

Untersuchungen zum Eisenstoffwechsel neuraler Zellen

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2005

vorgelegt von

Hans-Hermann Höpken

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2005

Dekan: Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Dringen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Hamprecht

Meinen lieben Eltern

Danksagung

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von August 2001 bis September 2004 im Labor von Herrn Prof. Ralf Dringen am Lehrstuhl von Herrn Prof. Bernd Hamprecht im Interfakultären Institut für Biochemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Ralf Dringen für die Bereitstellung dieses interessanten Themas. Ich bedanke mich vor allem für seine ständige Diskussionsbereitschaft, seine vielen Anregungen und Ratschläge. Besonders möchte ich ihm für die Ermöglichung meines Aufenthalts an der Monash University in Melbourne (Australien), die Unterstützung bei der Planung, Organisation und Durchführung des Vorhabens und sein großes Engagement vor Ort sowohl in wissenschaftlicher als auch in privater Hinsicht bedanken.

Herrn Prof. Bernd Hamprecht danke ich für seine Unterstützung in der Zeit der Doktorarbeit, für seine konstruktiven Fragen in den Arbeitsgruppenseminaren und sein Interesse an meiner wissenschaftlichen Arbeit. Besonders möchte ich mich bei ihm für seine Unterstützung bei der Teilnahme an den Studiengruppentagungen der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie bedanken. Die Konferenzen haben mir stets viel Freude bereitet.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Dringen, die ich im Laufe meiner Promotion kennen gelernt habe, bedanke ich mich für das tolle Arbeitsklima und die Unterstützung bei wissenschaftlichen Fragestellungen. Wir hatten viel Spaß zusammen.

Allen Mitarbeitern des Arbeitskreises Hamprecht danke ich für die freundliche Aufnahme und ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Stephen R. Robinson möchte ich für die Möglichkeit danken, in seinem Labor im *Department of Psychology an der Monash University* (Melbourne) arbeiten zu können. Ebenfalls möchte ich mich bei seinen Mitarbeitern für die ständige Hilfsbereitschaft bedanken, insbesondere bei Jeff Liddell, der mich bei der Durchführung der histochemischen Anfärbungen unterstützt hat. Besonders herzlich möchte ich Elena Hartley und ihrer Familie danken, bei denen ich ein schönes Weihnachtsfest verbracht habe.

Herrn Prof. U. Weser möchte ich für die Nutzung seines Atomabsorptionsspektrometers und Herrn Dr. H. J. Hartmann für seine Unterstützung bei der Durchführung der Messungen danken.

Herrn Prof. H. Wolburg danke ich für die Gewinnung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Astrogliazellen.

Frau Prof. G. Dodt danke ich für die Bereitstellung ihres Fluoreszenzmikroskops und ihren Mitarbeitern für die Einführung in das Gerät und die dazugehörige *Software*.

Großer Dank gebührt auch meinen Eltern, die mich immer bedingungslos unterstützt haben und es dabei sicher nicht einfach hatten.

Mein allergrößter Dank geht an meine Freundin Alexandra, die mich stets motivieren konnte, unendlich viel Geduld aufgebracht hat und mein Leben bereichert hat. Ihr wird immer ein besonderer Platz in meinem Herzen gehören.

Inhalt

<u>1</u>	<u>Abkürzungen und Nomenklatur</u>	<u>9</u>
<u>2</u>	<u>Einleitung</u>	<u>12</u>
2.1	Neurale Zellen	12
2.1.1	Das Gehirn und seine Zellen	12
2.1.2	Neurale Zellkulturen als Modellsysteme	15
2.2	Eisenstoffwechsel	16
2.2.1	Vorkommen und Bedeutung von Eisen für biologische Systeme	17
2.2.1.1	Eisen als essentieller Bestandteil zellulärer Proteine	17
2.2.1.2	Toxisches Potential redoxaktiven Eisens	20
2.2.2	Eisenaufnahmemechanismen	21
2.2.2.1	Aufnahme von transferringebundenem Eisen	22
2.2.2.2	Weitere Eisenaufnahmemechanismen	25
2.2.3	Eisenspeicherung	26
2.2.4	Eisenexport	27
2.2.5	Regulation des intrazellulären Eisenstoffwechsels	28
2.3	Eisenstoffwechsel des Gehirns	30
2.3.1	Eisenaufnahme ins Gehirn	30
2.3.2	Eisenstoffwechsel neuraler Zellen	32
2.3.2.1	Vorkommen von Eisen und Proteinen des Eisenstoffwechsels	32
2.3.2.2	Eisenstoffwechsel neuraler Zellkulturen	35
2.3.3	Eisen und neurodegenerative Erkrankungen	36
2.4	Antioxidative Mechanismen und oxidativer Stress	38
2.4.1	Bildung reaktiver Sauerstoffspezies im Gehirn	38
2.4.2	Antioxidative Mechanismen neuraler Zellen	40
2.4.2.1	Glutathionstoffwechsel	40
2.4.2.2	Peroxidentgiftung	41
2.5	Aufgabenstellung	42
<u>3</u>	<u>Ergebnisse</u>	<u>44</u>
3.1	Morphologische und immunocytochemische Charakterisierung neuraler Zellkulturen	44
3.2	Nachweis von Eisen	46
3.2.1	Atomabsorptionsspektrometrie	47
3.2.2	Kolorimetrische Eisenbestimmung	47
3.2.2.1	Eichgerade	48
3.2.2.2	Einfluss von Ferrozin und Neocuproin	49
3.2.2.3	Vergleich verschiedener Eisensalze und Einfluss divalenter Kationen	50
3.2.3	Nachweis von Eisen in astrogliareichen Primärkulturen	51
3.2.3.1	Vergleich von atomabsorptionsspektrometrischer und kolorimetrischer Eisenbestimmung	51
3.2.3.2	Cytochemischer Nachweis von Eisen in neuralen Zellen	53

3.3	Eisen und Proteine des Eisenstoffwechsels in Kulturen neuraler Zellen	54
3.3.1	Quantitativer und qualitativer Nachweis von Eisen	55
3.3.2	Nachweis der mRNAs von Proteinen des Eisenstoffwechsels	57
3.3.3	Vorkommen von Proteinen des Eisenstoffwechsels	58
3.3.3.1	Ferritin	58
3.3.3.2	Transferrinrezeptor	60
3.3.3.3	Transferrin	61
3.4	Eisenakkumulation in neuronalen Zellen	62
3.4.1	Eisenakkumulation in Astrogliazellen	63
3.4.2	Transferrinabhängigkeit der Eisenaufnahme in neuronalen Zellen	68
3.5	Modulation des Ferritin- und Transferrinrezeptorgehaltes in Astroglia-kulturen durch Eisenapplikation oder Eisenentzug	72
3.5.1	Eisengehalt und Vitalität	72
3.5.2	Vorkommen von Ferritin und Transferrinrezeptor	75
3.5.3	Einfluss von Cycloheximid	79
3.6	Histochemische Anfärbungen von Eisen und Proteinen des Eisenstoffwechsels in Gehirnschnitten der Ratte	83
3.7	Peroxidentgiftung und Eisentoxizität in Astroglia-kulturen von Wildtyp- und Glutathionperoxidase 1-defizienten Mäusen	87
3.7.1	Wasserstoffperoxidentgiftung und Peroxidtoxizität	88
3.7.2	Glutathiongehalt und Glutathionoxidation	91
<u>4</u>	<u>Diskussion</u>	<u>93</u>
4.1	Nachweismethoden für Eisen	93
4.2	Eisengehalte neuraler Zellkulturen	94
4.3	Ferritin, Transferrinrezeptor und Transferrin in neuronalen Zellen	97
4.4	Eisenakkumulation in neuronalen Zellen	99
4.5	Modulation des Ferritin- und Transferrinrezeptorgehaltes durch Eisenüberschuss oder Eisenmangel	102
4.6	Peroxidentgiftung und eisenvermittelte Toxizität von H ₂ O ₂	104
4.7	Ausblick	107
<u>5</u>	<u>Experimenteller Teil</u>	<u>110</u>
5.1	Material	110
5.2	Geräte	110
5.3	Reagenzien und Chemikalien	112
5.4	Methoden	114
5.4.1	Zellkulturen	114
5.4.1.1	Allgemeine Techniken	114
5.4.1.2	Astroglia-reiche Primärkulturen	114
5.4.1.3	Oligodendroglia-reiche Sekundärkulturen	114
5.4.1.4	Microglia-reiche Sekundärkulturen	115

5.4.1.5	Neuronenreiche Primärkulturen	116
5.4.2	Anfärbungen	116
5.4.2.1	Immuncytochemische Anfärbungen	116
5.4.2.2	Chromatinfärbung	117
5.4.2.3	Immunhistochemische Anfärbung von Gehirnschnitten	117
5.4.2.4	Eisen(III)-Färbungen	118
5.4.2.5	Rhodaminfärbung	119
5.4.2.6	Elektronenmikroskopie	119
5.4.3	<i>Western Blot</i> -Analysen	120
5.4.4	Detektion von Eisen in Polyacrylamidgelen	122
5.4.5	Bestimmungsmethoden	123
5.4.5.1	Kolorimetrische Eisenbestimmung	123
5.4.5.2	Atomabsorptionsspektrometrische Eisenbestimmung	124
5.4.5.3	Wasserstoffperoxid	124
5.4.5.4	Glutathion und Glutathiondisulfid	125
5.4.5.5	Zellvitalität	126
5.4.5.6	Protein	126
5.4.6	Molekularbiologische Methoden	126
5.4.6.1	Sequenzanalyse und <i>Primerdesign</i>	126
5.4.6.2	Reverse Transkription	127
5.4.6.3	Polymerasekettenreaktion	127
<u>6</u>	<u>Literaturreferenzen</u>	<u>129</u>
<u>7</u>	<u>Zusammenfassung</u>	<u>154</u>

1 Abkürzungen und Nomenklatur

Alle Abkürzungen, die für das *Journal of Neurochemistry* als bekannt vorausgesetzt werden (siehe Internetseite „blackwellpublishing.com“), sind in der folgenden Liste nicht aufgeführt.

α	anti
AA/BA	Acrylamid/Bisacrylamid
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
Abb.	Abbildung
AD	Alzheimersche Erkrankung (engl.: <i>Alzheimer's disease</i>)
AIDS	erworbenes Immundefizienzsyndrom (engl.: <i>Acquired Immune deficiency syndrome</i>)
al.	andere (lateinisch: <i>alii</i>)
AP	Alkalische Phosphatase
APK(s)	astrogliareiche Primärkultur(en)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
3AT	3-Amino-1,2,4-triazol
BCIP	5-Brom-4-chlor-indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i>)
BSO	Buthioninsulfoximin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA(s)	komplementäre Desoxyribonucleinsäure(n) (engl.: <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CHX	Cycloheximid
CP	Ceruloplasmin
D	spezifische Entgiftungsgeschwindigkeitskonstante
d	Tag(e) (lateinisch: <i>dies</i>)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol
Dcytb	duodenales Cytochrom b
DFX	Deferoxamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMT1	divalenter Metallionentransporter 1
dNTPs	Desoxyribonucleosidtriphosphate

DRH123	Dihydrorhodamin 123
engl.	englisch
FAC	Eisenammoniumcitrat (engl.: <i>ferric ammonium citrate</i>)
Fe-S	Eisen-Schwefel
FCS	fötales Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GalC	Galactocerebrosid
GFAP	gliales fibrilläres saures Protein (engl.: <i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GPI	Glycosyl-Phosphatidylinositol
GPx	Glutathionperoxidase(n)
GPx(1)	Glutathionperoxidase 1
GPx1(-/-)	Glutathionperoxidase 1-defizient
GR	Glutathionreductase
GSx	Gesamtglutathion (Menge an GSH + 2 x Menge an GSSG)
Hrsg.	Herausgeber
IgG	Immunglobulin G
IPS	idiopathisches Parkinsonsyndrom
IRE(s)	engl.: <i>iron responsive element(s)</i>
IRP(s)	engl.: <i>iron regulatory protein(s)</i>
K _A	Bindungskonstante
KPi	Kaliumphosphatpuffer (0.1 M, pH 7.4)
LDH	Lactatdehydrogenase
MBP	basisches Myelinprotein (engl.: <i>myelin basic protein</i>)
mRNA(s)	Botenribonucleinsäure (engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MS	multiple Sklerose
MSK(s)	microgliareiche Sekundärkultur(en)
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NPK(s)	neuronenreiche Primärkultur(en)
n.s.	nicht signifikant
OSK(s)	oligodendrogliareiche Sekundärkultur(en)
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PFA	Paraformaldehyd
RH123	Rhodamin 123
RSS	reaktive Sauerstoffspezies

Rt	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (engl.: <i>standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SSS	Sulfosalicylsäure
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tf	Transferrin
TfR	Transferrinrezeptor
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierter Bereich (engl.: <i>untranslated region</i>)
v/v	Volumen/Volumen (engl.: <i>volume per volume</i>)
w/v	Gewicht/Volumen (engl.: <i>weight per volume</i>)
z.B.	zum Beispiel

Zur Unterscheidung von neuronalen Zellen in Kultur und im Gehirn werden Zellen in Kultur als Astrogliazellen, Microgliazellen oder Oligodendrogliazellen bezeichnet. Sind die entsprechenden Zellen *in vivo* gemeint, werden sie als Astrocyten, Microglia bzw. Oligodendrocyten bezeichnet.

Mit dem Begriff „Eisen“ werden in der vorliegenden Arbeit Eisenkomplexe oder Eisenionen bezeichnet. Eisenkomplexe von zweiwertigem Eisen sind als Eisen(II), Komplexe von dreiwertigem Eisen als Eisen(III) gekennzeichnet.

Soweit sinnvoll und vorhanden sind in dieser Arbeit deutsche Fachbegriffe verwendet worden. Sofern keine deutschen Fachbegriffe genutzt werden konnten oder deutsche Begriffe keine eindeutige Bezeichnung darstellten, wurden englische Fachbegriffe verwendet. Diese sind, ebenso wie alle anderen Begriffe aus Fremdsprachen, kursiv geschrieben.

2 Einleitung

2.1 Neurale Zellen

2.1.1 Das Gehirn und seine Zellen

Das Gehirn des Menschen und der höheren Säugetiere ist ein sehr komplexes Organ. Diese Komplexität ist durch eine sehr große Anzahl von Verschaltungen zwischen Neuronen und durch die morphologische und funktionelle Verknüpfung der verschiedenen Zelltypen des Gehirns miteinander gekennzeichnet. Neben Neuronen, die für die Erregungsfortleitung, die Signalverarbeitung und die Informationsintegration verantwortlich sind, sind besonders Gliazellen wichtig, die ungefähr 90% der Zellen und ca. 50% der Zellmasse des Gehirns ausmachen (Kuffler und Nicholls 1966; Somjen 1988) und viele wichtige Funktionen im Gehirn ausüben (Kettenmann und Ransom 2005). Gliazellen lassen sich in Astrocyten, Oligodendrocyten, Microglia und Ependymzellen (Abb. 1) einteilen. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass sich die Eigenschaften von Gliazellen eines Zelltyps, wie auch die von Neuronen, je nach Lokalisation und Aufgabe im Gehirn stark unterscheiden können (Kettenmann und Ransom 2005).

Neuronen besitzen im Vergleich zu anderen neuralen Zellen meist große Somata sowie eine Vielzahl von Fortsätzen (Dendriten und Axone) und zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Bildung von Aktionspotentialen aus (Raine 1999). Neuronen sind für die Erregungsleitung, die Verschaltung und Prozessierung von Information sowie für die Steuerung willkürlicher und unwillkürlicher Bewegungen und Vorgänge verantwortlich. Obwohl im menschlichen Gehirn pro Tag ca. zwanzigtausend Neuronen absterben (Raine 1999), können die Funktionen des Gehirns auch bis ins hohe Alter erfüllt werden. In den meisten Gehirnbereichen können abgestorbene Neuronen nicht ersetzt werden. Es gibt jedoch bestimmte Areale im Gehirn, wie den *Hippocampus* und die Subventrikularzone, in denen Neuronen aus neuralen Stammzellen generiert werden (Gage 2002; Alvarez-Buylla und Garcia-Verdugo 2002; Lie *et al.* 2004).

Neuronen können nach mehreren Kriterien eingeteilt werden, z.B. nach ihrer Auswirkung auf Zielzellen (inhibitorisch, excitatorisch oder sekretorisch), ihrer

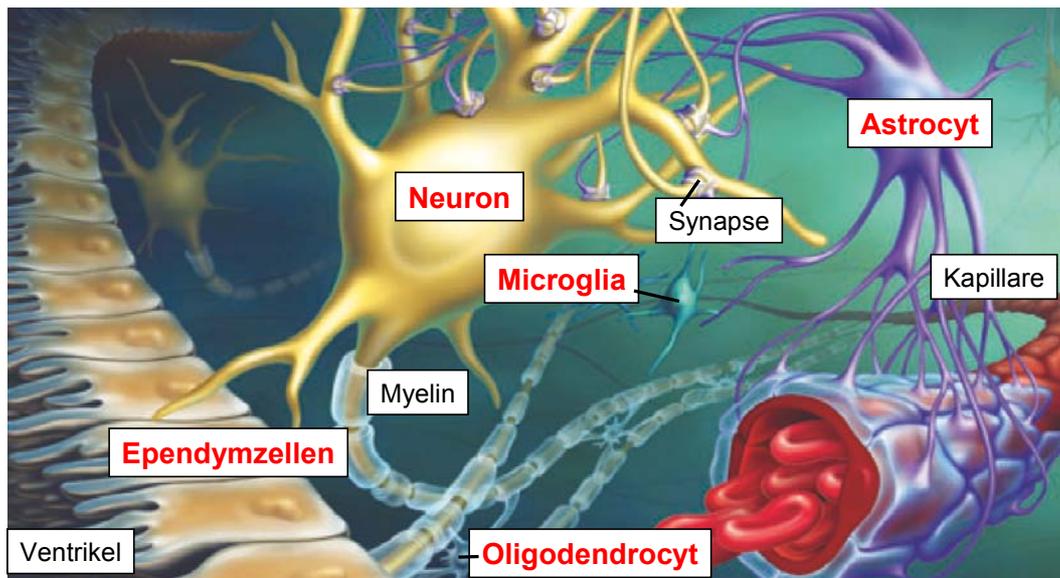


Abb. 1: Schematische Darstellung der Zelltypen des Gehirns. Modifiziert nach Pfrieder und Steinmetz (2003).

Funktion (sensorisch, motorisch oder verschaltend) oder ihren Neurotransmittern (Glutamat, Noradrenalin, Dopamin und viele andere). Diese Einteilung berücksichtigt jedoch nicht, dass viele Neuronen mehrere Neurotransmitter verwenden können (Changeux 1986; Hökfelt *et al.* 1986).

Astrocyten sind der im Gehirn am häufigsten vorkommende Zelltyp. Sie bilden ein dichtes Netzwerk aus Zellfortsätzen, die sich um andere Zellen herum legen. Dieses Netzwerk bildet nicht nur einen morphologischen sondern auch einen funktionellen Verband. So wird durch *gap junctions*, die überwiegend durch das Connexin 43 gebildet werden (Kirchhoff *et al.* 2001; Bennett *et al.* 2003; Ransom und Ye 2005) die interzelluläre Kommunikation zwischen Astrocyten ermöglicht. Astrocyten spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Funktionen des Gehirns (Kirchhoff *et al.* 2001). So können ihre Endfüße auf Kapillarendothelzellen liegen, welche die Blut-Hirn-Schranke bilden (Kuffler und Nicholls 1966; Nedergaard *et al.* 2003; Bauer *et al.* 2005). Astrocyten umgeben die Kapillaren des Gehirns mit ihren Endfüßen fast vollständig, so dass sie die Hauptmediatoren zwischen Endothelzellen und dem umgebenen neuronalen Gewebe sind (Bauer *et al.* 2005). Die Blut-Hirn-Schranke wird durch *tight junctions* zwischen benachbarten Endothelzellen abgedichtet (Nedergaard *et al.* 2003). Möglicherweise sind Astrocyten durch die Freisetzung von Faktoren auch an der Bildung der *tight junctions* beteiligt (Abbott 2002; Nedergaard *et al.* 2003).

Astrocyten stehen auch in engem Kontakt zu Neuronen. Sie sind für die neuronale Erregungsfortleitung unverzichtbar, da sie Neurotransmitter wie Glutamat und Ionen wie K^+ aufnehmen können und so zur Beendigung der Neurotransmission und zur Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase beitragen (Anderson und Swanson 2000; Hertz 2004; Newman 2005). Astrocyten können aber auch bidirektional mit Neuronen kommunizieren. Erhalten Astrocyten Signale von benachbarten Neuronen, können sie darauf mit der Freisetzung neuroaktiver Substanzen reagieren (Kirchhoff *et al.* 2001; Fellin und Carmignoto 2004). Astrocyten besitzen Rezeptoren für nahezu alle Neurotransmitter und Neuromodulatoren (van Calker und Hamprecht 1980; Porter und McCarthy 1997; Verkhratsky *et al.* 1998; Kettenmann und Steinhäuser 2005). Als Reaktion auf neuronale Aktivität kann die intrazelluläre Calciumionenkonzentration in Astrocyten ansteigen und/oder die astrogliale Zellmembran depolarisiert werden (Araque *et al.* 2002; Fellin und Carmignoto 2004). Astrocyten wiederum können als Folge der erhöhten intrazellulären Calciumionenkonzentration mit der Freisetzung von Glutamat und/oder ATP reagieren, die als Gliatransmitter präsynaptische oder postsynaptische Neuronen beeinflussen (Newman 2003; Fellin und Carmignoto 2004).

Microglia werden oft „Macrophagen des Gehirns“ genannt, da sie im Gehirn ähnliche Funktionen ausüben wie Macrophagen in der Peripherie (van Rossum und Hanisch 2004). Mit diesen haben sie auch einige wesentliche biochemische und physiologische Merkmale gemeinsam. Im Unterschied zu Macrophagen sind Microglia echte parenchymale Zellen, da sie außerhalb der Basalmembran von Blutkapillaren vorkommen (Streit 2005). Ihre Fortsätze befinden sich häufig zwischen den Fortsätzen der Astrocyten (Lassmann *et al.* 1991). Sie zeigen ein ausgeprägtes Territorialverhalten, das heißt, *in vivo* befindet sich zwischen zwei Microglia immer ein Abstand. Microglia sind an völlig unterschiedlichen Vorgängen im Gehirn beteiligt, z.B. an der Regulation der Proliferation von Astrocyten (Giulian und Baker 1985) und an immunologischen Prozessen. Bei Letzteren wirken sie wie Macrophagen als Antigen präsentierende Zellen und, im Falle lokaler entzündlicher Reaktionen des Gehirns, als Immuneffektorzellen (Giulian 1987; Nelson *et al.* 2002; Neumann 2005). Eine besondere Eigenschaft der Microglia ist die Fähigkeit zur Superoxidproduktion durch das Enzym NADPH-Oxidase (Sonderer *et al.* 1987; Colton und Gilbert 1987;

Sankarapandi *et al.* 1998; Dringen 2005; Streit 2005). Diese Eigenschaft teilen sie mit peripheren Lymphocyten, was ihre Funktion als „Immunzellen des Gehirns“ unterstreicht.

Oligodendrocyten bilden die Myelinschicht um Axone der Nervenzellen im Gehirn (Baumann und Pham-Dinh 2001; Butt 2005). Myelin ist sehr reich an Lipiden und arm an Wasser. Es wurde zum ersten Mal 1854 von Virchow beschrieben (Virchow, 1854; zitiert nach Baumann und Pham-Dinh, 2001). Dabei handelt es sich um Verlängerungen der Plasmamembran, die um Axone gewickelt sind und dadurch eine elektrische Isolierung der Axone bewirken. Ein einzelner Oligodendrocyt kann mehrere Myelinsegmente an einem oder an mehreren Axonen ausbilden. Zwischen den Myelinsegmenten befinden sich Aussparungen in der Myelinhülle, die man Ranviersche Schnürringe nennt. Die Ranvierschen Schnürringe ermöglichen eine saltatorische Erregungsleitung entlang der Axone, so dass Impulse auch an dünnen, feinen Nervenfasern sehr schnell weitergeleitet werden können (Baumann und Pham-Dinh 2001; Butt 2005).

Die Schädigung von Oligodendrocyten ist ein wichtiges Merkmal der multiplen Sklerose (MS) (Keegan und Noseworthy 2002; LeVine und Chakrabarty 2004). MS ist eine chronische und entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems. Die Faktoren, die den selektiven Abbau des Myelins und das Absterben der Oligodendrocyten bei MS bewirken, sind bisher nicht bekannt (Goldbaum und Richter-Landsberg 2001; Pitt *et al.* 2003). MS besitzt Eigenschaften einer Autoimmunerkrankung, jedoch werden auch oxidative Schädigungen von Oligodendrocyten im Zusammenhang mit MS diskutiert (Smith *et al.* 1999; Casaccia-Bonnel 2000; LeVine und Chakrabarty 2004).

2.1.2 Neurale Zellkulturen als Modellsysteme

Es ist experimentell oft sehr schwierig, Informationen über Eigenschaften eines bestimmten Zelltyps des Gehirns zu erhalten, da das komplexe Netzwerk von Fortsätzen die Zellen im Gehirn zu einem schwer analysierbaren System verknüpft. Visualisierende histochemische Methoden sind zwar zum Nachweis von Molekülen in Zellen geeignet, erlauben jedoch kaum deren Quantifizierung. Ein Weg zur Untersuchung von Eigenschaften und Funktionen der verschiedenen Zelltypen des

Gehirns ist die Verwendung von Zellkulturen, die für einen Zelltyp des Gehirns angereichert sind (Dringen *et al.* 2004). Mit Hilfe dieser Zellkulturen können prinzipielle Eigenschaften eines Zelltyps bestimmt werden. Zudem lassen sich mit Hilfe von Kokulturen (Moore 2001) auch mögliche Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zelltypen des Gehirns untersuchen. Daten, die vergleichend an Zellkulturen verschiedener Zelltypen (Kranich *et al.* 1996; Hirrlinger *et al.* 2002b) oder an Kokulturen (Moore 2001) gewonnen wurden, erlauben im günstigsten Fall eine Aussage über das Zusammenspiel der verschiedenen Zellen im Gehirn. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass Zellen in Kultur andere Eigenschaften als im intakten Organ besitzen können. Deshalb ist es notwendig, die an Zellkulturen gewonnenen Daten auf ihre physiologische Relevanz zu überprüfen. Dies ist z.B. durch den Vergleich mit histochemischen und immunhistochemischen Anfärbungen oder mit Daten von Untersuchungen an Gehirnhomogenaten möglich.

2.2 Eisenstoffwechsel

Eisenionen sind unverzichtbar für lebende Organismen. Auf Grund ihrer Eigenschaft, an Reaktionen mit Ein-Elektronen-Übergängen teilzunehmen, sind sie als Bestandteil verschiedener Kofaktoren für viele enzymatische Reaktionen wichtig und spielen z.B. eine bedeutende Rolle beim Sauerstofftransport oder in der mitochondrialen Atmungskette (Crichton 2001; Hentze *et al.* 2004). Eisenmangel ist eine der häufigsten Mangelerscheinungen beim Menschen und verursacht unter anderem Anämie, Müdigkeit, Lernstörungen und Komplikationen bei der Schwangerschaft (Boulet 1997; Rao und Georgieff 2002). Eine Eisenunterversorgung während der Entwicklung kann zu Verhaltensstörungen und neurologischer Schädigung führen (Shah 1991; Rao *et al.* 1999; de Deungria *et al.* 2000; los Monteros *et al.* 2000; Pinero *et al.* 2001). Obwohl Eisenionen essentiell sind, können sie auch sehr nachteilige Wirkungen auf biologische Systeme haben. In redoxaktiver Form verursachen Eisenionen die Bildung hochreaktiver Hydroxylradikale aus Wasserstoffperoxid und Superoxid durch „Fenton-Chemie“ (Crichton 2001; Crichton *et al.* 2002). H_2O_2 entsteht durch die Aktivität der Superoxiddismutasen bei der Entgiftung von Superoxid, welches wiederum ein Nebenprodukt der Atmungskette ist (Korshunov *et al.* 1997). Zur Verhinderung der zellulären Bildung von Hydroxylradikalen wird H_2O_2 durch Catalase und durch Glutathionperoxidasen (GPx) wirkungsvoll entgiftet (Dringen und Hamprecht 1997; Hirrlinger *et al.* 2002b; Dringen *et al.* 2004)

und die Konzentration redoxaktiven Eisens in der Zelle gering gehalten (Hoepken *et al.* 2004; Liddell *et al.* 2004; Pantopoulos 2004).

Um den vielfältigen Anforderungen an den Eisenstoffwechsel gerecht zu werden, haben Zellen im Laufe der Evolution Mechanismen für die Aufnahme, die Speicherung und den Export von Eisen entwickelt (Abb. 2). Diese Mechanismen haben zum Ziel, einerseits genügend Eisen für essentielle zelluläre Funktionen zur Verfügung zu stellen und andererseits eine Zellschädigung durch eisenverursachten oxidativen Stress so gering wie möglich zu halten. Eine effektive Kontrolle der intrazellulären Eisenkonzentration erfordert die wirksame Regulation des Transports und der Speicherung von Eisen. Die wichtigsten bekannten Transport-, Speicherungs- und Regulationsmechanismen von Säugerzellen für Eisen (Abb. 2) werden in den folgenden Kapiteln näher beschrieben.

2.2.1 Vorkommen und Bedeutung von Eisen für biologische Systeme

2.2.1.1 Eisen als essentieller Bestandteil zellulärer Proteine

In biologischen Systemen liegt Eisen in Komplexen entweder in zweiwertiger (Eisen(II)) oder in dreiwertiger (Eisen(III)) Form vor. Zu den wichtigsten Eisenkomplexen zählen Hämgruppen, Eisen-Schwefel (Fe-S)-Komplexe und die eisenhaltigen Kofaktoren der Ribonucleotidreduktasen (Crichton 2001).

