollständig zum unschädlichen Polyacrylamid polymerisiert. Nach Zugabe von APS und TEMED und gründlichem Mischen muss das Trenngel sofort zwischen die Glasplatten pipettiert werden. Danach wird das Gel, um eine glatte Oberfläche zu erhalten, mit Isopropanol (25%) beschichtet. Die vollständige Polymerisation benötigt mindestens 30 min. bei Raumtemperatur.

Nach der Polymerisation des Trenngels wird das Isopropanol (25%) vollständig entfernt, mit H<sub>2</sub>O dest. nachgespült und überschüssige Flüssigkeit mit einem saugfähigen Filterpapier aufgenommen. Anschließend wird das 5%ige Sammelgel nach Pipettierschema in einem sauberen 50 ml Falcon Röhrchen hergestellt und zwischen die Glasplatten fast bis zum oberen Rand auf das Trenngel gegossen. Nun wird der 10-Well-Kamm vorsichtig unter Vermeidung von Luftblasen in das Sammelgel gesteckt. Erneut erfolgt eine Polymerisation bei Raumtemperatur für mindestens 30 min.. Das Gel kann sofort verwendet oder bis zu einer Woche bei 4°C gelagert werden. Für die Lagerung kann entweder der 10-Well-Kamm entfernt werden, dann füllt man jede Tasche mit Elektrophorese-Puffer, oder man belässt den Kamm im Sammelgel. In beiden Fällen wird das Gel mit einem H<sub>2</sub>O dest. befeuchtetem Papier umwickelt und in einer Plastikfolie bei 4°C gelagert.

	<b>12%iges Trenngel (für 2 Gele)</b>	<b>5%iges Sammelgel (für 2 Gele)</b>
H <sub>2</sub> O dest.	9,8 ml	3,75 ml
ProSieve 50 gel solution (Cambrex)	4,8 ml	500 µl
1,5 M Tris <sup>1</sup> -HCl, pH 8,8	5,0 ml	-
1 M Tris <sup>1</sup> -HCl, pH 6,6	-	650 µl
10% SDS Solution (Fa. Roth)	200 µl	50 µl
10% APS <sup>2</sup> (Fa. Pharmacia Biotech)	200 µl	50 µl
TEMED <sup>3</sup> (Fa. Pharmacia Biotech)	8,0 µl	5,0 µl

<sup>1</sup> Tris(hydromethyl)-aminomethan

<sup>2</sup> Ammoniumpersulfat

<sup>3</sup> N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin

Tabelle 3: Pipettierschema für die Herstellung von zwei 12%igen Trenngelen und zwei 5%igen Sammelgelen

### Probenvorbereitung

Nach der Probengewinnung und Proteinbestimmung stellt man einen einheitlichen Proteingehalt der Zelllysate ein, dieser richtet sich nach der verwendeter Zellart und dem nachzuweisenden Protein. Bei dieser Masterarbeit wurden verschiedene Proteinkonzentrationen zwischen 20 und 200 µg/µl getestet. Die besten Ergebnisse wurden aufgrund der geringen Mengen an nachzuweisendem Protein (mitochondriales Ferritin) im Zelllysate bei hohen eingesetzten Proteinkonzentrationen erzielt. Um ein gleiches Endvolumen zu erhalten, ergänzt man die verschiedenen Zelllysate auf ein einheitliches Volumen (bis 50 µl) mit H<sub>2</sub>O dest. oder PBS (1x).

Die Proben werden bei geringen Proteinkonzentrationen 1:1 mit Denaturing Sample Puffer (2x) versetzt und bei hohen eingesetzter Probenvolumen wird der Denaturing Sample Puffer (4x) im Verhältnis 1:3 verwendet. Der Denaturing Sample Puffer enthält

das anionische Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat), dadurch werden die Proteine zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Es erfolgt eine Auftrennung nach Proteingröße.

1 M Tris-HCl, pH 6,6	2,5 ml
Glycerol (Merck)	4 ml
10 % SDS	1 g
0,1 % (w/v) Bromphenolblau (Pharmacia Biotech)	1 ml
mit H <sub>2</sub> O dest. auf 20 ml aufgefüllt	

Tabelle 4: 2x Denaturing Sample Puffer

Der Denaturing Sample Puffer wird bei Raumtemperatur verwendet und in die eiskühlten Proben pipettiert und gevortext. Da SDS bei niedrigen Temperaturen ausfällt, werden die Proben vor der Verwendung kurz im Wasserbad erwärmt, restliche Luftbläschen durch zentrifugieren für 1 min. bei 2000 x g (Zentrifuge 5414C, Eppendorf) entfernt und 20 bis 70 µl der Proben pro Geltasche mit speziellen Gelelektrophoresepipettenspitzen (Biozym) aufgetragen. Vor dem Pipettieren der Proben wird die Elektrophoresekammer mit Elektrophoresepuffer befüllt und die Geltaschen mit dem Puffer gespült, um restliche Luftbläschen zu entfernen. Außerdem wird eine Tasche mit 5 µl einer Molekulargewichtsleiter (Spectra Multicolor High Range Protein Ladder; Fermentas) beladen, um eine Größenbestimmung der Proteine zu ermöglichen und den Fortschritt des elektrophoretischen Laufes zu überwachen.

### 3.6.2 Elektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgt in einer mit Elektrophoresepuffer gefüllten Elektrophoresekammer bei einer konstanten elektrischen Spannung von 180 Volt bei einer Temperatur von 4°C für die Dauer von ca. 35 min.

Für die Elektrophorese werden zwei Puffer hergestellt.

Tris (Merck)	121 g
Tricin <sup>1</sup> (Amresco)	179 g
mit H <sub>2</sub> O dest. auf 1 Liter auffüllen	
<sup>1</sup> N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin	

Tabelle 5: Tris/Tricin Puffer (10x)

Tris/Tricin Puffer (10x)	100 ml
10% SDS-Lösung	10 ml
mit H <sub>2</sub> O dest. auf 1 Liter auffüllen	

Tabelle 6: Elektrophoresepuffer

Der Elektrophoresepuffer kann mehrmals verwendet werden.

### 3.7 Western Blot

Als Western Blot bezeichnet man die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran und den anschließenden immunologischen Nachweis der Proteine mittels markierten Antikörpern.

Die bei der SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine werden aus der Polyacrylamidmatrix auf eine Nitrozellulose-Membran (Porengröße 0,2 µm (BioRad)) transferiert. Das bei der elektrophoretischen Auftrennung entstandene Muster bleibt bei der Übertragung bestehen, das an die Proteine angelagerte SDS wird jedoch ausgewaschen, wodurch die Proteine renaturieren und teilweise wieder ihre Sekundär- und Tertiärstruktur einnehmen. Die immobilisierten Proteine werden durch Immunodetektion mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen.

Der Proteintransfer beim Western Blot erfolgt in einem sogenannten „Blotsandwich“ in einer mit Blotpuffer gefüllten Apparatur (BioRad).

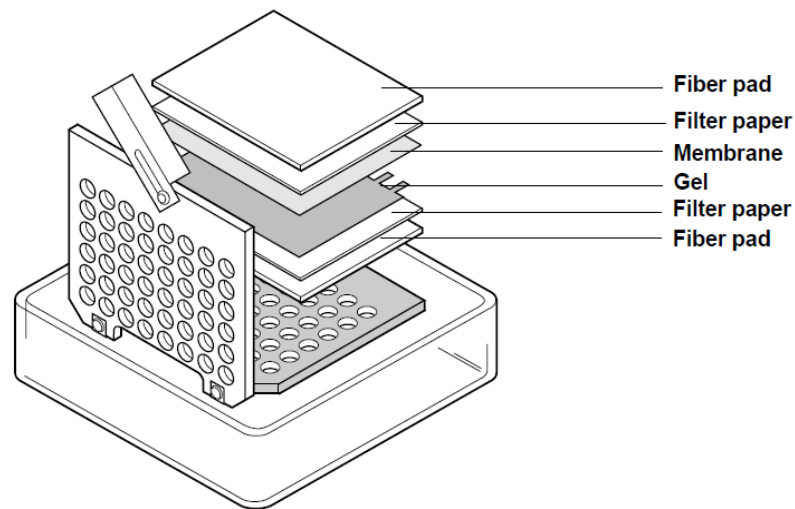


Abbildung 26: Aufbau eines „Blotsandwiches“

Vor dem Aufbau zum „Blotsandwich“ werden die verwendeten Schwämme, das Filterpapier und die Nitrozellulose-Membran in Blotpuffer getränkt. Vor dem Blotten trennt man das Sammelgel vom Trenngel ab. Die einzelnen Schichten werden wie in Abbildung 26 platziert und eventuell entstandene Luftbläschen zwischen den Lagen mit Hilfe eines auf dem Sandwich rollenden Röhrchens durch Bewegen von der Mitte nach außen entfernt.

In die Blotapparatur wird vor dem Einfüllen des Blotpuffers zusätzlich ein Eisbehälter mit Eis zur Kühlung gesteckt. Das Blotten erfolgt bei einer konstanten elektrischen Stromstärke von 0,5 mA bei einer Temperatur von 4°C für die Dauer von ca. 35 min.

Tris (Merck)	30 g
Tricin (Amresco)	144 g
mit H <sub>2</sub> O dest. auf 1 Liter auffüllen	

Tabelle 7: Herstellungsanleitung Tris/Glycin Puffer (10x)

Tris/Glycin (10x)	100 ml
Methanol	200 ml
10% SDS-Lösung	200 µl
mit H <sub>2</sub> O dest. auf 1 Liter auffüllen	

Tabelle 8: Herstellungsanleitung des Blot Puffers

### 3.7.1 Proteindetektion Ponceau S

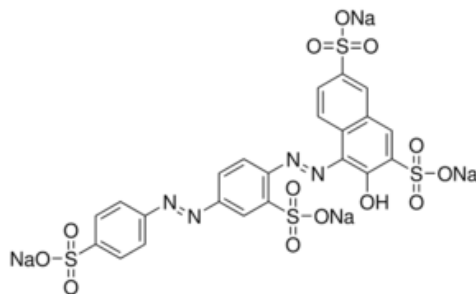


Abbildung 27: Ponceau S [„Ponceau S for microscopy (Hist.) | Sigma-Aldrich“, o. J.]

Zur Überprüfung und Visualisierung des Transfers auf die Nitrozellulose-Membran werden die Proteine mit einem Farbstoff sichtbar gemacht. Dafür wird die Nitrozellulose-Membran kurz (2-5 min.) mit einer roten 0,5%igen Ponceau S Lösung (Merck) eingefärbt und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen und entfärbt, die übertragenen Proteine bleiben dabei temporär gefärbt.



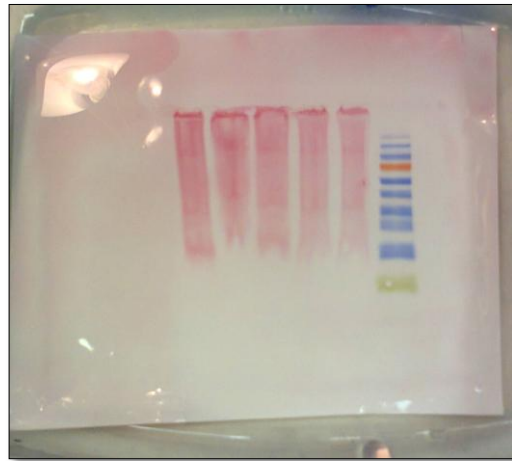


Abbildung 28: Gefärbte Protein-Banden (SH-SY5Y Zellen) auf Nitrozellulose-Membran (0,2  $\mu\text{m}$ , BioRad). Proteinmenge 200  $\mu\text{g}$ /Geltasche, gefärbt mit 0,5 %igem Ponceau S (Merck)

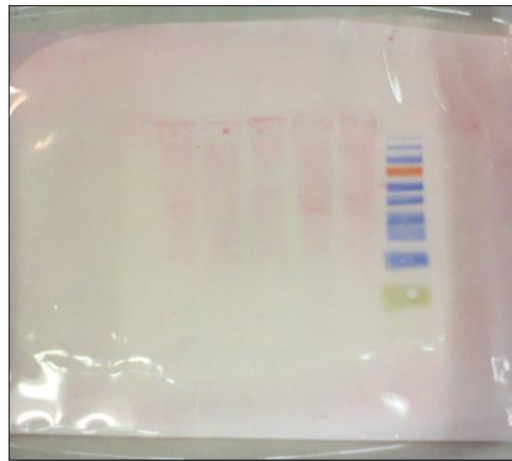


Abbildung 29: Gefärbte Protein-Banden (SH-SY5Y Zellen) auf Nitrozellulose-Membran (0,2  $\mu\text{m}$ , BioRad). Proteinmenge 140  $\mu\text{g}$ /Geltasche, gefärbt mit 0,5 %igem Ponceau S (Merck)

### 3.7.2 Immunodetektion einzelner Proteine

Bestimmte Proteinbanden werden mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert. Der spezifische Antikörper (monoklonal) bindet an das passende Epitop des Antigens, der gesuchten Proteinbanden, auf der Nitrozellulose-Membran.

#### **Mitochondriales Ferritin**

Mitochondriales Ferritin wird als Precursorprotein mit einer Molekularmasse von 30kDa und einer Leitsequenz von 60 Aminosäuren in den Mitochondrien synthetisiert. Die Leitsequenz wird proteolytisch abgespalten und es entsteht eine 22kDa Ferritin-Untereinheit, die Ferroxidaseaktivität besitzt und somit potentiell schädliches freies Eisen sequenzieren kann. Mitochondriales Ferritin hat eine organspezifische Expression, so wurden nur geringe Mengen in Eisenspeicherorganen gefunden. [Drysdale et al., 2002]

#### **Beta-Aktin**

Beta-Aktin ist eine der sechs Isoformen des Aktins. Es ist ein hochkonserviertes Protein mit einer Molekularmasse von 42 kDa und wird als Ladekontrolle verwendet, da es in allen eukaryotischen Zellen vorkommt. [Ng et al., 1985]

#### **Antikörper**

1. Antikörper: Anti-Ferritin mitochondrial Antikörper (ab 30 749), Maus, monoklonal, gelagert bei -20°C
2. Antikörper: Anti-Mouse, gelagert bei -20°C
2. Antikörper: Beta-Aktin (abcam), gelagert bei -20°C

### 3.7.2.1 Blockieren

Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, wird die Nitrozellulosemembran nach dem Blotten mit 5%iger Milchpulverlösung blockiert.

Die Nitrozellulose-Membran wird in einem 50 ml Plastikröhrchen (Becton Dickinson Labware) oder einer Plastikschiessel mit Abdeckung unter ständigem Rollen bzw. auf dem Belly Dancer für 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C im Kühlschrank in 5%iger Milchpulverlösung blockiert.

PBS (1x)	1 l
0,05 % Tween 20 (Pharmacia Biotech)	500 µl

Tabelle 9: PBS/Tween 20 (Waschpuffer)

PBS/Tween 20	40 ml
5% Milchpulver	2 g

Tabelle 10: Blockierlösung (für 2 Blots)

Nach dem Blockieren werden die Blots mit je 10-15 ml Waschpuffer für 3x 2 min. gewaschen.

### 3.7.2.2 Inkubation mit dem primären Antikörper

Der 1. Antikörper bindet spezifisch an das Epitop des gesuchten Proteins. Je nach verwendetem Antikörper wird dieser in unterschiedlichem Verhältnis in PBS/Tween 20, 1% Magermilchpulver verdünnt. Die 1%ige Milchpulverlösung dient bei der Inkubation als Antikörperträger. Es wurden verschiedene Antikörperkonzentrationen getestet.

Die Inkubation mit dem 1. Antikörper erfolgt in einem 50 ml Plastikröhrchen über Nacht bei 4°C unter ständigem Rollen.

mouse-anti-human ferritin mitochondrial Antikörper (ab 30 749) (1:500)	10ml PBS/Tween 20 + 1% Milchpulver + 20µl mouse-anti-human ferritin mitochondrial Antikörper
Mouse anti beta-actin (abcam) (1:15000)	10ml PBS/Tween 20 + 1% Milchpulver + 0,666µl mouse anti beta-actin Antikörper

Tabelle 11: 1. Antikörper, Angaben für die Stammlösungen (je 2ml pro Röhrchen verwendet)

Der 1. Antikörper wird nach der ersten Verwendung zur Konservierung mit 0,05% Natriumazidlösung (5µl 10%ige Na-Azidlösung/ml) versetzt und kann mehrere Wochen verwendet werden.

Nach der Inkubation mit dem 1. Antikörper und vor der Behandlung mit dem 2.

Antikörper werden, um überschüssigen, nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, fünf Waschstschritte mit je 10-15ml Waschpuffer durchgeführt.

- 2x 5 min.
- 1x 15 min.
- 2x 5 min.

### 3.7.2.3 Inkubation mit dem sekundären Antikörper

Der 2. Antikörper richtet sich spezifisch gegen die Spezies in der der 1. Antikörper hergestellt wurde und bindet an diesen. Außerdem ist der 2. Antikörper an ein Enzym, z.B. HRP (horseradish peroxidase), gekoppelt. HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol, wobei Chemilumneszenz entsteht.

Die Inkubation mit dem 2. Antikörper erfolgt für 1h in einem abdeckbaren Behälter unter ständiger Bewegung auf dem Belly Dancer bei Raumtemperatur. Der 2. Antikörper wird immer frisch hergestellt.

mouse-anti-human ferritin mitochondrial Antikörper (ab 30 749) (1:15000)	10ml PBS/Tween 20 + 1% Milchpulver + 0,667µl anti-mouse Antikörper
Mouse anti beta-actin (abcam) (1:15000)	10ml PBS/Tween 20 + 1% Milchpulver + 0,667µl anti-mouse Antikörper

Tabelle 12: 2. Antikörper, Angaben für die Stammlösungen (je 2ml pro Röhrchen verwendet)

Nach der Inkubation mit dem 2. Antikörper sind wieder fünf Waschschritte mit 10-15ml Waschpuffer erforderlich, um überschüssige, ungebundene Antikörper zu entfernen.

- 2x 5 min.
- 1x 15 min.
- 2x 5 min.

### 3.7.2.4 Detektion – Chemilumineszenz

Chemilumineszenz ist die Emission von Licht (meist im sichtbaren Bereich zwischen 400 und 700 nm) von Atomen oder Molekülen in elektronisch angeregtem Zustand durch eine chemische Reaktion. [Albrecht et al., o. J.]

Ausgangsstoff für die Chemilumineszenz sind sogenannte Luminophore. Das bekannteste ist Luminol (3-Amino-Phthalsäurehydrazid). Durch die Reaktion des Substrats Luminol mit Peroxiden, katalysiert durch das am sekundären Antikörper gekoppelte Enzym HRP (horseradish peroxidase, eine Peroxidase aus Meerrettich) entstehen instabile Verbindungen, oft Dioxetane, die unter Lichtemission noch weiter zerfallen und somit durch Chemilumineszenzdetektion gemessen werden können.

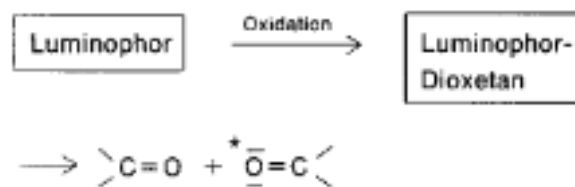


Abbildung 30: Reaktionsmechanismus Chemilumineszenz [Albrecht et al., 1990]

Kurz vor der Chemilumineszenzdetektion werden die zwei Substratlösungen, Luminol/Enhancer Solution und Stable Peroxide Solution eines Clarity Western ECL Substrate Kits (BioRad) im Verhältnis 1:1 gemischt und auf dem Blot verteilt.

Luminol/Enhancer Solution	500 µl
Stable Peroxide Solution	500 µl

Tabelle 13: Mischverhältnis der Substratlösungen des Clarity Western ECL Substrate Kits (BioRad)

Anschließend wird die Nitrozellulose-Membran mit einer sauberen Plastikfolie bedeckt, die Luftbläschen vorsichtig entfernt und unmittelbar danach die Lichtemission im Chemilumineszenz-Detektor (Fusion Fx7 PEQLAB) detektiert. Die Belichtungszeit richtet sich nach den verwendeten und vorhandenen Antikörpern.