Die Hämproteine, in denen Eisen an die Stickstoffatome eines Porphyrin-Ringsystems koordiniert ist, sind vor allem am Sauerstofftransport, an der Aktivierung von Sauerstoff und an Ein-Elektronen-Übertragungen beteiligt (Crichton 2001). Für den Transport von Sauerstoff sind die Hämproteine Myoglobin und Hämoglobin verantwortlich. Häm ist dabei über zahlreiche hydrophobe Wechselwirkungen und über die koordinative Bindung seines Eisenatoms an den Imidazolring eines benachbarten Histidins der Polypeptidkette stark an das Protein gebunden. Die sechste freie Koordinationsstelle des Eisenatoms steht für die reversible Bindung von Sauerstoff zur Verfügung (Collman *et al.* 1978a/b; Perutz 1979; Crichton 2001).

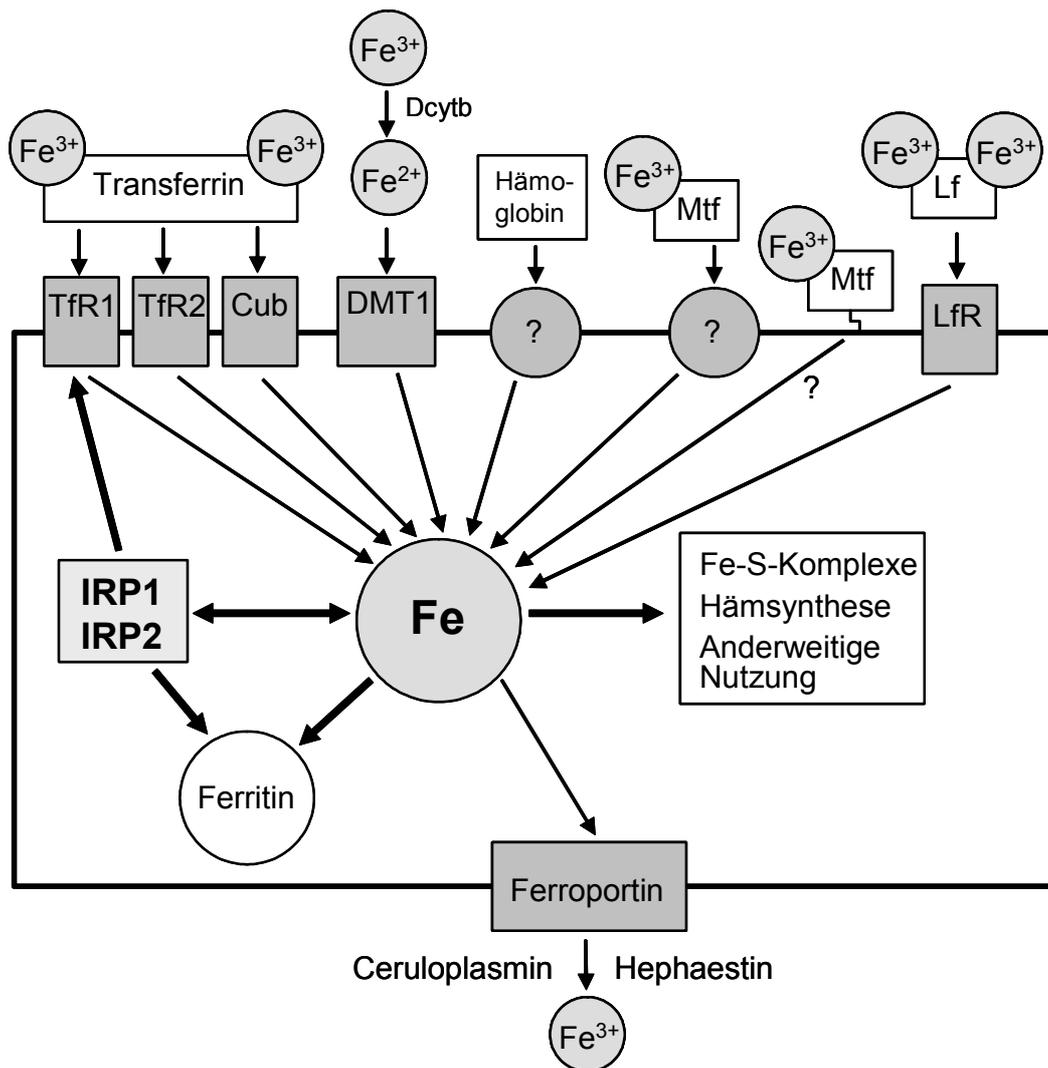


Abb. 2: Überblick über den Eisenstoffwechsel. Die Abbildung zeigt eine hypothetische Säugerzelle mit Eisenimport- (oben) und Eisenexportwegen (unten). Der Eisen-Transferrin-Komplex wird über seine Rezeptoren TfR1 und TfR2 sowie in der Niere über Cubilin durch Endocytose aufgenommen. DMT1 ist für die Aufnahme von Fe²⁺ und die Freisetzung von Eisen aus den Endosomen nach transferrinvermittelter Eisenaufnahme (nicht dargestellt) verantwortlich. Im Darm kann Dcytb Fe²⁺ durch Reduktion von Fe³⁺ bereitstellen. Des Weiteren kann Eisen über Hämoglobin, Melanotransferrin und Lactoferrin aufgenommen werden. Melanotransferrin hat nur eine Bindungsstelle für Eisen und tritt sowohl extrazellulär als auch membrangebunden auf. Lactoferrin wird ähnlich wie Transferrin rezeptorvermittelt aufgenommen. Aufgenommenes Eisen kann für die Hämsynthese, für die Synthese von Fe-S-Komplexen und für die Synthese anderer Eisenkomplexe verwendet werden. Überschüssiges Eisen wird in Ferritin gespeichert. Die Regulation der Expression von TfR und Ferritin erfolgt über IRP1 und IRP2. Der einzige bekannte Eisenexporter ist Ferroportin, der Fe²⁺ aus der Zelle transportiert, das anschließend durch Ceruloplasmin oder Hephaestin zu Fe³⁺ oxidiert wird. Neben den dargestellten Mechanismen ist vor allem für die Eisenaufnahme noch eine Vielzahl anderer Mechanismen bekannt (Conrad und Umbreit 2000; Hentze *et al.* 2004; Pantopoulos 2004), die hier nicht alle berücksichtigt werden konnten. Modifiziert nach Hentze *et al.* (2004).

Ebenfalls zu den Hämproteinen gehören mehrere Enzyme, die molekularen Sauerstoff als Substrat nutzen, z.B. Cytochromoxidase und Cytochrom P450-Monooxygenasen. Cytochromoxidase, das terminale Enzym der mitochondrialen Atmungskette, katalysiert die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser. Dieses Enzym besitzt zwei Hämgruppen, die als Häm a_1 und Häm a_2 bezeichnet werden (Tsukihara *et al.* 1995; Ferguson-Miller und Babcock 1996; Babcock 1999). Cytochrom P450-Monooxygenasen katalysieren Hydroxylierungsreaktionen, bei denen ein organisches Substrat RH unter Verbrauch eines Sauerstoffatoms zu R-OH hydroxyliert wird. Das andere Sauerstoffatom wird durch Reduktionsäquivalente zu Wasser reduziert (Sono *et al.* 1996). Die dritte Gruppe der Hämproteine umfasst die Cytochrome, die am Transport von Elektronen beteiligt sind. Cytochrome kommen in der Natur sehr häufig vor und fungieren als Elektronenträger in Mitochondrien, im endoplasmatischen Reticulum und in photosynthetischen Organellen (Rich 1984).

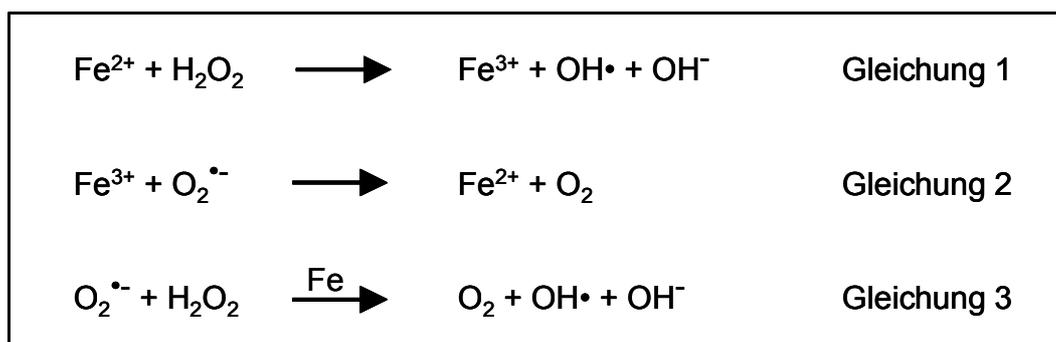
Neben den Hämproteinen gibt es noch eine andere große Gruppe von eisenhaltigen Proteinen, die so genannten Fe-S-Proteine. Man unterscheidet zwischen einfachen und komplexen Fe-S-Proteinen. Die komplexen Proteine besitzen zusätzlich zum Fe-S-Komplex noch weitere Kofaktoren wie Flavinnucleotide, Molybdän oder Hämgruppen. Kristallografisch wurden vier verschiedene Formen von Fe-S-Komplexen in Modellsubstanzen und Proteinen nachgewiesen (Holm *et al.* 1996). Dazu gehören die Rubredoxine, die bisher nur in Bakterien gefunden wurden. Sie besitzen ein einzelnes Eisenatom, das an vier Cysteinreste einer Polypeptidkette gebunden ist (Holm *et al.* 1996). Weiterhin treten rhombische Zwei-Eisen-Zwei-Schwefel (2Fe-2S)-Komplexe auf, die entweder vier Cystein-Schwefel-Bindungen oder eine Mischung aus Cystein- und Histidin-Bindungen besitzen (Holm *et al.* 1996). Außerdem gibt es kubische Drei-Eisen-Vier-Schwefel (3Fe-4S)-Komplexe und Vier-Eisen-Vier-Schwefel (4Fe-4S)-Komplexe (Holm *et al.* 1996), die unter anderem, wie in Kapitel 2.2.5 näher beschrieben wird, eine bedeutende Funktion bei der Regulation des Eisenstoffwechsels von Zellen besitzen (Eisenstein 2000; Pantopoulos 2004).

Einen besonderen Eisenkomplex bildet die Ribonucleotidreductase aus. Dieses Enzym katalysiert eine Ein-Elektronen-Übertragung bei der Reduktion von Ribonucleotiden zu ihren korrespondierenden Desoxyribonucleotiden (Stubbe und

van der Donk 1998, Stubbe 1998). Die im Menschen vorkommende Ribonucleotidreductase besitzt im aktiven Zentrum ein Tyrosylradikal, das benachbart zu einem Eisenkomplex ist. Dieser Eisenkomplex besteht aus zwei an einem Sauerstoffatom gebundenen Eisenatomen (Stubbe und Der Donk 1998; Stubbe 1998). Der Eisenkomplex ist für die Stabilität des Tyrosylradikals erforderlich. Behandelt man das Enzym mit dem Eisenchelator Deferoxamin (DFX), verliert es sowohl seinen Eisenkomplex als auch das Tyrosylradikal und damit seine enzymatische Aktivität (Hoffbrand *et al.* 1976; Nyholm *et al.* 1993).

2.2.1.2 Toxisches Potential redoxaktiven Eisens

Obwohl Eisenkomplexe als Kofaktoren vieler Proteine essentiell sind, stellen Eisenionen in redoxaktiver Form ein hohes Gefährdungspotential für biologische Systeme dar. Sie bewirken in der Fenton-Reaktion (Gleichung 1) die Bildung hochreaktiver Hydroxylradikale aus H_2O_2 . 1876 beschrieb Fenton die Oxidation von Weinsäure bei Zugabe von H_2O_2 und Fe^{2+} und zeigte, dass Fe^{2+} in dieser Reaktion katalytisch wirkt (Fenton 1894, zitiert nach Koppenol 2001). Jedoch analysierte er nicht die Mechanismen der Reaktion, die später nach ihm benannt wurde. Die Reaktion von Eisenionen mit H_2O_2 wurde hauptsächlich von Haber, Willstätter und Weiss untersucht (Haber und Willstätter 1931; Haber und Weiss 1932; Weiss und Humphrey 1949). Die so genannte Fenton-Reaktion beschreibt die Produktion von Hydroxylradikalen aus H_2O_2 und Fe^{2+} (Gleichung 1). Unter zellulären Bedingungen kann Fe^{3+} durch verschiedene reduzierende Verbindungen zu Fe^{2+} reduziert werden. So können Superoxid (Gleichung 2) und Ascorbat Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduzieren. Die Summe von Gleichung 2 und der Fenton-Reaktion (Gleichung 1) ergibt die eisenkatalysierte Haber-Weiss-Reaktion (Gleichung 3), bei der aus Superoxid und H_2O_2 ein Molekül Sauerstoff, ein Hydroxylradikal und ein Hydroxylanion entstehen.



Damit Eisen bei der Fenton-Reaktion oder der Haber-Weiss-Reaktion reagieren kann, muss es in redoxaktiver Form vorliegen. Dies ist in Zellen durch das Vorkommen von nicht proteingebundenem Eisen möglich (Kakhlon und Cabantchik 2002; Kruszewski 2003; Kurz *et al.* 2004). Zudem kann Superoxid nicht nur Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduzieren, sondern auch Eisen aus Ferritin, Hämproteinen oder Fe-S-Komplexen freisetzen, so dass anschließend freies Eisen vorliegt (Biernacki *et al.* 1986; Harris *et al.* 1994; Keyer und Imlay 1996; Paul 2000; Agrawal *et al.* 2001).

Eisen kann sein toxisches Potential in Zellen in Gegenwart von Superoxid und H_2O_2 ausüben. In Zellen entsteht H_2O_2 durch die Aktivität der Superoxiddismutasen bei der Entgiftung von Superoxid (Inoue *et al.* 2003), welches als Nebenprodukt in der Atmungskette gebildet wird (Korshunov *et al.* 1997; Halliwell 2001). Zudem gibt es weitere Enzyme, die H_2O_2 produzieren. So führt die oxidative Desaminierung von Dopamin durch Monoaminoxidasen, der wichtigste katabole Stoffwechselweg für Dopamin (Cohen 2000), ebenfalls zur H_2O_2 -Bildung.

Durch die hohe Reaktivität von Hydroxylradikalen kommt es zu Schädigungen von Biomolekülen. So verursachen Hydroxylradikale DNA-Schädigungen, indem sie mit den Purin- und Pyrimidinbasen reagieren (Halliwell 1992; Halliwell 2001). Dabei entstehen modifizierte Basen wie 8-Hydroxyguanin, das sich bevorzugt mit Adenin an Stelle von Cytosin paart, oder die Pyrimidinderivate Thymin- und Cytosinglycol. Zudem initiieren Hydroxylradikale den Prozess der Lipidperoxidation, indem sie ein Wasserstoffatom aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie der Linolensäure oder der Arachidonsäure abstrahieren (Halliwell 1992, 2001). Es entstehen dabei Radikale, die mit molekularem Sauerstoff Peroxylradikale bilden. Die Peroxylradikale wiederum abstrahieren Wasserstoff von benachbarten Lipiden und lösen somit eine Kettenreaktion aus, die zur Bildung vieler Lipidhydroperoxide führt (Halliwell 1992). Auch Proteine werden durch Hydroxylradikale oxidativ geschädigt (Halliwell 1992; Halliwell und Gutteridge 1999).

2.2.2 Eisenaufnahmemechanismen

Eisenaufnahmemechanismen sind im Darm wichtig, um den Verlust des Körpers an Eisen durch abgestorbene Zellen oder Blutungen wieder auszugleichen. Zum anderen brauchen auch alle anderen Zellen Mechanismen zur Eisenaufnahme, da

sie Eisen für die Ausübung vieler enzymatischer Reaktionen benötigen. Mittlerweile sind viele unterschiedliche Wege der Eisenaufnahme in Zellen bekannt (Abb. 2). Die wichtigsten Transportmechanismen werden in diesem Kapitel zusammengefasst.

2.2.2.1 Aufnahme von transferringebundenem Eisen

Der wohl bekannteste und am besten untersuchte Mechanismus der Eisenaufnahme in Säugerzellen ist die vom Transferrinrezeptor (TfR) vermittelte Aufnahme transferringebundenen Eisens (Abb. 3). Dieser Mechanismus konnte bereits bei vielen Zelltypen nachgewiesen werden. Es ist der Hauptweg der Eisenaufnahme von Reticulocyten und Hepatocyten (Nunes *et al.* 1984; Kohno und Tokunaga 1985; Morgan und Baker 1988). Transferrine stellen eine Familie eisenbindender Proteine dar. Sie sind im Plasma und anderen Körperflüssigkeiten von Vertebraten zu finden. Ovotransferrin (ursprünglich Conalbumin) wurde 1900 von Osborne und Cambell in Eiweiß und Serum entdeckt und als erstes Transferrin gereinigt (Osborne und Cambell 1900, zitiert nach Crichton 2001). Seine Eigenschaften als eisenbindendes und transportierendes Protein wurden jedoch erst viele Jahre später beschrieben (Schade und Caroline 1944, 1946). 1947 wurde der Begriff Transferrin eingeführt (Holmberg und Laurell 1947), der bis heute als allgemeiner Name für Proteine dieser Familie verwendet wird. Zu den Transferrinen gehört auch das Lactoferrin, das unter anderem in der menschlichen Milch vorkommt und von Leukocyten sezerniert wird. Möglicherweise ist Lactoferrin auch an der Eisenaufnahme durch die Blut-Hirn-Schranke hindurch beteiligt (Fillebeen *et al.* 1999). Eine besondere Form eines Transferrins stellt das Melanotransferrin dar, das über einen Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) unter anderem in der Membran von Melanocyten vorkommt (Rose *et al.* 1986). Melanotransferrin besitzt im Unterschied zu anderen Transferrinen, die in der Regel zwei Bindungsstellen für Eisen haben, nur eine funktionelle Bindungsstelle (Baker *et al.* 1992). Melanotransferrin spielt eine wichtige Rolle bei der Eisenaufnahme von Melanomzellen (Richardson und Baker 1994).

Transferrine sind Glycoproteine mit einer molekularen Masse von ca. 80 kDa. Sie bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette von ca. 680 Aminosäureresten. Kristallografische Studien an menschlichem Lactoferrin (Anderson *et al.* 1987; Anderson *et al.* 1989), menschlichem Serumtransferrin (Bailey *et al.* 1988) und

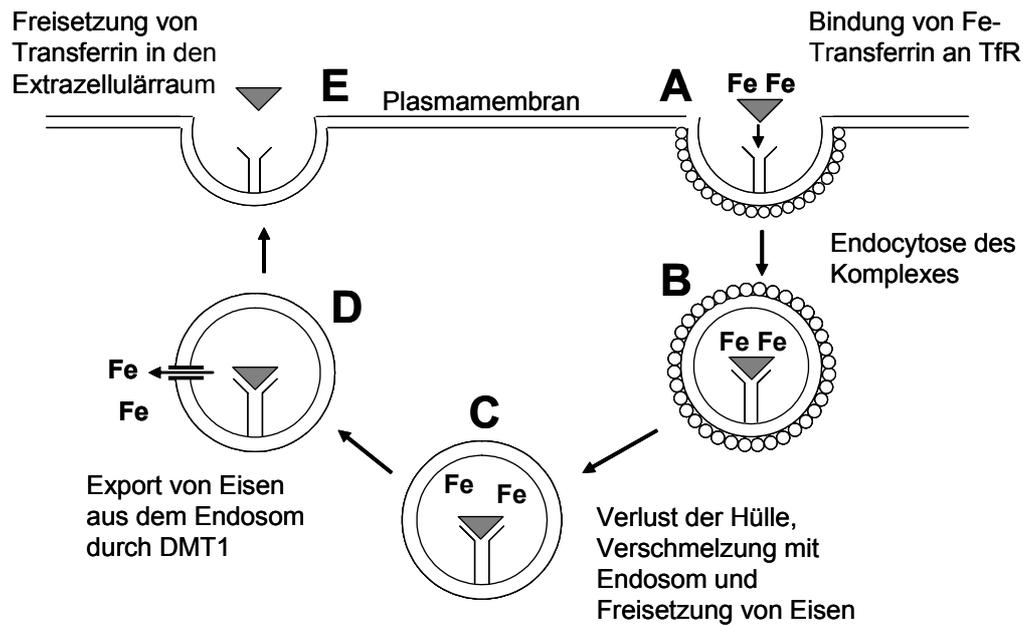


Abb. 3: Eisenaufnahme über das Transferrinsystem. Im Plasma ist bei pH 7.4 vorhandenes Eisen nahezu vollständig an Transferrin (\blacktriangledown) gebunden. Dieser Komplex bindet an den TfR ($\uparrow\downarrow$) von Zellen (A) und wird über rezeptorvermittelte Endocytose aufgenommen (B). Nach Abbau der Hülle verschmilzt das aufgenommene Vesikel mit einem Endosom. Bei dem im Endosom herrschenden pH von ca. 5.5 dissoziiert Eisen vom Transferrin-TfR-Komplex ab (C), wird von einer unbekannteren Ferrireduktase zu Fe^{2+} reduziert und verlässt das Endosom über DMT1 (D). Der Transferrin-TfR-Komplex gelangt zurück an die Plasmamembran, wo das Transferrin bei pH 7.4 abdissoziiert (E). Modifiziert nach Crichton (2001).

Ovotransferrin (Kurokawa *et al.* 1995) haben gezeigt, dass die Polypeptidketten dieser Transferrine in zwei strukturell homologe Domänen, die aminoterminalen (N)-Domäne und die carboxyterminale (C)-Domäne, gefaltet sind. Beide Domänen besitzen eine Bindungsstelle für Fe^{3+} . Neben Eisen binden Transferrine auch andere Metallionen wie Al^{3+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{3+} , Cd^{2+} und Ni^{2+} (Aasa *et al.* 1963; Aisen *et al.* 1969; Trapp 1983; de Jong *et al.* 1995; Hirose *et al.* 1996). Eine physiologische Relevanz dieser Bindungen ist jedoch nicht erwiesen. Transferrin hat eine Halbwertszeit von ca. 8 d (Katz 1961). Es wird vermutet, dass Transferrin mehr als hundert Zyklen von Eisenbindung, Transport und Freisetzung durchläuft, bevor es abgebaut wird (Katz 1961).

Die Aufnahme von transferringebundenem Eisen wird durch den TfR ermöglicht. TfR sind Homodimere, die aus zwei identischen Untereinheiten mit einer molekularen Masse von ca. 90 kDa bestehen (Schneider *et al.* 1984; McClelland *et al.* 1984). Eine

Untereinheit besteht aus 760 Aminosäuren mit einer kurzen aminoterminalen Domäne (Aminosäuren 1 bis 67), einer hydrophoben transmembranen Region (Aminosäuren 68 bis 88) und einer großen extrazellulären Domäne (Aminosäuren 89 bis 760), in der die Bindungsstelle für Transferrin lokalisiert ist (Schneider *et al.* 1984; McClelland *et al.* 1984; Aisen 1998). Die beiden Untereinheiten des TfR sind durch Disulfidbrücken an den Aminosäuren Cys-89 und Cys-98 beider Untereinheiten miteinander verbunden (Jing und Trowbridge 1987). Transferrin im Plasma ist nur zu ca. 30% mit Eisen gesättigt. Somit enthält die überwiegende Menge des Transferrins im Plasma nur ein oder gar kein Eisenion. Um eine geregelte Eisenaufnahme über TfR zu ermöglichen, unterscheidet sich die Bindung von Apotransferrin und eisenhaltigem Transferrin am TfR. Im Kaninchen bindet Apotransferrin ($K_A: 4.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) nur mit 1/25 der Affinität von zweifach mit Eisen beladenem Transferrin ($K_A: 1.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$), während das einfach beladene Transferrin ($K_A: 2.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) 6-7mal schwächer bindet als zweifach beladenes Transferrin (Young *et al.* 1984).

Die Aufnahme von eisenhaltigem Transferrin erfolgt durch TfR-vermittelte Endocytose (Abb. 2). Dabei bindet eisenhaltiges Transferrin an seinen Rezeptor und wird in clathrinbedeckten Vesikeln in die Zelle aufgenommen. Nach Entfernung der Clathrinhülle entstehen Vesikel, die mit der Membran von Endosomen verschmelzen. Innerhalb der Endosomen wird mit Hilfe einer ATP-abhängigen Protonenpumpe ein konstanter pH-Wert von 5 bis 6 gehalten. Bei diesem niedrigen pH-Wert wird die Bindung von Eisen an Transferrin gelöst (Cheng *et al.* 2004). Das freigesetzte Eisen wird von einer bisher nicht charakterisierten Ferrireductase reduziert und vom divalenten Metallionentransporter 1 (DMT1) durch die endosomale Membran hindurch ins Cytosol transportiert (Fleming *et al.* 1998; Andrews 1999). Der Transferrin-TfR-Komplex wird zur Plasmamembran zurückgebracht (Abb. 3). Bei einem pH-Wert von 7.4 in der extrazellulären Umgebung dissoziiert Apotransferrin von seinem Rezeptor (Abb. 3) und steht für weitere Aufnahmezyklen zur Verfügung (Cheng *et al.* 2004; Pantopoulos 2004).

Neben der beschriebenen Eisenaufnahme durch TfR gibt es noch weitere transferrinabhängige Mechanismen der Eisenaufnahme. Hepatocyten, erythroide Zellen und Zellen des Analsinus exprimieren einen weiteren Transferrinrezeptor (TfR2), und Nierenzellen nehmen Transferrin durch die megalinabhängige,

cubilinvermittelte Endocytose auf (Hentze *et al.* 2004). Für Hepatocyten wurde auch eine TfR-unabhängige Eisenaufnahme eisenhaltigen Transferrins nachgewiesen (Trinder *et al.* 1988; Trinder *et al.* 1996). In Melanomzellen konnte eine Eisenaufnahme über membrangebundenes Melanotransferrin gezeigt werden (Richardson und Baker 1994). Die physiologische Relevanz dieser Prozesse für die Eisenhomöostase von Zellen wurde jedoch noch nicht beschrieben.

2.2.2.2 Weitere Eisenaufnahmemechanismen

Zusätzlich zur Aufnahme von Protein-Eisen-Komplexen können Zellen auch Eisen aufnehmen, das nicht proteingebunden ist (Abb. 2). So nehmen Darmepithelzellen Eisen neben anderen Mechanismen auch über DMT1 aus dem Darmlumen auf (Gunshin *et al.* 1997; Tallkvist *et al.* 2003). DMT1 ist ein Protonensymporter mit breiter Spezifität, der neben Fe^{2+} auch Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} und Pb^{2+} transportiert (Gunshin *et al.* 1997). Da nur divalente Metallionen Substrate von DMT1 sind, muss das in der Nahrung hauptsächlich vorkommende Fe^{3+} reduziert werden, bevor es durch DMT1 aufgenommen werden kann. Dies übernimmt im Darm die Reductase Dcytb (duodenales Cytochrom b; McKie *et al.* 2001). Zudem können auch Cystein und Glutathion bei der Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} eine Rolle spielen und damit die Eisenaufnahme im Darm beeinflussen (van Campen 1972; Simpson *et al.* 1998).

Im Serum können, besonders bei Erkrankungen, die mit einer Störung des Eisenstoffwechsels verbunden sind, große Mengen an Eisen nachgewiesen werden, das nicht an Transferrin gebunden sind. Dabei kommt es häufig zur Bildung von Eisen-Citrat-Komplexen (Grootveld *et al.* 1989). Der Transport von nicht proteingebundenem Eisen wurde mit Eisencitrat, Eisenammoniumcitrat (FAC) oder Eisen(III)-Nitrilotriacetat untersucht (Graham *et al.* 1998; Gutierrez *et al.* 1998; Scheiber-Mojdehkar *et al.* 1999). Die Eisenaufnahme von Eisen-Citrat-Komplexen wurde in Hepatocyten nachgewiesen (Graham *et al.* 1998; Scheiber-Mojdehkar *et al.* 1999) und konnte durch eisenhaltiges Transferrin und noch intensiver durch Apotransferrin inhibiert werden (Graham *et al.* 1998). Zudem gibt es bei intestinalen und erythroiden Zellen einen Transportweg für die Eisenaufnahme, bei dem Integrine und Mobilferrin beteiligt sind (Conrad und Umbreit 2000). Die physiologische Relevanz dieser Mechanismen ist aber noch ungeklärt.

Bakterien und Pilze besitzen eine Vielzahl von Eisenaufnahmemechanismen. Sie können transferrin- oder lactoferrin gebundenes Eisen aufnehmen, aber auch Eisenkomplexe wie Eisencitrat oder Häm (Crichton 2001). Eine Besonderheit bei Mikroorganismen stellt die Eisenaufnahme über Siderophore dar (Neilands 1993; Kosman 2003). Siderophore sind eisenbindende Substanzen, die von Bakterien und Pilzen produziert und freigesetzt werden. Sie binden extrazellulär mit hoher Affinität Fe^{3+} , das anschließend von den Zellen aufgenommen werden kann (Neilands 1993; Kosman 2003). Synthetische Siderophore wie DFX, ein Derivat des natürlichen Siderophores Ferrioxamin, werden bei Erkrankungen eingesetzt, die mit einem erhöhten Eisenspiegel verbunden sind (Crichton 2001).

2.2.3 Eisenspeicherung

Wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben ist Eisen nicht nur notwendig für viele zelluläre Funktionen. Es kann auch toxisch wirken, weil es die Produktion von hochreaktiven Hydroxylradikalen verursachen kann. Deshalb besitzen Zellen Speicherformen, die Eisen in redoxinaktiver Form lagern und für zelluläre Funktionen zur Verfügung stellen können. Ferritin, das wichtigste Protein zur Eisenspeicherung, wurde erstmals vom Physiologen Vilem Laufberger aus der Pferdemiß gereinigt und als Depot für Eisen vorgeschlagen (Laufberger 1937). Ferritin oder ferritinähnliche Proteine konnten mit Ausnahme weniger Archaeobakterien in allen untersuchten Organismen nachgewiesen werden (Harrison *et al.* 1998).

Ferritin ist ein oligomeres Protein, das aus 24 Untereinheiten besteht. Diese bilden eine Proteinhülle mit einem externen Durchmesser von 11 bis 13 nm und einer molekularen Masse von ca. 500 kDa. In dieser Proteinhülle können bis zu 4500 Eisenatome (Fischbach und Anderegg 1965) in einer wasserlöslichen, nicht toxischen und für die Zelle zugänglichen Form als Eisen(III)hydroxyphosphat-Micellen gespeichert werden (Chasteen und Harrison 1999; Crichton 2001). Es gibt zwei verschiedene Formen von Ferritin-Untereinheiten, L-Ferritin und H-Ferritin, die molekulare Massen von 20 kDa bzw. 22 kDa aufweisen. Während die Aminosäuresequenzen von H- und L-Ferritin des Menschen nur zu 54% identisch sind, stimmen die Aminosäuresequenzen von H-Ferritin bei Mensch und Ratte bzw. von L-Ferritin bei Mensch und Pferd zu 90% bzw. 85% überein (Crichton 2001). H-Ferritin besitzt Ferroxidaseaktivität, die mit der schnellen Eisenaufnahme in und

Eisenabgabe aus Ferritinpartikel in Zusammenhang gebracht wird (Bauminger *et al.* 1993; Treffry *et al.* 1995; Torti und Torti 2002). Zusätzlich gibt es mitochondriales Ferritin, welches nur aus H-Untereinheiten besteht und ebenfalls Eisen speichern kann (Corsi *et al.* 2002; Torti und Torti 2002). Homopolymere aus L-Ferritin, die kein Eisen speichern können, wurden nur unter pathologischen Bedingungen wie dem sehr seltenen Hyperferritin-Katarakt-Syndrom gefunden (Levi *et al.* 1998).

Eine andere Speicherform für Eisen ist Hämosiderin. Hämosiderin wurde erstmals 1867 von Perls entdeckt (Perls 1867). Histologisch handelt es sich dabei um eisenreiche Körnchen in Geweben, die sich in der so genannten „Berliner Blau-Reaktion“ mit Kaliumhexacyanoferrat(II) anfärben lassen. Hämosiderin wurde erstmals 1929 von Cook isoliert (Cook 1929). Es ist unlöslich, im Lichtmikroskop als goldgelbe, intrazelluläre Körnchen sichtbar und in membranähnlichen Strukturen, den so genannten Siderosomen, eingelagert, die anscheinend von Lysosomen abstammen (Richter 1978). Hämosiderin enthält Ferritin oder seine Abbauprodukte (Shoden *et al.*, 1953; Richter 1978). Man vermutet, dass Hämosiderin aus der intralysosomalen Aggregation und Degradation von Ferritin entsteht (Richter 1978). Ob Hämosiderin tatsächlich eine Funktion als Speicherform für Eisen hat oder nur ein Nebenprodukt der Aggregation und des Abbaus von Ferritin ist, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden.

2.2.4 Eisenexport

Bei höheren Organismen wie Säugetieren gibt es keine spezifischen Mechanismen zur Sekretion von Eisen aus dem Körper. Vielmehr muss ein Verlust von Eisen, etwa durch Blutungen oder Verlust abgestorbener Epithelzellen, ausgeglichen werden, indem Eisen mit der Nahrung zugeführt wird (Pantopoulos 2004). Auf zellulärer Ebene ist ein Export von Eisen jedoch erforderlich, um die Versorgung aller Zellen mit Eisen zu gewährleisten. Das bisher einzige in Säugerzellen bekannte Eisenexportprotein ist Ferroportin (Abboud und Haile 2000; Donovan *et al.* 2000; McKie *et al.* 2000). Dieses Protein hat eine molekulare Masse von ca. 62 kDa und besitzt mindestens zehn Transmembran-Domänen (Abboud und Haile 2000). Ferroportin konnte auf der basolateralen Membran von Enterocyten und auf der Membran von Macrophagen der Leber und der Niere nachgewiesen werden (Abboud und Haile 2000; Le und Richardson 2002). Im Gehirn wird Ferroportin von

Endothelzellen, Neuronen, Astrocyten, Oligodendrocyten und Ependymzellen exprimiert (Wu *et al.* 2004). Der Export von Eisen mittels Ferroportin ist an eine extrazelluläre Ferroxidaseaktivität gekoppelt (Abb. 2). Deshalb sind am ferroportinvermittelten Transport die Ferroxidasen Ceruloplasmin im Plasma, seine membranverankerte Form im Gehirn bzw. sein membranverankertes Homolog Hephaestin im Darmepithel beteiligt (Harris *et al.* 1999; Frazer *et al.* 2001; Jeong und David 2003). Ceruloplasmin ist eine Ferroxidase, die Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidiert (Harris 2003). Die sezernierte Form wird vorwiegend in der Leber exprimiert (Yang *et al.* 1986), während die membranverankerte Form auf der Membran von Astrocyten des zentralen Nervensystems auftritt (Jeong und David 2003). Bei kultivierten Astrogliazellen ist der Export von Eisen durch Ferroportin vom Vorhandensein von Ceruloplasmin abhängig (Jeong und David 2003).

2.2.5 Regulation des intrazellulären Eisenstoffwechsels

Die Erhaltung einer optimalen intrazellulären Eisenkonzentration ist essentiell für das Überleben von Zellen. Hierzu ist eine Regulation des Eisenstoffwechsels zwingend notwendig. Das bisher am besten untersuchte System zur Regulation des Eisenstoffwechsels ist die posttranskriptionale Kontrolle der Translation durch Interaktion so genannter *iron responsive elements* (IREs) in den mRNAs für Proteine wie Ferritin und TfR mit *iron regulatory proteins* (IRPs) (Crichton 2001; Martini *et al.* 2002; Torti und Torti 2002; Pantopoulos 2004). Die mRNAs für DMT1 und Ferroportin besitzen ebenfalls IREs (Lee *et al.* 1998; McKie *et al.* 2000), jedoch wurde ihre Funktionsfähigkeit bisher nicht nachgewiesen.

IREs sind konservierte Sequenzen von ca. 30 Nucleotiden im 3'- oder 5'-untranslatierten Bereich (UTR) der mRNAs für die oben genannten Proteine. Diese IREs bilden Haarnadelstrukturen in den mRNAs aus (Aziz und Munro 1987; Ke und Theil 2002), an die spezifisch IRPs binden können. Zwei allgemeine Prinzipien der Regulation des Eisenstoffwechsels durch IRE-IRP-Interaktion sind bekannt (Abb. 4). Die Verringerung der intrazellulären Verfügbarkeit von Eisenionen reprimiert die Translation von Ferritin durch Bindung von IRPs an dessen mRNA (Abb. 4A), so dass die Speicherkapazität für Eisen verringert wird. Gleichzeitig wird die mRNA für TfR durch Bindung von IRPs stabilisiert und verstärkt TfR synthetisiert, was die Eisenaufnahme in die Zelle steigert (Abb. 4B). Im Gegensatz dazu verhindert ein

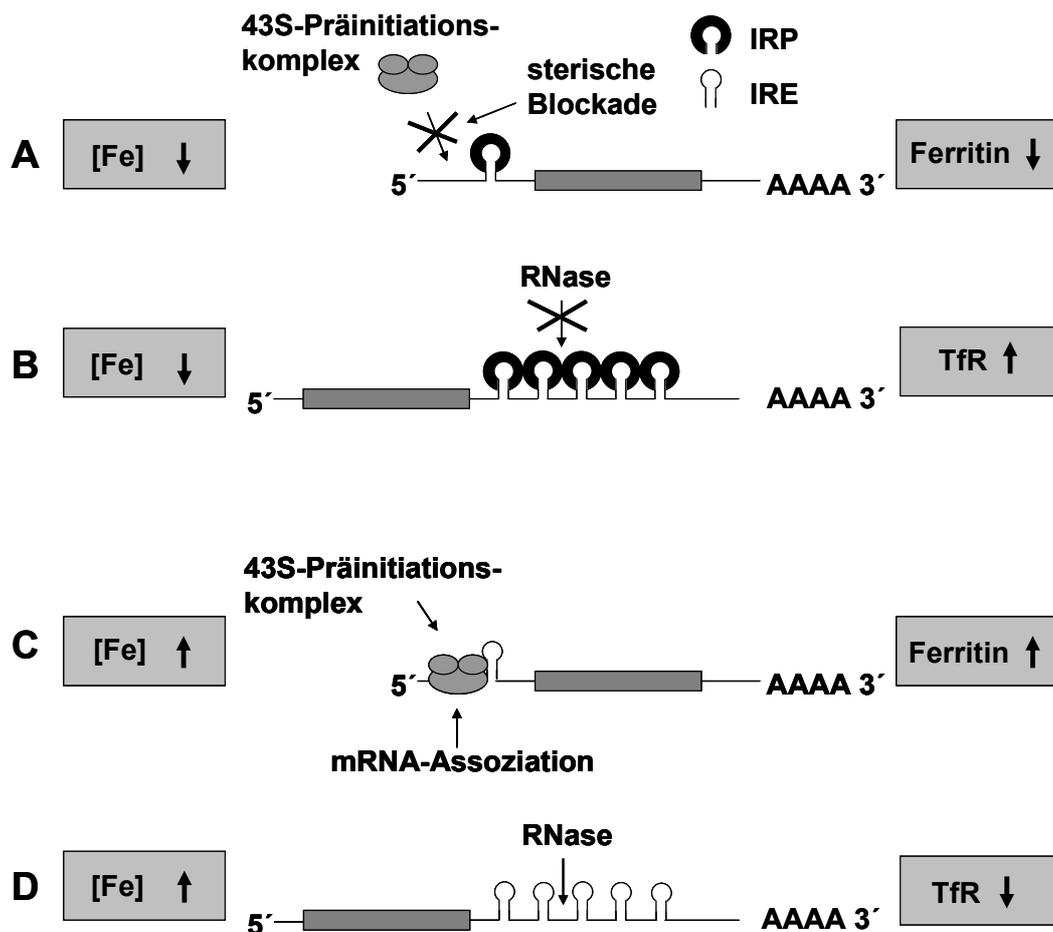


Abb. 4: Eisenabhängige posttranskriptionale Regulation der Synthese von Ferritin und TfR. Durch Interaktionen von IRPs (●) mit IREs (⌋) wird die Synthese von Ferritin und TfR eisenabhängig reguliert. Bei niedriger Eisenkonzentration binden IRP an das IRE im 5'-untranslatierten Bereich der mRNA von Ferritin (A). Dadurch kann sich der 43S-Präinitiationskomplex nicht an die mRNA anlagern und es findet keine Ferritinsynthese statt. Im Gegensatz dazu wird die Synthese von TfR über die Stabilität der mRNA reguliert. Die mRNA für den TfR ist normalerweise Ziel von RNasen und somit kurzlebig. Binden jedoch bei Eisenmangel IRPs an die IREs im 3'-untranslatierten Bereich der TfR-mRNA, wird diese stabilisiert und es wird vermehrt TfR produziert (B). Bei hoher Eisenkonzentration findet keine Interaktion von IRPs mit IREs statt. Dies führt im Falle des Ferritins zu einer gesteigerten Translation (C), weil die Bindung des 43S-Präinitiationskomplexes an die Ferritin-mRNA nicht mehr blockiert ist. Hingegen verringert sich die Stabilität der TfR-mRNA, da sie nun anfälliger für RNasen ist, was zu einer Verringerung der TfR-Synthese führt (D).

Anstieg des zellulären Eisengehalts die Bindung von IRPs an IREs und steigert somit die Translation von Ferritin (Abb. 4C). Gleichzeitig wird die mRNA für TfR destabilisiert (Abb. 4D) (Eisenstein 2000; Hentze *et al.* 2004; Pantopoulos 2004).

Es gibt zwei eng verwandte IRPs, IRP1 und IRP2, die auf unterschiedliche Weise als Eisensensoren agieren. IRP1 ist ein monomeres cytoplasmatisches Protein mit einer molekularen Masse von 98 kDa (Rouault *et al.* 1988). Es tritt als Apoform oder als Holoform auf. Letztere enthält einen 4Fe-4S-Komplex und ist enzymatisch aktiv als cytosolische Aconitase (Hirling *et al.* 1994; Eisenstein 2000). Die Apoform, die keinen 4Fe-4S-Komplex besitzt, kann an IREs binden, wozu die Holoform nicht imstande ist (Rouault *et al.* 1988). Die Bindung des IRP1 an ein IRE wird also durch das Vorhandensein des 4Fe-4S-Komplexes reguliert. Bei geringer intrazellulärer Eisenverfügbarkeit verliert die Holoform ihren 4Fe-4S-Komplex und bindet dann als Apoform an IREs (Hirling *et al.* 1994, Eisenstein 2000). Im Unterschied zum IRP1, das in nahezu allen Geweben vorkommt (Mullner *et al.* 1992; Henderson *et al.* 1993), wurde das IRP2 hauptsächlich im Darm und im Gehirn nachgewiesen (Henderson *et al.* 1993; Samaniego *et al.* 1994). Das menschliche IRP2 hat eine molekulare Masse von 105 kDa und ist in seiner Aminosäuresequenz zu 57% identisch mit IRP1 (Samaniego *et al.* 1994). IRP2 besitzt im Unterschied zu IRP1 keinen 4Fe-4S-Komplex und keine Aconitaseaktivität (Guo *et al.* 1994). Hingegen enthält IRP2 eine zusätzliche Insertion von 73 Aminosäuren, die vermutlich bei hohen Eisenkonzentrationen eisenvermittelt oxidiert wird (Iwai *et al.* 1995), was dann zum proteasomalen Abbau von IRP2 führt (Guo *et al.* 1995). Neben der Beladung von IRP1 mit Eisen oder dem Oxidationszustand von IRP2 können auch Substanzen wie NO oder H₂O₂ (Pantopoulos *et al.* 1996) aber auch hypoxische Bedingungen (Hanson *et al.* 1999) die IRE-IRP-Interaktion beeinflussen.

2.3 Eisenstoffwechsel des Gehirns

2.3.1 Eisenaufnahme ins Gehirn

Die hohe metabolische Aktivität im Gehirn, die Produktion von Neurotransmittern und die Bildung des Myelins sind Prozesse im Gehirn, die auf Grund verschiedener enzymatischer Reaktionen Eisen erfordern. Deshalb gibt es Mechanismen, die den Transport von Eisen durch die Blut-Hirn-Schranke ermöglichen. Von der Leber wird transferringebundenes Eisen ins Blut abgegeben (Idzerda *et al.* 1986) und kann somit im gesamten Körper verteilt werden. Um die Gehirnzellen zu erreichen, muss Eisen in die Kapillarendothelzellen, welche die Blut-Hirn-Schranke bilden, gelangen

und aus diesen Zellen auf der abluminalen Seite wieder freigesetzt werden. Bisher sind die Mechanismen der Eisenaufnahme in und der Transcytose durch die Kapillarendothelzellen nicht vollständig geklärt. An der Eisenaufnahme von Kapillarendothelzellen sind vermutlich Transferrine beteiligt, da diese Zellen die höchste Dichte an TfR im Gehirn aufweisen (Jefferies *et al.* 1984; Pardridge *et al.* 1987; Moos 1996) und eisenbeladenes Transferrin die Blut-Hirn-Schranke passieren kann (Banks *et al.* 1988; Skarlatos *et al.* 1995; Deane *et al.* 2004). Neben TfR wurde auf Endothelzellen auch Melanotransferrin nachgewiesen (Rothenberger *et al.* 1996), das ebenfalls die Blut-Hirn-Schranke passieren kann (Demeule *et al.* 2002). Diskutiert wird auch eine rezeptorvermittelte Endocytose von Lactoferrin durch Kapillarendothelzellen (Fillebeen *et al.* 1999). Die Expression von Ferroportin in Kapillarendothelzellen deutet direkt auf eine Funktion von Ferroportin bei der Eisenaufnahme aus der Peripherie in das Gehirn hin (Wu *et al.* 2004). Man vermutet, dass Endothelzellen aufgenommenes Eisen an perivaskuläre Astrocyten abgeben, die mit ihren Endfüßen die Blutkapillaren berühren. Dabei spielt vermutlich endotheliales Ferroportin eine Rolle, ebenso wie DMT1, das in Endfüßen von Astrocyten vorkommt (Wang *et al.* 2001). Somit könnten verschiedene Mechanismen am Transfer von Eisen aus der Peripherie ins Gehirn beteiligt sein.

Über mögliche Freisetzungsmechanismen von Eisen aus dem Gehirn über die Blut-Hirn-Schranke ist wenig bekannt. Bisher wurde die Freisetzung von Apotransferrin und in geringem Maß von Holotransferrin aus dem Gehirn beschrieben (Zhang und Pardridge 2001). Die Blut-Hirn-Schranke verhindert den Transport von überschüssigem Eisen aus der Peripherie ins Gehirn (Moos und Morgan 2000; Deane *et al.* 2004). Störungen des Eisenstoffwechsels haben also auf das Gehirn eine andere Auswirkung als auf die Peripherie. So findet man bei β 2-Microglobulin-defizienten Mäusen trotz erhöhter Eisenkonzentration in der Leber kaum eine Veränderung des Eisengehaltes im Gehirn (Moos *et al.* 2000). Diese Mäuse werden als Tiermodell der Hämochromatose genutzt, einer autosomal-rezessiven Erbkrankheit, die mit einer erhöhten Eisenaufnahme im Darm verbunden ist (Robson *et al.* 2004). Im Gegensatz dazu wurde bei Aceruloplasminämie ein erhöhter Eisengehalt im Gehirn gefunden, während die Konzentration im Serum verringert ist (Miyajima 2003; Xu *et al.* 2004). Diese vererbte Erkrankung des Eisenstoffwechsels wird durch das Fehlen von Ceruloplasmin ausgelöst.

2.3.2 Eisenstoffwechsel neuraler Zellen

Das Vorkommen von Eisen und Proteinen des Eisenstoffwechsels in neuralen Zellen wurde in einer Vielzahl von Studien an Gehirnschnitten und an Kulturen neuraler Zellen untersucht. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Literaturdaten zu diesem Thema.

2.3.2.1 Vorkommen von Eisen und Proteinen des Eisenstoffwechsels

Oligodendrocyten sind die Zellen des Gehirns, denen der prominenteste Eisenstoffwechsel zugeschrieben wird. Im adulten Gehirn besitzen diese Zellen die höchsten Eisengehalte und die größte Menge an Ferritin und Transferrin (Bloch *et al.* 1985; Benkovic und Connor 1993; Connor *et al.* 1994, 1995). Während der Gehirnentwicklung wird Eisen zunächst in amöboiden Microglia der subcortikalen weißen Substanz akkumuliert, welche es dann vermutlich an Oligodendrocyten weitergeben (Connor *et al.* 1995). Bis zu einem Alter von ca. zwei Wochen sind in Gehirnschnitten von Ratten fast ausschließlich diese amöboiden Microglia eisen- und ferritinpositiv (Connor *et al.* 1995; Cheepsunthorn *et al.* 1998). Anschließend verschiebt sich das Verhältnis und es kommt zu einem Anstieg der Zahl eisen- und ferritinpositiver Oligodendrocyten (Connor *et al.* 1995; Cheepsunthorn *et al.* 1998). Die Eisenakkummulation in Oligodendrocyten könnte unmittelbar mit der Myelinbildung zusammenhängen (Connor und Menzies 1996). Darauf deuten Ergebnisse aus Untersuchungen an myelindefizienten Ratten hin. Bei diesen Ratten sind Oligodendrocyten nicht in der Lage zu differenzieren (Connor *et al.* 1987). Obwohl die Eisenaufnahme ins Gehirn dieser Ratten normal ist (Gocht *et al.* 1993), akkumuliert Eisen in Astrocyten und Microglia der weißen Substanz statt in Oligodendrocyten (Connor und Menzies 1990). Im adulten Gehirn sind nur wenige ruhende Microglia eisenpositiv. Neben den amöboiden eisenpositiven Microglia, die bei der Entwicklung des Gehirns auftreten, findet man amöboide eisenpositive Microglia in der weißen Substanz von AIDS-Patienten, in MS-Plaques und in der Umgebung neuritischer Plaques bei der Alzheimer-Erkrankung (Jefferies *et al.* 1996; LeVine 1997).

Tabelle 1: Vorkommen von Eisen und Proteinen des Eisenstoffwechsels in neuronalen Zellen

	Astrocyten		Microglia		Oligodendrocyten		Neuronen	
	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
Eisen	+ (33)	+/- (1,4,12, 24)	+ (33)	+ (1,6)	+ (33)	+ (6,9)	+ (33)	+/- (1,5,12,24)
Ferritin	+ (13, 29)	+/- (1,3,4, 8,24)	+ (33)	+ (1,3,4, 24)	+ (28,33)	+ (1,3,4, 24)	+ (33)	+/- (1,3,4,24)
TfR	+ (13)	+/- (7,23)	+ (33)	+/- (17,23)	+ (33)	+/- (7,20,23)	+ (25,33)	+ (7,16,23)
Tf	+ (11)	+/- (4,24)	?	- (24)	+ (10,11)	+ (1,4,5,24)	?	+ (4,9,24)
IRP1	?	?	?	?	+ (19)	+ (19)	?	+ (19)
IRP2	?	?	?	?	?	?	?	+ (19,30)
DMT1	+ (15,21)	+ (2,31)	?	+ (24)	?	+ (24)	?	+ (2,31)
CP	- (26)	+ (14,18,22)	?	- (22)	?	- (22)	?	+ (14,22)
GPI-CP	+ (14,27)	+ (14,18,22)	?	- (22)	?	- (22)	?	+ (14,22)
Fpn1	+ (15)	+ (32)	?	+ (32)	?	+ (32)	?	+ (32)

(1) Benkovic und Connor 1993; (2) Burdo *et al.* 2001; (3) Cheepshunthorn *et al.* 1998; (4) Connor *et al.* 1990; (5) Connor und Menzies 1990; (6) Connor *et al.* 1995; (7) Connor und Menzies 1995; (8) Dickinson und Connor 1995; (9) Dwork *et al.* 1988; (10) Espinosa de los Monteros *et al.* 1988; (11) Espinosa de los Monteros *et al.* 1990; (12) Han *et al.* 2002; (13) Hoepken *et al.* 2004; (14) Hwang *et al.* 2004; (15) Jeong und David 2003; (16) Jefferies *et al.* 1984; (17) Kaur und Ling 1995; (18) Klomp *et al.* 1996; (19) Leibold *et al.* 2001; (20) Lin und Connor 1989; (21) Lis *et al.* 2004; (22) Mollgard *et al.* 1988; (23) Moos 1996; (24) Moos *et al.* 2000; (25) Oh *et al.* 1986 (26) Patel und David 1997; (27) Patel *et al.* 2000; (28) Qi und Dawson (1994); (29) Regan *et al.* 2002; (30) Siddappa *et al.* 2003; (31) Wang *et al.* 2001; (32) Wu *et al.* 2004; (33) eigene Ergebnisse. + = Vorkommen nachgewiesen, - = Vorkommen nicht nachgewiesen, +/- = keine eindeutige Aussage möglich, ? = nicht beschrieben.

Im Unterschied zu Oligodendrocyten und Microglia, gibt es für das Vorkommen von Eisen in Astrocyten und Neuronen speziesabhängige Unterschiede. In menschlichen Gehirnschnitten (Connor *et al.* 1990) wurden im Unterschied zu Gehirnschnitten aus Mäusen (Moos *et al.* 2000) eisenpositive Astrocyten gefunden. Eisenpositive Neuronen wurden in Gehirnschnitten von Ratten (Benkovic und Connor 1993; Han *et al.* 2002) und Menschen (Connor *et al.* 1990) aber nicht in Gehirnen von Mäusen (Moos *et al.* 2000) nachgewiesen.

Die Verteilung des Eisenspeicherproteins Ferritin stimmt überwiegend mit der Verteilung von Eisen im Gehirn überein. Wie Eisen kommt Ferritin im Verlauf der Gehirnentwicklung zunächst überwiegend in Microglia vor, bevor ferritinpositive Oligodendrocyten auftreten (Cheepsunthorn *et al.* 1998). Während Oligodendrocyten und Microglia beide Isoformen von Ferritin besitzen, überwiegt bei Neuronen das H-Ferritin (Cheepsunthorn *et al.* 1998; Han *et al.* 2002). Dabei findet man H-Ferritin vor allem im Zellkern (Cheepsunthorn *et al.* 1998). Man vermutet, dass dieses nukleäre Ferritin dem Schutz der DNA dient, da H-Ferritin an DNA binden und diese vor der Toxizität von Eisen schützen kann (Thompson *et al.* 2002). Das Eisentransportprotein Transferrin tritt im Gehirn ebenfalls überwiegend in Oligodendrocyten auf. Reife Oligodendrocyten besitzen den größten Teil der Transferrin-mRNA und des Transferrins des Gehirns (Bloch *et al.* 1985; Connor *et al.* 1987). In geringen Mengen wurde Transferrin auch in Neuronen (Dwork *et al.* 1988) und Astrocyten (Connor *et al.* 1990) nachgewiesen.

TfR wurde bei adulten Ratten und Mäusen überwiegend auf Kapillarendothelzellen und Neuronen nachgewiesen (Jefferies *et al.* 1984; Moos 1996), aber auch Oligodendrocyten und Microglia enthalten TfR in den ersten Tagen der postnatalen Entwicklung (Lin und Connor 1989; Kaur und Ling 1995). Im Gehirn adulter Mäuse konnte TfR in Oligodendrocyten, Microglia und Astrocyten nicht nachgewiesen werden (Moos 1996). Zur Expression von IRPs im Gehirn gibt es bisher nur wenige Studien. IRP1 wurde immunhistochemisch in Neuronen und Oligodendrocyten nachgewiesen (Leibold *et al.* 2001). IRP2 wurde bisher nur in Neuronen gefunden (Leibold *et al.* 2001; Siddappa *et al.* 2003). DMT1 wurde hauptsächlich in Astrocyten und Neuronen aber auch in Microglia und Oligodendrocyten nachgewiesen (Moos *et al.* 2000; Wang *et al.* 2001; Burdo *et al.* 2001). Ferroportin kommt in Astrocyten,

Microglia, Oligodendrocyten und Neuronen vor (Wu *et al.* 2004) und Ceruloplasmin tritt im Gehirn in Astrocyten und Neuronen auf (Mollgard *et al.* 1988; Klomp *et al.* 1996; Hwang *et al.* 2004).

Wenige Untersuchungen beschreiben das Vorkommen der genannten Proteine des Eisenstoffwechsels in Zellkulturen neuraler Zellen (Tabelle 1). Ferritin und Transferrin wurden bisher in Astrogliazellen (Regan *et al.* 2002; Espinosa de los Monteros *et al.* 1990) und Oligodendrogliazellen (Qi und Dawson 1994; Espinosa de los Monteros *et al.* 1990) nachgewiesen. TfR wurde in kultivierten Neuronen und Astrogliazellen nachgewiesen (Oh *et al.* 1986; Qian *et al.* 2000). DMT1, Ferroportin sowie eine GPI-verankerte Form von Ceruloplasmin (GPI-CP) kommen in Astrogliazellen vor (Patel und David 1997; Patel *et al.* 2000; Jeong und David 2003). Dies deutet auf eine Beteiligung dieser Proteine am Eisenstoffwechsel von Astrogliazellen hin (Jeong und David 2003; Lis *et al.* 2004).

2.3.2.2 Eisenstoffwechsel neuraler Zellkulturen

Über den Eisenstoffwechsel kultivierter neuraler Zellen ist sehr wenig bekannt. Die meisten Untersuchungen wurden an Astrogliazellen und Oligodendrogliazellen durchgeführt. In Kultur nehmen Astrogliazellen sowohl transferringebundenes als auch nicht proteingebundenes Eisen auf (Qian *et al.* 2000; Hoepken *et al.* 2004; Riemer *et al.* 2004). Eisen kann von kultivierten Astrogliazellen auch freigesetzt werden. Daran sind wahrscheinlich Ferroportin und GPI-CP beteiligt (Jeong und David 2003). Die Kolokalisation von GPI-CP mit dem Eisenexportprotein Ferroportin in der Membran von Astrogliazellen (Jeong und David 2003) lässt vermuten, dass Fe^{2+} durch Ferroportin exportiert und anschließend von GPI-CP oxidiert wird. Diese Hypothese wird durch Befunde zu Eisengehalten von Gehirnzellen bei Aceruloplasminämie unterstützt, da diese Erkrankung zu einer Akkumulation von Eisen in Astrocyten führt (Miyajima 2003).

Einen besonderen Mechanismus der Eisenaufnahme von Oligodendrogliazellen scheint die Aufnahme von ferritingspeichertem Eisen darzustellen. Oligodendrocyten besitzen Bindungsstellen für Ferritin auf ihrer Plasmamembran und kultivierte Oligodendroglia-Vorläuferzellen können Ferritin über einen endocytotischen Mechanismus aufnehmen (Hulet *et al.* 1999, 2000). Die Aufnahme

von ferritingspeichertem Eisen würde es Oligodendrocyten ermöglichen, eine hohe intrazelluläre Eisenkonzentration aufrecht zu erhalten ohne sich einer hohen Eisentoxizität auszusetzen. Ob *in vivo* eine solche Aufnahme tatsächlich erfolgt, ist nicht erwiesen.

2.3.3 Eisen und neurodegenerative Erkrankungen

Wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben, kann Eisen in redoxaktiver Form bei der Reaktion mit H_2O_2 die Bildung reaktiver Hydroxylradikale verursachen. Dies stellt insbesondere für das Gehirn eine potentielle Gefahr dar, weil 1. in bestimmten Gehirnarealen wie *substantia nigra*, *putamen* oder *globus pallidus* hohe Eisengehalte auftreten (Hill und Switzer 1984; Riederer *et al.* 1992; Benkovic und Connor 1993), 2. die Zellen des Gehirns eine hohe oxidative Stoffwechselaktivität aufweisen (Clarke und Sokoloff 1999), 3. im Vergleich zu anderen Geweben im Gehirn nur geringe bis moderate spezifische Aktivitäten der Superoxiddismutasen, Catalase und GPx gefunden wurden (Cooper und Kristal 1997; Ho *et al.* 1997) und 4. weil das Gehirn reich an mehrfach ungesättigten Fettsäureketten ist, die leicht zu Lipidperoxiden oxidiert werden können (Porter 1984; Halliwell 1992).