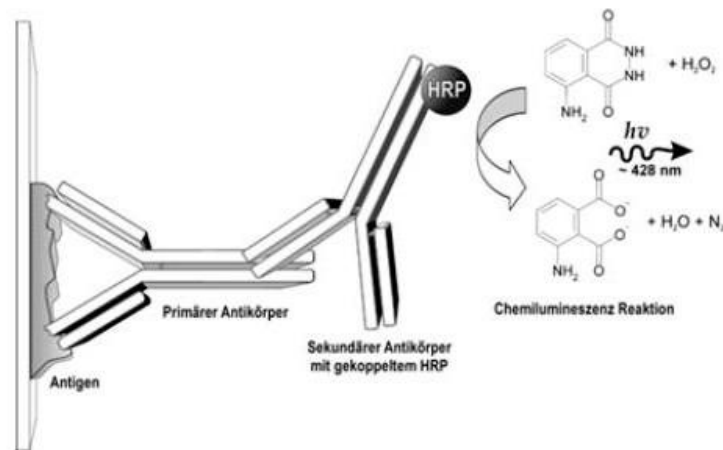


Abbildung 31: Schema der Immundetektion. Reaktionsreihfolge: Antigen auf Nitrozellulose-Membran – primärer Antikörper – sekundärer Antikörper mit gekoppeltem HRP – Chemilumineszenzreaktion [Burnette, 1981]



Abbildung 32: Chemilumineszenz-Detektor (Fusion Fx7 PEQLAB)

### Auswertung

Nach der Chemilumineszenzdetektion erfolgt die Auswertung mit Hilfe der Software AlphaEaseFC, Alpha Innotech. Die erhaltenen Daten werden mittels der Software GraphPad Prism Version 5.0 analysiert. Der Mittelwert der Kontrollen wird auf 100% normiert und mit den Mittelwerten der Replikate verglichen. Zur Bestimmung der Signifikanz wird der ungepaarte t-Test verwendet. Signifikante Unterschiede werden angegeben mit \*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ) und \*\*\*( $p < 0,001$ ).

### 3.7.2.5 Strippen der Nitrozellulose-Membran

Durch die Methode des Strippens können die im Western Blot eingesetzten Antikörper von der Nitrozellulose-Membran annähernd vollständig entfernt werden, um die Membran danach wieder mit anderen Antikörpern zu behandeln.

Die Nitrozellulose-Membran wird mit 10ml Stripping Puffer, pH 2,2 in einem Gefäß mit Deckel bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgen zwei Waschschrte von je 30 Minuten mit PBS/Tween 20. Nach einstündigem Blockieren mit Blockierlösung bei Raumtemperatur und fünf Waschschrten (2 x 5 min., 1 x 15 min., 2 x 5 min.) kann die Nitrozellulose-Membran erneut mit dem ersten und folgend mit dem zweiten Antikörper inkubiert werden nach dem Prinzip wie oben beschrieben.

Glycin (2 M, pH 2,2)	15 g
SDS 10%	10 ml
Tween 20	10 ml
mit H <sub>2</sub> O dest. auf einen Liter aufgefüllt und pH Wert von 2,2 mit 5 M HCl eingestellt	

Tabelle 14: Herstellungsanleitung des Stripping Puffers

## 3.8 Elektrochemiluminescence Immunoassay

Der MSD-ECLIA (Meso Scale Discovery - Elektrochemiluminescence Immunoassay, Sector Imager 2400) bietet eine Kombination aus Elektrochemilumineszenzdetektion und einem Reverse Phase Protein Array. Die Methode beruht auf dem Prinzip der Lichtemissionsmessung und bietet eine hohe Präzision, sowie Sensitivität und ist weniger zeit- und arbeitsintensiv als SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot. Im Rahmen dieser Masterarbeit wird der MSD-ECLIA für die quantitative Bestimmung von mitochondrialem Ferritin in SH-SY5Y und HepG2 Zellen



verwendet. Die Intensität des Lichtsignals, das bei einer chemischen Reaktion mit dem Analyten emittiert, wird gemessen. Auf der Array-Plattform wird dafür Ruthenium (II)-tris-bipyridin-(4-methylsulfon)  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]$  als Tracer verwendet, der mit dem Analyten konjugiert. Durch die dabei entstehende rasche Redoxreaktion wird Licht in Gegenwart einer angelegten Spannung emittiert. [Top 10 Tips for Meso Scale Discovery (MSD) Assay Prep and Analysis]

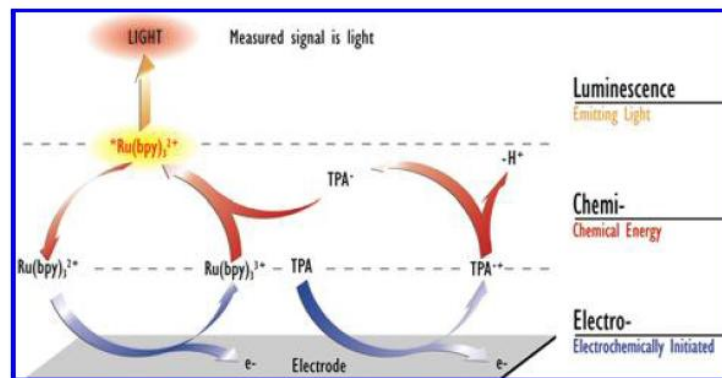


Abbildung 33: Schema der Elektrochemilumineszenzprozesse [Wilbur, 2004]

### Probenvorbereitung

Zunächst wird für die verwendeten Zelllysate die Proteinmenge bestimmt. Ausgehend von den Ergebnissen der Proteinbestimmung werden eine Standardlösung (bestehend aus Kontroll-Zelllysate) mit einer Proteinmenge von  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  und die Proben (Zelllysate der behandelten Zellen) mit einer Proteinmenge von  $0,05\mu\text{g}/\mu\text{l}$  hergestellt und mit PBS/TWEEN 20/Proteaseinhibitoren auf ein Endvolumen von  $30\mu\text{l}$  der Standardlösung und  $100\mu\text{l}$  der Proben ergänzt. Dafür wird  $1\text{ml}$  PBS/TWEEN 20 mit drei Proteaseinhibitoren versetzt: 1)  $10\mu\text{l}$  Natriumfluorid ( $\text{NaF}$ ), 2)  $10\mu\text{l}$  Sigma Proteaseinhibitor und 3)  $10\mu\text{l}$  Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, P-7626) ( $100\text{mM}$ ). Aus dem Ausgangsstandard (Kontroll-Zelllysate, Proteinkonzentration  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) wird nun eine achtfache Standardverdünnungsreihe erstellt.

Standard (Kontroll-Zelllysate)	µg Protein/Well
1	4
2	2
3	1
4	0,5
5	0,25
6	0,125
7	0,063
8	0,031

Tabelle 15: Standardreihe für den ECLIA

### Reagenzien

<b>Waschlösung</b> PBS/0,05% TWEEN 20	500ml PBS (1x) + 250µl TWEEN 20
<b>1% MSD Block A</b>	100mg BSA (Trockenpulver, MSD) in 10ml PBS (1x)
<b>3% MSD Block A</b>	300mg BSA (Trockenpulver, MSD) in 10ml PBS (1x)

Tabelle 16: Reagenzien für den ECLIA

### Antikörper

Für die Detektion von humanem Ferritin mitochondrial:

1. Antikörper: Anti-human Ferritin mitochondrial Antikörper (ab 30 749), Maus, monoklonal, 1:10 vorverdünnt, gelagert bei -20°C
2. Antikörper: Anti-Mouse SulfoTAG, MSD, gelagert bei 4°C

Für die Detektion von Beta-Actin (als Ladekontrolle):

1. Antikörper: Beta-Aktin (abcam), gelagert bei -20°C
2. Antikörper: Anti-Mouse SulfoTAG, MSD, gelagert bei 4°C

### Durchführung des ECLIAs

Für die Messung werden spezielle Mikrotiter-Platten (MULTI-ARRAY™ Plates, MA2400 96 High Binding Plate) mit Kohleelektroden, die auf dem Boden angeordnet sind, verwendet. 4µl/Well der Standards im Doppelansatz und der Proben im Vierfachansatz werden mittels Reverse Pipetting auf die Mikrotiter-Platten mittig aufgetragen. Es erfolgt eine Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur in Ruhe. Danach wird die restliche Flüssigkeit in den Wells durch schwingvolles Ausleeren und ausklopfen auf saugendem Papier entfernt und 150µl/Well Blockierlösung (PBS/TWEEN 20 + 3% MSD Block A) aufgetragen, die Mikrotiterplatte durch ein Klebeband verschlossen und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Belly Dancer inkubiert. Vor dem Auftragen des ersten und zweiten Antikörpers erfolgen drei Waschschrte mit jeweils 150µl/Well PBS/TWEEN 20. Für die zwei benötigten Antikörpermischung werden zum einen ca. 2µl des ersten Antikörpers (Anti-Ferritin mitochondrial Antikörper (ab 30 749), 1:10 Verdünnung), 2µl des zweiten Antikörpers (Anti-Mouse SulfoTAG, MSD) und 2ml PBS/TWEEN 20/ 1% MSD Block A in einem Eppendorftube zusammen pipettiert und zum anderen werden 0,25µl erster Antikörper (Beta-Aktin Antikörper, abcam), 1µl zweier Antikörper (Anti-Mouse SulfoTAG, MSD) und 0,5ml PBS/TWEEN 20/ 1% MSD Block A zusammen vermischt. 25µl/Well der Antikörpermischungen werden aufgetragen, die Platte wird erneut mit einer Klebefolie gut verschlossen und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Belly Dancer inkubiert, bevor sie über Nacht bei 4°C auf dem Belly Dancer inkubiert wird.

Am nächsten Tag werden die Antikörpermischungen durch rasches Umschwenken entfernt, restliche Tropfen mit saugfähigem Papier beseitigt und die Wells mit je 150µl PBS/TWEEN 20 dreimal gewaschen. 5ml des MSD Read Buffers (4x) werden mit 15ml destilliertem Wasser verdünnt und 150µl des verdünnten MSD Read Buffers werden pro Well mittels Reverse Pipetting aufgetragen, um das Entstehen von Luftblasen zu vermeiden, die sich störend auf das Messergebnis auswirken. Sofort danach erfolgt die Messung im Meso Scale Discovery Sector Imager 2400.



Abbildung 34: Sector Imager 2400, MSD (Meso Scale Discovery)

### Auswertung

Die Auswertung erfolgt mittels Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft Office) und dem Statistikprogramm GraphPad Prism Version 5. Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wird eine Standardgerade ( $\mu\text{g Protein/Well Zelllysats}$ ) des Kontroll-Zelllysats erstellt.

In den Zelllysaten der vorinkubierten Zellen werden die erhaltenen Werte für das mitochondriale Ferritin auf die Werte des Beta-Aktins in den Lysaten normiert. Zur Bestimmung der Signifikanz wird der ungepaarte t-Test verwendet. Signifikante Unterschiede werden angegeben mit  $*(p < 0,05)$ ,  $**(p < 0,01)$  und  $*** (p < 0,001)$ .

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Das zentrale Ziel der *in vitro* Studie ist die Analyse des Eisenstoffwechsels nach der Behandlung mit Erythropoietin (EPO) und/oder bei chemisch induzierter Hypoxie durch Dimethyloxalylglycin (DMOG) in humanen neuronalen Zellen und humanen Hepatozyten.

Als Modell für humane neuronale Zellen wird die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y verwendet. Die SH-SY5Y Zellen exprimieren alle drei Isoformen der Prolyl-4-Hydroxylase (PHD). [Smirnova et al., 2010] Außerdem wird die systemische Wirkung von EPO und/oder DMOG am Beispiel der humanen Hepatokarzinomzelllinie HepG2 als Modell für Hepatozyten getestet, da die Leber das Hauptspeicherorgan für Eisen darstellt und die HepG2 Zelllinie ein weit verbreitetes Modell für die Untersuchungen von Genexpressionen unter Hypoxie ist.

In dieser Studie wird der Effekt von EPO unter Normoxie geprüft. Durch die Behandlung mit DMOG wird eine chemisch induzierte Hypoxie hervorgerufen. Der Einfluss von EPO wird zusätzlich auch unter gleichzeitiger Gabe von DMOG und somit unter chemisch induzierter Hypoxie untersucht.

Alle Behandlungen erfolgen zeitabhängig (2h, 6h, 24h). EPO wird in der Konzentration von [3,3 U/ml] den Zellen verabreicht. DMOG wird in zwei verschiedenen Konzentrationen, [0,5mM] und [1mM], verwendet. Die eingesetzten Konzentrationen für DMOG werden aufgrund der Ergebnisse von MTT-Zellviabilitätstests an SH-SY5Y einer vorherigen Masterarbeit (Cornelius, 2011) bestimmt. Außerdem liegen die Empfehlungen des Herstellers (Cayman Chemicals) und der Literatur (Nagel et al., 2011) für die zu verwendenden Konzentrationen von DMOG in Zellkulturversuchen bei einer Spanne von [0,1mM] bis [1mM].

Bei der Studie werden verschiedene Komponenten des Eisenstoffwechsels analysiert. Zum einen wird der labile Eisenpool (LIP) mittels fluoreszenzspektroskopischem Verfahren untersucht. Zum anderen wird die zytosolische Ferritinkonzentration mit Hilfe eines Ferritin Enzym-linked Immunosorbent Assays (ELISA) gemessen. Außerdem wird auch der mitochondriale Ferritingehalt nach Elektrophorese mittels

Western Blot und Chemilumineszenzdetektion sowie mittels Elektrochemilumineszenz Immunoassay (ECLIA) bestimmt.

Bei den Resultaten der Zellkulturstudie muss jedoch beachtet werden, dass die Zellen als Monolayer unter 95% Luft/ 5% CO<sub>2</sub> (ca. 152 mmHg O<sub>2</sub>; 1 mmHg = 0,133 kPa) und somit in einer hyperoxischen Umgebung im Vergleich zu den meisten humanen Körperzellen kultiviert werden. [Halliwell, 2007] In der Mehrzahl der adulten Gewebe liegt die Sauerstoffkonzentration im Bereich von 3-5%. [Semenza, 2012] Im Vergleich dazu beträgt der Luftsauerstoffgehalt 21%, der auch beim Kultivieren der Zellen verwendet wird. [Chepelev und Willmore, 2011]

#### Zeitabhängige Effekte (2h, 6h, 24h) von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf den labilen Eisenpool in SH-SY5Y Zellen

Der zelluläre labile Eisenpool (LIP) bildet den Übergangspool zwischen dem zellulär benötigten Eisen, der Eisenaufnahme und –speicherung und ist ein kritischer Faktor bei der Produktion von Hydroxylradikalen (OH•) durch die Fenton-Reaktion. Um einen Überschuss an „freiem“ Eisen zu vermeiden, wird die Größe des LIP in engen Grenzen reguliert. [Kakhlon und Cabantchik, 2002], [Kruszewski, 2003] Durch die Expression von Proteinen wie IRP1, Ferritin und/oder DMT1, die bei der Eisenhomöostase beteiligt sind, wird das zelluläre LIP Level eingestellt. [Kruszewski, 2003] Ein Ansatzpunkt für eine Therapie bei Eisenüberladung ist daher der intrazelluläre LIP. [Glickstein, 2005]

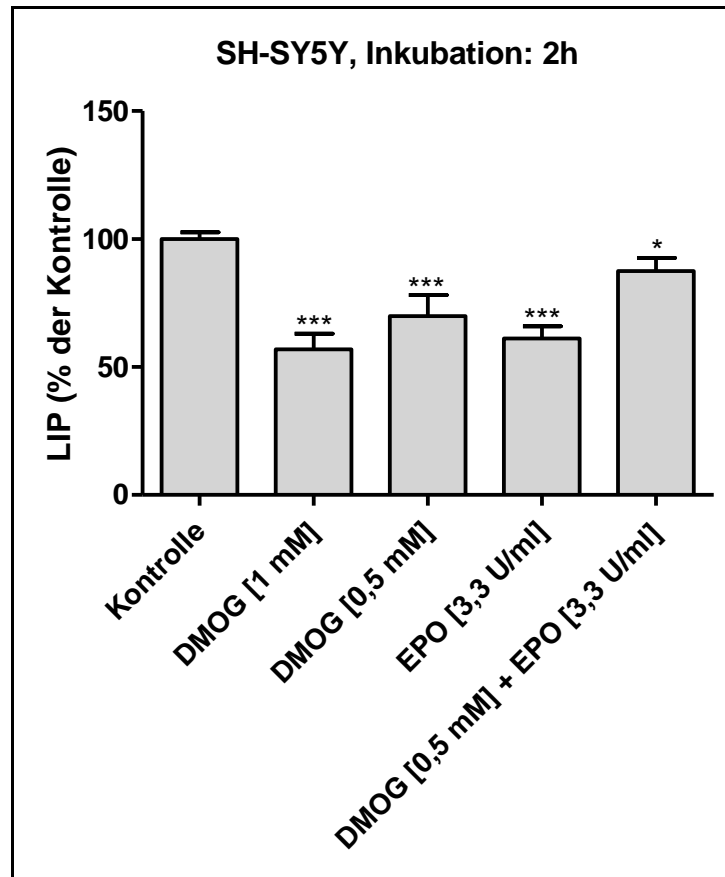


Abbildung 35: Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf den labilen Eisenpool nach 2 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen

SH-SY5Y Neuroblastomzellen werden in komplementiertem DMEM/Ham's F-12 Medium (10% FBS, 1% L-Glutamin und 0,1% Gentamycin) gezüchtet. Die Zellen werden in 96-Well-Mikrotiterplatten mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/Well ausgesetzt, mit DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] behandelt und für 2 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Der Effekt der Substanzen auf den labilen Eisenpool (LIP) wird mittels Fluoreszenzanalyse gemessen. Die Fluoreszenzlösung des Mittelwerts der Kontrollen wird auf 100% normiert. Die Diagramme zeigen die mittlere prozentuale Verfügbarkeit an zytoplasmatischem labilen Eisen  $\pm$  SEM, berechnet aus drei separaten Experimenten im Mehrfachansatz. Signifikante Unterschiede sind angegeben mit \*( $p < 0,05$ ) und \*\*\*( $p < 0,001$ ).

Nach 2 Stunden Inkubation der SH-SY5Y mit DMOG [1mM], DMOG [0,5mM] und EPO [3,3U/ml] zeigen sich deutliche, hoch signifikante Reduzierungen des LIP. Bei der Behandlung mit DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] wird noch eine signifikante Senkung des LIP im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle deutlich, die jedoch geringer ist als bei den separaten Behandlungen.

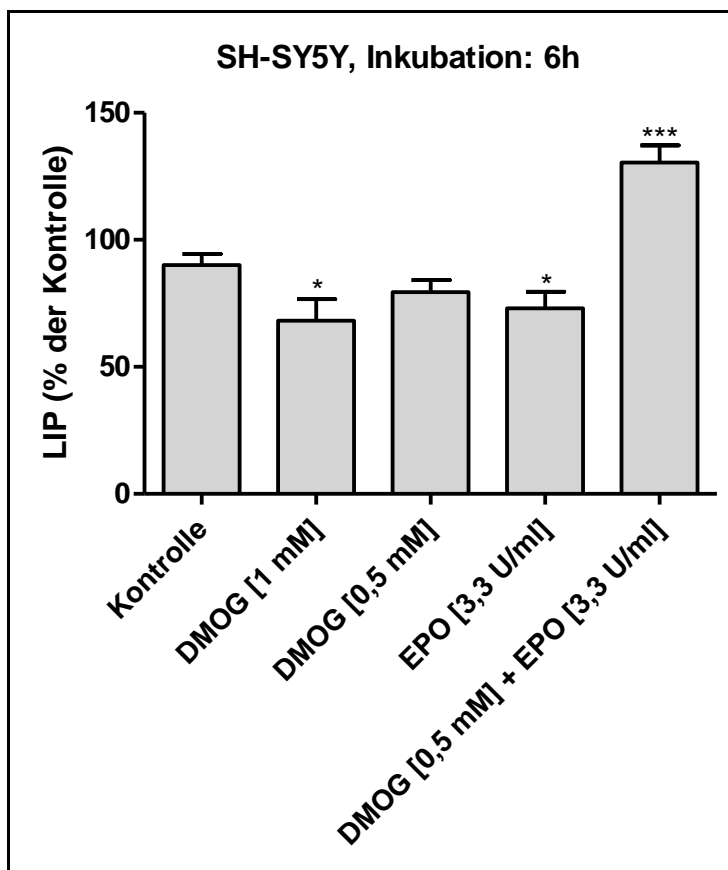


Abbildung 36: Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf den labilen Eisenpool nach 6 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen

SH-SY5Y Neuroblastomzellen werden in komplementiertem DMEM/Ham's F-12 Medium (10% FBS, 1% L-Glutamin und 0,1% Gentamycin) gezüchtet. Die Zellen werden in 96-Well-Mikrotiterplatten mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/Well ausgesetzt, mit DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] behandelt und für 6 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5% iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Die Diagramme zeigen die mittlere prozentuale Verfügbarkeit an zytoplasmatischem labilen Eisen  $\pm$  SEM, berechnet aus drei separaten Experimenten im Mehrfachansatz. Signifikante Unterschiede sind angegeben mit \*( $p < 0,05$ ) und \*\*\*( $p < 0,001$ ). Detaillierte Informationen über die CAL-Methode zur Messung des LIPs siehe Legende Abbildung 35.

Nach 6 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen lassen sich andere Auswirkungen beobachten als nach 2 Stunden Inkubation. Das LIP Level sinkt zwar noch bei der Behandlung mit DMOG [1mM], DMOG [0,5mM] und EPO [3,3U/ml]. Jedoch lässt sich nur noch für DMOG [1mM] und EPO [3,3U/ml] eine Signifikanz feststellen. Eine deutliche Veränderung gibt es bei DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml], dabei wird eine eindeutige, hoch signifikante Steigerung der LIP Konzentration gemessen.



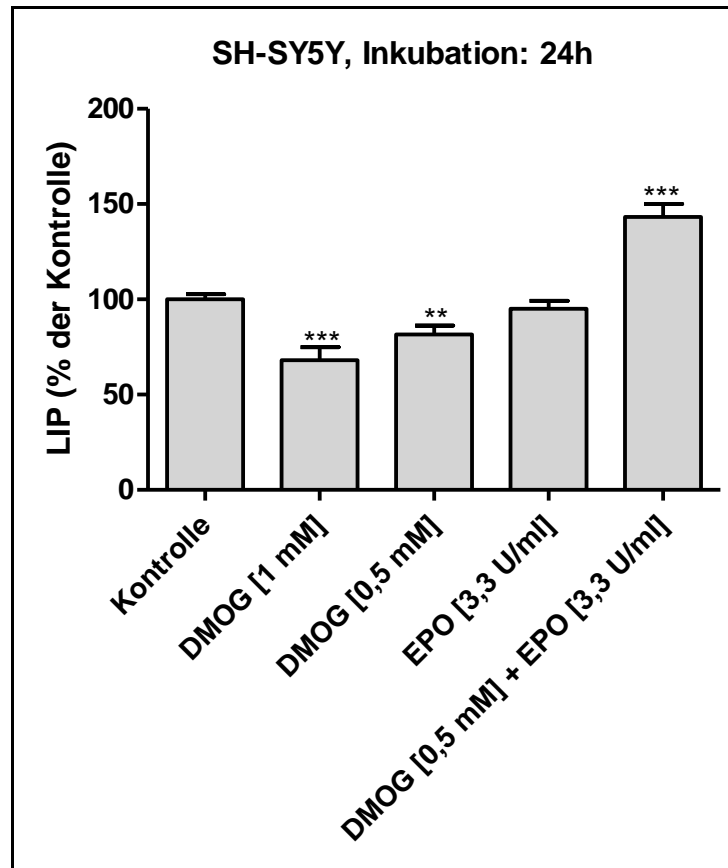


Abbildung 37: Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf den labilen Eisenpool nach 24 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen

SH-SY5Y Neuroblastomzellen werden in komplementiertem DMEM/Ham's F-12 Medium (10% FBS, 1% L-Glutamin und 0,1% Gentamycin) gezüchtet. Die Zellen werden in 96-Well-Mikrotiterplatten mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/Well ausgesetzt, mit DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] behandelt und für 24 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Die Diagramme zeigen die mittlere prozentuale Verfügbarkeit an zytoplasmatischem labilen Eisen  $\pm$  SEM, berechnet aus drei separaten Experimenten im Mehrfachansatz. Signifikante Unterschiede sind angegeben mit \*\*( $p < 0,01$ ) und \*\*\*( $p < 0,001$ ). Detaillierte Informationen über die CAL-Methode zur Messung des LIPs siehe Legende Abbildung 35.

Nach 24 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen herrscht ein ähnliches Bild wie nach 6 Stunden Inkubation. Die Effekte sind jedoch deutlicher zu erkennen. Die LIP Konzentration bei der Behandlung mit DMOG [1mM] sinkt hoch signifikant und bei der Inkubation mit DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] ist ein hoch signifikanter Anstieg zu beobachten. Unter der DMOG [0,5 mM] Konzentration ist jetzt eine signifikante Reduzierung zu erkennen, während kein Effekt nach EPO [3,3U/ml] Gabe mehr sichtbar ist.

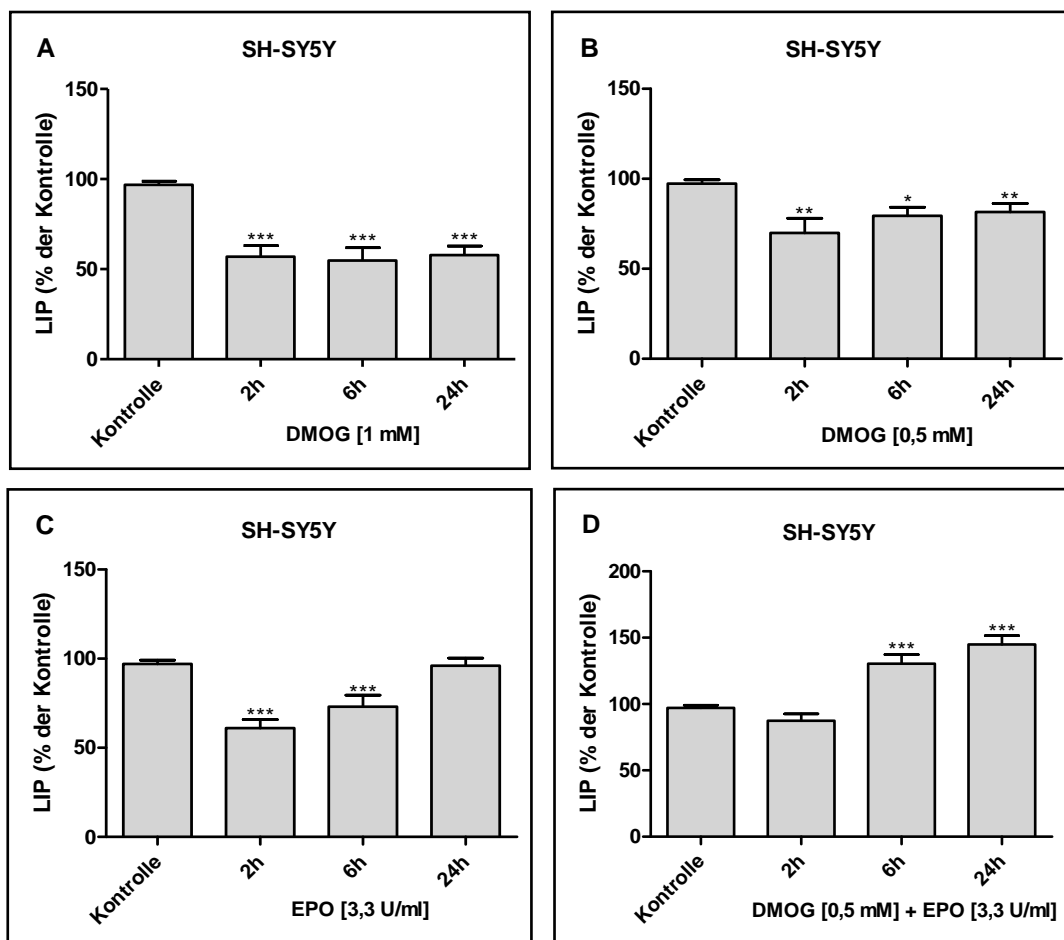


Abbildung 38: Zeitabhängige Effekte (2h, 6h, 24h) von DMOG [1mM] (A), DMOG [0,5mM] (B), EPO [3,3U/ml] (C) und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] (D) auf den labilen Eisenpool in SH-SY5Y Zellen

SH-SY5Y Neuroblastomzellen werden in komplementiertem DMEM/Ham's F-12 Medium (10% FBS, 1% L-Glutamin und 0,1% Gentamycin) gezüchtet. Die Zellen werden in 96-Well-Mikrotiterplatten mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/Well ausgesetzt, mit DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] behandelt und für 2 Stunden, 6 Stunden und 24 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Die Diagramme zeigen die mittlere prozentuale Verfügbarkeit an zytoplasmatischem labilen Eisen  $\pm$  SEM, berechnet aus mindestens drei separaten Experimenten im Mehrfachansatz. Signifikante Unterschiede sind angegeben mit \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) und \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Detaillierte Informationen über die CAL-Methode zur Messung des LIPs siehe Legende Abbildung 35.

Bei der Gegenüberstellung der zeitabhängigen Effekte (2h, 6h, 24h) wird ersichtlich, dass mit DMOG [1mM] die deutlichste Reduzierung des LIPs erfolgt. Eine hoch signifikante Verringerung des LIP ist zu allen Zeitpunkten sichtbar. Mit DMOG [0,5mM] wird auch eine Verminderung des LIP zu allen Zeitpunkten festgestellt, jedoch ist der Effekt nicht ganz so deutlich (nach 2h und 24h sehr signifikant, nach 6h

signifikant) wie bei DMOG in der höheren Konzentration. Bei der Behandlung mit EPO ist ein eindeutiger Kurzzeiteffekt erkennbar. Nach 2h und 6h findet eine hoch signifikante Reduzierung des LIP statt, während nach 24h der Effekt nicht mehr vorhanden zu sein scheint. Überraschenderweise und im Gegensatz zu den anderen Ergebnissen gibt es bei chemisch induzierter Hypoxie durch Inkubation mit DMOG [0,5mM] mit EPO [3,3U/ml] nach 6h und 24h eine deutliche, hoch signifikante Erhöhung des LIP. Bei einer Inkubationszeit von 2h werden noch keine Effekte gemessen.

DMOG zeigte im Zellkulturmodell an humanen mesenzephalischen neuronalen Vorläuferzellen (hmNPC) HIF-1 $\alpha$  Stabilisation erst in zytotoxischen Dosen (0,5mM). Bei einer nicht-toxischen Dosis von 100 $\mu$ M DMOG konnte nur eine ungenügende HIF-1 $\alpha$  Stabilisation nachgewiesen werden. [Milosevic et al., 2009]

Im Tiermodell (Ratten) des ischämischen Schlaganfalls zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt bei der Vor- und Nachbehandlung mit DMOG. Dabei bot eine geringere Dosis (40 mg/kg Körpergewicht) besseren Schutz als eine höhere Dosis (200 mg/kg Körpergewicht), aber nur bei der hohen Dosis zeigte sich eine signifikante Erhöhung des HIF-1 $\alpha$  Levels nach 24h. [Nagel et al., 2011]

Zeitabhängige Effekte (2h, 6h, 24h) von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf den labilen Eisenpool in HepG2 Zellen

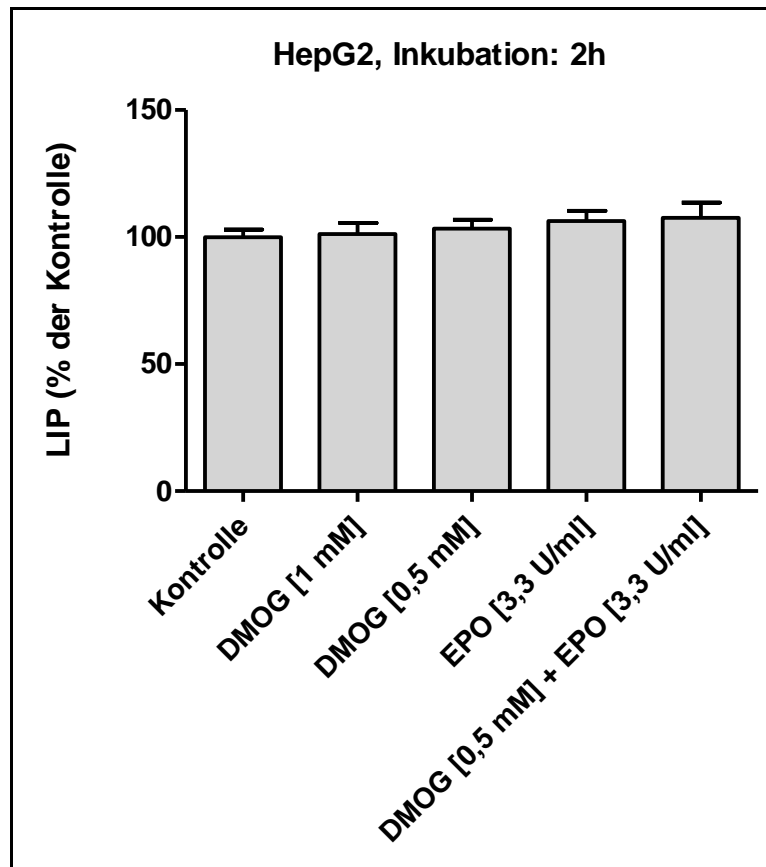


Abbildung 39: Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf den labilen Eisenpool nach 2 Stunden Inkubation in HepG2 Zellen

HepG2 Hepatokarzinomzellen werden in komplementiertem DMEM Medium (10% FBS, 1% L-Glutamin und 0,1% Gentamycin) gezüchtet. Die Zellen werden in 96-Well-Mikrotiterplatten mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/Well ausgesetzt, mit DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] behandelt und für 2 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Der Effekt der Substanzen auf den labilen Eisenpool (LIP) wird mittels Fluoreszenzanalyse gemessen. Die Fluoreszenzlöschung des Mittelwerts der Kontrollen wird auf 100% normiert. Die Diagramme zeigen die mittlere prozentuale Verfügbarkeit an zytoplasmatischem labilen Eisen  $\pm$  SEM, berechnet aus drei separaten Experimenten im Mehrfachansatz.

Nach einer zweistündigen Inkubationszeit mit DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] in HepG2 Zellen sind keine Effekte auf den LIP im Vergleich zur Kontrolle erkennbar.

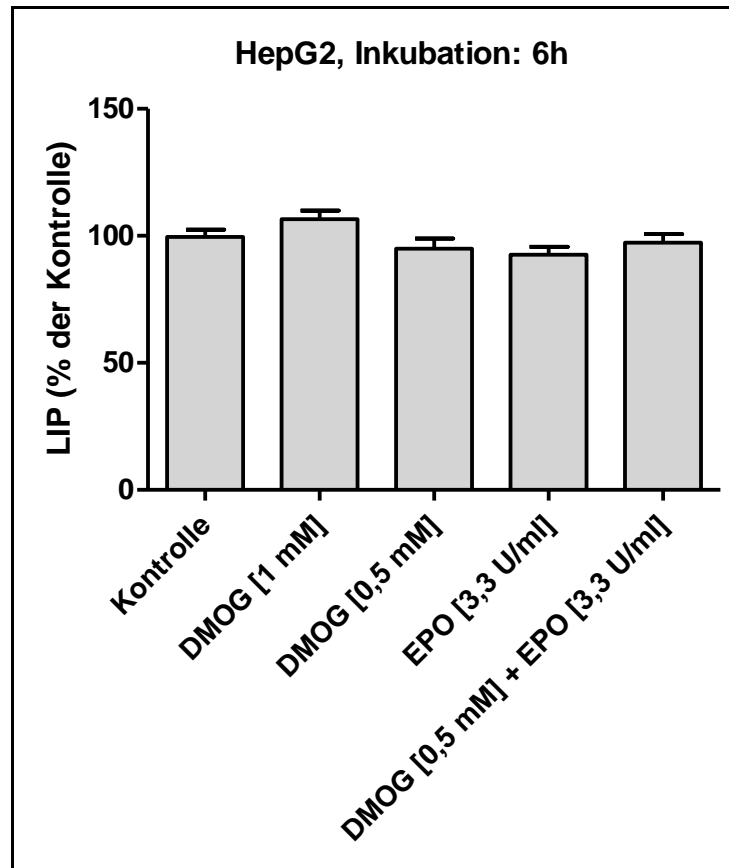


Abbildung 40: Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf den labilen Eisenpool nach 6 Stunden Inkubation in HepG2 Zellen

HepG2 Hepatokarzinomzellen werden in komplementiertem DMEM Medium (10% FBS, 1% L-Glutamin und 0,1% Gentamycin) gezüchtet. Die Zellen werden in 96-Well-Mikrotiterplatten mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/Well ausgesetzt, mit DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] behandelt und für 6 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Die Diagramme zeigen die mittlere prozentuale Verfügbarkeit an zytoplasmatischem labilen Eisen  $\pm$  SEM, berechnet aus drei separaten Experimenten im Mehrfachansatz. Detaillierte Informationen über die CAL-Methode zur Messung des LIPs siehe Legende Abbildung 39.

Auch nach 6h Behandlungsphase können keine signifikanten Effekte festgestellt werden. Es sind höchstens sehr kleine Tendenzen erkennbar, dabei scheint der LIP durch die Inkubation mit DMOG [1mM] tendenziell erhöht, während es bei DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] zu einer tendenziellen Verringerung des LIPs kommt.

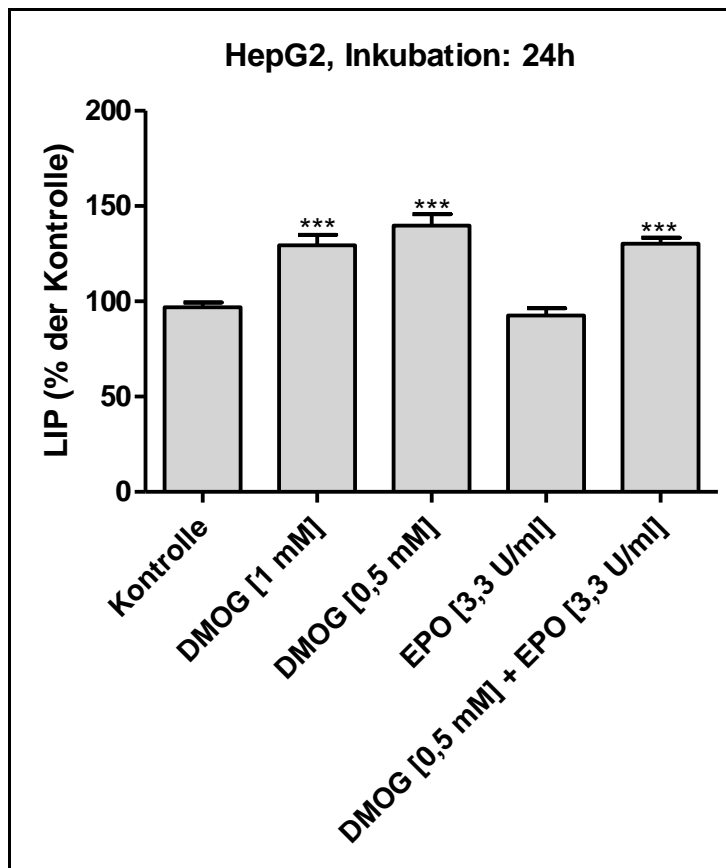


Abbildung 41: Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf den labilen Eisenpool nach 24 Stunden Inkubation in HepG2 Zellen

HepG2 Hepatokarzinomzellen werden in komplementiertem DMEM Medium (10% FBS, 1% L-Glutamin und 0,1% Gentamycin) gezüchtet. Die Zellen werden in 96-Well-Mikrotiterplatten mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/Well ausgesetzt, mit DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] behandelt und für 24 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Die Diagramme zeigen die mittlere prozentuale Verfügbarkeit an zytoplasmatischem labilen Eisen  $\pm$  SEM, berechnet aus drei separaten Experimenten im Mehrfachansatz. Signifikante Unterschiede sind angegeben mit \*\*\*( $p < 0,001$ ). Detaillierte Informationen über die CAL-Methode zur Messung des LIPs siehe Legende Abbildung 39.