Bei einer Vielzahl neurologischer und neurodegenerativer Erkrankungen wurden Störungen des Eisenstoffwechsels mit verstärkter Eisenakkumulation in bestimmten Gehirnarealen gefunden (Connor *et al.* 2001; Burdo und Connor 2003; Bartzokis *et al.* 2004). Dazu gehören das idiopathische Parkinsonsyndrom (IPS) (Jellinger 1999; Gotz *et al.* 2004; Kaur und Andersen 2004), die Alzheimersche Erkrankung (AD) (Perry *et al.* 2002; Huang *et al.* 2004; Todorich und Connor 2004), MS (LeVine und Chakrabarty 2004), die Friedreich-Ataxie (Puccio und Koenig 2002) und das Hallervorden-Spatz-Syndrom (Koeppen und Dickson 2001; Ponka 2004). Ob Störungen des Eisenstoffwechsels ursächlich für die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen sind, ist unklar. Störungen des Eisenstoffwechsels im Gehirn werden aber als gemeinsame Komponente bei der Progression vieler neurodegenerativer Erkrankungen angesehen (Qian und Shen 2001; Rouault 2001; Thompson *et al.* 2001; Huang *et al.* 2004). Im Folgenden sollen Befunde zu einem veränderten Eisenstoffwechsel bei IPS und AD genauer beschrieben werden.

Das IPS ist durch progressive Degeneration dopaminergener Neuronen in der *pars compacta* der *substantia nigra* charakterisiert. Die Etiologie der Krankheit ist unbekannt, jedoch ergab die biochemische Analyse von *post mortem*-Gewebe starke Hinweise auf oxidativen Stress in der *substantia nigra* während der Progression der Erkrankung (Bains und Shaw 1997; Schulz *et al.* 2000; Kaur und Andersen 2004). Eine mögliche Ursache für oxidativen Stress könnte die durch Eisen vermittelte Bildung von Hydroxylradikalen sein. Viele Untersuchungen haben eine erhöhte Eisenkonzentration in der *substantia nigra* von IPS-Patienten ergeben (Dexter *et al.* 1987; Dexter *et al.* 1989; Riederer *et al.* 1992; Griffiths *et al.* 1999). Dabei treten erhöhte Eisengehalte in Astrocyten, Oligodendrocyten und Microglia auf, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu Neuronen liegen (Jellinger *et al.* 1990; Dexter *et al.* 1991). Zudem konnten erhöhte Eisengehalte in neuromelaninhaltigen dopaminergen Neuronen festgestellt werden (Ben Shachar *et al.* 1992; Youdim und Riederer 1993). Trotz der Eisenakkumulation in der *substantia nigra* ist das Vorkommen des Eisenspeicherproteins Ferritin in dieser Hirnregion unverändert (Dexter *et al.* 1991). Zusätzlich zum erhöhten Eisengehalt findet man beim IPS eine Störung des Glutathionstoffwechsels. In der *substantia nigra* von IPS-Patienten ist der Gehalt an GSH im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen um 40 bis 50% verringert (Riederer *et al.* 1989; Sofic *et al.* 1992; Pearce *et al.* 1997). Der verringerte GSH-Gehalt könnte zu einer verringerten Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies (RSS) und in Kombination mit dem erhöhten Eisengehalt zur verstärkten Bildung toxischer Hydroxylradikale führen.

AD gehört zu den häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen. Sie ist mit einem fortschreitenden und irreversiblen Verlust des kognitiven Leistungsvermögens verbunden, wohingegen motorische und sensorische Funktionen normalerweise nicht betroffen sind (Huang *et al.* 2004). Neuropathologisch ist AD gekennzeichnet durch das Vorkommen extrazellulärer unlöslicher Plaques, deren Hauptkomponente das β -Amyloid ist, und durch das Vorkommen intrazellulärer neurofibrillärer Bündel, die aus dem mikrotubuliassoziierten Protein Tau bestehen (Masters *et al.* 1985; Grundke-Iqbal *et al.* 1986). Bei AD wurden Eisenakkumulationen in neurofibrillären Bündeln und Plaques des *Hippocampus* und des cerebralen Cortex nachgewiesen (Good *et al.* 1992; Connor *et al.* 1992b; LeVine 1997). Neben den Eisenakkumulationen treten auch veränderte Verteilungsmuster verschiedener

Proteine des Eisenstoffwechsels auf, die auf Störungen des Eisenstoffwechsels hinweisen. So wurden Transferrin und Ferritin in Assoziation mit Plaques nachgewiesen (Connor *et al.* 1992a). Intrazelluläres Transferrin wurde vor allem in Astrocyten statt in Oligodendrocyten gefunden (Connor *et al.* 1992a). Ferritin wurde hauptsächlich in Microglia nachgewiesen, die mit Plaques oder Blutkapillaren assoziiert waren (Connor *et al.* 1992a). Zudem wurde in Gehirnschnitten von AD-Patienten ein verändertes Verteilungsmuster für IRP2 nachgewiesen, während die Verteilung von IRP1 unverändert war (Smith *et al.* 1998).

2.4 Antioxidative Mechanismen und oxidativer Stress

In jeder Zelle entstehen während des normalen Stoffwechsels RSS. Dazu gehören unter anderem Superoxid, H_2O_2 , Alkylhydroperoxide, Singulett-Sauerstoff und Hydroxylradikale. Zur Entgiftung dieser Verbindungen sind während der Evolution verschiedene Mechanismen entwickelt worden, da eine starke Belastung von Zellen mit RSS zu oxidativem Stress führen kann. Unter oxidativem Stress versteht man eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Bildung und Entgiftung von RSS in Richtung einer erhöhten Konzentration an RSS. Dies kann auf erhöhter Bildung von RSS und/oder verminderter Entgiftung beruhen. Folge oxidativen Stresses kann die Schädigung der Zellen z.B. durch Lipidperoxidation, DNA-Strangbrüche und Proteinmodifikationen sein (Halliwell und Gutteridge 1999; Halliwell 2001). Antioxidative Mechanismen bestehen in auf der Beseitigung der RSS wie z.B. von Superoxid durch Superoxiddismutasen und von H_2O_2 durch Catalase und GPx (Abb. 5).

2.4.1 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies im Gehirn

Nach Schätzungen von Halliwell (Halliwell 1992) werden bis zu 5% der in die Atmungskette eingeschleusten Elektronen einzeln auf Sauerstoff übertragen und generieren somit Superoxid. Bei einem Anteil des Gehirns von 20% am Sauerstoffumsatz (Clarke und Sokoloff 1999) wird somit bis zu 1% des vom Körper verbrauchten Sauerstoffs im Gehirn zu Superoxid. Dies stellt hohe Ansprüche an die Fähigkeit des Gehirns zur Entgiftung von RSS.

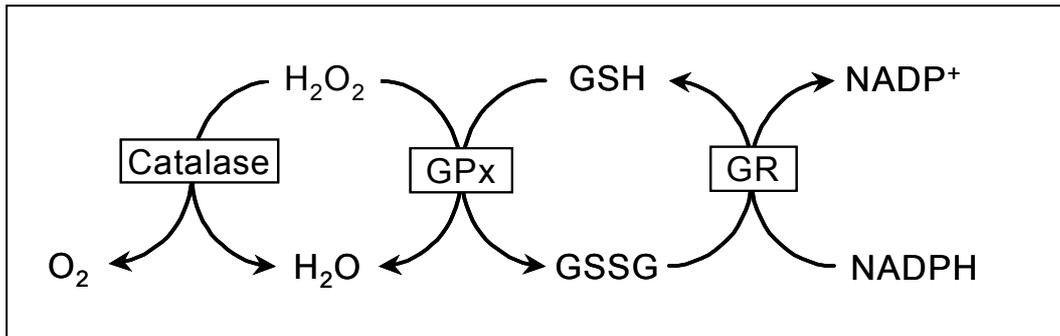


Abb. 5: Beseitigung von H₂O₂ in Zellen. H₂O₂ kann in Zellen durch Catalase oder GPx entgiftet werden. Bei der Peroxidreduktion durch GPx wird GSH zu GSSG oxidiert. Die Reduktion von GSSG erfolgt über GR in einem NADPH-abhängigen Prozess.

Eine weitere Quelle für Superoxid, die quantitativ weniger bedeutend ist, jedoch eine wichtige Rolle bei pathologischen Prozessen spielt, ist die Reaktion der NADPH-Oxidase. Sie katalysiert den Transfer eines Elektrons von NADPH auf Sauerstoff und generiert dabei Superoxid. Dieses Ectoenzym wurde zuerst für neutrophile Granulocyten beschrieben (Rossi 1986), kommt aber auch in Microgliazellen vor (Sankarapandi *et al.* 1998; Dringen 2005). Die NADPH-Oxidase wird über eine Vielzahl von Mechanismen reguliert (Vignais 2002; Bokoch und Knaus 2003). Dies ist unbedingt notwendig, da eine ungesteuerte Superoxidproduktion zu starken Zellschäden führen kann. Dies trifft vor allem für das Gehirn zu, da dort in direkter Nachbarschaft der NADPH-Oxidase exprimierenden Microglia Neuronen lokalisiert sind (Dringen 2005).

Eine weitere Quelle für RSS sind enzymatische Reaktionen, die durch Oxidasen wie Xanthinoxidase oder Monoaminoxidasen katalysiert werden (Halliwell 2001; Nicotra *et al.* 2004). Diese Enzyme verwenden Sauerstoff als Elektronenakzeptor für Oxidationsreaktionen. Dabei entsteht als weiteres Produkt H₂O₂. Zusätzlich können Catecholamine wie Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin durch Sauerstoff enzymunabhängig autooxidiert werden, wobei ebenfalls RSS entstehen (Fornstedt 1990; Hirrlinger *et al.* 2002c).

2.4.2 Antioxidative Mechanismen neuraler Zellen

2.4.2.1 Glutathionstoffwechsel

H₂O₂ kann entweder durch Catalase zu Wasser und Sauerstoff disproportioniert oder durch die Aktivität der GPx zu Wasser reduziert werden (Abb. 5). Die für die GPx-Reaktion notwendigen Elektronen werden vom Tripeptid GSH (γ -Glutamylcysteinylglycin) geliefert, das bei der Reaktion zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert wird (Abb. 5). Die selenhaltigen GPx treten in mehreren Isoformen auf (Ursini *et al.* 1995). Von den verschiedenen GPx-Isoformen ist GPx1 die am stärksten exprimierte (Ho *et al.* 1997). Untersuchungen an GPx1-defizienten (GPx1(-/-))-Mäusen lassen vermuten, dass GPx1 ein wichtiges Enzym des antioxidativen Systems von Gehirnzellen ist. So haben Versuche mit verschiedenen Stresssystemen ergeben, dass die Gehirne von GPx1(-/-)-Mäusen stärker geschädigt werden als die Gehirne von Wildtyp-Mäusen (Zhang *et al.* 2000; Crack *et al.* 2001; Flentjar *et al.* 2002).

Die Regenerierung des GSH erfolgt durch die Glutathionreduktase (GR). Sie reduziert GSSG zu GSH, wobei NADPH als Elektronendonator dient (Abb. 5). Um die Regenerierung von GSH zu gewährleisten, ist eine ständige Verfügbarkeit von NADPH notwendig. Zu den NADPH-regenerierenden Enzymen im Gehirn gehören die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, das Malat-Enzym und die NADP⁺-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase (Baquer *et al.* 1988; Bukato *et al.* 1995; Minich *et al.* 2003; Dringen *et al.* 2004).

Die Biosynthese des Glutathions erfolgt durch zwei enzymkatalysierte Reaktionen (Meister, 1974). Die γ -Glutamylcysteinsynthetase bildet aus Glutamat und Cystein das Dipeptid γ -Glutamylcystein. Dieses Dipeptid dient als Substrat der Glutathionsynthetase und wird in deren Reaktion mit Glycin zu Glutathion umgesetzt. Jedes der Enzyme verbraucht pro Reaktion ein Molekül ATP. Die Glutathionsynthese wird mittels Rückkopplungshemmung der γ -Glutamylcysteinsynthetase durch das Endprodukt GSH reguliert (Richman und Meister 1975).

Im Glutathionstoffwechsel von Gehirnzellen spielt die metabolische Interaktion zwischen Astrogliazellen und Neuronen eine wichtige Rolle (Dringen 2000; Dringen und Hirrlinger 2003). Astrogliazellen und Neuronen bevorzugen für ihre

Glutathionsynthese unterschiedliche extrazelluläre Ausgangsmoleküle (Astroglia: Cystin und Glutamat; Neuronen: Cystein und Glutamin), und konkurrieren daher nicht um die extrazellulären Synthesestufen (Kranich *et al.* 1996). Neuronen sind für ihre GSH-Synthese auf Cystein angewiesen, da sie Cystin nicht aufnehmen können (Sagara *et al.* 1993a,b; Kranich *et al.* 1996). Im Extrazellulärraum ist jedoch vor allem Cystin vorhanden, da Cystein schnell durch Sauerstoff autooxidiert wird. Astrogliazellen hingegen können Cystin als Baustein für die GSH-Synthese effizient nutzen (Kranich *et al.* 1996; Kranich *et al.* 1998). Sie setzen GSH frei, aus dem durch das astrogliale Ectoenzym γ -Glutamyltranspeptidase (Dringen *et al.* 1997) das Dipeptid Cysteinylglycin entsteht, welches von Neuronen zur GSH-Synthese verwendet werden kann (Dringen *et al.* 1999b; Dringen und Hirrlinger 2003). Dabei wird Cysteinylglycin durch das neuronale Ectoenzym Aminopeptidase N hydrolysiert (Dringen *et al.* 2001). Die entstehenden Aminosäuren Cystein und Glycin können anschließend von Neuronen aufgenommen und für ihre GSH-Synthese verwendet werden. Zusätzlich stellen Astrogliazellen durch Freisetzung von Glutamin Neuronen auch die Vorstufe des dritten Bausteins (Glutamat) für die GSH-Synthese zur Verfügung (Dringen und Hirrlinger 2003).

2.4.2.2 Peroxidentgiftung

Um die Fähigkeit verschiedener neuraler Zellen zur H_2O_2 -Entgiftung zu analysieren, wurden hauptsächlich Zellkulturmodelle verwendet (Dringen und Hamprecht 1997; Dringen *et al.* 1999b, 2004; Hirrlinger *et al.* 2000, 2002b; Baud *et al.* 2004). Da die intrazelluläre Konzentration von H_2O_2 sehr gering ist und deshalb dessen Entgiftung kaum messbar ist, wurden Untersuchungen zum Peroxidstoffwechsel oft durch Zugabe von H_2O_2 oder organischer Hydroperoxide wie tert-Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid durchgeführt (Dringen und Hamprecht 1997; Dringen *et al.* 1998a/b; Kussmaul *et al.* 1999; Hirrlinger *et al.* 2002b; Baud *et al.* 2004). Um den Einfluss der Catalase an der Entgiftung von H_2O_2 zu untersuchen, kann Catalase durch 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT) gehemmt werden (Margoliash und Novogrodsky 1958). Zur Untersuchung der Beteiligung des GSH-Systems an der Entgiftung von Peroxiden kann man die Bildung von GSH durch irreversible Inhibition der γ -Glutamylcysteinsynthetase mit Buthioninsulfoximin (BSO) verhindern und dadurch den GSH-Gehalt in Zellen verringern (Griffith und Meister 1979). Zudem lassen sich GPx durch Mercaptosuccinat hemmen (Tappel 1984).

Die Mechanismen der Entgiftung von H_2O_2 sind besonders gut an Kulturen von Astrogliazellen erforscht. H_2O_2 wird von diesen Zellen in einer Reaktion mit einer Kinetik erster Ordnung und einer Halbwertszeit von wenigen Minuten entgiftet (Dringen und Hamprecht 1997; Dringen *et al.* 1998a). Die Entgiftung von H_2O_2 wird durch die Verringerung der GSH-Konzentration nur geringfügig beeinflusst (Dringen und Hamprecht 1997; Liddell *et al.* 2004). Dennoch ist GPx an der Beseitigung von H_2O_2 beteiligt, da transient GSSG nachgewiesen werden kann (Dringen und Hamprecht 1997). Die Inhibition von GPx durch Mercaptosuccinat führt zunächst zu einer verlangsamten H_2O_2 -Entgiftung, die letztendlich, vermutlich durch eine peroxidabhängige Autoinaktivierung der Catalase, vollständig unterbleibt (Sokolova *et al.* 2001). Die Inhibition von Catalase durch 3AT führt nur zu einer marginalen Verlangsamung der H_2O_2 -Entgiftung (Dringen und Hamprecht 1997; Liddell *et al.* 2004). Jedoch wird die Entgiftungsrate für H_2O_2 durch Verringerung des GSH-Gehalts und gleichzeitiger Inhibition der Catalase stark verringert (Liddell *et al.* 2004). Dies zeigt, dass sowohl das GSH-System als auch Catalase an der Entgiftung von H_2O_2 in Kulturen von Astrogliazellen beteiligt ist.

Microgliazellen, Oligodendrogliazellen und Neuronen sind ebenfalls in der Lage exogenes H_2O_2 zu beseitigen (Dringen *et al.* 1999a; Hirrlinger *et al.* 2000, 2002b). Dabei sind Oligodendrogliazellen besonders effizient bei der Entgiftung von H_2O_2 (Hirrlinger *et al.* 2002b). Sie besitzen höhere spezifische GPx- und Catalase-Aktivitäten als Astrogliazellen, Microgliazellen oder Neuronen (Hirrlinger *et al.* 2002b). An der Entgiftung von H_2O_2 durch Oligodendrogliazellen sind Catalase und GPx beteiligt (Baud *et al.* 2004). In kultivierten Neuronen ist die Entgiftung von H_2O_2 bei Hemmung der Catalase deutlich verlangsamt (Dringen *et al.* 1999a). Zusätzlich zur Catalase ist auch das GSH-System an der Entgiftung von Peroxiden in kultivierten Neuronen beteiligt, da GSH nach Peroxidapplikation schnell oxidiert wird (Dringen *et al.* 1999a).

2.5 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst das Vorkommen bekannter Proteine des Eisenstoffwechsels auf mRNA- und Proteinebene in Kulturen von Astrogliazellen, Microgliazellen, Oligodendrogliazellen und Neuronen vergleichend untersucht werden. Zudem sollte der spezifische Eisengehalt dieser neuralen Zellkulturen

bestimmt werden. Die gewonnenen *in vitro*-Daten sollten durch Untersuchungen an Gehirnschnitten der Ratte auf *in vivo*-Relevanz geprüft werden. Des Weiteren sollten durch Applikation von transferringebundenem Eisen und nicht proteingebundenem Eisen Mechanismen der Eisenakkumulation in neuronalen Zellen untersucht werden. Ferner sollten die Konsequenzen von Eisenapplikation bzw. Eisenentzug auf den zellulären Eisengehalt und auf den Gehalt von TfR und Ferritin analysiert werden sowie die Toxizität von Eisen bestimmt werden. Schließlich sollte die Bedeutung von Eisen bei der Toxizität von H₂O₂ durch vergleichende Untersuchungen an Astrogliaulturen von Wildtyp- und GPx1-defizienten Mäusen untersucht werden.

3 Ergebnisse

Die Abbildungen und Tabellen der vorliegenden Arbeit zeigen repräsentative Experimente, die in Dreifachbestimmungen an einer Kultur durchgeführt wurden, oder sie fassen Daten aus Experimenten an mehreren Kulturen zusammen. Wurden Daten aus mehreren Experimenten zusammengefasst, ist die Anzahl der zusammengefassten Einzeldaten (n) angegeben. Die Symbole in den Diagrammen repräsentieren den Mittelwert und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an. Statistische Vergleiche mehrerer Datensätze wurden mit der nicht parametrischen Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) gefolgt von *Dunn's Multiple Comparisons Test* durchgeführt. $p > 0.05$ wurde als nicht signifikant gewertet. Signifikante Unterschiede zwischen Datensätzen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Sternen gekennzeichnet: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Alle in dieser Arbeit aufgeführten Experimente wurden, wenn nicht anders angegeben, mindestens an zwei, in der Regel an drei oder mehr unabhängigen Kulturen durchgeführt.

Der Eisengehalt von FAC kann zwischen einzelnen Chargen variieren. Der Eisengehalt der für die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Experimente verwendeten Charge wurde mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) ermittelt und betrug 0.91 ± 0.04 mol Eisen pro mol FAC (Riemer *et al.* 2004). Die Konzentration applizierten Eisens ist in den jeweiligen Experimenten entweder in μM FAC oder in μM Eisen als FAC angegeben ($100 \mu\text{M}$ FAC = $91 \mu\text{M}$ Eisen als FAC).

3.1 Morphologische und immunocytochemische Charakterisierung neuraler Zellkulturen

Etablierte Zellkulturmodelle für Astrogliazellen (Hamprecht und Löffler 1985), Neuronen (Löffler *et al.* 1986), Microgliazellen (Hirrlinger *et al.* 2000) und Oligodendrogliazellen (Hirrlinger *et al.* 2002b) wurden in der vorliegenden Arbeit hergestellt und ihre biochemischen Eigenschaften untersucht. Abb. 6 zeigt Phasenkontrastaufnahmen dieser vier verwendeten Typen neuraler Zellkulturen. Zellen astrogliareicher Primärkulturen (APKs) besaßen teilweise Ausläufer und bildeten nach 11 d in Kultur einen dichten Zellrasen (Abb. 6A), der nach 14 d konfluent war. Oligodendrogliareiche Sekundärkulturen (OSKs), microgliareiche Sekundärkulturen (MSKs) und neuroneneiche Primärkulturen (NPKs) waren nicht

konfluent (Abb. 6B,C,D). Oligodendrogliazellen besaßen feine verzweigte Ausläufer in alle Richtungen (Abb. 6B). Microgliazellen wiesen nur wenige oder gar keine Fortsätze auf (Abb. 6C) und Neuronen in Kultur zeigten ein weit verzweigtes Netzwerk von Fortsätzen (Abb. 6D). Die Morphologie der Zellen in den untersuchten Kulturen entsprach der für die jeweilige Kultur beschriebenen Morphologie (Löffler *et al.* 1986; Reinhart *et al.* 1990; Gutterer *et al.* 1999; Hirrlinger *et al.* 2000; Hirrlinger *et al.* 2002b).

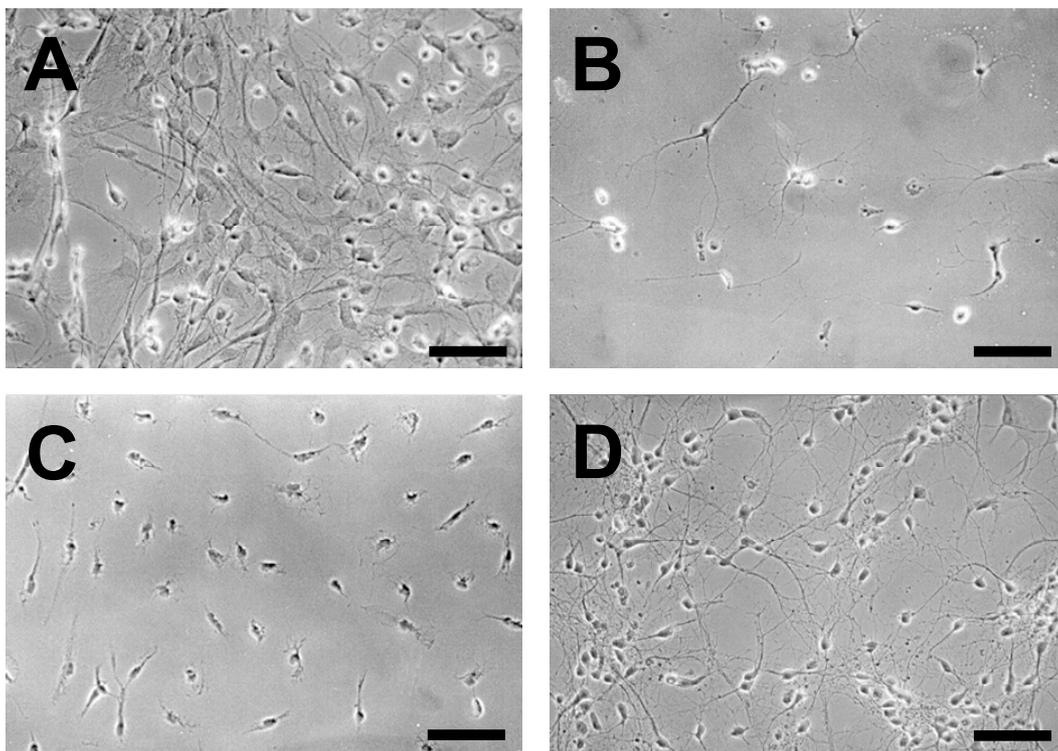


Abb. 6: Phasenkontrastaufnahmen neuraler Zellen. **A:** APK (Kulturalter: 11 d); **B:** OSK (Kulturalter: 6 d); **C:** MSK (Kulturalter: 3 d); **D:** NPK (Kulturalter: 5 d). Die Balken in den Bildern entsprechen jeweils einer Länge von 50 μm .

Die hergestellten neuralen Zellkulturen wurden durch immuncytochemischen Nachweis zelltypspezifischer Marker analysiert. Abb. 7 zeigt solche immuncytochemischen Anfärbungen der vier verwendeten Zellkulturtypen. Astrogliazellen wurden mit einem Antikörper gegen das Astrocyten-Markerprotein GFAP (Bock *et al.* 1977) angefärbt (Abb. 7A). Zur Identifizierung von Oligodendrocyten wurde ein Antikörper gegen das oligodendrocytenspezifische Lipid Galactocerebroside (GalC; Ranscht *et al.* 1982) verwendet (Abb. 7B). Die Identifizierung von Microgliazellen erfolgte durch die Bindung des Antikörpers Ox42 an den microglia-spezifischen

(Morimura *et al.* 1990) Marker CD11b (Abb. 7C). Neuronen wurden mit einem Antikörper gegen GAP43 (Jacobson *et al.* 1986) identifiziert (Abb. 7D). Die immunocytochemische Analyse der Expression zellspezifischer Marker bestätigte, dass die hergestellten Zellkulturen für den jeweils gewünschten Zelltyp stark angereichert waren.

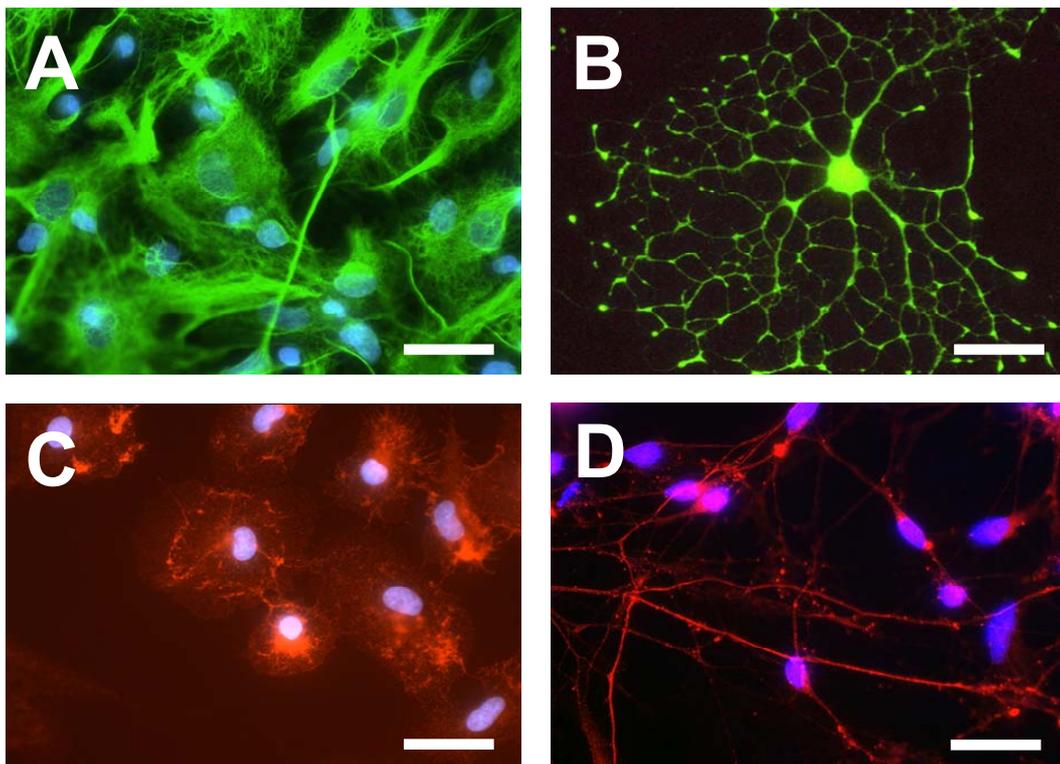


Abb. 7: Immunocytochemische Anfärbungen neuraler Zellkulturen gegen zelltypspezifische Marker. **A:** GFAP-Färbung (grün) einer APK (Kulturalter: 8 d); **B:** GalC-Färbung (grün) einer OSK (Kulturalter: 6 d); **C:** CD11b-Färbung (rot) einer MSK (Kulturalter: 3 d); **D:** GAP43-Färbung (rot) einer NPK (Kulturalter: 5 d). Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau). Die Balken in den einzelnen Bildern entsprechen jeweils einer Länge von 25 µm.

3.2 Nachweis von Eisen

Um den Eisenstoffwechsel neuraler Zellen in Kultur zu untersuchen, wurden quantitative und qualitative Nachweismethoden für Eisen eingesetzt. Zur Quantifizierung von Eisen wurde zum einen AAS angewendet, zum anderen eine kolorimetrische Nachweismethode zur Quantifizierung von Eisen etabliert, die auf die eisenchelierende Eigenschaft der Substanz Ferrozin basiert. Der Fe^{2+} -Chelator Ferrozin wurde bereits für die Bestimmung von Eisen in biologischen Proben eingesetzt (Ceriotti und Ceriotti 1980; Fish 1988). Die von Fish beschriebene

Methode wurde in der vorliegenden Arbeit für die Quantifizierung von Eisen in kultivierten Zellen modifiziert und für Messungen in *wells* von Microtiterplatten etabliert (Riemer *et al.* 2004). Ergebnisse zu dieser Etablierung werden in diesem Kapitel dargestellt. Des Weiteren wurde zum cytochemischen Nachweis von Eisen(III) in Zellkulturen eine von Nguyen-Legros *et al.* (1980) modifizierte Methode der Perls-Färbung, die zur Anfärbung von Eisen(III) in Gehirnschnitten bereits häufig verwendet wurde, erneut modifiziert.