Nach 24h sind deutliche Effekte auf die Größe des LIP sichtbar. Bei der Behandlung mit DMOG [1mM], DMOG [0,5mM] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] kommt es zu einer hoch signifikanten Erhöhung des LIP. Unter Einfluss von EPO [3,3U/ml] gibt es keine Veränderung des LIP im Vergleich zur Kontrolle.

Im Gegensatz zur beobachteten LIP Erhöhung in HepG2 Zellen nach 24h durch chemisch induzierte Hypoxie mittels DMOG in dieser Studie, konnte in anderen *in vitro* Untersuchungen mit anderem Studiendesign eine merkliche Reduzierung des LIPs in

HepG2 Zellen nach einer 12-stündigen Behandlung mit den Eisenchelatoren Deferipron, Desferrioxamin und ICL670 gezeigt werden. [Glickstein, 2005]

Borcar et al. ermittelten die Wirkung von drei PHD-Inhibitoren ( $\text{CoCl}_2$ , Desferrioxamin und Dimethyloxalylglycin) auf die HIF-Stabilisation unter anderem in humanen Hepatomazellen (HepG2). Durch alle drei Inhibitoren (Inkubation: 24h) wurden das HIF-1 $\alpha$  Level dosisabhängig und im unterschiedlichen Ausmaß erhöht. DMOG erhöhte die HIF-1 Konzentration nicht im selben Umfang in Vergleich zu den anderen zwei Inhibitoren. [Borcar et al., 2012]

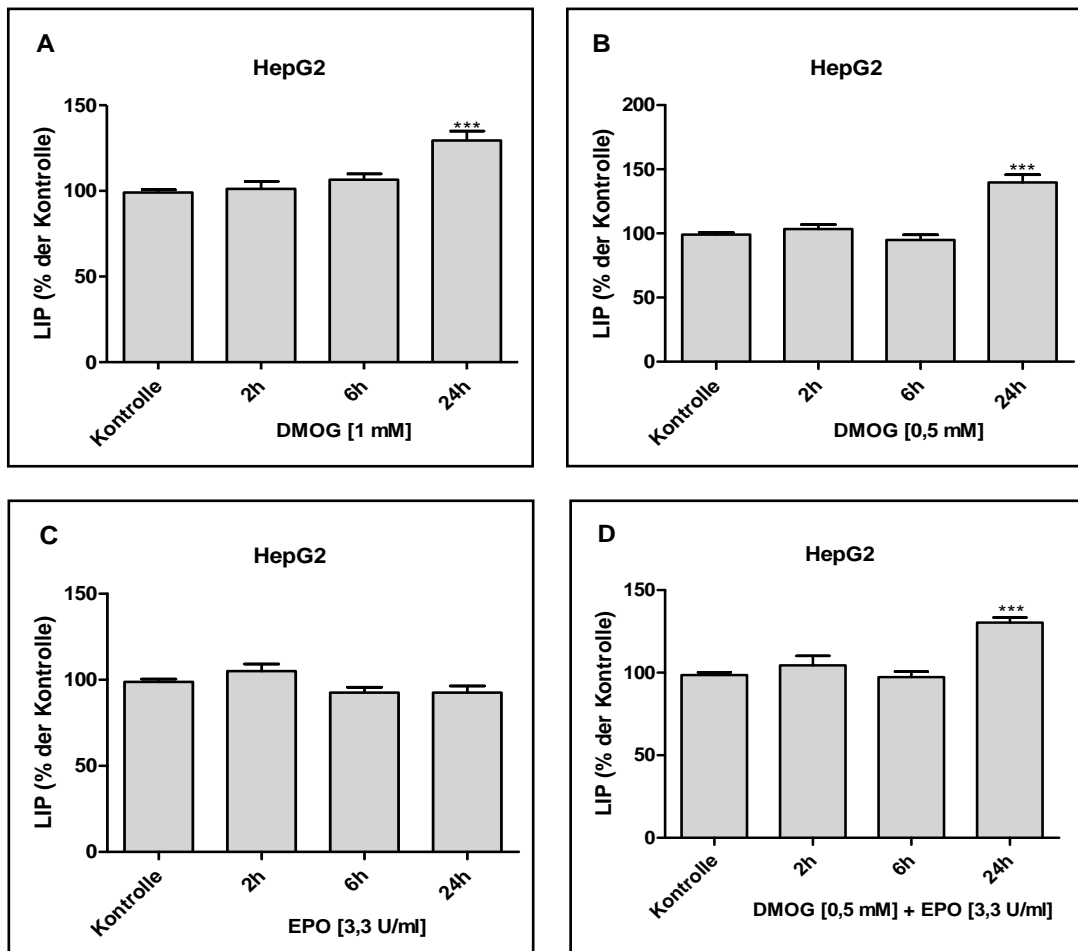


Abbildung 42: Zeitabhängige Effekte (2h, 6h, 24h) von DMOG [1mM] (A), DMOG [0,5mM] (B), EPO [3,3U/ml] (C) und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] (D) auf den labilen Eisenpool in HepG2 Zellen

HepG2 Hepatokarzinomzellen werden in komplementiertem DMEM Medium (10% FBS, 1% L-Glutamin und 0,1% Gentamycin) gezüchtet. Die Zellen werden in 96-Well-Mikrotiterplatten mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/Well ausgesetzt, mit DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] behandelt und für 2 Stunden, 6 Stunden und 24 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Die Diagramme zeigen die mittlere prozentuale Verfügbarkeit an zytoplasmatischem labilen Eisen  $\pm$  SEM, berechnet aus mindestens drei separaten Experimenten im Mehrfachansatz. Signifikante Unterschiede sind angegeben mit \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Detaillierte Informationen über die CAL-Methode zur Messung des LIPs siehe Legende Abbildung 39.

Bei der Betrachtung der zeitabhängigen Effekte (2h, 6h, 24h) der Substanzen lässt sich allgemein sagen, dass es in HepG2 Zellen erst nach 24h zu Auswirkungen auf den LIP kommt. Bei der Inkubation mit DMOG in beiden verwendeten Konzentrationen kommt es nach 24h zur hoch signifikanten Erhöhung des LIP, wobei die Ausprägung bei DMOG [0,5mM] noch stärker vorhanden ist. Auch bei der Behandlung mit DMOG



[0,5mM] + EPO [3,3U/ml] zeigt sich nach 24h eine hoch signifikante Steigerung der LIP Konzentration. EPO [3,3U/ml] hat nach allen Zeitmessungen keinen Effekt auf den LIP Spiegel in HepG2 Zellen.

Vergleich der Mittelwerter  $\pm$  SEM der Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf den labilen Eisenpool nach 2 Stunden, 6Stunden und 24 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen und HepG2 Zellen

Der labile Eisenpool ist bei verschiedenen Zelltypen unterschiedlich groß. Diese Unterschiede reflektieren die verschiedenen Funktionen von bestimmten Organen und ihren Bedarf an Eisenionen in einem Organismus. [Kruszewski, 2003]

In den folgenden Tabellen sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von SH-SY5Y und HepG2 Zellen nach den unterschiedlichen Behandlungen zusammengefasst.

		Kontrolle 2h	DMOG [1mM] 2h	DMOG [0,5mM] 2h	EPO [3,3 U/ml] 2h	DMOG [0,5mM] + EPO [3,3 U/ml] 2h
<b>LIP - SH-SY5Y</b>	Mittelwert	100,0	56,9	69,9	61,1	87,5
	$\pm$ SEM	2,6	6,1	8,2	4,7	5,2
<b>LIP - HepG2</b>	Mittelwert	100,0	101,2	103,3	106,3	107,6
	$\pm$ SEM	3,0	4,3	3,5	3,9	6,0

Tabelle 17: Mittelwert  $\pm$  SEM

Vergleich der Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf den labilen Eisenpool nach 2 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen und HepG2 Zellen

		Kontrolle 6h	DMOG [1mM] 6h	DMOG [0,5mM] 6h	EPO [3,3 U/ml] 6h	DMOG [0,5mM] + EPO [3,3 U/ml] 6h
<b>LIP - SH-SY5Y</b>	Mittelwert	90,0	68,2	79,4	73,0	130,4
	± SEM	4,5	8,4	4,8	6,5	6,8
<b>LIP - HepG2</b>	Mittelwert	99,6	106,6	94,9	92,6	97,4
	± SEM	2,8	3,3	4,1	3,1	3,3

Tabelle 18: Mittelwert ± SEM

Vergleich der Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf den labilen Eisenpool nach 6 Stunden  
Inkubation in SH-SY5Y Zellen und HepG2 Zellen

		Kontrolle 24h	DMOG [1mM] 24h	DMOG [0,5mM] 24h	EPO [3,3 U/ml] 24h	DMOG [0,5mM] + EPO [3,3 U/ml] 24h
<b>LIP - SH-SY5Y</b>	Mittelwert	100,0	68,1	81,6	95,1	145,4
	± SEM	2,7	6,7	4,7	4,1	6,7
<b>LIP - HepG2</b>	Mittelwert	96,9	129,4	139,8	92,6	130,3
	± SEM	2,5	5,5	5,9	3,9	3,2

Tabelle 19: Mittelwert ± SEM

Vergleich der Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf den labilen Eisenpool nach 24 Stunden  
Inkubation in SH-SY5Y Zellen und HepG2 Zellen

Allgemein gibt es bei der LIP Messung breite Variationen zwischen den Ergebnissen, die bei beiden Zelllinien vorkommen, jedoch vermehrt bei den SH-SY5Y Zellen zu beobachten sind. Dennoch können deutliche Effekte und Signifikanzen nachgewiesen werden.

Die Resultate bei den LIP Messungen unterscheiden sich maßgeblich zwischen den verwendeten Zelllinien, SH-SY5Y und HepG2. Zum einen vom Zeitpunkt bei dem signifikante Effekte auf den LIP Spiegel zu beobachten sind und zum anderen von der Effektrichtungen, die bei den einzelnen Substanzen gemessen werden.

In SH-SY5Y Zellen sind bei allen Substanzen, außer bei der Behandlung mit DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml], schon signifikante Effekte nach 2h nachweisbar, während in den HepG2 Zellen die Auswirkungen, außer bei der Inkubation mit EPO [3,3U/ml], erst nach 24h das Signifikanzniveau erreichen. Gemeinsamkeiten zwischen den beiden Zelllinien sind bei der Wirksamkeit von EPO [3,3U/ml] nach 24h feststellbar.

EPO [3,3U/ml] wirkt in SH-SY5Y zunächst nach 2h und 6h LIP senkend. In HepG2 Zellen nach allen Zeiteinheiten und in SH-SY5Y Zellen nach 24h hat die Behandlung mit EPO [3,3U/ml] keine Auswirkungen auf den LIP.

Eine weitere Gemeinsamkeit zeigt sich in der Effektrichtung bei der Behandlung mit DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] nach 24h, dabei kommt es in HepG2 Zellen sowie in SH-SY5Y Zellen zu einer gesteigerten LIP Konzentration.

Gegensätze zwischen den Zellen gibt es in der Effektentwicklung während der Inkubation mit DMOG [0,5mM] und DMOG [1mM], die besonders nach 24h deutlich werden. Hier kommt es in den SH-SY5Y Zellen zu einer sehr signifikanten (DMOG [0,5mM]) beziehungsweise zu einer hoch signifikanten (DMOG [1mM]) Reduzierung des LIPs, während im Kontrast dazu eine hoch signifikante Erhöhung des LIPs in HepG2 bei diesen zwei Behandlungen gemessen wird.

#### Zeitabhängige Effekte (2h, 6h, 24h) von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von zytosolischem Ferritin in SH-SY5Y Zellen

Die Hauptaufgabe von Ferritin ist die dynamische Speicherung von zellulärem Eisen, wodurch die Zelle vor potentiellen, eisenabhängigen Schäden durch freie Radikale geschützt wird. Auf der anderen Seite kann das gespeicherte Eisen bei Bedarf wieder freigesetzt werden. [Friedman et al., 2011] Eine Überexpression der H-chain Ferritinuntereinheit senkt den LIP und dadurch die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte Zyto- und Genotoxizität. Auf der anderen Seite führt eine Senkung des zellulären Ferritinlevels durch antisense-vermittelte Syntheseinhibitoren zu einer gesteigerten LIP Konzentration und einer erhöhten Anfälligkeit für oxidativen Stress. [Kruszewski, 2003]

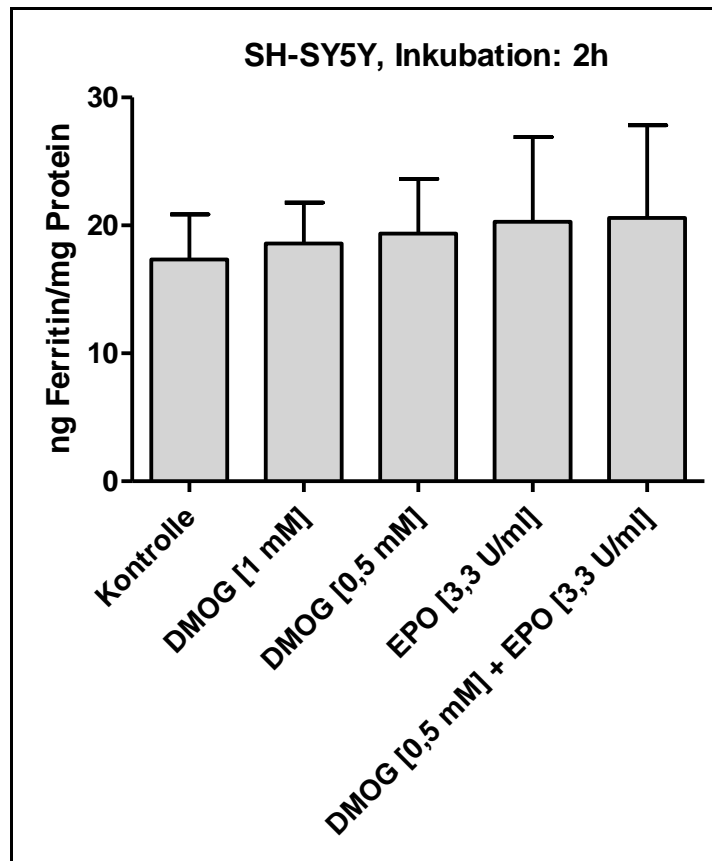


Abbildung 43: Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von zytosolischem Ferritin nach 2 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen

SH-SY5Y Neuroblastomzellen werden in komplementiertem DMEM/Ham's F-12 Medium (10% FBS, 1% L-Glutamin und 0,1% Gentamycin) gezüchtet. Die Zellen werden in 6-Well-Platten mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/Well ausgesetzt, mit DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] behandelt und für 2 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Die quantitative Bestimmung des Effekts der Substanzen auf das humane, zytosolische Ferritin erfolgt mittels antikörperbasierendem Testkit und anschließender photometrischen Messung. Für die statistische Auswertung werden die Mittelwerte für jedes Paar Standards, Proben und Kontrollen berechnet. Die Diagramme zeigen die Ferritinkonzentration in ng Ferritin/mg Protein  $\pm$  SEM, berechnet aus drei separaten Experimenten im Doppelsatz.

Die Messung der Expression des zytosolischen Ferritins in SH-SY5Y Zellen wird in ng Ferritin/mg Protein angegeben. Der zytosolische Ferritingehalt der Kontrolle liegt bei ca. 17 ng Ferritin/mg Protein. Bei einer Inkubationszeit von 2h gibt es sichtbare Variationen zwischen den einzelnen Messungen, jedoch ist noch kein Effekt auf das zytosolische Ferritin bei allen Behandlungen erkennbar.

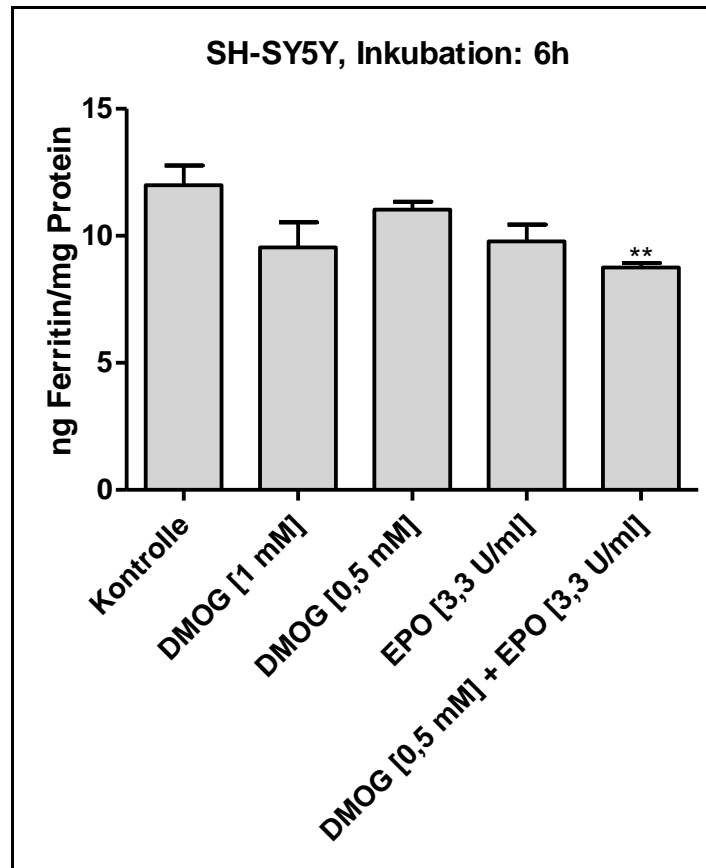


Abbildung 44: Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von zytosolischem Ferritin nach 6 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen

SH-SY5Y Neuroblastomzellen werden in komplementiertem DMEM/Ham's F-12 Medium (10% FBS, 1% L-Glutamin und 0,1% Gentamycin) gezüchtet. Die Zellen werden in 6-Well-Platten mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/Well ausgesetzt, mit DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] behandelt und für 6 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Die Diagramme zeigen die Ferritinkonzentration in ng Ferritin/mg Protein  $\pm$  SEM, berechnet aus drei separaten Experimenten im Doppelsatz. Signifikante Unterschiede sind angegeben mit \*\* ( $p < 0,01$ ). Detaillierte Informationen über die Methode zur Messung des zytosolischen Ferritins siehe Legende Abbildung 43.

Nach 6h Inkubationszeit sind Veränderungen in der zytosolischen Ferritinkonzentration erkennbar. Eine tendenzielle Reduzierung vor allen bei DMOG [1mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] wird in der graphischen Darstellung deutlich, jedoch kann statistisch nur für die Behandlung mit DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] eine sehr signifikante Verringerung des Ferritin-Gehaltes festgestellt werden. Das Ferritin Level sinkt ausgehend von ca. 12 ng Ferritin/mg Protein der Kontrolle bei der Behandlung mit DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf ca. 10 ng Ferritin/mg Protein.

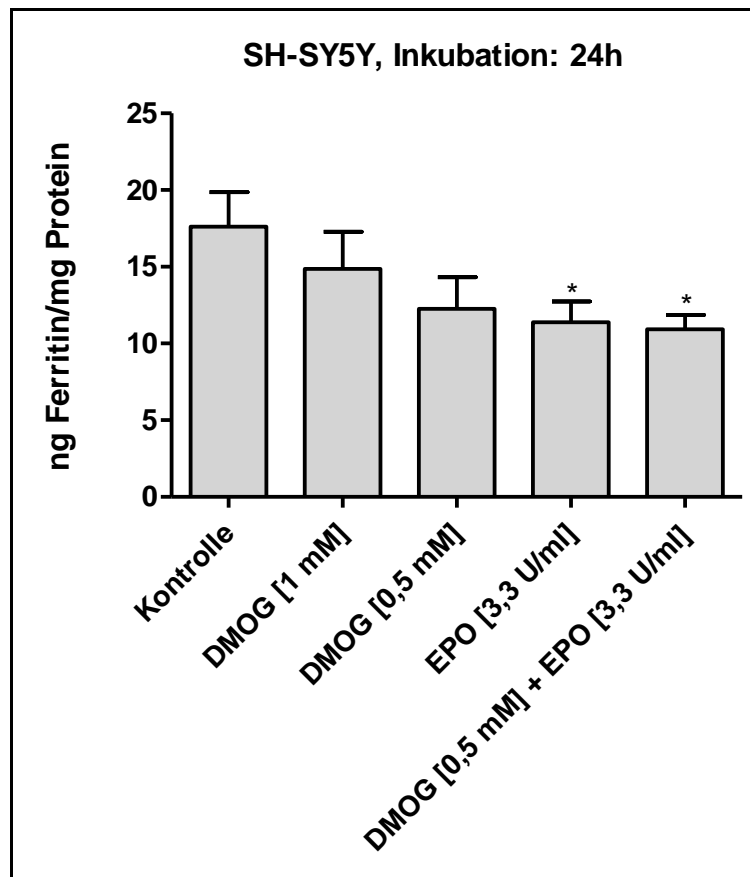


Abbildung 45: Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von zytosolischem Ferritin nach 24 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen

SH-SY5Y Neuroblastomzellen werden in komplementiertem DMEM/Ham's F-12 Medium (10% FBS, 1% L-Glutamin und 0,1% Gentamycin) gezüchtet. Die Zellen werden in 6-Well-Platten mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/Well ausgesetzt, mit DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] behandelt und für 24 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Die Diagramme zeigen die Ferritinkonzentration in ng Ferritin/mg Protein  $\pm$  SEM, berechnet aus fünf separaten Experimenten im Einzel- oder Doppelsatz. Signifikante Unterschiede sind angegeben mit \* ( $p < 0,05$ ). Detaillierte Informationen über die Methode zur Messung des zytosolischen Ferritins siehe Legende Abbildung 43.

Eine Senkung der zytosolischen Ferritinkonzentration ist auch nach 24h Inkubationszeit bei allen Behandlungen zu sehen. Der Effekt ist dabei stärker erkennbar im Vergleich zu den Behandlungen nach 6h. Mit der niedrigeren DMOG [0,5mM] Konzentration ist der abnehmende Effekt auf den Ferritin-Gehalt stärker als mit DMOG [1mM] in der höheren Konzentration. Nach statistischer Auswertung ergeben sich signifikante Reduzierungen der Expression des zytosolischen Ferritins durch die Behandlung mit EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml]. Der Ferritin-Gehalt verringert

sich auf ca. 11 ng Ferritin/mg Protein durch EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] verglichen mit der Kontrolle, die bei ca. 17 ng Ferritin/mg Protein liegt.

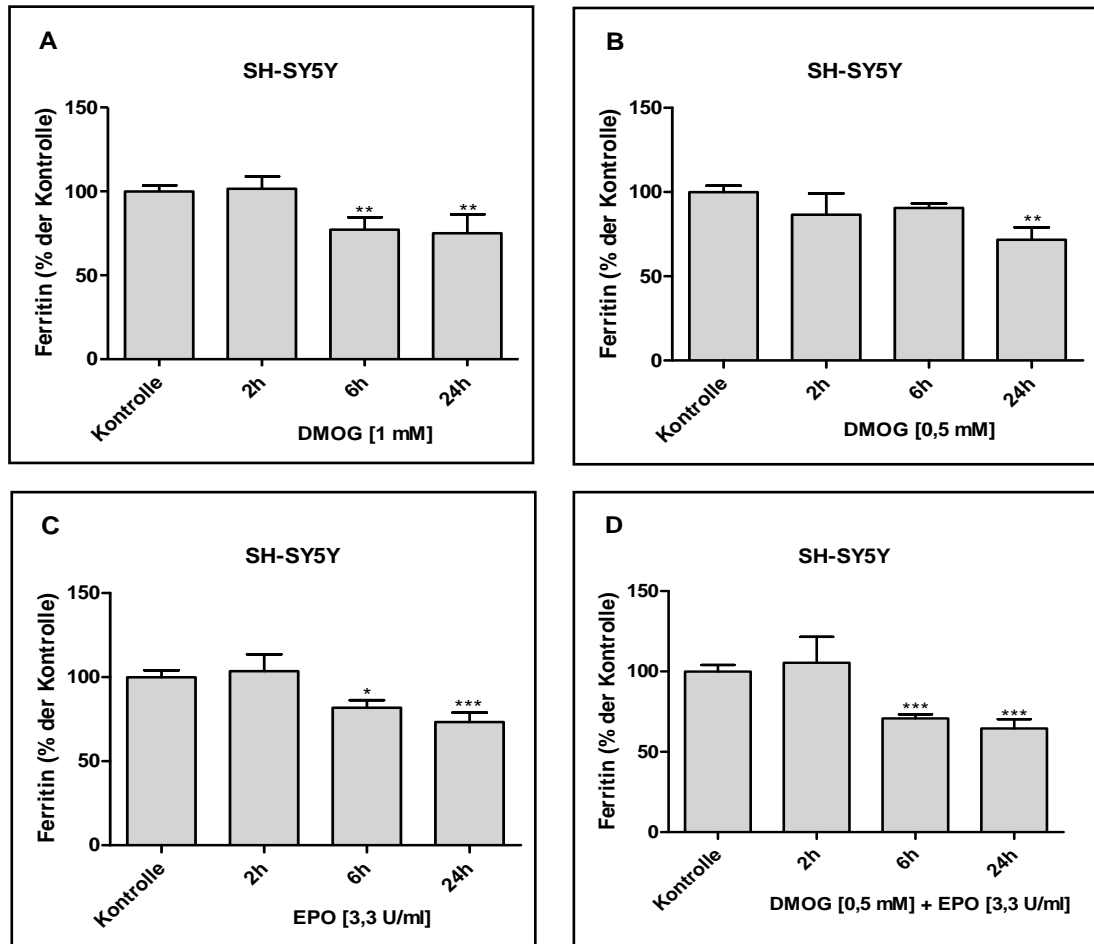


Abbildung 46: Zeitabhängige Effekte (2h, 6h, 24h) von DMOG [1mM] (A), DMOG [0,5mM] (B), EPO [3,3U/ml] (C) und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] (D) auf die Expression von zytosolischem Ferritin in SH-SY5Y Zellen

SH-SY5Y Neuroblastomzellen werden in komplementiertem DMEM/Ham's F-12 Medium (10% FBS, 1% L-Glutamin und 0,1% Gentamycin) gezüchtet. Die Zellen werden in 6-Well-Platten mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/Well ausgesetzt, mit DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] behandelt und für 2 Stunden, 6 Stunden und 24 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Die Diagramme zeigen die mittlere prozentuale Ferritinkonzentration  $\pm$  SEM, berechnet aus mindestens drei separaten Experimenten im Doppelsatz. Signifikante Unterschiede sind angegeben mit \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) und \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Detaillierte Informationen über die Methode zur Messung des zytosolischen Ferritins siehe Legende Abbildung 43.

Nach 24h sind die deutlichsten Effekte der einzelnen Substanzen zu sehen, wenn der prozentuale Ferritin-Gehalt angegeben ist. Die Kontrolle ist auf 100% gesetzt. Für beide eingesetzten DMOG Konzentrationen wird eine sehr signifikante Reduzierung berechnet. Für EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] ergeben sich noch höhere signifikante Unterschiede. Eine hoch signifikante Verminderung kann für beide Substanzen nachgewiesen werden. Nach 6h kann eine hoch signifikante Abnahme des zytosolischen Ferritins bei der Behandlung mit DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml], eine sehr signifikante Verringerung bei DMOG [1mM] Inkubation und eine signifikante Reduktion unter EPO [3,3U/ml] Einfluss festgestellt werden. Eine zweistündige Inkubationsphase hat unter allen Behandlungen keine signifikanten Auswirkungen auf den zytosolische Ferritin-Gehalt.

Auch in anderen Studien wurden die Effekte von EPO auf die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren erst nach längerer Inkubationszeit sichtbar, nahmen im Zeitverlauf aber wieder ab.

In einer Studie von Genc et al. zeigte die Behandlung mit EPO nach 12h ihre Maximalwirksamkeit. Es wurde der Effekt von EPO (1U/ml, Inkubation: 24h) auf die Transkription und Aktivierung von Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2), ein Schlüsseltranskriptionsfaktor des zellulären Antioxidantabwehrsystems, in SH-SY5Y Zellen wurde untersucht. Die Translokation von zytosolischem und nuklearem Nrf2 durch EPO erfolgte zeitabhängig. Dabei zeigte sich ein Maximalgehalt an Kern-Nrf2 bei EPO Gabe nach 3-6h und eine Abnahme an nuklearem Nrf2 nach 12h. Der zytosolische Nrf2-Gehalt verhielt sich reziprok zu der Kern-Nrf2 Expression. [Genc et al., 2010]



Zeitabhängige Effekte (2h, 6h, 24h) von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von zytosolischem Ferritin in HepG2 Zellen

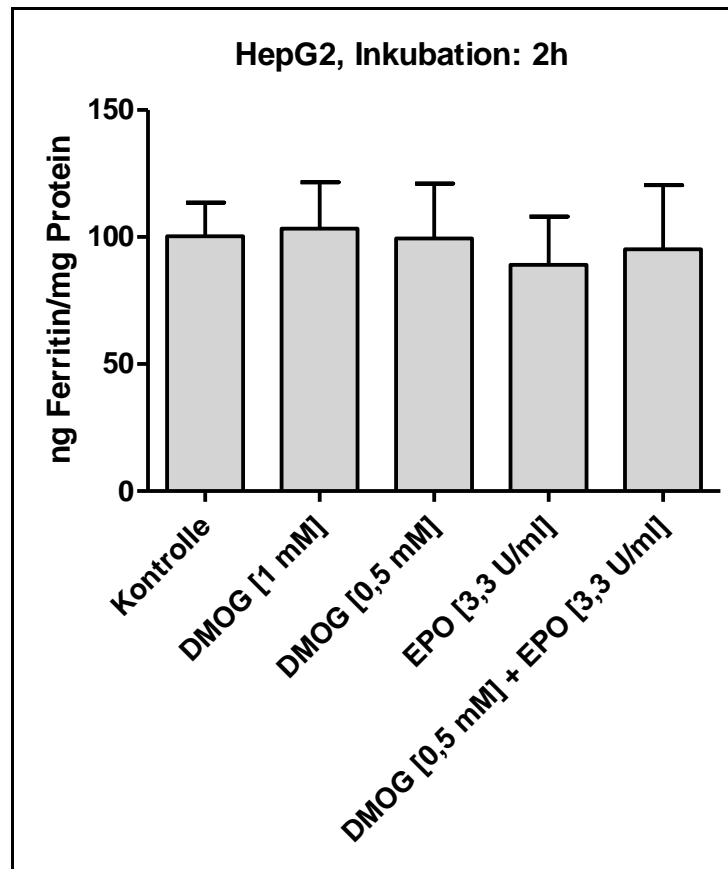


Abbildung 47: Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von zytosolischem Ferritin nach 2 Stunden Inkubation in HepG2 Zellen

HepG2 Hepatokarzinomzellen werden in komplementiertem DMEM Medium (10% FBS, 1% L-Glutamin und 0,1% Gentamycin) gezüchtet. Die Zellen werden in 6-Well-Platten mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/Well ausgesetzt, mit DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] behandelt und für 2 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Die quantitative Bestimmung des Effekts der Substanzen auf das humane zytosolische Ferritin erfolgt mittels antikörperbasiertem Testkit und anschließender photometrischer Messung. Für die statistische Auswertung werden die Mittelwerte für jedes Paar Standards, Proben und Kontrollen berechnet. Die Diagramme zeigen die Ferritinkonzentration in ng Ferritin/mg Protein  $\pm$  SEM, berechnet aus drei separaten Experimenten im Doppelsatz.

Die Expression des zytosolischen Ferritins wird ebenfalls in HepG2 Zellen gemessen und graphisch in ng Ferritin/mg Protein angegeben. Der Ferritingehalt liegt hier bei der Kontrolle bei ca. 100 ng/mg Protein. Unter zweistündiger Inkubation sind keine

signifikanten Effekte auf die Ferritinkonzentration feststellbar. Jedoch gibt es auch hier, wie schon beim SH-SY5Y Zellmodell, nach 2h Inkubation bei der zytosolischen Ferritinbestimmung deutlichen Variationen zwischen den einzelnen Messungen.

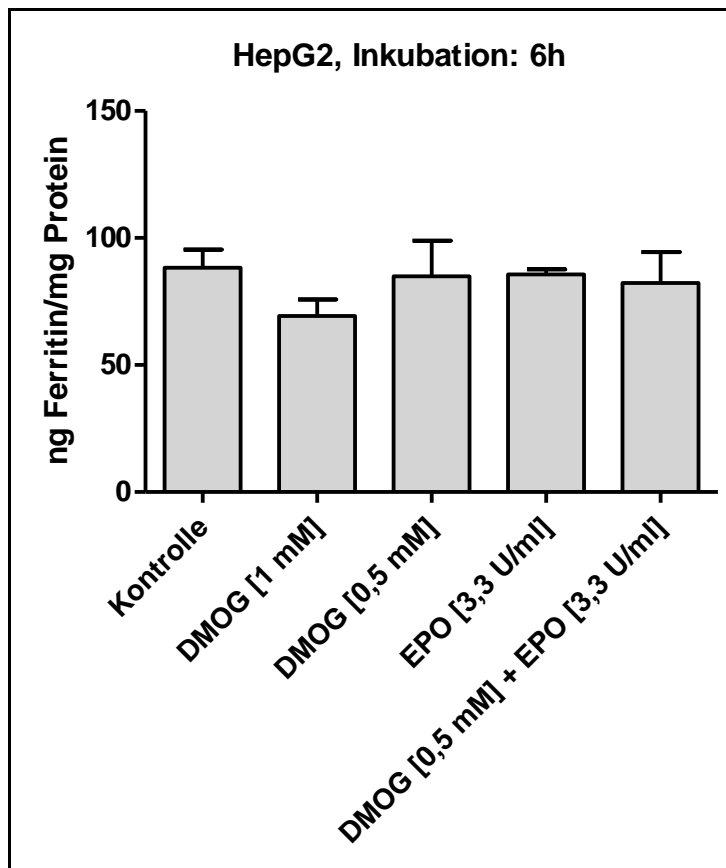


Abbildung 48: Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von zytosolischem Ferritin nach 6 Stunden Inkubation in HepG2 Zellen

HepG2 Hepatokarzinomzellen werden in komplementiertem DMEM Medium (10% FBS, 1% L-Glutamin und 0,1% Gentamycin) gezüchtet. Die Zellen werden in 6-Well-Platten mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/Well ausgesetzt, mit DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] behandelt und für 6 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Die Diagramme zeigen die Ferritinkonzentration in ng Ferritin/mg Protein  $\pm$  SEM, berechnet aus drei separaten Experimenten im Doppelsatz. Detaillierte Informationen über die Methode zur Messung des zytosolischen Ferritins siehe Legende Abbildung 47.

Auch nach 6h Inkubation sind keine nennenswerten Veränderungen der zytosolischen Ferritinkonzentration sichtbar. Es scheint eine tendenzielle Verringerung durch die Behandlung mit DMOG [1mM] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] zu geben. Bei

DMOG [0,5mM] und EPO [3,3U/ml] alleine ist kein Effekt im Vergleich zur Kontrolle erkennbar. Die Ferritinkonzentration der Kontrolle liegt hier bei ca. 90 ng Ferritin/mg Protein.

In anderen Studien wurden weitere Einflussfaktoren auf die Eisenstoffwechselregulationsmechanismen unter Kurzzeithypoxie im HepG2 Zellmodell analysiert.

So untersuchten Luo et al. in HepG2 Zellen welchen Beitrag HIF-1 bei der Expression von IRP 1, das bei der interzellulären Eisenhomöostase eine wichtige Rolle spielt, leistet und den potentiellen Mechanismus, der dabei beteiligt ist. Unter kurzzeitlicher (0h, 2h, 4h oder 6h) physikalischer Hypoxie (1% O<sub>2</sub> Hypoxiekammer) und chemischer Hypoxie (400µmol CoCl<sub>2</sub>) fanden sie heraus, dass sich das IRP 1 mRNA Level nach 4- und 6-stündiger physikalischer Hypoxie signifikant im Vergleich zu Zellen kultiviert unter Normoxie reduzierte. Im Kontrast dazu gab es bei chemischer Hypoxie keine offensichtlichen Effekte. Der Gehalt an HIF-1α nach physikalischer und chemischer Hypoxie stieg signifikant neben einer deutliche Expressionsreduzierung von IRP 1 und TfR. Dieser Effekt war jedoch nur auf kurzzeitige Hypoxiebedingungen beschränkt. Unter langzeitiger Hypoxie (> 8h) gab es eine Hochregulierung des IRP 1 mRNA Levels. [Luo et al., 2011]

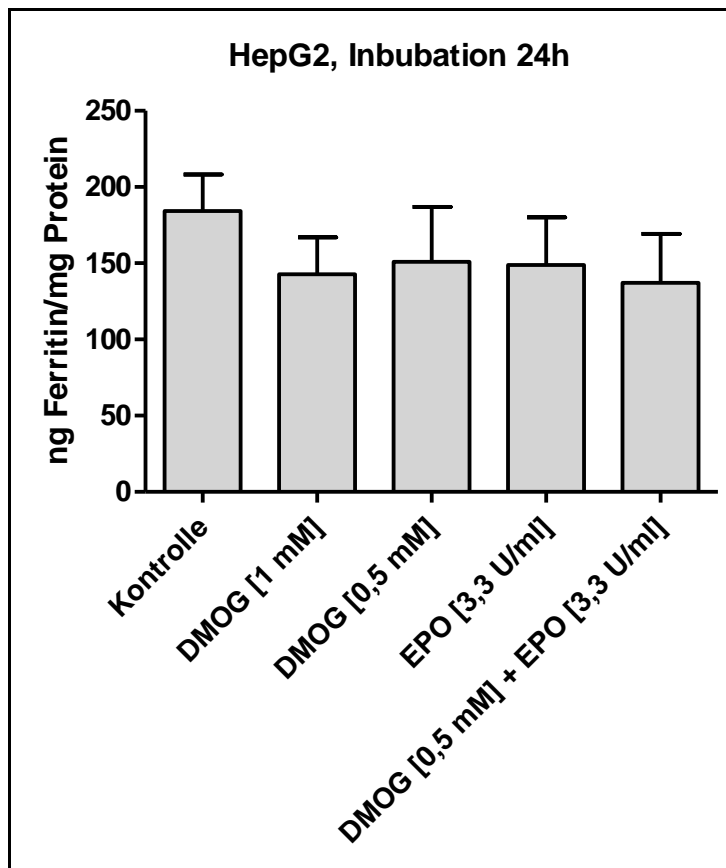


Abbildung 49: Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von zytosolischem Ferritin nach 24 Stunden Inkubation in HepG2 Zellen

HepG2 Hepatokarzinomzellen werden in komplementiertem DMEM Medium (10% FBS, 1% L-Glutamin und 0,1% Gentamycin) gezüchtet. Die Zellen werden in 6-Well-Platten mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/Well ausgesetzt, mit DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] behandelt und für 24 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Die Diagramme zeigen die Ferritinkonzentration in ng Ferritin/mg Protein  $\pm$  SEM, berechnet aus drei separaten Experimenten im Doppelsatz. Detaillierte Informationen über die Methode zur Messung des zytosolischen Ferritins siehe Legende Abbildung 47.

Nach einer Behandlungszeit von 24h können auch keine signifikanten Effekte auf die Expression des zytosolischen Ferritins gemessen werden. Es gibt eine anhaltende Entwicklung zur Reduzierung der Ferritinkonzentration im Vergleich zur Kontrolle, die teilweise schon nach 6h sichtbar wird. Der Ferritin-Gehalt der Kontrolle liegt bei ca. 180 ng Ferritin/mg Protein.