3.2.1 Atomabsorptionsspektroskopie

Die im Labor von Prof. Weser (Universität Tübingen) etablierte AAS-Bestimmung von Eisen wurde in einigen Versuchen an Zellkulturen und für die Validierung der kolorimetrischen Eisenbestimmung angewendet. Um den Messbereich dieser Methode zu bestimmen, wurde zunächst eine Eichreihe mit verschiedenen Standardmengen an Eisen(II)sulfat erstellt und der AAS unterworfen. Abb. 8 zeigt, dass das Messsignal (Schreiber Ausschlag) in einem Bereich von 0 pmol bis 75 pmol Eisen(II)sulfat proportional zu Eisenmenge zunahm.

3.2.2 Kolorimetrische Eisenbestimmung

Die Quantifizierung von Eisen wurde nach einer Modifikation (Riemer *et al.* 2004) der von Fish (1988) beschriebenen Methode durchgeführt. Dabei wird das Eisen zunächst durch Behandlung der Zellen mit salzsaurer Kaliumpermanganat-Lösung aus Komplexen und Proteinen freigesetzt. Anschließend wird das freigesetzte Eisen durch den Eisenchelator Ferrozin gebunden. Die Absorption des Ferrozin-Eisen-Komplexes wird bei 550 nm gemessen. Da Ferrozin spezifisch für Fe^{2+} ist, muss dem Messansatz Ascorbat zugesetzt werden, welches Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert. Durch Zugabe des Kupferchelators Neocuproin wird verhindert, dass Ferrozin Kupfer bindet, und dadurch das Ergebnis verfälscht.

Zur Etablierung der kolorimetrischen Eisenbestimmung mit Ferrozin in Zellkulturen wurden neben der Bestimmung des Messbereichs auch die benötigte Menge an Ferrozin, der Einfluss von Neocuproin, der Nachweis von Eisen aus verschiedenen Eisensalzen und der Einfluss anderer divalenter Kationen auf den Eisennachweis untersucht. Zudem wurden an APKs mit der Ferrozin-Methode gemessene

Eisengehalte mit Werten der gleichen Proben verglichen, deren Eisengehalte durch AAS bestimmt wurden.

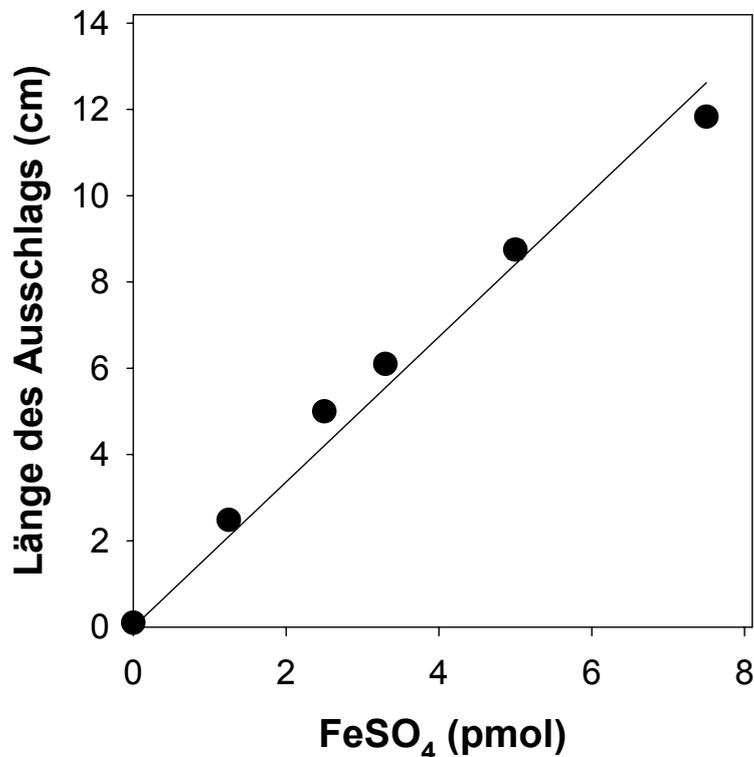


Abb. 8: Eichgerade zur Eisenquantifizierung durch Atomabsorptionsspektrometrie. Unterschiedliche Mengen von Eisensulfat wurden in das Atomabsorptionsspektrometer appliziert. In einem Bereich von 0 bis 75 pmol Eisensulfat war der Ausschlag des Schreibers proportional zur Eisenmenge. Die Standardabweichungen in diesem Experiment sind kleiner als die verwendeten Symbole. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0.989.

3.2.2.1 Eichgerade

Abb. 9 zeigt eine typische Eichgerade, die unter Verwendung der etablierten Standardbedingungen zur Eisenbestimmung (s. 5.4.5.1) gewonnen wurde. Der Anstieg der Absorption bei 550 nm mit der Eisenmenge war in den Bereichen von 0 nmol bis 30 nmol bzw. zwischen 0 pmol und 1000 pmol linear (Abb. 9A,B). Die Berechnung des Extinktionskoeffizienten aus 18 solcher Standardgeraden ergab einen Wert von $26.98 \pm 0.96 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Dieser Wert stimmt sehr genau mit dem in der Literatur beschriebenen Extinktionskoeffizienten von $27.9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für den Eisen(II)-Ferrozin-Komplex bei 562 nm überein (Berlett *et al.* 2001).

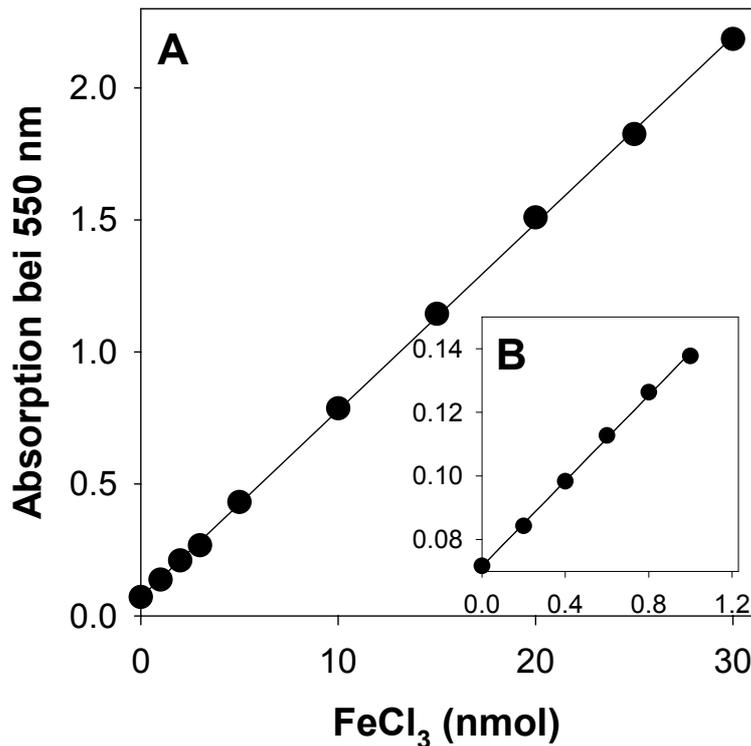


Abb. 9: Absorption des Eisen(II)-Ferrozin-Komplexes bei steigender Eisenmenge. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SD eines repräsentativen Experiments. Der Anstieg der Absorption ist linear zwischen 0 und 30 nmol (**A**) und zwischen 0 und 1000 pmol (**B**) FeCl₃. Die Standardabweichungen sind kleiner als die verwendeten Symbole. Die Korrelationskoeffizienten betragen 0.999 für beide Stoffmengenbereiche.

3.2.2.2 Einfluss von Ferrozin und Neocuproin

Um die maximale nachweisbare Eisenmenge und die dazu benötigte Ferrozinmenge zu bestimmen, wurden FeCl₃-Mengen zwischen 0 nmol und 100 nmol in *wells* einer Microtiterplatte mit verschiedenen Mengen an Ferrozin gemischt. Abb. 10A zeigt die Abhängigkeit der Absorption des Eisen(II)-Ferrozin-Komplexes von der Eisenmenge und der Ferrozinmenge im Versuchsansatz. Ohne Ferrozin im Detektionsreagenz war, unabhängig von der Eisenmenge, nur eine sehr geringe Absorption (<0.05) bei 550 nm zu messen. Bei der höchsten eingesetzten Ferrozinmenge von 200 nmol stieg die Absorption des gebildeten Komplexes bis zu 50 nmol linear mit der Eisenmenge an. Da die Absorption für 50 nmol FeCl₃ aber bereits bei ca. 3.5 lag, wurde in allen weiteren Versuchen als höchster FeCl₃-Standard eine Stoffmenge von 30 nmol (maximale Absorption bei ca. 2.0) verwendet. Ein 3-facher Überschuss von Ferrozin im Vergleich zu Eisen war nötig, um eine maximale Absorption des Komplexes bei 550 nm zu erreichen. Für alle weiteren Versuche wurde eine Ferrozinmenge von 200 nmol eingesetzt.

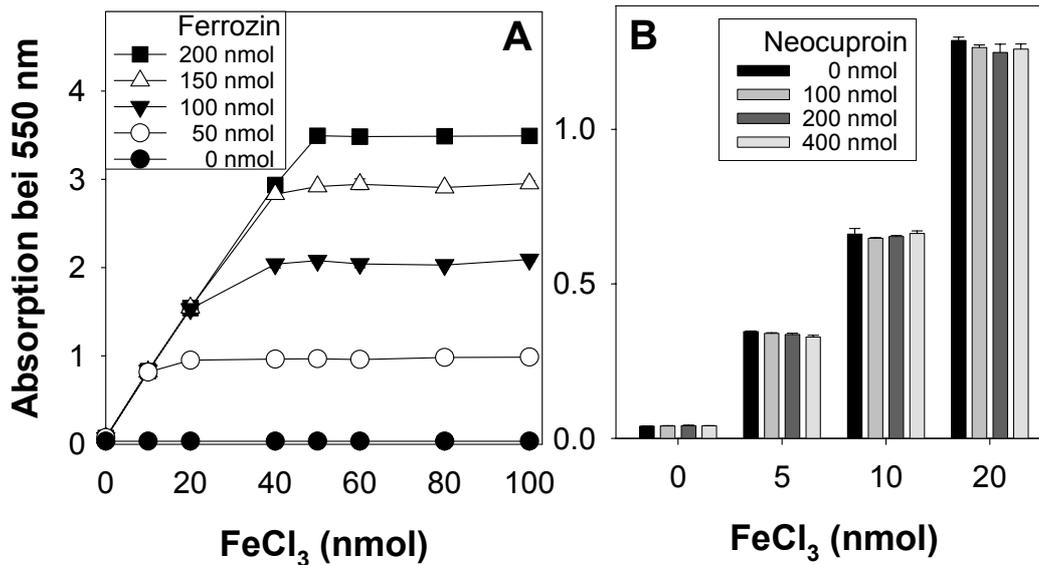


Abb. 10: Ferrozin- und Neocuproin-Abhängigkeit der kolorimetrischen Eisenmessung. Es wurden Mengen von Eisen(III)chlorid zwischen 0 nmol und 100 nmol (A) bzw. 0 nmol und 20 nmol (B) eingesetzt und die Absorption bei 550 nm nach Zugabe des Detektionsreagenz mit den angegebenen Gehalten an Ferrozin (A) und Neocuproin (B) gemessen.

Da Kupfer ebenfalls von Ferrozin cheliiert werden kann (Fish 1988) und in geringen Mengen in Zellen vorkommt (Prohaska und Gybina 2004), wurde im Detektionsreagenz der Kupferchelator Neocuproin verwendet, der eine Interaktion von Kupfer mit Ferrozin verhindern soll (Fish 1988). Um sicherzustellen, dass Neocuproin die Eisenbestimmung nicht negativ beeinflusst, wurden FeCl₃-Lösungen unterschiedlicher Konzentration mit Detektionsreagenzien inkubiert, die Neocuproinmengen von bis zu 400 nmol enthielten. Die Eisenbestimmung wurde durch die eingesetzten Mengen an Neocuproin nicht beeinflusst (Abb. 10B).

3.2.2.3 Vergleich verschiedener Eisensalze und Einfluss divalenter Kationen

Da Ferrozin Fe²⁺ aber nicht Fe³⁺ cheliiert (Carter 1971), wurde Ascorbat im Reaktionsreagenz eingesetzt, um Fe³⁺ zu Fe²⁺ zu reduzieren. Um zu untersuchen, ob Eisen aus Eisen(II)-Salzen und Eisen(III)-Salzen gleichermaßen detektiert wird, wurde die Absorption des Eisen(II)-Ferozin-Komplexes für Stoffmengen von 0 bis 20 nmol der Eisensalze FAC, Eisen(II)ammoniumsulfat ((NH₄)₂Fe(SO₄)₂), Eisen(II)sulfat (FeSO₄) und Eisen(III)chlorid (FeCl₃) verglichen. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen den eingesetzten Eisensalzen gefunden (Abb. 11A). Die Methode ist somit für den Eisennachweis von Eisen(II)salzen und Eisen(III)salzen gleichermaßen geeignet.

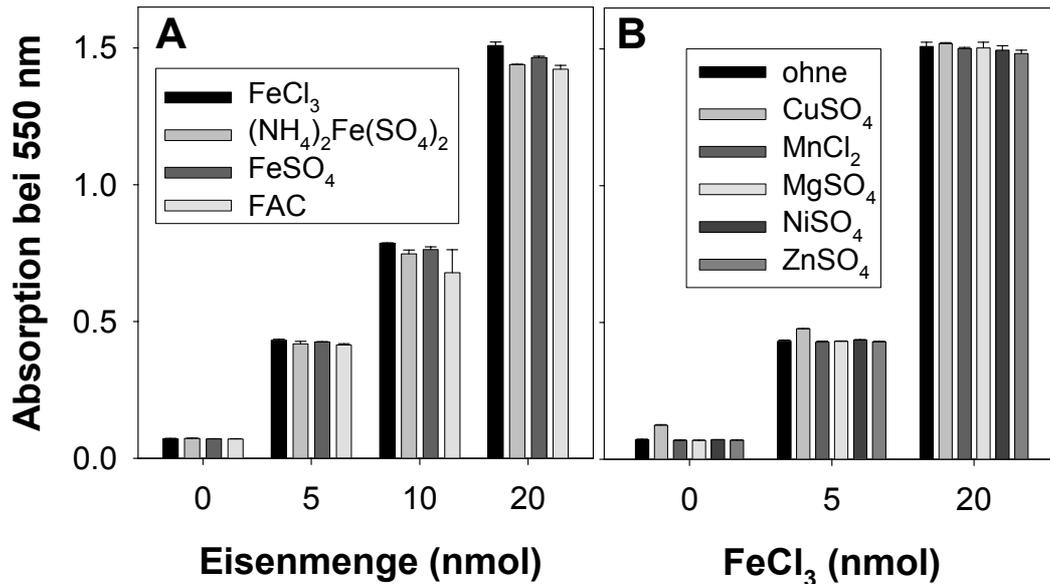


Abb. 11: **A:** Abhängigkeit der Absorption des Eisen(II)-Ferrozin-Komplexes von der Art und der Konzentration des eingesetzten Eisensalzes. Die genannten Eisensalze wurden in Mengen von 0, 5, 10 und 20 nmol eingesetzt. **B:** Einfluss divalenter Kationen auf die kolorimetrische Eisenbestimmung. Der Eisengehalt der Mischungen von 0 nmol, 5 nmol oder 20 nmol Eisen(III)chlorid mit zusätzlich 10 nmol der angegebenen Substanzen wurde bestimmt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SD eines repräsentativen Experiments.

Um den Einfluss anderer divalenter Kationen auf den Eisennachweis zu untersuchen, wurden jeweils 10 nmol MnCl₂, CuSO₄, MgSO₄, NiSO₄ oder ZnSO₄ ohne oder in Kombination mit 5 bzw. 20 nmol FeCl₃ der kolorimetrischen Eisenbestimmung unterzogen. Abb. 11B zeigt, dass keine der verwendeten divalenten Kationen den Nachweis von Eisen störte. Allenfalls CuSO₄ führte in Abwesenheit von FeCl₃ zu einem geringfügigen Anstieg der Absorption bei 550 nm im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 11B).

3.2.3 Nachweis von Eisen in astrogliareichen Primärkulturen

3.2.3.1 Vergleich von atomabsorptionsspektrometrischer und kolorimetrischer Eisenbestimmung

Um die Anwendbarkeit der Ferrozin-Methode zur Untersuchung des Eisengehaltes von Zellkulturen zu überprüfen, wurde der durch die kolorimetrische Methode gemessene Eisengehalt von APKs vor und nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an FAC mit dem durch AAS gemessenen Eisengehalt verglichen

(Tabelle 2 und Abb. 12). Für unbehandelte Zellen ergab sich mit der Ferrozin-Methode ein Eisengehalt von 8.4 ± 2.9 nmol/mg Protein (Tabelle 2). Bei der AAS wurde für APKs ein Eisengehalt von 7.6 ± 2.0 nmol/mg Protein ermittelt (Tabelle 2). Somit besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den mit beiden Methoden bestimmten basalen Eisengehalten von APKs. Auch nach Inkubation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an FAC, die zu einer konzentrationsabhängigen Steigung des Eisengehaltes der APKs führte (Abb. 12), wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit beiden Methoden gemessenen Eisengehalten gefunden (Tabelle 2 und Abb. 12).

Um die Durchführung der Ferrozin-Methode zu vereinfachen, wurde die Eisenbestimmung auch direkt in den *wells* von 24-*well*-Platten durchgeführt. Da dadurch Eisenmessung und Proteinbestimmung aus derselben Probe nicht mehr möglich war, die Durchführung der Eisenbestimmung aber erheblich vereinfacht wurde, wurden die Proteinwerte in diesem Fall aus identisch behandelten *Replika-wells* bestimmt. Zwischen den Eisengehalten, die durch die verschiedenen Durchführungen der Ferrozin-Methode gewonnen wurden und den Werten, die durch AAS bestimmt worden waren, gab es keine signifikanten Unterschiede (Abb. 12). Somit wurden beide Ferrozin-Methoden der Eisenbestimmung von APKs durch AAS erfolgreich validiert.

Tabelle 2: Eisengehalte von APKs: Vergleich der Messmethoden

APK	spezifischer Eisengehalt (nmol/mg Protein)			
	AAS	n	Ferozin-Methode	n
unbehandelt	7.6 ± 2.0	9	8.4 ± 2.9	124
24 h FAC	290 ± 58	9	302 ± 61	18

Die Eisengehalte von APKs wurden vor (unbehandelt) oder nach 24 h Inkubation in DMEM/PS mit 100 μ M FAC mit den angegebenen Methoden quantifiziert.

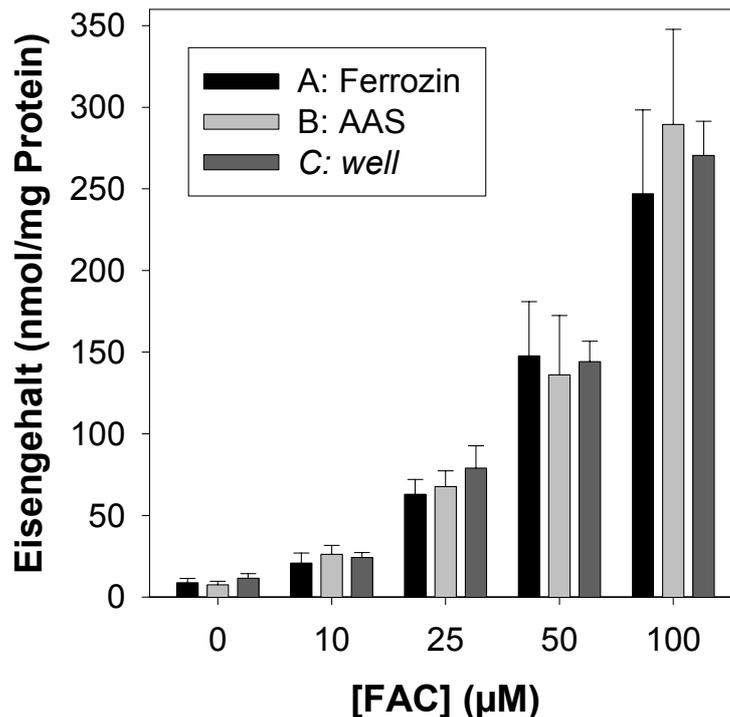


Abb. 12: Spezifischer Eisengehalt von APKs nach Inkubation mit FAC. Die Zellen wurden für 24 h mit FAC der angegebenen Konzentrationen in DMEM/PS ohne FCS inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 200 µl 50 mM NaOH lysiert. **A:** Ein Teil des Lysats wurde in Eppendorfgefäße überführt und mit saurer KMnO_4 -Lösung behandelt, um Eisen aus Komplexen und Proteinen freizusetzen. Sodann wurde der Eisengehalt kolorimetrisch bestimmt. **B:** Ein anderer Teil des Lysats wurde für die Quantifizierung von Eisen durch AAS eingesetzt. **C:** Die Zellen wurden direkt in den *wells* der Zellkulturplatten mit saurer KMnO_4 -Lösung behandelt und anschließend wurde der Eisengehalt kolorimetrisch bestimmt. Die angegebenen Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SD von 9 Messungen aus drei 15 bis 18 d alten APKs. Der Proteingehalt der Kulturen war 111 ± 19 µg pro *well*.

3.2.3.2 Cytochemischer Nachweis von Eisen in neuronalen Zellen

Zum cytochemischen Nachweis von Fe(III) in Zellen wurde die von Ngyuen-Legros *et al.* (1980) entwickelte verstärkte Perls-Färbung zur Untersuchung von Eisen in Gehirnschnitten für die Anwendung in Zellkulturen modifiziert. Bei der Perls-Färbung entsteht bei der Reaktion von Fe(III) mit Kaliumhexacyanoferrat(II) im sauren Milieu das Berliner Blau. Die Intensivierung der Färbung wurde erreicht durch Reaktion mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und H_2O_2 , was die Bildung eines unlöslichen braunen Farbstoffes verursachte.

Die in Kap. 5.4.2.4 beschriebene Eisenfärbung führte zu einer Anfärbung weniger Zellen in konfluenten APKs (Abb. 13A) und nahezu aller Zellen in MSKs (Abb. 13C).

Um die Spezifität dieser Methode für Eisen zu untersuchen, wurde die DAB-Reaktion an APKs und MSKs mit und ohne vorherige Perls-Färbung durchgeführt (Abb. 13). Bei beiden Zellkulturtypen war ein Reaktionsprodukt nach der DAB-Inkubation nur dann sichtbar, wenn vorher die eisenspezifische Perls-Färbung durchgeführt wurde (Abb. 13A,C). Ohne Perls-Färbung wurden keine Zellen in APKs (Abb. 13B) und MSKs (Abb. 13D) angefärbt. Somit stand mit der in Kap. 5.4.2.4 beschriebenen Methode ein cytochemischer Nachweis von Fe(III) zur Verfügung.

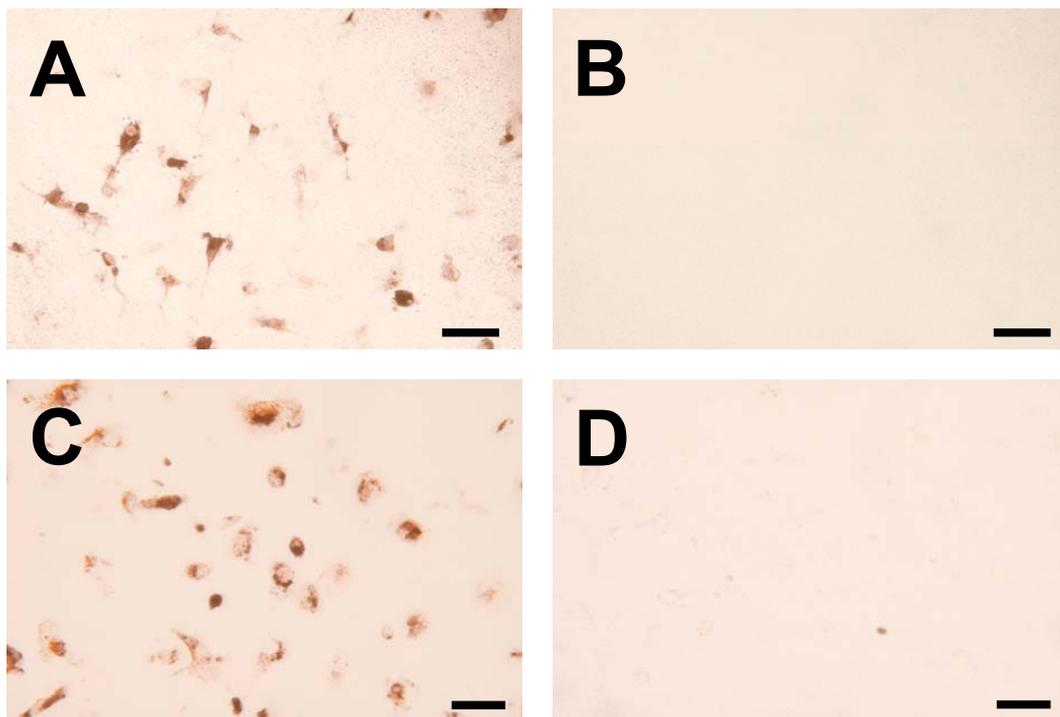


Abb. 13: Modifizierte Perls-Färbung neuraler Zellkulturen. APKs (**A,B**) und MSKs (**C,D**) wurden nach der in 5.4.2.4 beschriebenen Methode auf Eisen gefärbt (**A,C**). Als Negativkontrolle wurde der erste Anfärbungsschritt mit Kaliumhexacyanoferrat(II) in saurer Umgebung unterlassen (**B,D**). Der Balken in den Bildern entspricht jeweils einer Länge von 25 μm .

3.3 Eisen und Proteine des Eisenstoffwechsels in Kulturen neuraler Zellen

In diesem Kapitel werden APKs, OSKs, MSKs und NPKs im Hinblick auf das Vorkommen verschiedener Proteine des Eisenstoffwechsels und der entsprechenden mRNAs sowie im Hinblick auf ihren Eisengehalt verglichen. Eisen in den Zellen wurde durch Eisenfärbung untersucht und der zelluläre Eisengehalt quantitativ mit der Ferrozin-Methode bestimmt. Der Nachweis der mRNAs für die beiden Ferritin-Untereinheiten, für TfR und Transferrin sowie für IRP1 und IRP2 in neuralen

Zellkulturen wurde durch RT-PCR erbracht. Außerdem wurde das Vorkommen von Ferritin, TfR und Transferrin in neuronalen Zellen durch immunocytochemische Anfärbungen und durch *Western Blot*-Analysen untersucht.

3.3.1 Quantitativer und qualitativer Nachweis von Eisen

Mit Hilfe der Ferrozin-Methode wurde der zelluläre Eisengehalt verschiedener neuronaler Zellkulturen bestimmt. Der höchste Eisengehalt (36.9 ± 6.2 nmol Eisen/mg Protein) wurde in MSKs gemessen (Abb. 14). Ihr spezifischer Eisengehalt war fast viermal so hoch wie der von APKs und doppelt so hoch wie der von OSKs und NPKs. Der zelluläre Eisengehalt von MSKs war signifikant höher als der der anderen untersuchten neuronalen Zellkulturen. Im Gegensatz dazu waren die Eisengehalte von APKs, OSKs und NPKs nicht signifikant verschieden (Abb. 14).

Durch cytochemische Eisenfärbung wurde untersucht, ob Eisen homogen in allen Zellen der untersuchten Kulturen vorkommt oder ob es heterogen in wenigen Zellen der Kulturen nachgewiesen werden kann. Abb. 15 zeigt solche Anfärbungen, wobei im jeweiligen linken Bildausschnitt eine Phasenkontrastaufnahme und in der rechten Bildhälfte die Durchlichtaufnahme des gleichen Ausschnitts dargestellt ist. In MSKs wurden nahezu alle Zellen für Eisen angefärbt (Abb. 15C), während in den drei anderen Kulturtypen nur einzelne eisenpositive Zellen nachgewiesen wurden (Abb. 15A,B,D). Versuche, die eisenpositiven Zellen in den verschiedenen Zellkulturen mit Hilfe einer zusätzlich durchgeführten Immunfluoreszenzanfärbung für zelltypspezifische Marker zu identifizieren, scheiterten, da in den eisenpositiven Zellen aufgrund der Intensität der Eisenfärbung keine Fluoreszenz zu erkennen war (Daten nicht gezeigt).

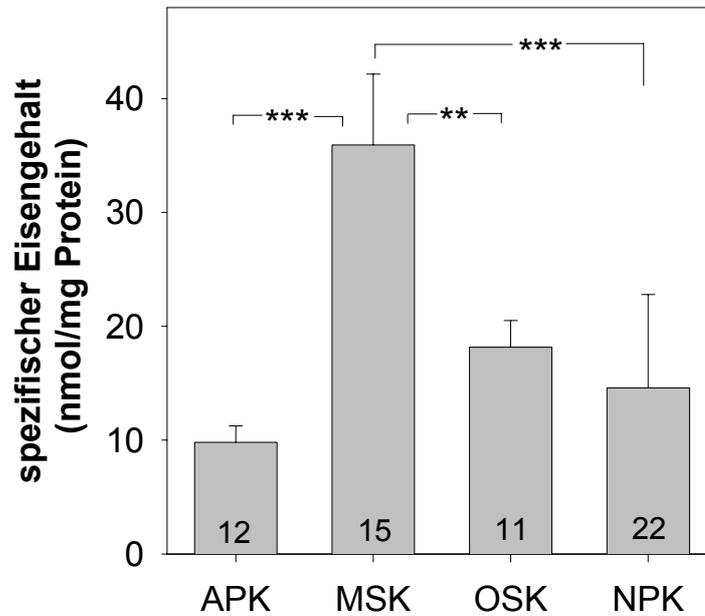


Abb. 14: Spezifischer Eisengehalt neuraler Zellkulturen. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm SD von Daten, die an n (Zahlen in den jeweiligen Balken) Kulturschalen aus 3 bis 4 unabhängig präparierten Kulturen gewonnen wurden. Der durchschnittliche Proteinwert der 50 mm-Kulturschalen betrug $860 \pm 160 \mu\text{g}$ (APK), $54 \pm 17 \mu\text{g}$ (MSK), $80 \pm 12 \mu\text{g}$ (OSK) und $195 \pm 80 \mu\text{g}$ (NPK).