Vergleich der Mittelwerte  $\pm$  SEM der Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von zytosolischem Ferritin nach 2 Stunden, 6 Stunden und 24 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen und HepG2 Zellen

		Kontrolle 2h	DMOG [1mM] 2h	DMOG [0,5mM] 2h	EPO [3,3 U/ml] 2h	DMOG [0,5mM] + EPO [3,3 U/ml] 2h
<b>Ferritin - SH-SY5Y</b>	Mittelwert	17,3	18,6	19,4	20,3	20,6
	$\pm$ SEM	3,5	3,2	4,3	6,6	7,2
<b>Ferritin - HepG2</b>	Mittelwert	100,4	103,3	99,4	89,0	95,2
	$\pm$ SEM	13,2	18,3	21,7	19,0	25,2

Tabelle 20: Mittelwert  $\pm$  SEM

Vergleich der Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von zytosolischem Ferritin nach 2 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen und HepG2 Zellen

		Kontrolle 6h	DMOG [1mM] 6h	DMOG [0,5mM] 6h	EPO [3,3 U/ml] 6h	DMOG [0,5mM] + EPO [3,3 U/ml] 6h
<b>Ferritin - SH-SY5Y</b>	Mittelwert	12,0	9,5	11,0	9,8	8,8
	$\pm$ SEM	0,8	1,0	0,3	0,7	0,1
<b>Ferritin - HepG2</b>	Mittelwert	88,3	69,3	85,0	85,7	82,3
	$\pm$ SEM	7,1	6,6	14,0	2,0	12,1

Tabelle 21: Mittelwert  $\pm$  SEM

Vergleich der Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von zytosolischem Ferritin nach 6 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen und HepG2 Zellen

		Kontrolle 24h	DMOG [1mM] 24h	DMOG [0,5mM] 24h	EPO [3,3 U/ml] 24h	DMOG [0,5mM] + EPO [3,3 U/ml] 24h
<b>Ferritin - SH-SY5Y</b>	Mittelwert	17,6	14,9	12,3	11,4	10,9
	± SEM	2,3	2,4	2,1	1,4	1,0
<b>Ferritin - HepG2</b>	Mittelwert	184,2	142,7	151,0	148,9	137,3
	± SEM	24,1	24,4	36,1	31,2	32,0

Tabelle 22: Mittelwert ± SEM

Vergleich der Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von zytosolischem Ferritin nach 24 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen und HepG2 Zellen

Bei einem direkten Vergleich der Effekte auf die Expression des zytosolischen Ferritins zwischen SH-SY5Y und HepG2 Zellen wird anschaulich, dass der Ausgangsferritingehalt bei den Leberkarzinomzellen HepG2 (zwischen 90 und 180 ng Ferritin/mg Protein bei der Kontrolle) deutlich höher liegt, als bei der Neuroblastomazelllinie SH-SY5Y (zwischen 12 und 17 ng Ferritin/mg Protein bei der Kontrolle). Diese Ergebnisse unterstützen die Tatsache, dass die Leber das größte Eisenspeicherorgan darstellt und die Eisengehalte in neuronalen Zellen deutlich geringer sind. Außerdem fällt auf, dass die Variationen zwischen den einzelnen Messungen bei den HepG2 Zellen im Vergleich zu den SH-SY5Y Zellen größer zu sein scheinen. Bei den HepG2 Zellen können nach allen Inkubationszeiten bei allen Behandlungen keine signifikanten Effekte festgestellt werden. Hingegen ergeben sich bei den SH-SY5Y Zellen bei der Betrachtung des Ferritingehaltes in ng Ferritin/mg Protein sehr signifikante Verminderungen nach 6h bei der Behandlung mit DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] und eine signifikante Abnahme nach 24h bei EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml]. Bei der Darstellung des prozentualen Ferritingehalts der verwendeten Substanzen in Bezug auf die auf 100% gesetzte Kontrolle in SH-SY5Y Zellen werden die reduzierenden Effekte graphisch und statistisch noch deutlicher. Besonders nach 24h ergeben sich für EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] hoch signifikante Verminderungen und bei DMOG in beiden Konzentrationen ([0,5mM]; [1mM]) eine sehr signifikante Abnahmen der Ferritinexpression.

Die H-chain Untereinheit ist der Hauptregulator für die Ferritinaktivität. Eine Überexpression modifiziert den zellulären Phänotyp. Dies wurde zum ersten Mal an Mäuseerythroleukämiezellklonen, die mit einer Maus-H-chain transfiziert wurden, dargestellt. Die Zellen zeigten einen Eisenmangelphänotyp mit reduziertem LIP, einer Hochregulierung des Transferrin Rezeptors und verminderter Hämoglobinsynthese. Außerdem produzierten die Zellen auch weniger ROS nach einer Behandlung mit Wasserstoffperoxid im Vergleich zu den Kontrollzellen. [Arosio und Levi, 2002]

Ein Beweis für den möglichen protektiven Schutz von Ferritin gegen oxidativen Stress wurde durch eine Studie an Endothelzellen bestätigt, die zuerst mit Eisen und danach mit Wasserstoffperoxid und Häm beladen wurden. Die Vorbehandlung bewahrte die Zellen vor oxidativem Stress und es wurde vermutet, dass Ferritin dabei das protektive Agens darstellte. [Arosio und Levi, 2002]

Vergleich der Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Veränderung des LIP Levels und die Expression von zytosolischem Ferritin nach 2 Stunden, 6Stunden und 24 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen und HepG2 Zellen

Die intrazelluläre Eisenkonzentration ist in einem engen steady state geregelt, dabei spielen der labile Eisenpool und die zytosolische Ferritinkonzentration eine zentrale Rolle. Eine theoretische Annahme ist, dass sich die LIP Konzentration entgegengesetzt zum Ferritinspiegel verhält.

Epsztejn et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen LIP und Ferritin bzw. H-Ferritin in Mäuseerythroleukämiezellen. Zellen mit erhöhtem H-Ferritinlevel zeigten geringe LIP Konzentrationen und damit niedrigere ROS Produktion. Die Studie belegt, dass H-Ferritin als Regulator des LIP eine Rolle spielt und somit zur möglichen Verringerung von oxidativem Stress beiträgt. [Epsztejn et al., 1999]

In den folgenden Tabellen wird versucht die Effekte der einzelnen Inkubationen auf den labilen Eisenpool und auf Ferritin zusammenfassend darzustellen. Dabei werden die folgenden Symbole für statistisch signifikante Effektausprägung sowie tendenzielle Effekte, die statistisch jedoch nicht signifikant sind, verwendet:

Statistisch signifikante Effektausprägung im Vergleich zur Kontrolle:

↓ u ↑ ... leicht

↓↓ u ↑↑ ... stark

↓↓↓ u ↑↑↑ ... sehr stark

Tendenzieller Effekt im Vergleich zur Kontrolle, statistisch jedoch nicht signifikant:

(↓) u (↑) ... leicht

(↓↓) u (↑↑) ... stark

(↓↓↓) u (↑↑↑) ... sehr stark

Inkubation: 2h	DMOG [1mM]	DMOG [0,5mM]	EPO [3,3 U/ml]	DMOG [0,5mM] + EPO [3,3 U/ml]
<b>LIP - SH-SY5Y</b>	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓
<b>Ferritin - SH-SY5Y</b>	/	/	/	/

Tabelle 23: Vergleich der Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf das Verhalten des labilen Eisenpools und die Expression von zytosolischem Ferritin nach 2 Stunden Inkubation in SH-SY5Y-Zellen

In SH-SY5Y-Zellen hat schon eine Inkubationszeit von 2h einen deutlich reduzierenden Einfluss auf die LIP Konzentration, während der Ferritin-Gehalt noch unverändert bleibt.

Die reduzierende Wirkung von EPO [3,3U/ml] auf den LIP ist nach 2h Inkubation in SH-SY5Y Zellen am deutlichsten.

Das hämatopoetische Glykoprotein EPO zeigt neuroprotektive Effekte bei verschiedenen neuronalen Zelltypen *in vivo* und *in vitro*. [Um et al., 2007]

Wenker et al. testeten die neuroprotektiven Effekte von EPO speziell in der Mikroglia im SH-SY5Y Zellmodell. Die Zellen wurden in einer apoptosestimulierenden Umgebung (Medium mit EOC-2 Mikrogliazellen oder Makrophagen (RAW 264.7)) kultiviert, die durch EPO (25 U/mL) und EpoR aufgehoben wurde. Außerdem wurde



gezeigt, dass EPO keine direkten antiinflammatorischen Effekte auf die Mikrogliaaktivierung hatte, es beeinflusste aber indirekt die Resistenz der Neuronen gegen eine proinflammatorische Umgebung. [Wenker et al., 2013]

Pregi et al. zeigten die apoptosepräventive Wirkung von EPO in SH-SY5Y Zellen. Die Zellen wurden mit EPO (25 U/ml, Inkubation: 12h) vorbehandelt und danach wurde TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) (25 ng/ml), ein proinflammatorisches Zytokin, zugesetzt. Durch die EPO Vorbehandlung wurden die Zellen resistent gegen den Zelltod. Der Effekt zeigte sich jedoch nicht bei gleichzeitiger Gabe. [Pregi et al., 2009]

Misonou et al. zeigten, dass durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100-250  $\mu$ M) induzierter oxidativer Stress das Level an intrazellulärem A $\beta$  in SH-SY5Y Zellen steigerte. [Misonou et al., 2000]

Inkubation: 6h	DMOG [1mM]	DMOG [0,5mM]	EPO [3,3 U/ml]	DMOG [0,5mM] + EPO [3,3 U/ml]
<b>LIP - SH-SY5Y</b>	↓	/	↓	↑↑↑
<b>Ferritin - SH-SY5Y</b>	(↓)	(↓)	(↓)	↓↓

Tabelle 24: Vergleich der Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf das Verhalten des labilen Eisenpools und die Expression von zytosolischem Ferritin nach 6 Stunden Inkubation in SH-SY5Y-Zellen

Nach 6h nimmt die anfangs starke Verminderung des LIP Spiegels ab. Bei der Behandlung mit DMOG [0,5mM] + EPO [3,3 U/ml] schlägt der Effekt ins Gegenteil zu einer sehr starken LIP Erhöhung um. Auch bei Ferritin zeigen sich nun leichte Veränderungen. Bei allen Substanzen ist eine Abnahme des Ferritins zu beobachten. Die Reduzierung erfolgt bei den Behandlungen mit DMOG [1mM] und EPO [3,3 U/ml] parallel zur Senkung der LIP Konzentration. Überraschenderweise gibt es ein gegensätzliches Verhalten von LIP ↑↑↑ und Ferritin ↓↓ bei der Behandlung mit DMOG [0,5mM] + EPO [3,3 U/ml].

Inkubation: 24h	DMOG [1mM]	DMOG [0,5mM]	EPO [3,3 U/ml]	DMOG [0,5mM] + EPO [3,3 U/ml]
<b>LIP - SH-SY5Y</b>	↓↓↓	↓↓	/	↑↑↑
<b>Ferritin - SH-SY5Y</b>	(↓)	(↓)	↓	↓

Tabelle 25: Vergleich der Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf das Verhalten des labilen Eisenpools und die Expression von zytosolischem Ferritin nach 24 Stunden Inkubation in SH-SY5Y-Zellen

Nach 24h Inkubationszeit wird eine parallel laufende Reduzierung von LIP und Ferritin bei DMOG [0,5mM] und DMOG [1mM] sichtbar. Eine Ausnahme bildet wieder DMOG [0,5mM] + EPO [3,3 U/ml], wo sich wie schon nach 6h Inkubation LIP ↑↑↑ und Ferritin ↓ entgegengesetzt zueinander verhalten.

Chin et al. konnten in NT2 Zellen zwei molekulare Effekte nachweisen. Zum einen eine Induktion der EPO Produktion unter Hypoxie (2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) und zum anderen eine gesteigerte EpoR Expression und somit eine erhöhte EPO Sensitivität. Die Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass die EPO und EpoR Expression eine neuroprotektive Rolle bei Ischämie oder Hypoxie spielen. [Chin et al., 2000]

Das Ausmaß an EpoR Expression reguliert die EPO Antwort im Gehirn. Obwohl die Expression des EpoR nicht HIF abhängig ist, kann die Expression in Endothelzellen in der Zellkultur mit einer Kombination aus EPO Behandlung und geringerem Sauerstoffgehalt induziert werden. [Alnaeeli et al., 2012]

Um et al. zeigten, dass EPO (25 pM, Inkubation: 24h) Staurosporin-induzierte Apoptose (0,1 µM Staurosporin) in humanen Neuroblastomazellen (SH-SY5Y Zellen) verhinderte. Außerdem wurde dokumentiert, dass der EpoR essenziell für die antiapoptotischen Effekte von EPO ist und EPO mit hoher Affinität an den Rezeptor bindet. [Um et al., 2007]

Inkubation: 2h	DMOG [1mM]	DMOG [0,5mM]	EPO [3,3 U/ml]	DMOG [0,5mM] + EPO [3,3 U/ml]
<b>LIP - HepG2</b>	/	/	/	/
<b>Ferritin - HepG2</b>	/	/	/	/

Tabelle 26: Vergleich der Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf das Verhalten des labilen Eisenpools und die Expression von zytosolischem Ferritin nach 2 Stunden Inkubation in HepG2-Zellen

In den HepG2-Zellen sind nach 2h keine Auswirkungen weder auf die Größe des labilen Eisenpools noch auf den Ferritin-Gehalt feststellbar.

Inkubation: 6h	DMOG [1mM]	DMOG [0,5mM]	EPO [3,3 U/ml]	DMOG [0,5mM] + EPO [3,3 U/ml]
<b>LIP - HepG2</b>	/	/	/	/
<b>Ferritin - HepG2</b>	(↓)	/	/	(↓)

Tabelle 27: Vergleich der Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf das Verhalten des labilen Eisenpools und die Expression von zytosolischem Ferritin nach 6 Stunden Inkubation in HepG2-Zellen

Nach einer Einwirkzeit von 6h zeigt sich ebenfalls keine Auswirkung auf den LIP. Auch der Ferritinspiegel wird wenig beeinflusst. Eine tendenzielle Verringerung sind bei den Behandlungen mit DMOG [1mM] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] feststellbar.

Inkubation: 24h	DMOG [1mM]	DMOG [0,5mM]	EPO [3,3 U/ml]	DMOG [0,5mM] + EPO [3,3 U/ml]
<b>LIP - HepG2</b>	↑↑↑	↑↑↑	/	↑↑↑
<b>Ferritin - HepG2</b>	(↓↓)	(↓↓)	(↓↓)	(↓↓)

Tabelle 28: Vergleich der Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf das Verhalten des labilen Eisenpools und die Expression von zytosolischem Ferritin nach 24 Stunden Inkubation in HepG2-Zellen

Deutliche Effekte in den HepG2-Zellen ergeben sich erst nach 24h Inkubation. Dabei kommt es zu einer starken Erhöhung des LIP Spiegels bei DMOG [1mM], DMOG [0,5 mM] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml], während der Ferritin-Gehalt eher abnimmt. EPO [3,3U/ml] alleine scheint auch nach 24h keinen Einfluss auf den LIP zu haben.

Eine mögliche Erklärung für eine erniedrigte Ferritinkonzentration könnte mit einer erhöhten Eisenverfügbarkeit für andere Zellen und Gewebe als Antwort auf eine Hypoxiestimulation der Erythropoese und somit einer gesteigerten Hämsynthese sein. [Chepelev und Willmore, 2011]

Hepcidin ist dabei eine Schlüsselkomponente der systemischen Eisenregulation [De Domenico et al., 2008], wird vor allem von Hepatozyten der Leber produziert und auf Transkriptionsebene eisen- und sauerstoffsensitiv reguliert. [Haase, 2013], [De Domenico et al., 2008]

Der Eisenbedarf im Knochenmark steigt bei Stimulation der Erythropoese durch Hypoxie durch erhöhte EPO Synthese in der Niere und der Leber. Dabei wird Hepcidin durch Hypoxie unterdrückt. In Folge dessen kommt zu einer höheren intestinalen Eisenaufnahme und einer vermehrten Freisetzung aus internen Speichern. [Liu et al., 2012]

In einer Studie an gesunden, männlichen Freiwilligen zeigte sich, dass 50 IU/kg rhEPO nach 4 Stunden im Vergleich zur Placeboinjektion das Serumhepcidin signifikant anstieg ließ, während die Eisen- und Transferrinsättigung stark sank. 12 und 24 Stunden nach rhEPO Injektion lag das Hepcidinlevel jedoch unter dem der Placebobehandlung. [Lainé et al., 2011]

Hepcidin mRNA in Hepatomazellen (HepG2 Zellen) wurde durch chemische HIF-Stabilisation beziehungsweise Eisenchelatoren herunterreguliert. Im Mäusemodell, das Kohlenmonoxid, Hypoxie oder chemischen HIF-Induzierern (N-Oxalglycin) ausgesetzt war, erhöhte sich die Leberhepcidin mRNA statt reduziert zu werden. Volke et al. schlossen daraus, dass Hepcidin weder direkt noch indirekt durch HIF reguliert wird. Die Hepcidinexpression *in vitro* hängt von den Serumfaktoren ab und gleicht dem der TfR2 Expression. [Volke et al., 2009]

Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] nach 24 Stunden Inkubation auf die Expression von mitochondrialem Ferritin in SH-SY5Y Zellen und HepG2 Zellen

Mitochondriales Ferritin hat eine organspezifische Expression, so wurden nur geringe Mengen in Eisenspeicherorganen gefunden. Hohe Konzentrationen an mitochondrialem Ferritin können zu einer verminderten Expression von zytosolischem Ferritin führen und somit zu einer erhöhten Expression des Transferrin Rezeptors. Hohe mitochondriale Ferritinlevel führen also zu einem Eisendefizitphänotyp im Zytosol. Dies könnte ein Grund sein, warum der mitochondriale Ferritin-Gehalt in normalen Zellen auf einem niedrigen Niveau gehalten wird. Die Regulierung der Expression von mitochondrialem Ferritin und mögliche therapeutische Anwendungen haben Bedeutung für neurologische Störungen. [Drysdale et al., 2002]

Mitochondriales Ferritin scheint eine hohe Affinität für Eisen zu besitzen. Eine Erhöhung an mitochondrialem Ferritin in HeLa Zellen (Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) führte zu einem Eisenmangel im Zytosol, einer Reduzierung des LIP, einer Synthese von H-chain Ferritin und einer Steigerung des Transferrinrezeptors. [Drysdale et al., 2002] Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das mitochondriale Ferritin zusammen mit dem zytosolischen Ferritin und dem Transferrin Rezeptor gemeinsam die Eisenhomöostase im Zytoplasma und in den Mitochondrien reguliert. [Yang et al., 2013]

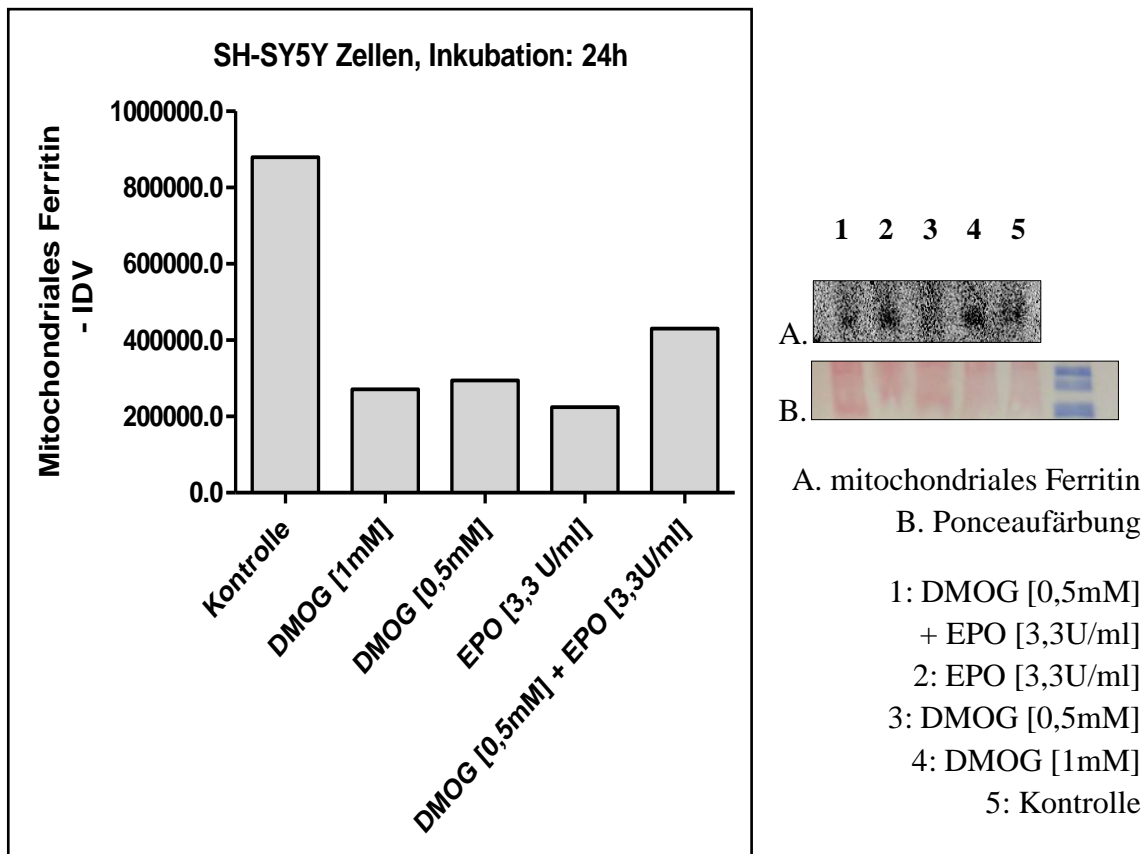


Abbildung 50: Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von mitochondrialem Ferritin nach 24 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen

SH-SY5Y Neuroblastomzellen werden in komplementiertem DMEM/Ham's F-12 Medium (10% FBS, 1% L-Glutamin und 0,1% Gentamycin) gezüchtet. Die Zellen werden in 6-Well-Platten mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/Well ausgesetzt, mit DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] behandelt und für 24 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Der Effekt der Substanzen auf Expression des humanen mitochondrialen Ferritins erfolgt mittels semi-quantitativem Western Blot und Chemilumineszenzdetektion. Für die statistische Auswertung wird der Quotient aus Intensität des mitochondrialen Ferritins und der gemessenen Intensität des  $\beta$ -Aktins herangezogen. Das Diagramm zeigt die relative Intensität der mitochondrialen Ferritin-Expression  $\pm$  SEM, aus einem Experiment.