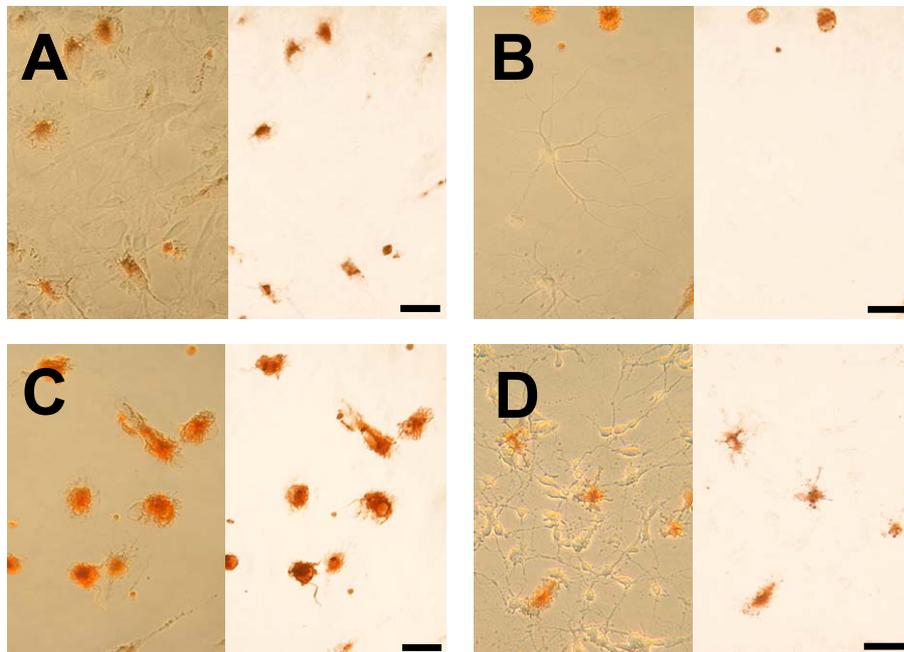


Abb. 15: Eisenfärbungen neuraler Zellkulturen. **A:** APK (Kulturalter: 15 d); **B:** OSK (Kulturalter: 6 d); **C:** MSK (Kulturalter: 3 d); **D:** NPK (Kulturalter: 5 d). Die jeweilige linke Bildhälfte zeigt eine Phasenkontrastaufnahme, die jeweilige rechte Bildhälfte die zugehörige Durchlichtaufnahme. Die Balken in den einzelnen Aufnahmen entsprechen $25 \mu\text{m}$.

3.3.2 Nachweis der mRNAs von Proteinen des Eisenstoffwechsels

Um zu untersuchen, welche Proteine des Eisenstoffwechsels in den verschiedenen neuronalen Zellkulturen exprimiert sein könnten, wurde das Vorkommen der mRNAs für L- und H-Ferritin, für TfR und Transferrin, sowie für IRP1 und IRP2 analysiert. Dazu wurde mRNA durch RT in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese diente als Matrize für die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR. Die RT-PCR liefert eine rein qualitative Aussage über das Vorliegen der entsprechenden mRNA in der Probe.

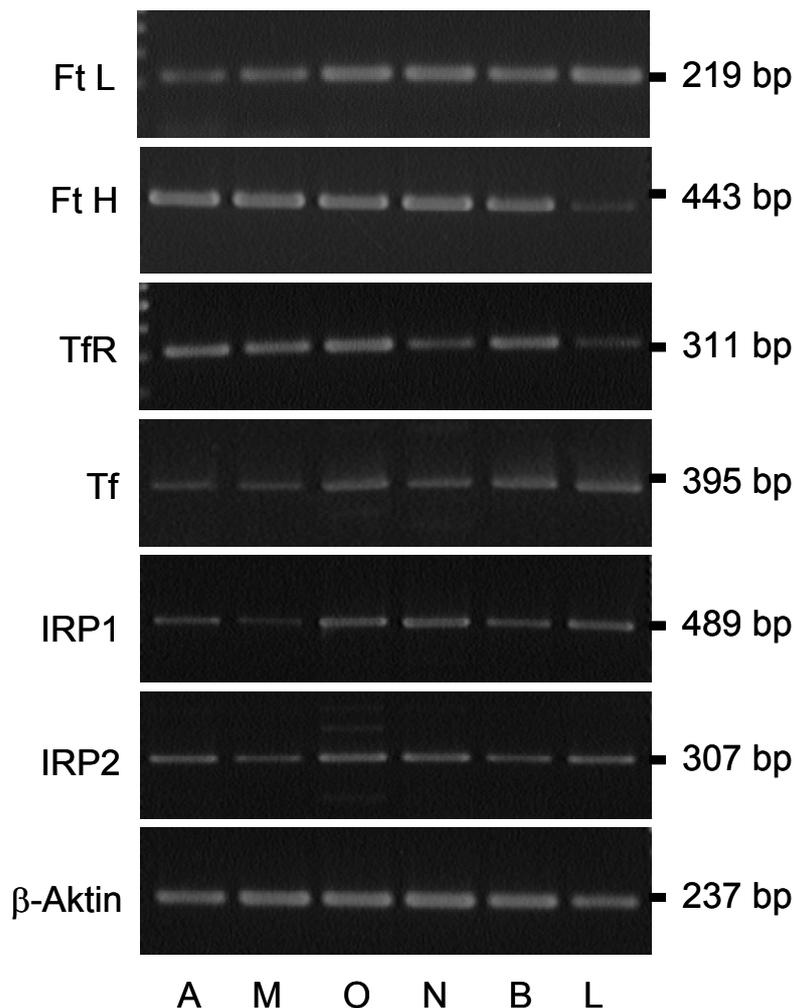


Abb. 16: RT-PCR-Analyse des Vorkommens der mRNAs von L- (Ft L) und H- (Ft H) Ferritin, Transferrinrezeptor (TfR), Transferrin (Tf) sowie von den *iron regulatory proteins* (IRP) 1 und 2. Je 1 µg Gesamt-RNA aus den Zellkulturen bzw. adultem Rattenhirn oder -leber wurde revers transkribiert. Die gewonnenen cDNAs wurden für PCRs mit spezifischen *Primern* zur Amplifikation der angegebenen Genprodukte eingesetzt. β-Aktin-cDNA wurde als Positivkontrolle für die Integrität der verwendeten mRNA eingesetzt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in einem 2%igem Agarosegel analysiert. A: APK; M: MSK; O: OSK; N: NPK; B: Gehirn; L: Leber.

Für alle Proben der verschiedenen Zellkulturtypen sowie für Gehirn und Leber wurden mit den spezifischen *Primerpaaren* DNA-Fragmente der zu erwartenden Größe amplifiziert (Abb. 16). Unspezifische Banden kleinerer oder größerer Masse waren für die untersuchten Proben nicht zu erkennen.

3.3.3 Vorkommen von Proteinen des Eisenstoffwechsels

Da der Nachweis des Vorhandenseins einer mRNA nicht das Vorhandensein des entsprechenden Proteins beweist, wurde das Vorkommen von Ferritin, TfR und Transferrin in neuronalen Zellkulturen durch immunocytochemische Anfärbung und *Western Blot*-Analyse untersucht.

3.3.3.1 Ferritin

Immunocytochemische Anfärbungen und *Western Blot*-Analysen von Ferritin wurden mit einem Antiserum durchgeführt, das sowohl L- als auch H-Ferritin erkennt. Abb. 17A-D zeigt immunocytochemische Anfärbungen von Ferritin in neuronalen Zellkulturen (grün). Die Kerne der Zellen wurden mit DAPI gegengefärbt (blau). In den APKs wurden nur vereinzelt ferritinpositive Zellen nachgewiesen (Abb. 17A). Im Gegensatz dazu war ein starkes Signal in nahezu allen Zellen der OSKs (Abb. 17B) und der MSKs (Abb. 17C) nachweisbar. In OSKs wurde sowohl im Zellkörper als auch in den Zellfortsätzen Ferritin nachgewiesen. Auch in den NPKs waren ferritinpositive Zellen erkennbar (Abb. 17D). Die Anfärbung war in der Nähe der Zellkerne besonders stark. Teilweise war auch eine schwache Anfärbung der Fortsätze zu erkennen (Abb. 17D).

Das Ergebnis der immunocytochemischen Anfärbungen von Ferritin in neuronalen Zellen wurde durch *Western Blot*-Analyse bestätigt. Starke Signale wurden für Homogenatüberstände von MSKs und OSKs nachgewiesen (Abb. 18). Diese Banden hatten eine molekulare Masse von ca. 21 kDa, was der molekularen Masse von Ferritinuntereinheiten entspricht. In APKs und NPKs waren allenfalls sehr schwache Banden dieser Masse erkennbar (Abb. 18). Unterhalb der 21 kDa-Bande trat in allen Proben eine schwache Bande mit einer molekularen Masse von ca. 18 kDa auf. Dieses letztere Ergebnis war jedoch nicht in allen durchgeführten Experimenten reproduzierbar. Mit dem eingesetzten Antikörper konnte nicht geklärt werden, ob es sich bei den zwei Banden von ca. 21 kDa und 18 kDa um die beiden Isoformen L-Ferritin und H-Ferritin handelte.

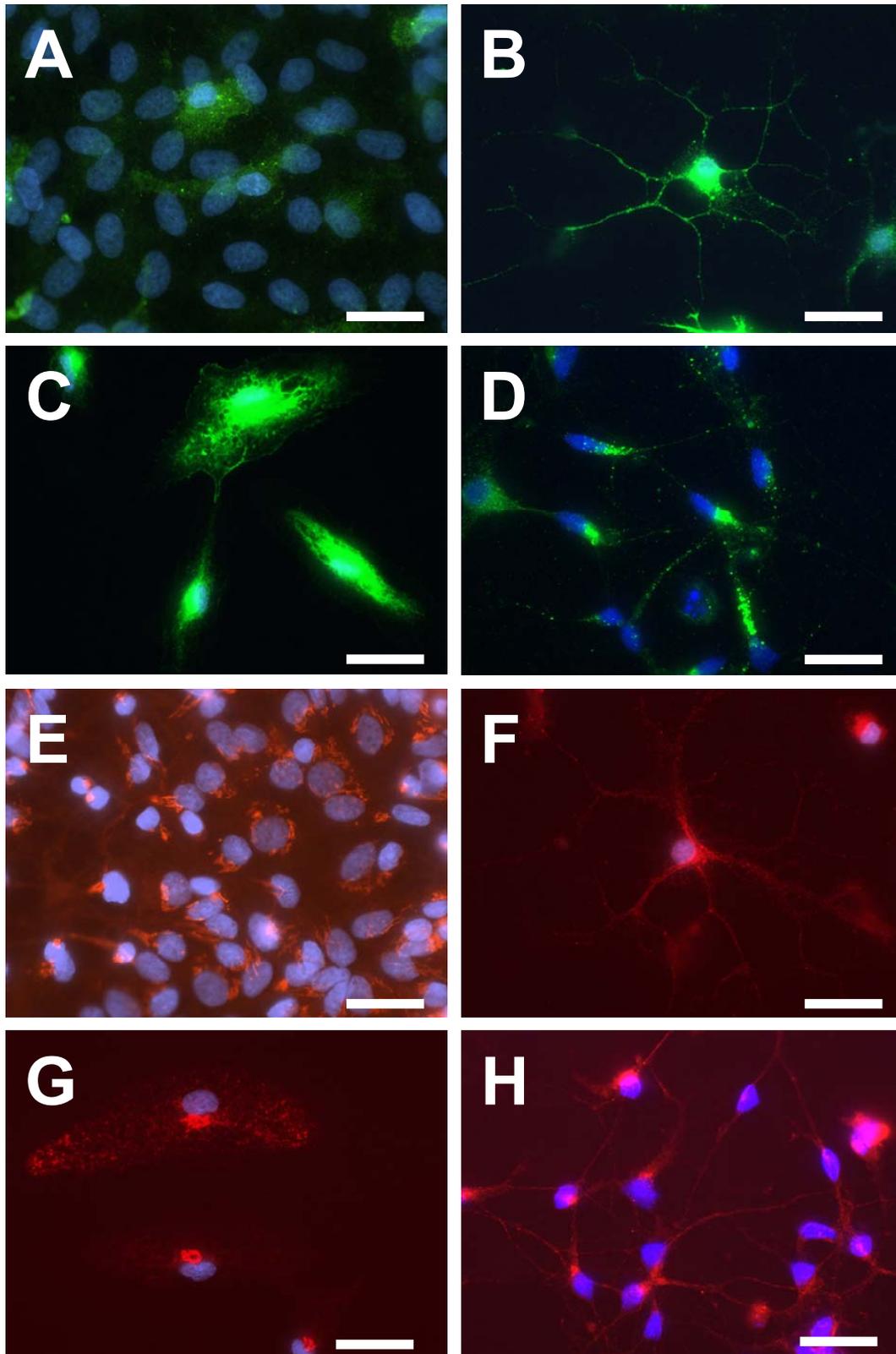


Abb. 17: Immunocytochemische Anfärbung von Ferritin (A-D) und TfR (E-H) in APKs (A,E; Kulturalter: 8 d), OSKs (B,F; Kulturalter: 6 d), MSKs (C,G; Kulturalter: 3 d) und NPKs (D,H; Kulturalter: 5 d). Zur Anfärbung von

Ferritin (grün) wurde ein Antiserum und zur Anfärbung von TfR (rot) ein monoklonaler Antikörper eingesetzt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Balken in den Aufnahmen entsprechen einer Länge von 25 µm.

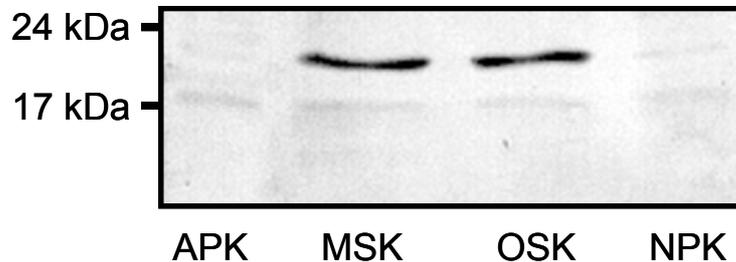


Abb. 18: Nachweis von Ferritin in neuronalen Zellkulturen durch *Western Blot*-Analyse. Für die Auftrennung wurde ein 12%iges Trenngel verwendet. In die Taschen wurden jeweils 40 µg Protein der cytosolischen Fraktion der verschiedenen Zellkulturtypen in 20 µl Probenpuffer aufgetragen.

3.3.3.2 Transferrinrezeptor

Das Vorkommen von TfR in neuronalen Zellkulturen wurde ebenfalls durch immunocytochemische Anfärbungen und *Western Blot*-Analysen untersucht. In Abb. 17E-H ist die immunocytochemische Anfärbung von TfR (rot) dargestellt. Die Kerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau). Die Zellen von APKs (Abb.17E) zeigten ein positives Signal für TfR, das überwiegend auf den Bereich um den Zellkern beschränkt war. Auch bei den anderen neuronalen Zelltypen war ein intensives TfR-Signal im Bereich des Zellkerns erkennbar (Abb. 17F-H). Bei Zellen in MSKs war häufig eine punktförmige, gleichmäßig verteilte Anfärbung über die gesamte Zelle zu erkennen (Abb. 17G).

Western Blot-Analysen des Vorkommens von TfR in neuronalen Zellkulturen wurden sowohl unter nicht reduzierenden Bedingungen (Abb. 19A) als auch unter reduzierenden Bedingungen durch Verwendung von Mercaptoethanol (Abb.19B) durchgeführt. Da der TfR aus zwei identischen Untereinheiten besteht, die durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Jing und Trowbridge 1987) können die Untereinheiten unter reduzierenden Bedingungen voneinander getrennt werden. Das Vorkommen von TfR konnte durch *Western Blot*-Analysen für die vier untersuchten neuronalen Zellkulturtypen bestätigt werden. Unter nicht reduzierenden Bedingungen wurde eine Proteinbande von ca. 185 kDa nachgewiesen (Abb. 19A),

was ungefähr der molekularen Masse des TfR-Dimers (180 kDa) entspricht. Reduktion der Proben mit Mercaptoethanol führte zum Nachweis einer intensiven Bande mit einer molekularen Masse von ca. 95 kDa (Abb. 19B). Der Vergleich der verschiedenen Kulturen ergab unterschiedliche Bandenintensitäten für TfR. Die stärksten Signale wurden für Proteinproben von MSKs und NPKs erhalten (Abb. 19). Die Analyse von Proben aus APKs und OSKs führte zu schwächeren TfR-Signalen.

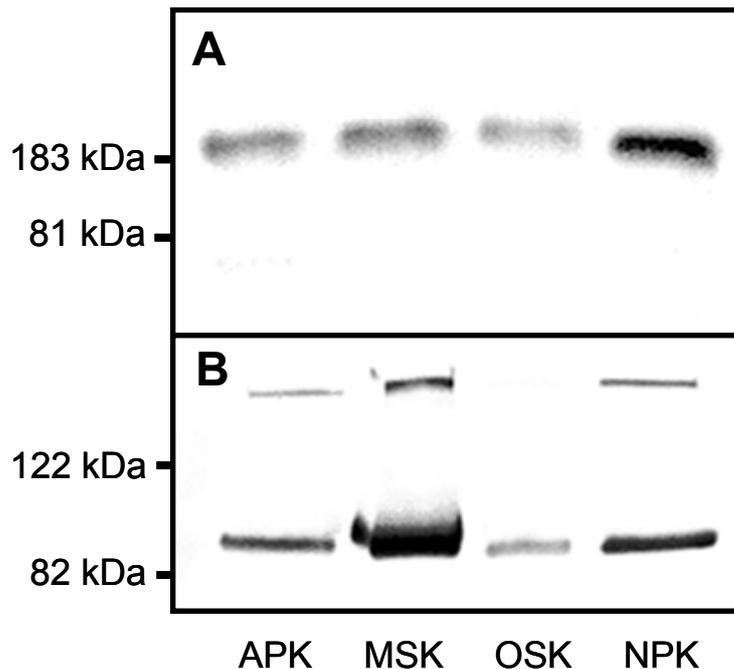


Abb. 19: Nachweis von TfR in neuronalen Zellkulturen durch *Western Blot*-Analyse. Die Auftrennung erfolgte unter nicht reduzierenden Bedingungen (**A**) und unter reduzierenden Bedingungen (**B**) in einem 8%igen Trenngel. Es wurden jeweils 20 μg Protein des Homogenatniederschlags der verschiedenen Zellkulturen in 10 μl Probenpuffer aufgetragen.

3.3.3.3 Transferrin

Mit Hilfe eines Antiserums gegen Transferrin wurde das Vorkommen von Transferrin in neuronalen Zellkulturen untersucht. Immunocytochemische Anfärbungen ergaben für alle untersuchten Zellkulturen positive Signale (Abb. 20). Bei den Zellen in OSKs und MSKs (Abb. 20B,C) waren vor allem die Zellkerne intensiv gefärbt. Bei der *Western Blot*-Analyse von Homogenaten neuronaler Zellen auf das Vorhandensein von Transferrin waren sowohl in der Membranfraktion als auch in der cytosolischen Fraktion Banden detektierbar (Abb. 21). Unter den nachgewiesenen Banden war auch eine von ca. 80 kDa, was der molekularen Masse von Transferrin entspricht.

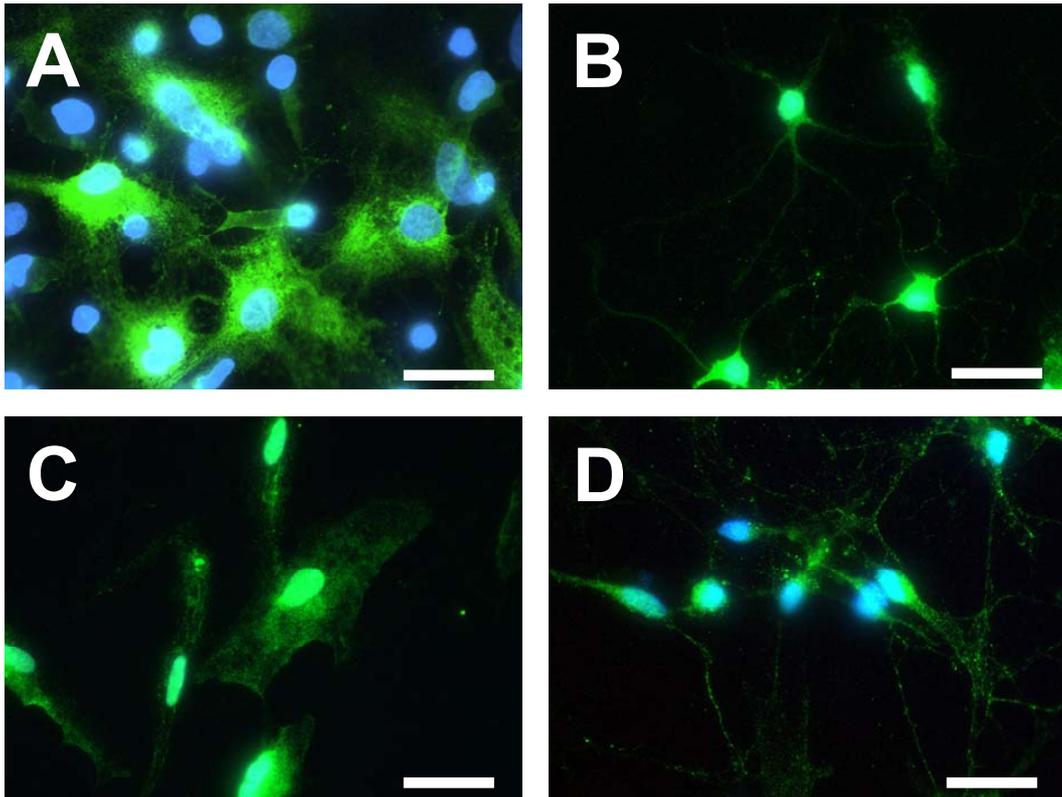


Abb. 20: Immuncytochemische Anfärbung von Transferrin (grün) in einer APK (**A**; 8 d), OSK (**B**; 6 d), MSK (**C**; 3 d) und NPK (**D**; 5 d) mit Hilfe eines Antiserums gegen Transferrin. Die Kerne der Zellen wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die Balken in den Aufnahmen entsprechen jeweils einer Länge von 25 μm .

Zudem traten insbesondere in der Membranfraktion noch weitere Banden im Bereich von 50 kDa und 20 kDa auf. Eine Präinkubation des Antikörpers mit Transferrin führte nicht zu einem veränderten Ergebnis beim Transferrinnachweis durch *Western Blot*-Analyse (Daten nicht gezeigt). Somit konnte die Spezifität des Antikörpers für Transferrin nicht nachgewiesen werden.

3.4. Eisenakkumulation in neuronalen Zellen

Wie in Kap. 2.3.2 beschrieben, enthalten Astrocyten mehrere Proteine, die an der Eisenaufnahme in diese Zellen beteiligt sein könnten. Um eine Beteiligung verschiedener Mechanismen an der Eisenaufnahme in Astrogliazellen zu untersuchen, wurde zunächst der Einfluss von FCS im Medium auf die Eisenaufnahme von APKs überprüft. Da in allen in der vorliegenden Arbeit verwendeten neuronalen Zellkulturen TfR-mRNA und -Protein nachgewiesen werden konnte, wurde die Fähigkeit der Zellen dieser Kulturen zur Aufnahme von transferringebundenem Eisen untersucht.

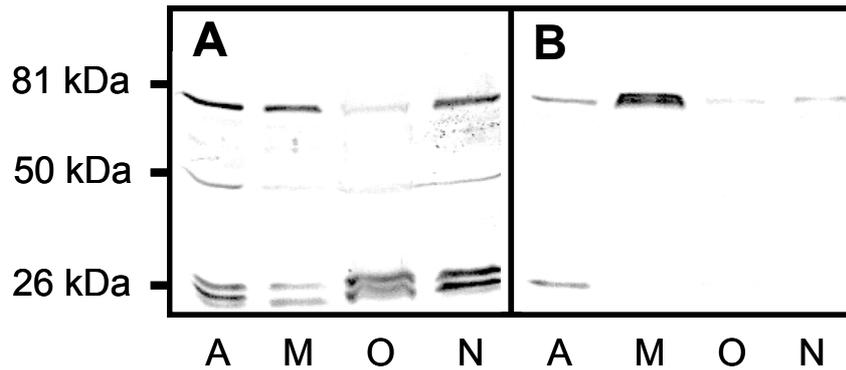


Abb. 21: Nachweis von Transferrin in neuronalen Zellkulturen. Für die Auftrennung wurde ein 10%iges Trenngel verwendet. In die Geltaschen wurden jeweils 50 µg Protein der Membranfraktion (**A**) oder der cytosolischen Fraktion (**B**) der verschiedenen Zellkulturen in 10 µl Probenpuffer aufgetragen. A: APK; M: MSK; O: OSK; N: NPK.

3.4.1 Eisenakkumulation in Astrogliazellen

Um den Einfluss von FCS auf die Eisenakkumulation von APKs zu untersuchen, wurden die Zellen bis zu 24 h lang mit Eisen verschiedener Konzentrationen (0 bis 100 µM Eisen als FAC) in serumhaltigem (10% FCS) oder serumfreiem Medium inkubiert. In beiden Medien kam es bis zu einer Inkubationszeit von ca. 16 h zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg des zellulären Eisengehalts (Abb. 22A,B). Dabei war der Anstieg bis zu einer Inkubationszeit von ca. 4 h unter beiden Bedingungen nahezu linear. Danach nahm die Geschwindigkeit der Eisenakkumulation ab. Die spezifischen Eisengehalte von APKs nach Inkubation mit FAC in serumfreiem Medium (Abb. 22B) waren deutlich höher als nach Inkubation in serumhaltigem Medium (Abb. 22A). Bereits 3 h Inkubation von APKs mit 100 µM Eisen führte bei Inkubation in serumfreiem Medium zu einem Eisengehalt, der ca. neunmal höher war als der von Zellen, die in serumhaltigem Medium inkubiert worden waren. Inkubation von APKs mit 100 µM Eisen in serumhaltigem Medium führte nur zu einer geringen Abnahme des Eisengehalts im Medium, wobei die Gesamt-Eisenmenge von Medium plus Zellen unverändert blieb (Abb. 22C). Gleiche Inkubationsbedingungen führten in serumfreiem Medium zu einer deutlichen Abnahme der extrazellulären Eisenmenge in den ersten 8 h, die der Zunahme des zellulären Eisengehalts während dieser Zeit nahezu entsprach (Abb. 22D). Nach 8 h Inkubation mit 100 µM Eisen waren im Medium nur noch ca. 14% der applizierten Eisenmenge nachzuweisen und ca. 75% des Eisens waren von den Zellen akkumuliert worden.

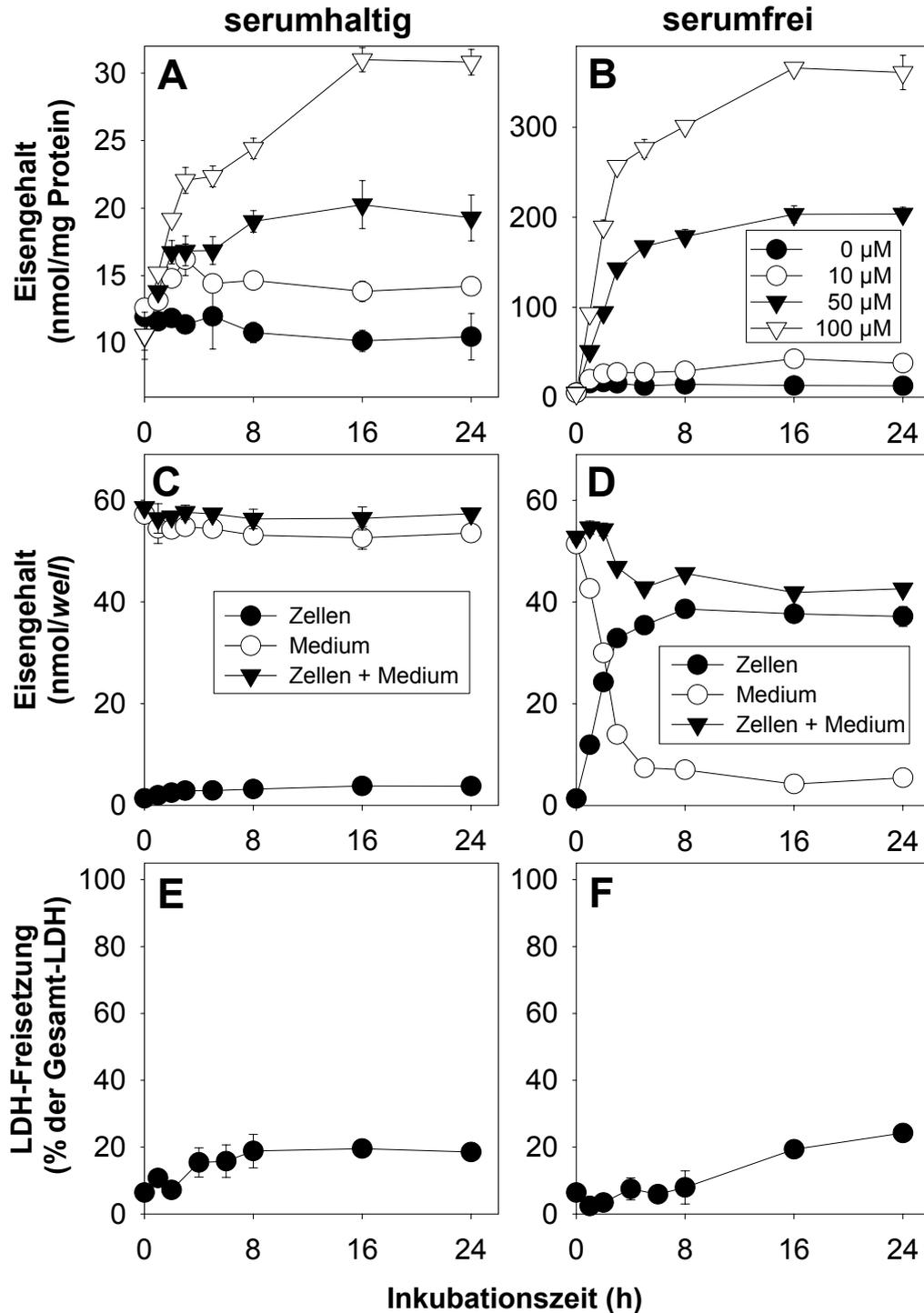


Abb. 22: Eisengehalte und Vitalität von APKs nach Applikation von FAC in serumhaltigem oder serumfreiem Medium. **A,B:** Eisengehalte von Zellen, die mit den in B angegebenen Konzentrationen an Eisen (als FAC) inkubiert wurden. **C,D:** Eisengehalte von Zellen, Medien sowie Zellen plus Medien von APKs, die mit 100 μM Eisen (als FAC) inkubiert wurden. **E,F:** LDH-Freisetzung der Zellen bei Inkubation mit 100 μM Eisen (als FAC). Die verwendete 15 d alte Kultur hatte einen Proteingehalt von $117 \pm 13 \mu\text{g}$ Protein.

Die Addition der Eisenmengen von Medium und Zellen ergab zu allen Zeitpunkten einen maximal 20%igen Verlust im Vergleich zum Eisengehalt des Ausgangsmediums. Ursache dieses Verlustes könnten die durchgeführten Waschschriffe sein.

Um zu untersuchen, ob die Eisenakkumulation von APKs unter serumfreien oder serumhaltigen Inkubationsbedingungen zu einer erhöhten Toxizität führte, wurde die Vitalität der Zellen durch Messung der LDH-Freisetzung bestimmt (Abb. 22E,F). Bei Inkubation von APKs mit 100 μ M Eisen in serumfreiem Medium war in den ersten 8 h allenfalls eine sehr geringe LDH-Freisetzung (< 8%) messbar (Abb. 22F). Bei längeren Inkubationszeiten war ein geringer Anstieg der LDH-Freisetzung zu beobachten (Abb. 22F). Bei der Inkubation in serumhaltigem Medium kam es bereits nach 4 h zu geringfügig erhöhter LDH-Freisetzung (< 20%), die aber bei längeren Inkubationszeiten kaum weiter anstieg (Abb. 22E).

Da trotz deutlich schnellerer Eisenakkumulation von APKs in serumfreiem Medium keine gesteigerte Toxizität im Vergleich zur Inkubation in serumhaltigem Medium beobachtet wurde, wurde vermutet, dass das akkumulierte Eisen unter diesen Bedingungen redoxinaktiv in Ferritin gespeichert wurde. Deswegen wurden Homogenatüberstände FAC-inkubierter APKs nach elektrophoretischer Auftrennung in nativen Gelen durch *Western Blot*-Analyse auf das Vorkommen von Ferritin (Abb. 23A) und durch Eisenfärbung eines nativen Gels auf eisenhaltiges Protein untersucht (Abb. 23B). *Western Blot*-Analysen zeigten einen Anstieg des Ferritingehaltes von APKs mit zunehmender Dauer der Inkubation mit Eisen sowohl in An- als auch in Abwesenheit von FCS (Abb. 23A). Trotz der wesentlich höheren Eisengehalte serumfrei inkubierter APKs (Abb. 22A,B) wurden für gleiche Inkubationszeiten mit Eisen in serumhaltigem oder serumfreiem Medium keine Unterschiede im Ferritingehalt gefunden. Die Eisenfärbung des nativen Gels ergab breite Banden nahezu identischen Massenbereichs wie das Signal für Ferritin in der *Western Blot*-Analyse. Banden anderer Masse waren nicht vorhanden. Die Intensität des Signals für Eisen stieg mit längerer Inkubationszeit unter beiden Bedingungen mit ähnlicher Rate an (Abb. 23B).

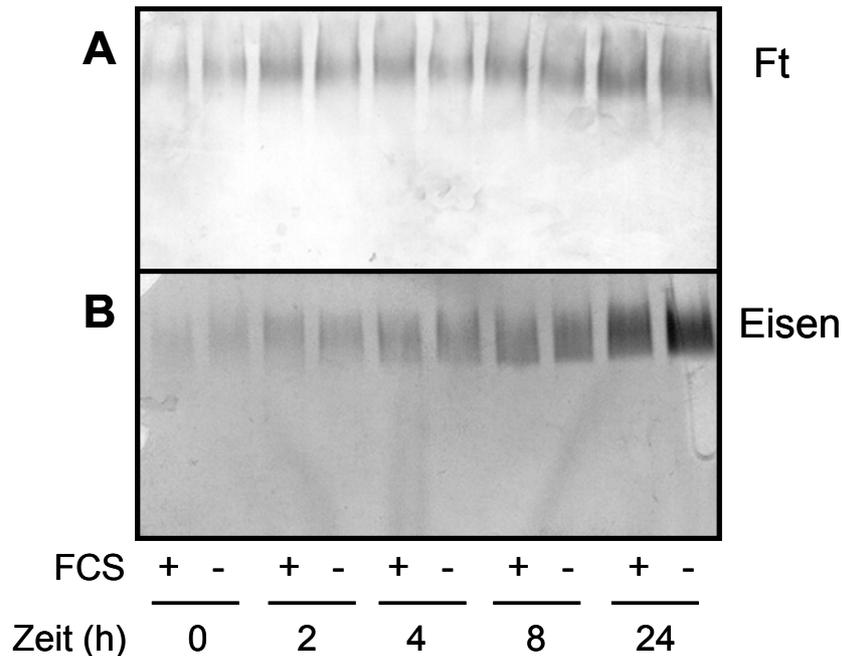


Abb. 23: Nachweis von Ferritin durch *Western Blot*-Analyse (Ft, **A**) und von eisenhaltigen Proteinen durch Eisenfärbung (**B**) eines nativen Gels. APKs wurden mit 100 μ M Eisen (als FAC) in serumhaltigem (+) oder serumfreiem (-) Medium für die angegebenen Zeiten inkubiert. Für die *Western Blot*-Analyse (**A**) wurden 30 μ g und für die Eisenfärbung (**B**) 20 μ g Protein der Überstandsfraktion pro Tasche aufgetragen. Die verwendete APK hatte ein Kulturalter von 15 d.

Durch Elektronenmikroskopie wurde versucht, die Verteilung von Eisen in Zellen von APKs nach Inkubation mit Eisen zu untersuchen. Abb. 24A zeigt eine Astrogliazelle einer APK nach 24 h Inkubation in serumfreiem Medium ohne Eisenzugabe. Astrogliazellen waren von anderen Zellen, die in den Kulturen vorkamen, durch das Vorhandensein von Intermediärfilamentbündeln (Abb. 24A,D, weiße Pfeile) und durch Fehlen von Zilien oder intrazellulären Membranstapeln zu unterscheiden. Die Inkubation der APKs mit 100 μ M Eisen (als FAC) in serumfreiem Medium hatte keine deutlichen Veränderungen der Zellen zur Folge. Jedoch traten im Unterschied zur Kontrolle bei eiseninkubierten Kulturen zu allen Zeitpunkten Zellen auf, die in organellartigen Strukturen schwarze Flecken aufwiesen (Abb. 24B-D, schwarze Pfeile). Dabei könnte es sich um abgelagertes Eisen handeln. Ein eindeutiger Nachweis für diese Hypothese konnte nicht erbracht werden. Eisenionen und kleinere Eisenkomplexe können durch die hier genutzte gängige Technik der Elektronenmikroskopie nicht nachgewiesen werden, so dass diese Methode keine eindeutige Aussage über die Verteilung des Eisens in den Zellen erlaubt.

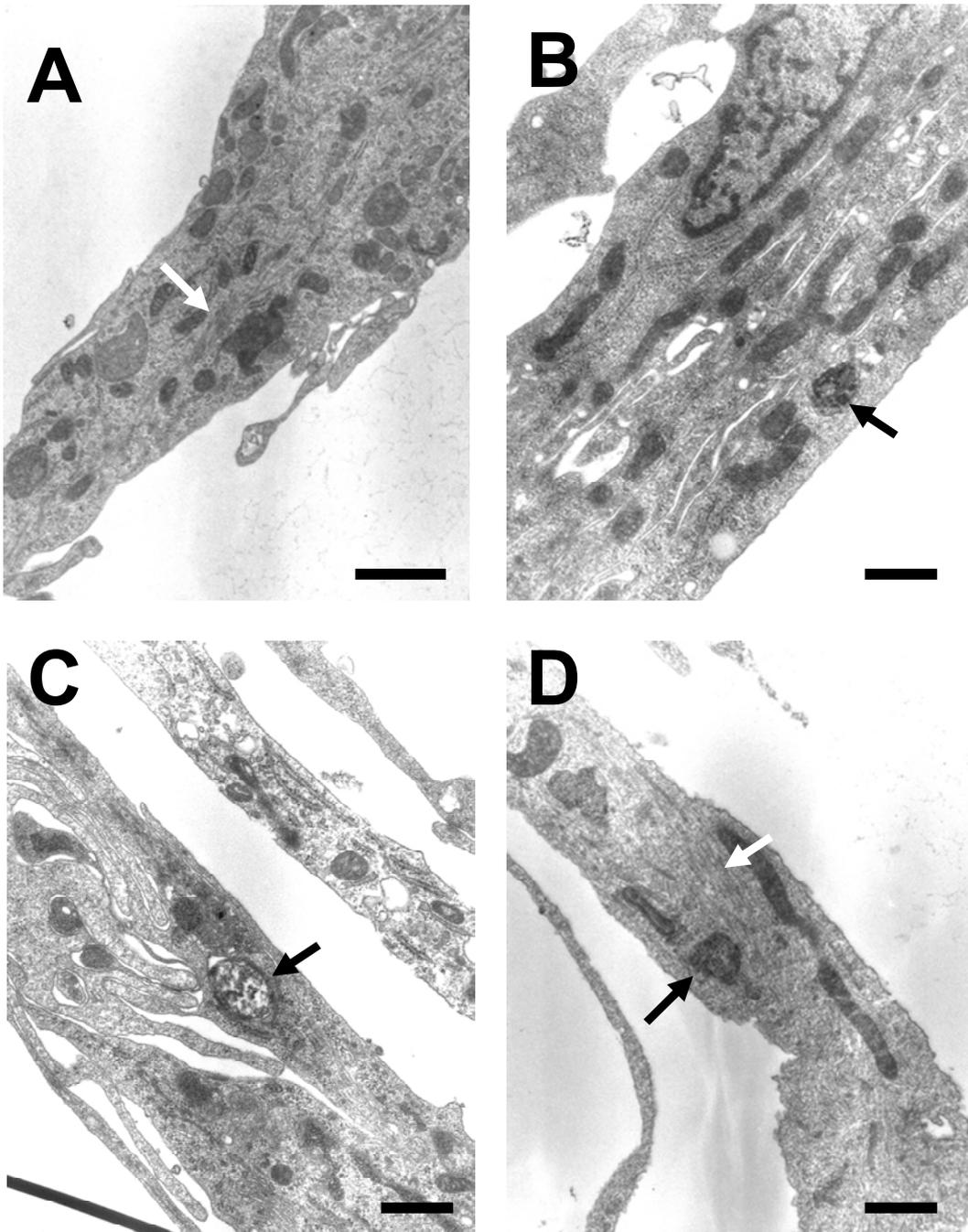


Abb. 24: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellen aus APKs nach Inkubation in DMEM für 24 h (**A**) oder nach Inkubation in DMEM plus 100 μ M Eisen (als FAC) für 2 h (**B**), 4 h (**C**) oder 24 h (**D**). Für dieses Experiment wurde eine 16 d alte APK verwendet. Der Balken in A entspricht einer Länge von 1 μ m, die Balken in B, C und D entsprechen einer Länge von 0.5 μ m. Die schwarzen Pfeile zeigen organellartige Strukturen mit schwarzen Flecken, die weißen Pfeile zeigen Intermediärfilamente.

3.4.2 Transferrinabhängigkeit der Eisenaufnahme in neuronalen Zellen

Um die durch Transferrin vermittelte Eisenaufnahme in neuronalen Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen in Medium mit äquimolaren Konzentrationen von Apotransferrin und Eisen als FAC inkubiert. Dieses Medium wurde vor der Anwendung über Nacht im Inkubator vorinkubiert, um einen konstanten pH-Wert für die verschiedenen Experimente und die vollständige Bindung des Eisens an Transferrin zu gewährleisten. Durch den Überschuss der Bindungskapazität des Transferrins für Eisen im Vergleich zur eingesetzten Eisenmenge sollte gewährleistet werden, dass in der Lösung nur transferringebundenes Eisen vorliegt.

Wurden APKs und NPKs für bis zu 24 h mit 20 μM Eisen (als FAC) und 20 μM Transferrin inkubiert, war ein deutlicher Anstieg des zellulären Eisengehaltes über die ersten 8 h der Inkubation zu beobachten (Abb. 25). Dabei war die Eisenakkumulation in NPKs (Abb. 25B) stärker als in APKs (Abb. 25A). Längere Inkubation als 8 h mit Transferrin und Eisen führte zu keiner weiteren signifikanten Steigerung des zellulären Eisengehalts (Abb. 25).

Neben der Zeitabhängigkeit der Eisenaufnahme wurde an APKs auch eine Konzentrationsabhängigkeit der Eisenaufnahme von transferringebundenem Eisen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit äquimolaren Konzentrationen an Eisen (als FAC) und Transferrin für 4 h inkubiert und anschließend der zelluläre Eisengehalt gemessen. Dabei war ein konzentrationsabhängiger Anstieg des zellulären Eisengehalts bei Konzentrationen von bis zu 20 μM Eisen plus Transferrin zu beobachten (Abb. 26).

Um den Anstieg des zellulären Eisengehalts nach Gabe von Transferrin plus Eisen durch Eisenfärbung zu bestätigen, wurden APKs und NPKs 24 h lang mit 20 μM Eisen (als FAC) plus 20 μM Transferrin inkubiert. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war in APKs ein deutlicher Anstieg der Braunfärbung von Zellen nach Inkubation mit Eisen plus Transferrin zu erkennen (Abb. 27A,B). In NPKs war unter diesen Bedingungen ebenfalls eine stärkere Anfärbung von Zellen im Vergleich zur Kontrolle und eine höhere Anzahl eisenpositiver Zellen sichtbar (Abb. 27C,D).

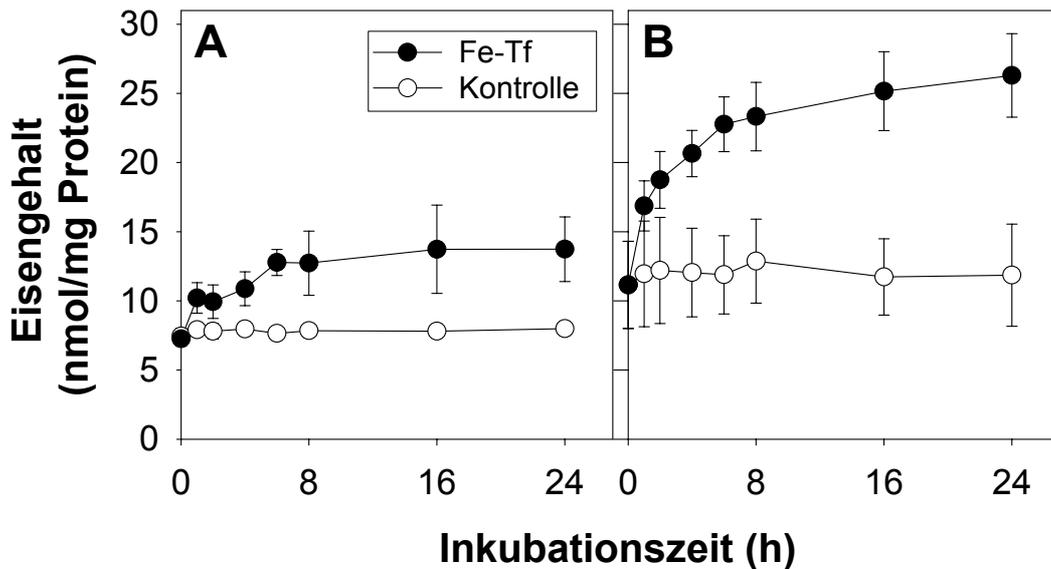


Abb. 25: Zellulärer Eisengehalt von APKs (A) und NPKs (B) nach Inkubation der Zellen in DMEM ohne (Kontrolle) oder mit 20 μM Eisen (als FAC) plus 20 μM Transferrin (Fe-Tf). Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD aus jeweils drei unabhängig durchgeführten Experimenten an drei verschiedenen Kulturen. Die 15 bis 18 d alten APKs und die 5 d alten NPKs hatten durchschnittliche Proteingehalte von $163 \pm 15 \mu\text{g}$ bzw. $54 \pm 12 \mu\text{g}$ pro *well* einer 24-*well*-Zellkulturplatte.

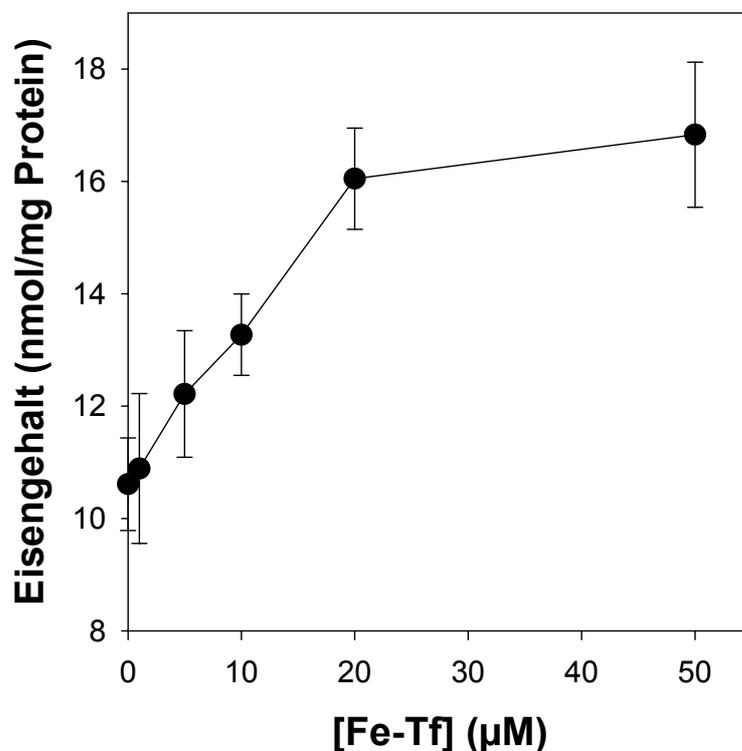


Abb. 26: Zellulärer Eisengehalt von APKs nach vierstündiger Inkubation der Zellen mit Eisen (als FAC) plus Transferrin (Fe-Tf) in äquimolaren Konzentrationen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten mit verschiedenen Kulturen. Die 15 d alten Kulturen hatten einen durchschnittlichen Proteingehalt von $132 \pm 15 \mu\text{g}$ pro *well* einer 24-*well*-Zellkulturplatte.

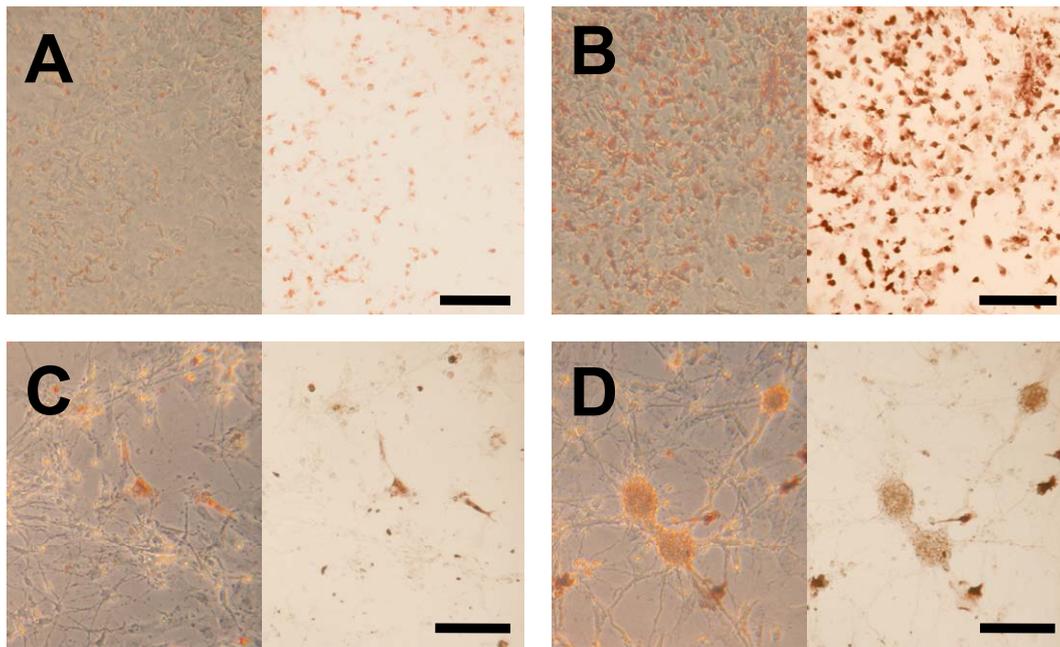


Abb. 27: Eisenfärbung einer APK (A,B) und einer NPK (C,D) vor (A,C) und nach (B,D) Inkubation der Zellen mit 20 μM Eisen (als FAC) plus 20 μM Transferrin für 24 h. Die jeweilige linke Bildhälfte zeigt eine Phasenkontrastaufnahme, die jeweilige rechte Bildhälfte die zugehörige Durchlichtaufnahme. Für die Anfärbungen wurden eine 15 d alte APK und eine 5 d alte NPK verwendet. Die Messbalken in den jeweiligen Bildern entsprechen einer Länge von 100 μm .

Durch *Western Blot*-Analysen wurde untersucht, ob die Inkubation von APKs und NPKs mit Eisen plus Transferrin das Vorkommen von Ferritin und TfR beeinflusst. Dazu wurden Zellen in 50 mm-Kulturschalen 24 h lang mit Eisen (20 μM ; als FAC) plus Transferrin (20 μM) inkubiert. Die *Western Blot*-Analyse für Ferritin ergab bei beiden Kulturtypen einen Anstieg des Ferritingehaltes nach Inkubation mit Eisen plus Transferrin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 28A). Für NPKs konnte zudem eine Verringerung des TfR-Gehaltes beobachtet werden (Abb. 28B). Das Signal für TfR in Proben von APKs war unter beiden Bedingungen sehr schwach, so dass keine eindeutigen Unterschiede zu erkennen waren.

Zum Vergleich der transferrinabhängigen Eisenaufnahme von APKs, MSKs, OSKs und NPKs wurden die Zellen für 4 h in DMEM mit Eisen (20 μM ; als FAC) und Transferrin (20 μM) inkubiert. Messung der spezifischen Eisengehalte unbehandelter neuraler Zellkulturen zeigte die höchsten Basalwerte von Eisen für MSKs (Abb. 14, Tabelle 3). Kontrollbedingungen in Medien ohne Eisenzugabe änderten den basalen

Eisengehalt neuraler Zellkulturen nicht (Tabelle 3). Im Gegensatz dazu führte eine 4-stündige Inkubation mit Eisen (20 μM ; als FAC) und Transferrin (20 μM) in allen

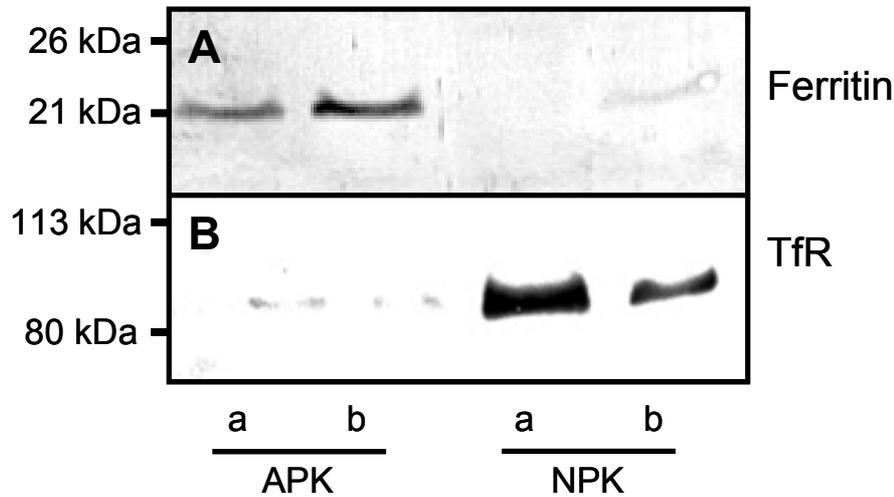


Abb. 28: *Western Blot-Analyse* von Ferritin (**A**) und TfR (**B**) in APKs (Kulturalter: 15 d) und NPKs (Kulturalter: 5 d) vor (a) und nach (b) Inkubation der Zellen für 24 h mit 20 μM Eisen (als FAC) plus 20 μM Transferrin. Es wurden jeweils 40 μg Protein des Homogenatüberstandes (A) bzw. 20 μg Protein des Homogenatniederschlags (B) aufgetragen.

untersuchten Zellkulturtypen nahezu zu einer Verdoppelung des spezifischen Eisengehalts der Zellen. Die höchste absolute Eisenmenge akkumulierte in MSKs, während die geringste Menge in APKs akkumulierte (Tabelle 3).

Zum Vergleich von transferrinabhängiger und -unabhängiger Eisenakkumulation wurden neurale Zellkulturen auch für 4 h in transferrinfreiem Medium mit 20 μM Eisen (als FAC) inkubiert. Unter diesen Bedingungen wurde in allen vier Zellkulturtypen eine starke Eisenakkumulation gemessen (Tabelle 3). Im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle waren die zellulären Eisengehalte von OSKs 10-fach, von MSKs 9-fach und von APKs sowie NPKs jeweils 7-fach gesteigert. In allen untersuchten Zellkulturtypen war somit die Eisenaufnahme in transferrinfreiem Medium deutlich höher als die in transferrinhaltigem Medium (Tabelle 3).

Tabelle 3: Spezifische Eisengehalte (nmol/mg Protein) neuraler Zellkulturen

Kultur	0 h	Kontrolle	Fe-Tf	Fe (FAC)	n
APK	7.4 ± 0.6	8.0 ± 0.5	13.4 ± 2.1	57 ± 9	9
MSK	35.6 ± 6.3	36.8 ± 5.9	86 ± 31	322 ± 70	9
OSK	15.4 ± 2.6	15.0 ± 1.1	32.4 ± 4.5	153 ± 11	6
NPK	11.1 ± 3.1	12.0 ± 3.2	21.1 ± 1.8	79 ± 13	9

Die Zellen wurden für 4 h in DMEM (Kontrolle), in DMEM mit 20 µM Eisen (als FAC) plus 20 µM Transferrin (Fe-Tf) oder in DMEM plus 20 µM Eisen (als FAC) inkubiert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte ± SD von Dreifachbestimmungen aus zwei bis drei unabhängigen Kulturen. Es wurden 15 bis 17 d alte APKs, 3 d alte MSKs, 6 d alte OSKs und 5 d alte NPKs verwendet.

3.5 Modulation des Ferritin- und Transferrinrezeptorgehaltes in Astrogliakulturen durch Eisenapplikation und Eisenentzug

Um den Einfluss von Eisenüberschuss und Eisenmangel auf den Gehalt von Ferritin und TfR in Astrogliazellen zu untersuchen, wurden APKs mit dem Eisensalz FAC oder mit dem Eisenchelator DFX bis zu 72 h lang inkubiert. Ferritin- und TfR-Gehalt wurden durch immunocytochemische Anfärbungen und *Western Blot*-Analysen bestimmt, sowie Eisengehalt und Vitalität der Zellen untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss des Proteinbiosyntheseinhibitors Cycloheximid (CHX; Siegel und Sisler 1963) in Kombination mit FAC auf den zellulären Eisengehalt, den Ferritingehalt und die Vitalität von APKs untersucht.