Das mitochondriale Ferritin wird in den SH-SY5Y Zellen mittels Western Blot und Chemilumineszenzdetektion nach 24h Inkubation bestimmt. HepG2 Zellen können nur sehr geringen Mengen an mitochondrialem Ferritin exprimieren, die unter der Nachweisgrenze des Western Blots liegen. In Folge dessen wird zur Bestimmung des mitochondrialen Ferritins in HepG2 Zellen nur die wesentlich empfindlichere Methode des Elektrochemilumineszenz Immunoassays zur weiteren Analyse verwendet. Western Blot und Chemilumineszenzdetektion werden als einfach Experiment durchgeführt und

besitzen dadurch nur eine geringe Aussagekraft. Es ergibt sich nach 24h Inkubation in SH-SY5Y Zellen eine Reduzierung des mitochondrialen Ferritin nach allen Behandlungen im Vergleich zur Kontrolle. Dieses Ergebnis bildet einen Gegensatz zu dem Resultat des Elektrochemilumineszenz Immunoassays. Den deutlichsten, reduzierenden Einfluss beim Western Blot und der Chemilumineszenzdetektion besitzt die Behandlung mit EPO [3,3U/ml]. Dieses Ergebnis steht konträr zu dem Resultat des Elektrochemilumineszenz Immunoassay, bei dem EPO [3,3U/ml] zum stärksten Anstieg der mitochondrialen Ferritinexpression beiträgt. Auch die Behandlungen mit DMOG [1mM] und [0,5mM] sowie mit DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] stehen ebenfalls im Widerspruch zu den Ergebnissen des Elektrochemilumineszenz Immunoassays.

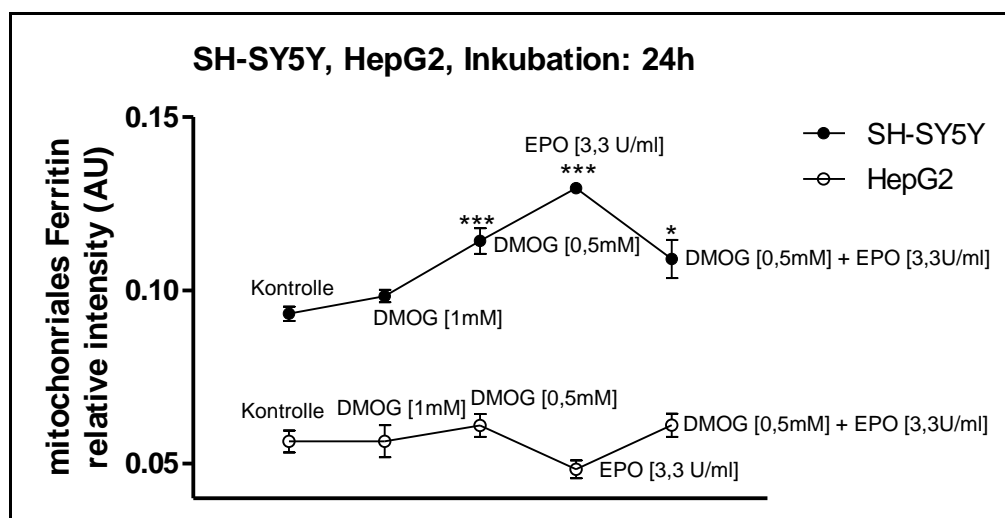


Abbildung 51: Effekte von DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] auf die Expression von mitochondrialem Ferritin nach 24 Stunden Inkubation in SH-SY5Y Zellen und HepG2 Zellen

SH-SY5Y Neuroblastomzellen werden in komplementiertem DMEM/Ham's F-12 Medium (10% FBS, 1% L-Glutamin und 0,1% Gentamycin) und HepG2 Hepatokarzinomzellen werden in komplementiertem DMEM Medium (10% FBS, 1% L-Glutamin und 0,1% Gentamycin) gezüchtet. Die Zellen werden in 6-Well-Platten mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/Well ausgesetzt, mit DMOG [1mM], DMOG [0,5mM], EPO [3,3U/ml] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] behandelt und für 24 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Die quantitative Bestimmung des Effekts der Substanzen auf das humane mitochondriale Ferritin erfolgt mittels Elektrochemilumineszenz Immunoassay. Für die statistische Auswertung wird der Quotient aus der Intensität des mitochondrialen Ferritins und der gemessenen Intensität des  $\beta$ -Aktins herangezogen. Das Diagramm zeigt die Intensität der Quotienten  $\pm$  SEM, berechnet aus drei separaten Experimenten im Doppelansatz. Signifikante Unterschiede sind angegeben mit \*( $p < 0,05$ ) und \*\*\*( $p < 0,001$ ).

Bei der Bestimmung des mitochondrialen Ferritins mittels Elektrochemilumineszenz Immunoassay wird auf den ersten Blick deutlich, dass sich die mitochondrialen Ferritinkonzentrationen zwischen SH-SY5Y Zellen und HepG2 Zellen unterscheiden. Die Ferritinkonzentration ist direkt proportional zur gemessenen Intensität. Je größer die Intensität, desto höher der mitochondriale Ferritingehalt.

SH-SY5Y Zellen weisen eine sichtbar höhere mitochondriale Ferritinkonzentration als HepG2 Zellen auf. Bei den SH-SY5Y Zellen zeigen sich nach 24h Inkubation auch deutlichere Effekte. Die offenkundigste Wirkung hat die Behandlung mit EPO [3,3U/ml]. Eine hoch signifikante Steigerung der mitochondrialen Ferritinkonzentration ist feststellbar und auch bei der Inkubation mit DMOG [0,5mM] kann eine hoch signifikante Erhöhung bewiesen werden. Bei der kombinierten Behandlung aus beiden Substanzen DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] zeigt sich noch eine signifikante Erhöhung. Bei DMOG [1mM] wird kein Effekt im Vergleich zur Kontrolle deutlich.

Betrachtet man die HepG2 Zellen, so können nach 24h keine statistischen signifikanten Veränderungen der mitochondrialen Ferritinexpression durch die Behandlungen nachgewiesen werden. Eine leichte, nicht signifikante Abnahme des mitochondrialen Ferritin-Gehaltes ist bei der Inkubation mit EPO [3,3U/ml] feststellbar. Bei DMOG [0,5mM] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml] sind nur leicht erhöhte Expression von mitochondrialem Ferritin graphisch ablesbar. DMOG [1mM] hat keinen Einfluss auf die Expression von mitochondrialem Ferritin.

Vergleicht man die Effekte in den beiden Zelllinie, wird anschaulich, dass es den deutlichsten Effekt bei der Behandlung mit EPO [3,3U/ml] gibt. Eine hoch signifikante Erhöhung des mitochondrialen Ferritins in SH-SY5Y und eine tendenzielle Verringerung bei HepG2 Zellen spiegelt die vollkommen entgegengesetzte Wirkung von EPO [3,3U/ml] in den unterschiedlichen Organen wider. Bei den Behandlungen mit den anderen Substanzen (DMOG [1mM], DMOG [0,5mM] und DMOG [0,5mM] + EPO [3,3U/ml]) kann kein konträres Resultat beobachtet werden. Die Ausprägung der Wirkung ist jedoch graphisch und statistisch in SH-SY5Y Zellen höher als in der HepG2 Zelllinie.



Auch in anderen Studien wurde die mögliche neuroprotektive Wirkung des mitochondrialen Ferritins untersucht.

Neuroblastomazellen (IMR-32 Zellen) zeigten eine Expressionsteigerung an mitochondrialem Ferritin nach einer Behandlung mit Wasserstoffperoxid in Kombination mit A $\beta$ <sub>1-42</sub>, welche oxidativen Stress auslöst. Die Überexpression an mitochondrialem Ferritin stellte einen neuroprotektiven Effekt dar. [Yang et al., 2013]

Wu et al. konnten ähnliche Effekte feststellen. Mitochondriales Ferritin wurde von Neuroblastomazellen (SH-SY5Y Zellen) überexprimiert und danach mit A $\beta$ <sub>25-35</sub> behandelt. Die Behandlung mit A $\beta$ <sub>25-35</sub> ließ die mitochondriale Ferritinkonzentration in mitochondrialem Ferritin überexprimierenden Zellen noch weiter leicht ansteigen. Der Anstieg des LIP wurde stark inhibiert im Vergleich zu den Zellen die nur eine höhere Expression an mitochondrialem Ferritin zeigten und bei denen der LIP nur langsam sank. [Wu et al., 2013]

## 5 Schlussbetrachtung

Weltweit erreichen viele Bevölkerungsgruppen eine durchschnittliche Lebenserwartung bis ins späte neunte Jahrzehnt. So steigt auch die Prävalenz der meisten neurodegenerativen Erkrankung dramatisch mit dem fortgeschrittenen Lebensalter an. [Forman et al., 2004]

Eisen und oxidativer Stress korrelieren dabei stark mit einer Vielzahl von neurodegenerativen Störungen. [Yang et al., 2013]

Eisen spielt eine essentielle Rolle im Gehirn und ist ein Schlüsselement bei der Kontrolle von schädlichen Prozessen wie beispielsweise Hypoxie. Es bildet einen Link zwischen Sauerstofftransport und Eisenmetabolismus, Assoziationen der Physiologie von Hypoxieantwort und der Kontrolle von verfügbarem Eisen im Gehirn sind wichtig für die Entwicklung von Behandlungsmöglichkeiten. [Weinreb et al., 2010], [Johnstone und Milward, 2010]

Die neuropathologischen Veränderungen von neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise der Alzheimer-Krankheit entstehen schon Jahre vor dem Auftreten erster kognitiver Symptome. Die Quantifizierung des Eisengehaltes könnte ein Marker für die Frühzeitdiagnose der Krankheiten sein. [Leskovjan et al., 2011]

Die Therapie einer Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen ist nur symptomatisch und verhindert nicht eine Krankheitsprogression. Da Eisen eine kausale Rolle spielt, ist es wichtig den Gehalt an freiem Eisen durch geeignete Medikamente wie beispielsweise Eisenchelatoren zu verringern. [Schneider und Bhatia, 2013]

Weitere Therapieansätze mit neuroprotektiver Wirkung sind die Erhöhung von endogenen EPO Konzentrationen im Gehirn beispielsweise durch HIF-1 $\alpha$  Stabilisatoren und die Gabe von exogenem EPO, das in seiner Wirksamkeit möglichst auf das Gehirn beschränkt ist.

HIF-1 $\alpha$  Stabilisatoren zeigen erfolgreiche neuroprotektive Wirkung und überlebensfördernde Effekte durch die Aktivierung von Downstreamgenen wie beispielsweise EPO. [Milosevic et al., 2009]

DMOG ist ein kompetitiver, nichtselektiver Inhibitor des sauerstoffsensitiven Enzyms Prolylhydroxylase und gehört somit zu den HIF-1 $\alpha$  Stabilisatoren.

DMOG zeigte im Zellkultur- und Tiermodell in höheren Dosen wirksame neuroprotektive Effekte, die aber auch zytotoxische Nebenwirkungen aufwiesen. Daher ist es möglicherweise kein geeigneter Kandidat als klinisches Arzneimittel. DMOG gibt jedoch Einblicke in die Mechanismen der PHD Inhibierung für mögliche neuroprotektive Therapieentwicklungen. [Nagel et al., 2011], [Milosevic et al., 2009]

EPO ist ein Glykoprotein, das als rhEPO und EPO Derivate bei peripherer Verabreichung die Blut-Hirn-Schranke passieren kann und im Gehirn neuroprotektive Effekt hervorruft. [Sirén et al., 2009]

RhEPO wird seit mehr als zwei Dekaden zur klinischen Behandlung von Anämie in Verbindung mit verschiedenen Krankheitsbildern eingesetzt. [Alnaeeli et al., 2012]

Die Sicherheit und Effizienz der Behandlung von verschiedenen neurologischen Erkrankungen mit EPO wird zurzeit in klinischen Studien an Patientenpopulation vom Neugeborenen bis zum Erwachsenen getestet. [Kumral et al., 2011]

EPO Derivate, wie beispielsweise asialo-EPO und CEPO, die die Blut-Hirn-Schranke leichter passieren, reduzierte Nebenwirkungen zeigen und keine hämatopoetische Aktivität besitzen, werden derzeit in klinischen und vorklinischen Studien geprüft.

Die möglichen Therapieansätze, DMOG und EPO, wurden im Rahmen dieser Masterarbeit im Zusammenhang mit einer Adaption des Eisenstoffwechsels *in vitro* untersucht.

Die Verteilungsmuster von LIP, zytosolischem Ferritin und mitochondrialem Ferritin nach der Behandlungen mit DMOG und EPO lassen drauf schließen, dass die Eisenanpassung unterschiedlichen Regulierungsmechanismen im systemischen und organspezifischem Stoffwechsel unterliegt, eine wichtige Rolle in der Physiologie und Pathologie des Gehirns spielt und für die Therapieentwicklung bei neurodegenerativen Erkrankungen genutzt werden kann.

## 6 Zusammenfassung

Viele neurodegenerative Erkrankungen sind gekennzeichnet durch Eisenanomalie und den dadurch verursachten oxidativen Stress. Im Rahmen dieser Masterarbeit wurden die Behandlungen mit Dimethyloxalylglycin (DMOG) in den Konzentrationen [0,5mM] sowie [1mM] und/oder Erythropoietin (EPO) in der Konzentration [3,3U/ml] im Zusammenhang mit der Adaption des Eisenstoffwechsels *in vitro* an Neuroblastomzellen (SH-SY5Y Zellen), als Beispiel für eine organspezifische Wirkung im Gehirn, und an Hepatokarzinomzellen (HepG2 Zellen), als Testmodell für den systemischen Effekt, zeitabhängig nach 2h, 6h und 24h untersucht. Die Wirkung und der Effekt von DMOG und EPO auf die Eisenstoffwechselkomponenten labiler Eisenpool (LIP), zytosolisches Ferritin und mitochondriales Ferritin unterscheiden sich zeit-, dosis- und zellartabhängig. In den Neuroblastomzellen zeigten alle Behandlungen nach 2h eine signifikante Reduktion des LIPs. Nach 6h und 24h wurde ein Anstieg des LIP bei der kombinierten Inkubation mit DMOG und EPO gemessen. DMOG alleine führte weiterhin zu einer LIP Senkung. EPO hatte nach 24h auf den LIP keine Wirkung mehr. Die deutlichsten, reduzierenden Effekte auf die zytosolische Ferritinkonzentration wurden nach 24h ermittelt. Signifikanz konnte dabei bei der Einzelbehandlung mit EPO und in Kombination mit DMOG berechnet werden. Bei der mitochondrialen Ferritinmessung gab es eine signifikante Erhöhung nach der Inkubation mit EPO, DMOG in der niedrigeren Konzentration und nach der kombinierten Behandlung. In den Hepatokarzinomzellen führten alle Behandlung außer EPO nach 24h zu einer Erhöhung des LIP, während bei EPO sich kein Effekt zeigte. Bei Ferritin konnten eine tendenzielle Reduzierung festgestellt werden, die jedoch statistisch nicht signifikant war. Auch beim mitochondrialen Ferritin konnten keine signifikante Änderung der Expression ermittelt werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es zellspezifische Unterschiede zwischen den Zelllinien SH-SY5Y und HepG2 hinsichtlich der Eisenstoffwechselanpassung nach den Behandlungen mit DMOG und/oder EPO gab. In den Neuroblastomzellen konnte in Bezug auf die Eisenadaption eine mögliche neuroprotektive Wirkung durch Reduzierung des freien Eisens nachgewiesen werden.

## Summary

Many neurodegenerative diseases are characterized by abnormal iron homeostasis and subsequent oxidative stress. The present *in vitro* study was performed to analyze the effects of dimethyloxalylglycine (DMOG) in concentrations of [0,5mM] and [1mM] and/or erythropoietin (EPO) in the concentration of [3,3U/ml] on the adaptation of iron metabolism. Neuroblastoma cells (SH-SY5Y cells) were used as a test model for organ-specific effects in the brain and hepatoma cells (HepG2 cells) were used as an example of systemic effects. Cells were treated for 2h, 6h or 24h. The effect of DMOG and EPO on the iron metabolism components labile iron pool (LIP), cytosolic ferritin and mitochondrial ferritin are time-, dose- and cell type-dependent.

In SH-SY5Y cells all treatments showed a significant reduction of the LIP after 2h. The simultaneous treatment with DMOG and EPO led to an increase of LIP after an incubation of 6h and 24h. DMOG alone led to a further reduction of LIP. The EPO treatment showed no longer effects after 24h of incubation. The clearest reducing effects on the cytosolic ferritin were determined after 24h. Significance was found after the treatment of EPO alone and in combination with DMOG. Mitochondrial ferritin expression was significantly increased after EPO and DMOG [0,5mM] alone and after simultaneous treatment.

In HepG2 cells all treatments except EPO led to an increase in the LIP after 24h. Treatment with EPO showed no effects. A trend towards a reduction in ferritin could be detected, but there was no statistical significance. For mitochondrial ferritin no significant change in expression can be detected either.

In conclusion, it was shown that there are cell-specific differences between the cell lines SH-SY5Y and HepG2 in terms of iron metabolism adjustment after the treatment with DMOG and/or EPO. In neuroblastoma cells, a potential neuroprotective effect was demonstrated by the adaption of iron metabolism through the reduction of free iron.

## 7 Literaturverzeichnis

Albrecht, S., Brandl, H., Adam, W. (1990). Chemilumineszenz-Reaktionen.

Anwendungen in der klinischen Chemie, Biochemie und Medizin. *Chemie in unserer Zeit*, 24(5), 227–238. doi:10.1002/ciuz.19900240507

Alnaeeli, M., Wang, L., Piknova, B., Rogers, H., Li, X., Noguchi, C. T. (2012).

Erythropoietin in Brain Development and Beyond. *Anatomy Research International*, 2012, 1–15. doi:10.1155/2012/953264

Arosio, P., Levi, S. (2002). Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free*

*Radical Biology and Medicine*, 33(4), 457–463. doi:10.1016/S0891-5849(02)00842-0

Berg, D., Hochstrasser, H. (2006). Iron metabolism in Parkinsonian syndromes.

*Movement Disorders*, 21(9), 1299–1310. doi:10.1002/mds.21020

Borcar, A., Menze, M. A., Toner, M., Hand, S. C. (2012). Metabolic preconditioning of

mammalian cells: mimetic agents for hypoxia lack fidelity in promoting phosphorylation of pyruvate dehydrogenase. *Cell and Tissue Research*, 351(1), 99–106. doi:10.1007/s00441-012-1517-2

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3

Brines, M. (2010). The Therapeutic Potential of Erythropoiesis-Stimulating Agents for

Tissue Protection: A Tale of Two Receptors. *Blood Purification*, 29(2), 86–92. doi:10.1159/000245630

Burnette, W. N. (1981). “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from

sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and

- radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112(2), 195–203. doi:10.1016/0003-2697(81)90281-5
- Carroll, V. A., Ashcroft, M. (2005). Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 7(06), 1–16.  
doi:10.1017/S1462399405009117
- Cell Lines | Life Technologies. (o. J.). Stand: 27.01.14, von  
<http://www.lifetechnologies.com/at/en/home/technical-resources/cell-lines.html>
- CELL SEARCH SYSTEM. (o. J.). Stand: 27.01.14, von  
<http://www2.brc.riken.jp/lab/cell/search.php>
- Chateauvieux, S., Grigorakaki, C., Morceau, F., Dicato, M., Diederich, M. (2011).  
Erythropoietin, erythropoiesis and beyond. *Biochemical Pharmacology*, 82(10),  
1291–1303. doi:10.1016/j.bcp.2011.06.045
- Chepelev, N. L., Willmore, W. G. (2011). Regulation of iron pathways in response to  
hypoxia. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(6), 645–666.  
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.023
- Chin, K., Yu, X., Beleslin-Cokic, B., Liu, C., Shen, K., Mohrenweiser, H. W., Noguchi,  
C. T. (2000). Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in  
brain. *Molecular Brain Research*, 81(1–2), 29–42. doi:10.1016/S0169-  
328X(00)00157-1
- De Domenico, I., McVey Ward, D., Kaplan, J. (2008). Regulation of iron acquisition  
and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nature Reviews Molecular  
Cell Biology*, 9(1), 72–81. doi:10.1038/nrm2295

DMOG • Dimethyloxallyl Glycine (CAS 89464-63-1) || Cayman Chemical | Supplier.

(o. J.). Stand: 27.01.14, von

<https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/71210>

Drysdale, J., Arosio, P., Invernizzi, R., Cazzola, M., Volz, A., Corsi, B., Levi, S. (2002).

Mitochondrial ferritin: a new player in iron metabolism. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 29(3), 376–383.

Epsztejn, S., Glickstein, H., Picard, V., Slotki, I. N., Breuer, W., Beaumont, C.,

Cabantchik, Z. I. (1999). H-Ferritin Subunit Overexpression in Erythroid Cells Reduces the Oxidative Stress Response and Induces Multidrug Resistance Properties. *Blood*, 94(10), 3593–3603.

File:ReidoffringaSH-SY5Y1.jpg - Wikipedia, the free encyclopedia. (o. J.). Stand:

27.01.14, von <http://en.wikipedia.org/wiki/File:ReidoffringaSH-SY5Y1.jpg>

Fisher, J., Devraj, K., Ingram, J., Slagle-Webb, B., Madhankumar, A. B., Liu, X.,

Connor, J. R. (2007). Ferritin: a novel mechanism for delivery of iron to the brain and other organs. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 293(2), C641–C649. doi:10.1152/ajpcell.00599.2006

Forman, M. S., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M.-Y. (2004). Neurodegenerative diseases: a

decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nature Medicine*, 10(10), 1055–1063. doi:10.1038/nm1113

Friedman, A., Arosio, P., Finazzi, D., Koziorowski, D., Galazka-Friedman, J. (2011).

Ferritin as an important player in neurodegeneration. *Parkinsonism & Related Disorders*, 17(6), 423–430. doi:10.1016/j.parkreldis.2011.03.016

Ganz, T. (2007). Molecular Control of Iron Transport. *Journal of the American Society*

*of Nephrology*, 18(2), 394–400. doi:10.1681/ASN.2006070802



- Ganz, T., Nemeth, E. (2012). Iron Metabolism: Interactions with Normal and Disordered Erythropoiesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(5), a011668–a011668. doi:10.1101/cshperspect.a011668
- Genc, K., Egrilmez, M. Y., Genc, S. (2010). Erythropoietin induces nuclear translocation of Nrf2 and heme oxygenase-1 expression in SH-SY5Y cells. *Cell Biochemistry and Function*, 28(3), 197–201. doi:10.1002/cbf.1639
- Glickstein, H. (2005). Intracellular labile iron pools as direct targets of iron chelators: a fluorescence study of chelator action in living cells. *Blood*, 106(9), 3242–3250. doi:10.1182/blood-2005-02-0460
- Gstraunthaler, G., Lindl, T. (2013). Standardisierung in der Zellkultur (Good Cell Culture Practice). In *Zell- und Gewebekultur*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Haase, V. H. (2013). Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Reviews*, 27(1), 41–53. doi:10.1016/j.blre.2012.12.003
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(Pt 5), 1147–1150. doi:10.1042/BST0351147
- HepG2 (liver hepatocellular carcinoma): cell culture and transfection protocol. (o. J.). Stand: 27.01.14, von <http://hepg2.com/>
- Ikuta, K., Addo, L., Hatayama, M., Toki, Y., Tanaka, H., Inamura, J., Kohgo, Y. (2013). Functional Validation and Clinical Significance Of a Newly Established Non-Transferrin-Bound Iron (NTBI) Assay System Utilizing Conventional Automated Analyzer. *Blood*, 122(21), 960–960.
- Jelkmann, W. (2010). Erythropoietin: back to basics. *Blood*, 115(21), 4151–4152. doi:10.1182/blood-2010-03-271395

- Johnstone, D., Milward, E. A. (2010). Molecular genetic approaches to understanding the roles and regulation of iron in brain health and disease. *Journal of Neurochemistry*, 113(6), 1387–1402. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06697.x
- Kakhlon, O., Cabantchik, Z. I. (2002). The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes1 1This article is part of a series of reviews on “Iron and Cellular Redox Status.” The full list of papers may be found on the homepage of the journal. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(8), 1037–1046. doi:10.1016/S0891-5849(02)01006-7
- Kozłowski, H., Luczkowski, M., Remelli, M., Valensin, D. (2012). Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer’s, Parkinson’s and prion diseases). *Coordination Chemistry Reviews*, 256(19–20), 2129–2141. doi:10.1016/j.ccr.2012.03.013
- Kruszewski, M. (2003). Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 531(1-2), 81–92. doi:10.1016/j.mrfmmm.2003.08.004
- Kumral, A., Tüzün, F., Oner, M. G., Genç, S., Duman, N., Özkan, H. (2011). Erythropoietin in neonatal brain protection: The past, the present and the future. *Brain and Development*, 33(8), 632–643. doi:10.1016/j.braindev.2010.10.014
- Lainé, F., Laviolle, B., Ropert, M., Bouguen, G., Morcet, J., Hamon, C., Loréal, O. (2011). Early effects of erythropoietin on serum hepcidin and serum iron bioavailability in healthy volunteers. *European Journal of Applied Physiology*, 112(4), 1391–1397. doi:10.1007/s00421-011-2097-7
- Leskovjan, A. C., Kretlow, A., Lanzirotti, A., Barrea, R., Vogt, S., Miller, L. M. (2011). Increased brain iron coincides with early plaque formation in a mouse model of

- Alzheimer's disease. *NeuroImage*, 55(1), 32–38.  
doi:10.1016/j.neuroimage.2010.11.073
- Levi, S., Arosio, P. (2004). Mitochondrial ferritin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(10), 1887–1889.  
doi:10.1016/j.biocel.2003.10.020
- Li, X., Jankovic, J., Le, W. (2011). Iron chelation and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Journal of Neural Transmission*, 118(3), 473–477.  
doi:10.1007/s00702-010-0518-0
- Liu, Q., Davidoff, O., Niss, K., Haase, V. H. (2012). Hypoxia-inducible factor regulates hepcidin via erythropoietin-induced erythropoiesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(12), 4635–4644. doi:10.1172/JCI63924
- Luo, Q.-Q., Wang, D., Yu, M.-Y., Zhu, L. (2011). Effect of hypoxia on the expression of iron regulatory proteins 1 and the mechanisms involved. *IUBMB Life*, 63(2), 120–128. doi:10.1002/iub.419
- Marti, H. H. (2004). Erythropoietin and the hypoxic brain. *Journal of Experimental Biology*, 207(18), 3233–3242. doi:10.1242/jeb.01049
- Milosevic, J., Adler, I., Manaenko, A., Schwarz, S. C., Walkinshaw, G., Arend, M., Schwarz, J. (2009). Non-hypoxic Stabilization of Hypoxia-Inducible Factor Alpha (HIF- $\alpha$ ): Relevance in Neural Progenitor/Stem Cells. *Neurotoxicity Research*, 15(4), 367–380. doi:10.1007/s12640-009-9043-z
- Misonou, H., Morishima-Kawashima, M., Ihara, Y. (2000). Oxidative Stress Induces Intracellular Accumulation of Amyloid  $\beta$ -Protein (A $\beta$ ) in Human Neuroblastoma Cells. *Biochemistry*, 39(23), 6951–6959. doi:10.1021/bi000169p

- Nagel, S., Papadakis, M., Chen, R., Hoyte, L. C., Brooks, K. J., Gallichan, D., Buchan, A. M. (2011). Neuroprotection by dimethyloxalylglycine following permanent and transient focal cerebral ischemia in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31(1), 132–143. doi:10.1038/jcbfm.2010.60
- Ng, S. Y., Gunning, P., Eddy, R., Ponte, P., Leavitt, J., Shows, T., Kedes, L. (1985). Evolution of the functional human beta-actin gene and its multi-pseudogene family: conservation of noncoding regions and chromosomal dispersion of pseudogenes. *Molecular and Cellular Biology*, 5(10), 2720–2732.
- Pantopoulos, K. (2004). Iron Metabolism and the IRE/IRP Regulatory System: An Update. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1012(1), 1–13. doi:10.1196/annals.1306.001
- Pelizzoni, I., Macco, R., Morini, M. F., Zacchetti, D., Grohovaz, F., Codazzi, F. (2011). Iron handling in hippocampal neurons: activity-dependent iron entry and mitochondria-mediated neurotoxicity. *Aging Cell*, 10(1), 172–183. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00652.x
- Peyssonnaud, C., Zinkernagel, A. S., Schuepbach, R. A., Rankin, E., Vaulont, S., Haase, V. H., Johnson, R. S. (2007). Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *Journal of Clinical Investigation*, 117(7), 1926–1932. doi:10.1172/JCI31370
- Ponceau S for microscopy (Hist.) | Sigma-Aldrich. (o. J.). Stand: 27.01.14, von <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/81460?lang=de&region=A>
- T

- Pregi, N., Wenker, S., Vittori, D., Leirós, C. P., Nesse, A. (2009). TNF-alpha-induced apoptosis is prevented by erythropoietin treatment on SH-SY5Y cells. *Experimental Cell Research*, 315(3), 419–431. doi:10.1016/j.yexcr.2008.11.005
- Rabie, T., Marti, H. H. (2008). Brain Protection by Erythropoietin: A Manifold Task. *Physiology*, 23(5), 263–274. doi:10.1152/physiol.00016.2008
- Reisi, P., Arabpoor, Z., Rashidi, B., Alaei, H., Salami, M., Hamidi, G., Dolatabadi, H. R. (2012). Erythropoietin improves neuronal proliferation in dentate gyrus of hippocampal formation in an animal model of Alzheimer's disease. *Advanced Biomedical Research*, 1(1), 50. doi:10.4103/2277-9175.100157
- Ross, R. A., Spengler, B. A., Biedler, J. L. (1983). Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 71(4), 741–747.
- Rouault, T. A. (2013). Iron metabolism in the CNS: implications for neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(8), 551–564. doi:10.1038/nrn3453
- Rouault, T. A., Cooperman, S. (2006). Brain Iron Metabolism. *Seminars in Pediatric Neurology*, 13(3), 142–148. doi:10.1016/j.spen.2006.08.002
- Salvador, G. A., Uranga, R. M., Giusto, N. M. (2011). Iron and Mechanisms of Neurotoxicity. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011, 1–9. doi:10.4061/2011/720658
- Sanchez, P. E., Fares, R. P., Risso, J.-J., Bonnet, C., Bouvard, S., Le-Cavorsin, M., Bezin, L. (2009). Optimal neuroprotection by erythropoietin requires elevated expression of its receptor in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(24), 9848–9853. doi:10.1073/pnas.0901840106

- Sargin, D., Friedrichs, H., El-Kordi, A., Ehrenreich, H. (2010). Erythropoietin as neuroprotective and neuroregenerative treatment strategy: Comprehensive overview of 12 years of preclinical and clinical research. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 24(4), 573–594.  
doi:10.1016/j.bpa.2010.10.005
- Schneider, S. A., Bhatia, K. P. (2013). Excess iron harms the brain: the syndromes of neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA). *Journal of Neural Transmission*, 120(4), 695–703. doi:10.1007/s00702-012-0922-8
- Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell*, 148(3), 399–408. doi:10.1016/j.cell.2012.01.021
- SH-SY5Y ATCC ® CRL-2266™ Homo sapiens bone marrow neuroblast. (o. J.). Stand: 27.01.14, von <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2266.aspx>
- SH-SY5Y Cell Line human Neuroblast from neural tissue. | Sigma-Aldrich. (o. J.). Stand: 01.06.13, von <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/94030304?lang=de&region=AT>
- Sirén, A.-L., Fasshauer, T., Bartels, C., Ehrenreich, H. (2009). Therapeutic potential of erythropoietin and its structural or functional variants in the nervous system. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 6(1), 108–127. doi:10.1016/j.nurt.2008.10.041
- Smirnova, N. A., Rakhman, I., Moroz, N., Basso, M., Payappilly, J., Kazakov, S., Gazaryan, I. G. (2010). Utilization of an In Vivo Reporter for High Throughput Identification of Branched Small Molecule Regulators of Hypoxic Adaptation. *Chemistry & Biology*, 17(4), 380–391. doi:10.1016/j.chembiol.2010.03.008

- Speer, R. E., Karuppagounder, S. S., Basso, M., Sleiman, S. F., Kumar, A., Brand, D., Ratan, R. R. (2013). Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylases as targets for neuroprotection by “antioxidant” metal chelators: From ferroptosis to stroke. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 26–36.  
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.026
- Steffen Albrecht, Herbert Brandl, & Waldemar Adam. (o. J.). Chemilumineszenz-Reaktionen. Anwendungen in der klinischen Chemie, Biochemie und Medizin - Albrecht - 2004 - Chemie in unserer Zeit - Wiley Online Library. Stand: 29.10.13
- Sytkowski, A. J. (2011). The Neurobiology of Erythropoietin. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 31(6), 931–937. doi:10.1007/s10571-011-9695-0
- Um, M., Gross, A. W., Lodish, H. F. (2007). A “classical” homodimeric erythropoietin receptor is essential for the antiapoptotic effects of erythropoietin on differentiated neuroblastoma SH-SY5Y and pheochromocytoma PC-12 cells. *Cellular Signalling*, 19(3), 634–645. doi:10.1016/j.cellsig.2006.08.014
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., Mahajan, R. (2009). Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Current Neuropharmacology*, 7(1), 65–74.  
doi:10.2174/157015909787602823
- Volke, M., Gale, D. P., Maegdefrau, U., Schley, G., Klanke, B., Bosserhoff, A.-K., Warnecke, C. (2009). Evidence for a Lack of a Direct Transcriptional Suppression of the Iron Regulatory Peptide Heparin by Hypoxia-Inducible Factors. *PLoS ONE*, 4(11), e7875. doi:10.1371/journal.pone.0007875

- Weinreb, O., Amit, T., Mandel, S., Kupersmidt, L., Youdim, M. B. H. (2010). Neuroprotective Multifunctional Iron Chelators: From Redox-Sensitive Process to Novel Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(6), 919–949. doi:10.1089/ars.2009.2929
- Weinreb, O., Amit, T., Youdim, M. B. H. (2012). Targeting dysregulation of brain iron homeostasis in ageing. *Nutrition and Aging*, 1(1), 27–39. doi:10.3233/NUA-2012-0003
- Weinreb, O., Mandel, S., Youdim, M. B. H., Amit, T. (2013). Targeting dysregulation of brain iron homeostasis in Parkinson's disease by iron chelators. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 52–64. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.017
- Wenker, S. D., Chamorro, M. E., Vittori, D. C., Nesse, A. B. (2013). Protective action of erythropoietin on neuronal damage induced by activated microglia. *FEBS Journal*, 280(7), 1630–1642. doi:10.1111/febs.12172
- Wilbur, J. (2004). An interview with James Wilbur, Ph.D. General Manager, Life Sciences, Meso Scale Discovery. *Assay and Drug Development Technologies*, 2(3), 255–259.
- Wu, W.-S., Zhao, Y.-S., Shi, Z.-H., Chang, S.-Y., Nie, G.-J., Duan, X.-L., Chang, Y.-Z. (2013). Mitochondrial Ferritin Attenuates  $\beta$ -Amyloid-Induced Neurotoxicity: Reduction in Oxidative Damage Through the Erk/P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(2), 158–169. doi:10.1089/ars.2011.4285
- Yang, H., Yang, M., Guan, H., Liu, Z., Zhao, S., Takeuchi, S., Tooyama, I. (2013). Mitochondrial ferritin in neurodegenerative diseases. *Neuroscience Research*, 77(1–2), 1–7. doi:10.1016/j.neures.2013.07.005



- Zecca, L., Youdim, M. B. H., Riederer, P., Connor, J. R., Crichton, R. R. (2004). Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(11), 863–873. doi:10.1038/nrn1537
- Zheng, W., Monnot, A. D. (2012). Regulation of brain iron and copper homeostasis by brain barrier systems: Implication in neurodegenerative diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 133(2), 177–188. doi:10.1016/j.pharmthera.2011.10.006



---

## Curriculum Vitae

---

### Angaben zur Person

Vor- und Zuname: Nina Prieß  
Geburtsort: Itzehoe, Deutschland

### Ausbildung

seit September 2012	Masterarbeit am Institut für medizinische Chemie, Medizinische Universität Wien
seit Dezember 2010	Masterstudium Ernährungswissenschaften, Spezialisierung: „Molekulare Ernährung“, Universität Wien
Okt. 2006 – Nov. 2010	Bakkalaureatsstudium Ernährungswissenschaften, Universität Wien
2003 - 2006	Fachgymnasium Itzehoe, Schwerpunkt: Ernährung, Berufliche Schule des Kreises Steinburg
1997 - 2003	Realschule Kellinghusen
1993 - 1997	Grundschule Kellinghusen

### Auslandserfahrungen

Sep. 2011 - Dez. 2011	Auslandssemester, University of Eastern Finland, Kuopio, Finnland
-----------------------	--

### Praktische Erfahrungen

September 2008	Globopharm, pharmazeutische Produktions- und Handelsgesellschaft mbH., Wien
----------------	--

### Studienbegleitende Tätigkeiten

Wintersemester 2013/14	Tätigkeit als studentische Mitarbeiterin, „Biochemisches Praktikum für Ernährungswissenschaftler“, Universität Wien
------------------------	---