3.5.1 Eisengehalt und Vitalität

Der Eisengehalt von APKs vor und nach Inkubation mit FAC und/oder DFX wurde durch AAS bestimmt. Die Zellen wurden in 50 mm-Zellkulturschalen bis zu 48 h lang ohne oder mit FAC in 5 ml Kulturmedium inkubiert. Unbehandelte APKs hatten einen Eisengehalt von 9.3 ± 1.2 nmol/mg Protein (n=9, aus 3 Experimenten). Bei Inkubation der Zellen mit FAC stieg der Eisengehalt konzentrationsabhängig an, ohne Zugabe von FAC zum Kulturmedium blieb der Eisengehalt unverändert (Abb. 29A). Bei allen verwendeten Konzentrationen an FAC stieg der zelluläre Eisengehalt vor allem in den ersten 8 h der Inkubation stark an. Nach 24 h war jeweils ein Plateau erreicht (Abb. 29A). Zu diesem Zeitpunkt hatte sich der spezifische Eisengehalt der Zellen bei Inkubation mit 100 µM FAC um das 5-fache, bei Inkubation mit 1 mM FAC sogar um das 17-fache im Vergleich zum Ausgangswert

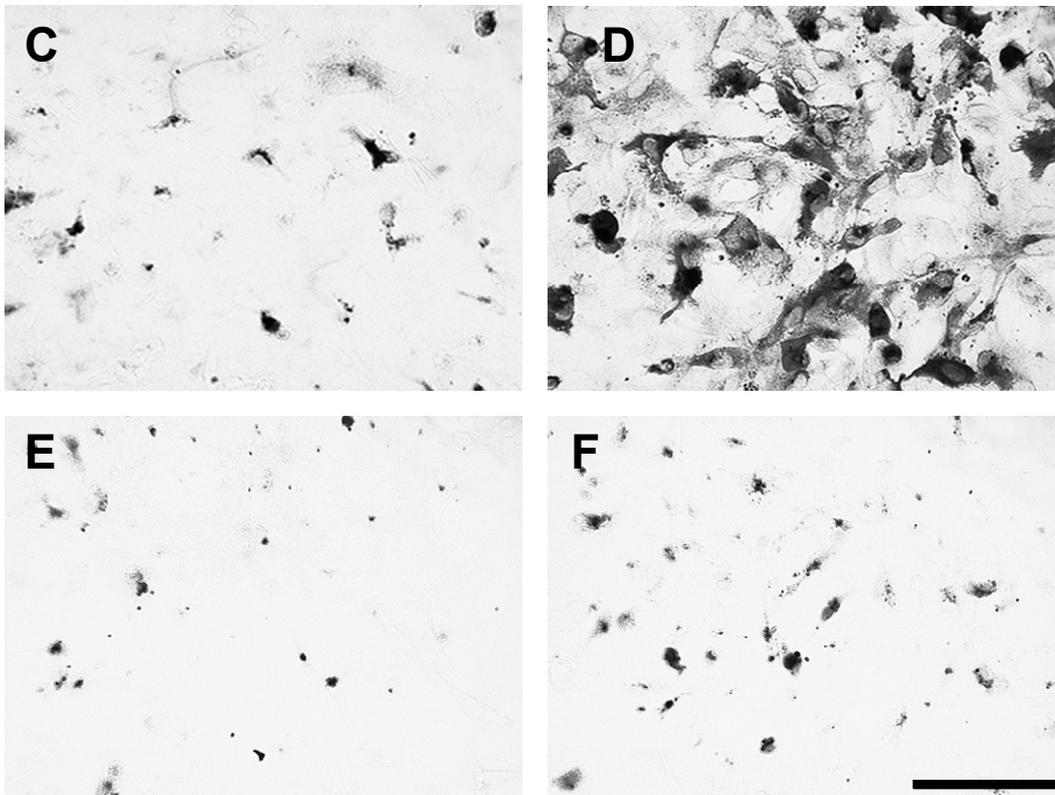
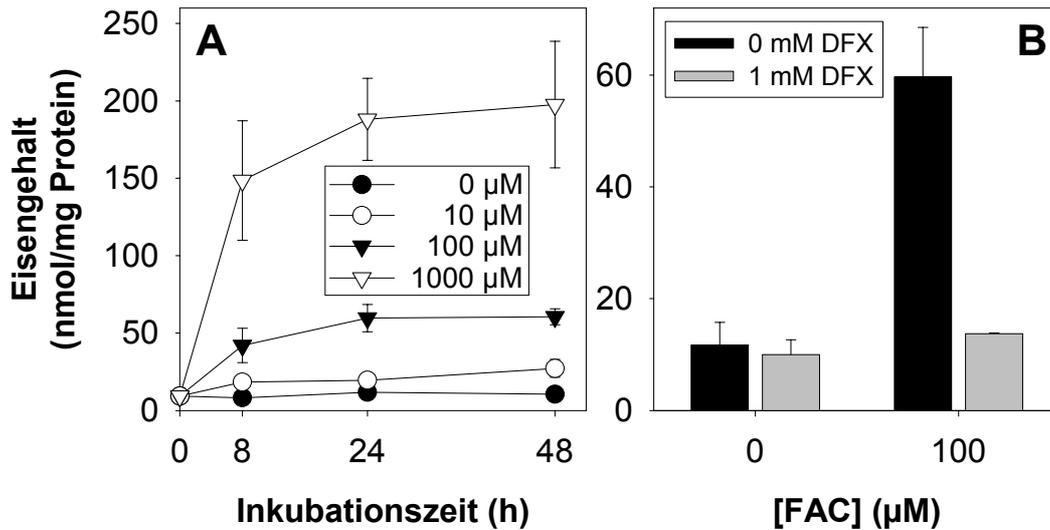


Abb. 29: Einfluss von FAC und DFX auf den Eisengehalt in APKs. **A:** Eisengehalt von APKs nach bis zu 48 h langer Inkubation mit FAC der angegebenen Konzentrationen. **B:** Eisengehalt von APKs nach 24 h Inkubation mit 100 μM FAC und/oder 1 mM DFX. Die Ergebnisse in A und B sind Mittelwerte \pm SD von Dreifachbestimmungen aus drei unabhängigen Kulturen eines Kulturalters von 15 bis 19 d. **C-F:** Eisenfärbung einer APK (Kulturalter: 13 d) nach Inkubation in Kulturmedium (**C**) oder in Kulturmedium mit 100 μM FAC (**D**), mit 1 mM DFX (**E**) oder mit 100 μM FAC plus 1 mM DFX (**F**). Der Balken in F entspricht einer Länge von 100 μm.

erhöht (Abb. 29A). Eisenfärbung bestätigte die Erhöhung des zellulären Eisengehaltes (Abb. 29C,D). Nach Inkubation der Zellen in Kulturmedium ohne FAC waren allenfalls vereinzelte Zellen positiv für Eisen (Abb. 29C). Nach Inkubation der Zellen mit 100 μ M FAC für 24 h waren deutlich mehr Zellen angefärbt und die Färbung der Zellen war intensiver (Abb. 29D).

Um die Effekte des Eisenchelators DFX auf den Eisengehalt von APKs zu untersuchen, wurden die Zellen 24 h lang mit DFX (1 mM) bzw. mit FAC (100 μ M) plus DFX (1 mM) inkubiert. Bei Inkubation mit DFX (1 mM) kam es zu keiner signifikanten Veränderung des intrazellulären Eisengehalts (Abb. 29B). Durch DFX konnte aber die Eisenakkumulation nach Gabe von 100 μ M FAC vollständig verhindert werden (Abb. 29B). Diese Verhinderung der Eisenakkumulation durch einen molaren Überschuss an DFX wurde durch Eisenfärbungen der Zellen bestätigt (Abb. 29F).

Als Maß für den Verlust der Zellen an Vitalität während einer Inkubation mit FAC und/oder DFX wurde die LDH-Freisetzung untersucht (Tabelle 4). Während der 24-stündigen Inkubation mit FAC (100 μ M) oder FAC (1 mM) kam es zur erhöhten Freisetzung zellulärer LDH. Die LDH-Freisetzung betrug nach Inkubation mit FAC (100 μ M) $21 \pm 9\%$ und war nach Inkubation mit FAC (1 mM) auf $38 \pm 16\%$ der Gesamt-LDH-Aktivität erhöht (Tabelle 4). Die gesteigerte LDH-Freisetzung war bereits nach 4 h ($18 \pm 9\%$, n=24, für 100 μ M FAC) und nach 8 h ($22 \pm 9\%$, n=27, für 100 μ M FAC) zu erkennen. Im Vergleich dazu gab es auch bei einer 72-stündigen Inkubation ($25 \pm 10\%$, n=27, für 100 μ M FAC) keine weitere Erhöhung der LDH-Freisetzung. Die Inkubation von APKs mit DFX für 24 h führte zu keiner erhöhten LDH-Freisetzung gegenüber der Kontrolle. Zudem wurde die durch FAC verursachte gesteigerte LDH-Freisetzung durch den Eisenchelator DFX vollständig verhindert (Tabelle 4).

Tabelle 4: Einfluss von FAC und DFX auf die Vitalität von APKs

FAC (μM)	DFX (1 mM)	LDH-Freisetzung (%)	n	Signifikanz zur Kontrolle
0	-	8 ± 5	30	-
10	-	14 ± 5	12	n.s.
100	-	21 ± 9	27	***
1000	-	38 ± 16	12	***
0	+	10 ± 5	21	n.s.
100	+	10 ± 5	21	n.s.

Die Zellen wurden 24 h lang mit FAC und/oder DFX der angegebenen Konzentrationen in Kulturmedium inkubiert. Anschließend wurde die LDH-Freisetzung gemessen. (Kontrolle: 0 μM FAC, kein DFX)

3.5.2 Vorkommen von Ferritin und Transferrinrezeptor

Um den Einfluss von FAC- und/oder DFX-Applikation auf den Gehalt von Ferritin und/oder TfR in APKs zu untersuchen, wurden *Western Blot*-Analysen und immunocytochemische Anfärbungen durchgeführt. Für die Detektion von Ferritin wurde die Überstandsfraktion, für die von TfR die membranhaltige Niederschlagsfraktion (s. 5.4.3) von Zellhomogenaten verwendet, die bei 500 g zentrifugiert wurden. Im Niederschlag von APK-Homogenaten konnte kein Ferritin nachgewiesen werden, im Überstand war TfR in geringen Mengen detektierbar (Daten nicht gezeigt).

Abb. 30A zeigt den Effekt einer Inkubation von APKs mit 100 μM FAC auf die Menge an TfR und Ferritin in den Kulturen. Mit dem monoklonalen Antikörper gegen TfR war in unbehandelten APKs eine starke Bande einer Masse von ca. 95 kDa nachweisbar (Abb. 30A). Im Gegensatz dazu war mit dem Antiserum gegen Ferritin allenfalls eine sehr schwache Bande bei ca. 22 kDa zu erkennen (Abb. 30B). Nach Inkubation der Zellen mit 100 μM FAC wurde die Intensität der TfR-Bande verringert, insbesondere wurde eine starke Abnahme zwischen 12 h und 24 h gefunden (Abb. 30A). Nach 72 h war nur noch eine sehr schwache TfR-Bande zu erkennen (30A). Im Gegensatz zur Intensität der TfR-Bande nahm die Intensität der Bande für Ferritin im Verlauf der FAC-Inkubation stark zu (Abb. 30B). Nach 8 h war bereits ein deutlicher Unterschied zur Kontrolle zu erkennen. Nach 24 h Inkubation mit FAC war das Maximum der

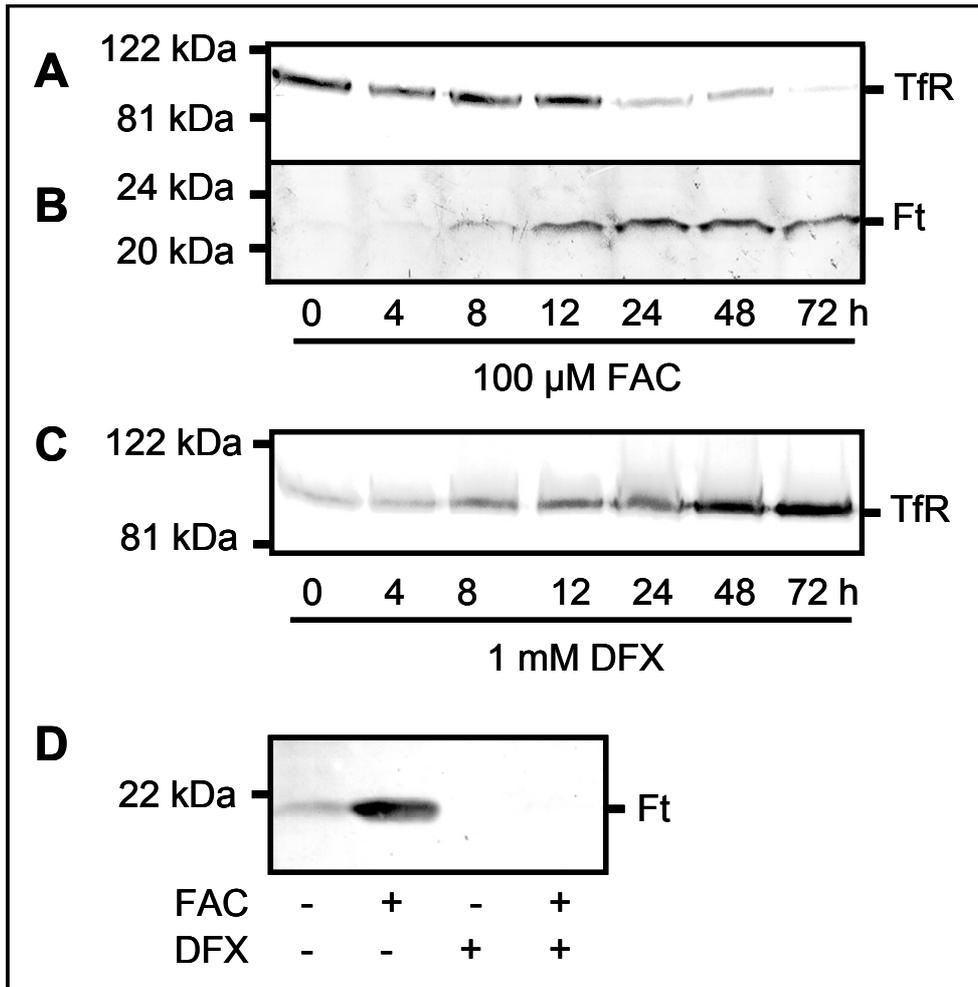


Abb. 30: *Western Blot*-Analyse für Ferritin und TfR. APKs wurden bis zu 72 h (**A, B, C**) oder 24 h (**D**) lang in Kulturmedium mit 100 µM FAC (**A, B**), 1 mM DFX (**C**) bzw. FAC (100 µM) und/oder DFX (**D**) inkubiert. Für die *Western Blot*-Analyse von Ferritin wurden 40 µg Protein der cytosolischen Fraktion, für die von TfR 40 µg Protein der Membranfraktion von APK-Homogenaten aufgetragen.

Bandenintensität erreicht (Abb. 30B). Danach kam es zu keiner weiteren Veränderung der Bandenintensität für Ferritin.

Um zu untersuchen, ob der Anstieg des Ferritingehaltes nach Eisengabe mit einer erhöhten Speicherung von Eisen in Ferritin verbunden war, wurden Proteinproben des Überstandes von APK-Homogenaten unter nativen Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt bevor eine Eisenfärbung im Gel sowie eine *Western Blot*-Analyse für Ferritin durchgeführt wurde. In Gel und *Blot* waren breite Banden nahezu identischer Massenbereiche zu erkennen. Nach 8 h Inkubation von APKs mit FAC war die Bandenintensität für Eisen im Gel und für Ferritin im *Blot* verstärkt (Abb.

31A,B). Das Maximum der Intensitäten war nach 24 h erreicht (Abb. 31A,B). Der zeitliche Verlauf des Anstiegs des Signals für Eisen und Ferritin in APK-Homogenaten nach Inkubation der Zellen mit Eisen war vergleichbar mit dem gezeigten Anstieg der Bandenintensität für Ferritin im SDS-Gel (Abb. 30A).

Die durch *Western Blot*-Analyse erzielten Ergebnisse zum Vorkommen von TfR und Ferritin nach FAC-Inkubation wurden durch immuncytochemische Anfärbungen von Astrogliazellen bestätigt. Inkubation der Zellen mit FAC (100 μ M) für 24 h führte zu einer deutlichen Zunahme des Signals für Ferritin im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 32A,B). Im Gegensatz dazu führte Inkubation von APKs mit 100 μ M FAC für 48 h allenfalls zu einer Abnahme des Signals für TfR im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 32 E,F).

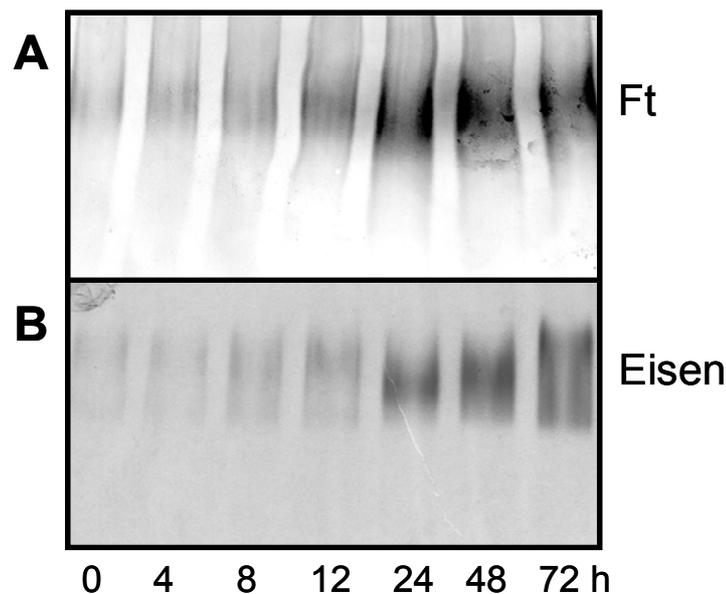


Abb. 31: *Western Blot*-Analyse für Ferritin (Ft, **A**) und Eisenfärbung eines nativen Gels (**B**). Eine APK (Kulturalter: 15 d) wurde bis zu 72 h lang in Kulturmedium mit FAC (100 μ M) inkubiert. Für die Auftrennung der Homogenatüberstände wurden 6%ige native Gele verwendet. Für die *Western Blot*-Analyse (**A**) wurden 30 μ g Protein und für die Eisenfärbung im Gel (**B**) 20 μ g Protein pro Tasche aufgetragen.

Der Einfluss des Eisenchelators DFX auf das Vorkommen von TfR und Ferritin wurde ebenfalls durch *Western Blot*-Analysen und immuncytochemische Anfärbungen untersucht. Dazu wurden APKs mit DFX (1 mM) bis zu 72 h lang inkubiert. Obwohl die 24-stündige Inkubation mit DFX zu keiner Veränderung des zellulären Eisen-

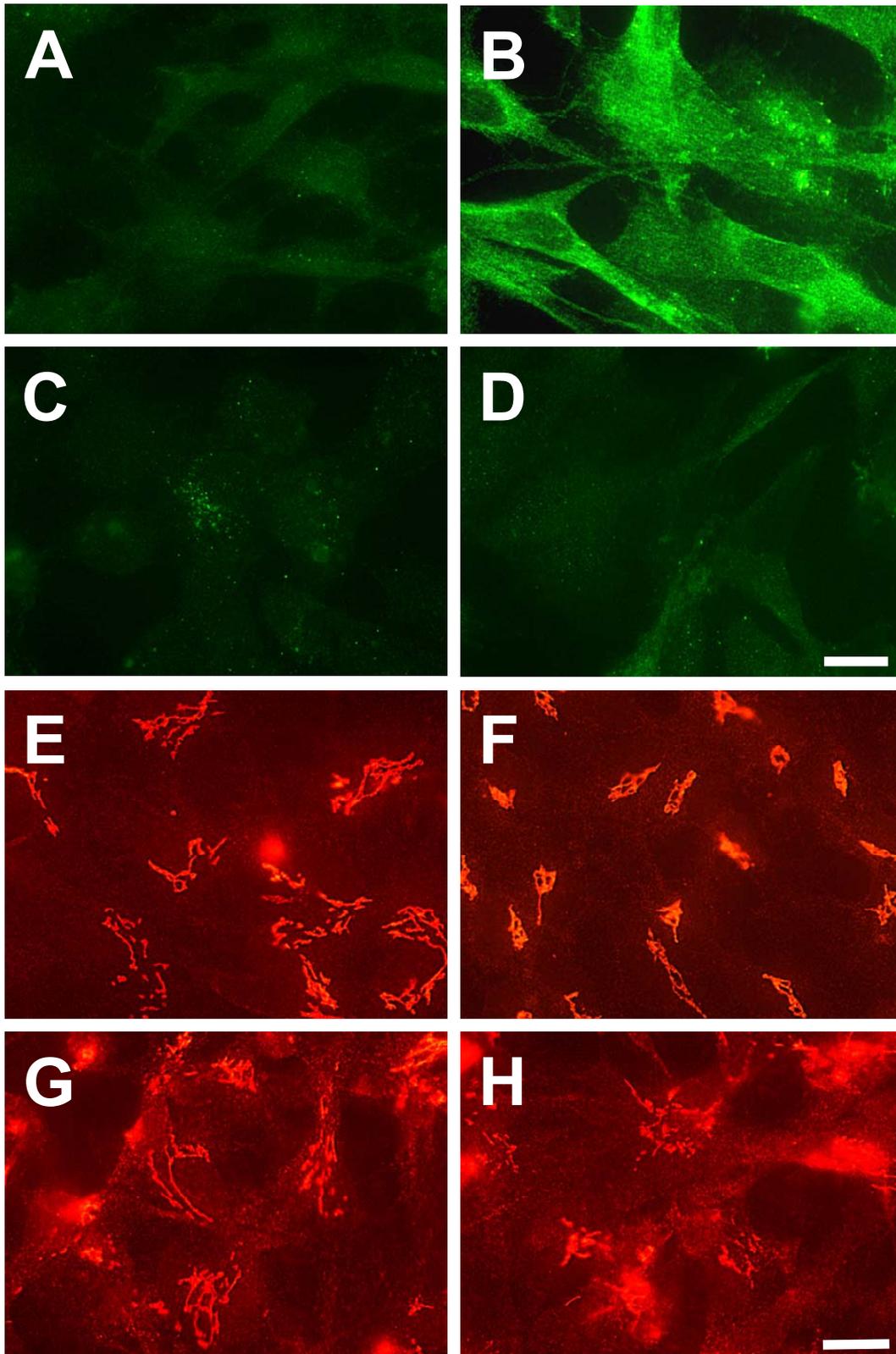


Abb. 32: Immuncytochemische Anfärbung einer 10 d alten APK gegen Ferritin (**A-D**, grün) und einer 13 d alten APK gegen TfR (**E-H**, rot) nach Inkubation in Kulturmedium (**A,E**), bzw. in Kulturmedium mit 100 μ M FAC (**B,F**), 1 mM DFX (**C,G**) oder 100 μ M FAC plus 1 mM DFX (**D,H**) für 24 h (**A-D**) bzw. 48 h (**E-H**). Die Balken in D (gilt für A-D) und H (gilt für E-H) entsprechen jeweils 20 μ m.

gehaltenes führte (Abb. 29B), war im *Western Blot* bereits nach 8 h eine erhöhte Bandenintensität für TfR im Vergleich zu unbehandelten Zellen nachweisbar (Abb. 30C). Die Intensität der TfR-Bande stieg bei Inkubation von APKs mit DFX über einen Zeitraum von 72 h Inkubation kontinuierlich an. Die immunocytochemische Anfärbung von TfR nach 48 h Inkubation von APKs mit 1 mM DFX zeigte ebenfalls ein verstärktes Signal (Abb. 32G) im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 32E). Gleiches galt für die Inkubation der Zellen mit DFX plus FAC (Abb. 32H).

Um den Effekt von DFX auf das Vorkommen von Ferritin in Astrogliazellen zu untersuchen, wurden APKs für 24 h mit 1 mM DFX inkubiert. Die *Western Blot*-Analyse von APK-Homogenaten zeigte eine Verringerung der schwachen Bandenintensität von Ferritin nach DFX-Inkubation der Zellen (Abb. 30D, dritte Bahn) im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 30D, erste Bahn). Die Reduktion des Ferritingehalts war auch zu erkennen, wenn APKs für 24 h mit DFX und FAC inkubiert wurden (Abb. 30D, vierte Bahn). Die Steigerung des Ferritinsignals durch FAC-Inkubation der Zellen für 24 h (Abb. 30D, zweite Bahn) wurde also durch gleichzeitige Inkubation mit einem Überschuss von DFX vollständig verhindert. Dieses Ergebnis wurde durch immunocytochemische Anfärbungen bestätigt. Die Inkubation von APKs mit DFX (1 mM) bzw. mit DFX (1 mM) plus FAC (100 μ M; Abb. 32C,D) führte zu keiner deutlichen Veränderung der Anfärbung der Zellen für Ferritin im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 32A), jedoch wurde die verstärkte Ferritinanfärbung der Zellen nach Inkubation mit FAC (Abb. 32B) durch gleichzeitige Inkubation mit DFX vollständig verhindert (Abb. 32D).

3.5.3 Einfluss von Cycloheximid

Um zu untersuchen, ob die Zunahme des Ferritingehalts während der Inkubation von APKs mit FAC auf Proteinbiosynthese beruht, wurden APKs während der Inkubation mit FAC (100 μ M) gleichzeitig mit CHX (10 μ M) behandelt, um die Proteinbiosynthese zu verhindern. Zunächst wurde durch AAS untersucht, ob bei Inkubation der Zellen mit CHX und/oder FAC Eisen aufgenommen wurde. Der Eisengehalt der Zellen nach Inkubation von APKs mit FAC für 24 h war etwas höher als bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit FAC und CHX (Abb. 33). Dennoch war der zelluläre Eisengehalt CHX-behandelter APKs durch Gabe von FAC verdoppelt worden (Abb. 33).

Abb. 34A zeigt den Einfluss von CHX auf die Synthese von Ferritin in APKs bei gleichzeitiger 24-stündiger Inkubation der Zellen mit FAC (100 μM) für durch *Western Blot*-Analyse eines nativen Gels. Durch Behandlung von APKs mit CHX wurde die FAC-vermittelte Steigerung der Ferritinmenge (Abb. 35A, zweite Bahn) vollständig verhindert (Abb. 35A, vierte Bahn). CHX alleine verursachte keine Veränderung des Signals für Ferritin im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 35A, vergleiche erste und dritte Bahn). Zusätzlich zur *Western Blot*-Analyse wurde eine Eisenfärbung des nativen Gels durchgeführt. Dabei konnte trotz erhöhten Eisengehalts der APKs nach Inkubation mit FAC und CHX für 24 h (Abb. 33) kein erhöhter Gehalt von Eisen in Ferritin im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden (Abb. 35B, vergleiche erste und dritte Bahn).

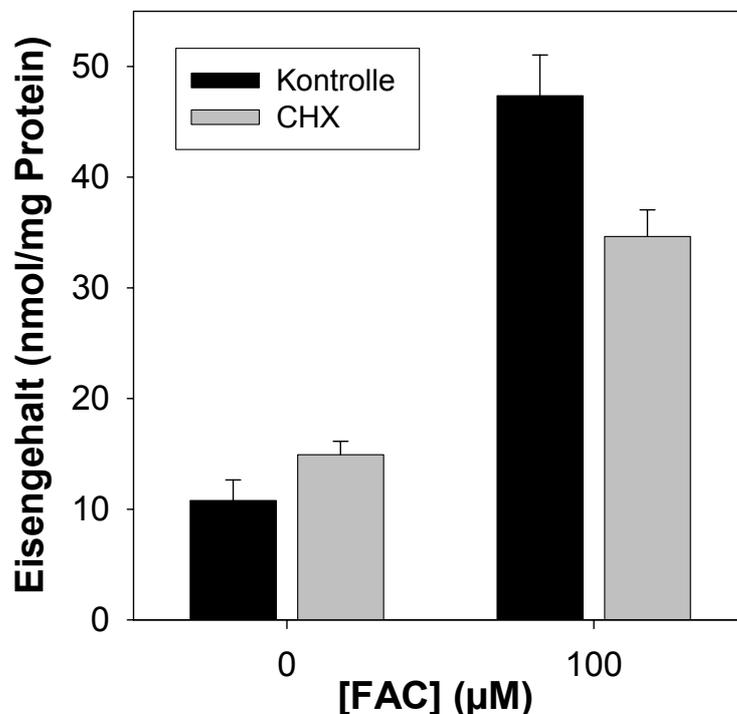
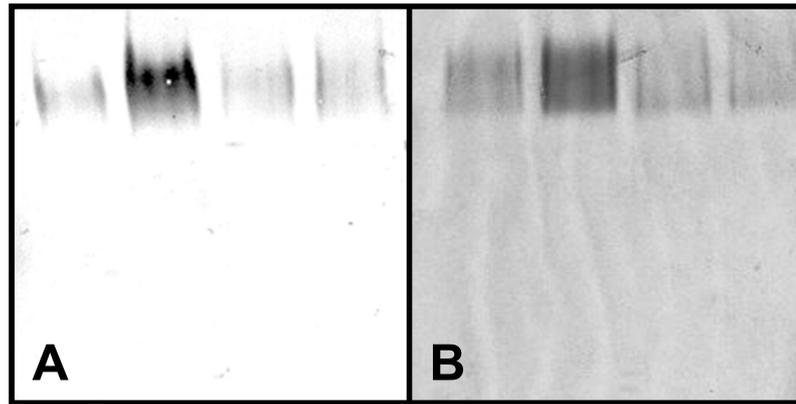


Abb. 33: Einfluss von CHX auf den Eisengehalt von APKs. Die Zellen wurden für 24 h in Kulturmedium oder in Kulturmedium mit 100 μM FAC, 10 μM CHX oder FAC (100 μM) plus CHX (10 μM) inkubiert. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SD von 6 Messungen aus zwei unabhängigen Experimenten, die an einer 15 d und einer 18 d alten Kultur durchgeführt wurden. Der Proteingehalt der Kulturen betrug 1.1 ± 0.2 mg pro 50 mm-Zellkulturschale.



FAC	-	+	-	+	-	+	-	+
CHX	-	-	+	+	-	-	+	+

Abb. 34: *Western Blot*-Analyse für Ferritin (A) und Eisenfärbung (B) eines nativen Gels nach Auftrennung von Lysatüberständen einer 15 d alten APK, die 24 h lang in Kulturmedium mit FAC (100 μ M) und/oder CHX (10 μ M) inkubiert wurde. Für die Auftrennung wurden 6%ige native Gele verwendet. Für die *Western Blot*-Analyse wurden 30 μ g Protein, für die Eisenfärbung im Gel 20 μ g Protein pro Tasche aufgetragen.

Eine potentiell protektive Wirkung der Synthese von Ferritin nach Eiseninkubation gegen eisenvermittelte Toxizität wurde durch Messung der LDH-Freisetzung überprüft. APKs wurden dazu bis zu 48 h lang mit FAC (100 μ M) und/oder CHX (10 μ M) inkubiert. Während die Inkubation der Zellen mit CHX keinen Einfluss auf ihre Vitalität hatte, kam es bei Inkubation der Zellen mit FAC zu einem geringen Anstieg der LDH-Freisetzung während der ersten 8 h (Abb. 35). Längere Inkubationsdauer führte nicht zu einem weiteren Anstieg der LDH-Freisetzung nach FAC-Gabe. Im Gegensatz dazu führte gleichzeitige Inkubation der Zellen mit FAC und CHX zu einem kontinuierlichen Anstieg an extrazellulärer LDH (Abb. 35). Nach 24 h Inkubation waren unter dieser Bedingung bereits $57 \pm 17\%$ der zellulären LDH im Medium nachweisbar (Abb. 35).

Um zu untersuchen, ob die erhöhte LDH-Freisetzung aus FAC-behandelten Astrogliazellen auf eisenvermittelte Bildung von RSS zurückzuführen ist, wurden APKs nach 4, 8 und 24 h Inkubation mit 100 μ M FAC und/oder 10 μ M CHX mit Dihydrorhodamin 123 (DRH123) inkubiert, um das Vorhandensein von Radikalen nachzuweisen. DRH123 wird durch Radikale zum fluoreszierenden Rhodamin 123 (RH123) oxidiert (Royall und Ischiropoulos 1993).

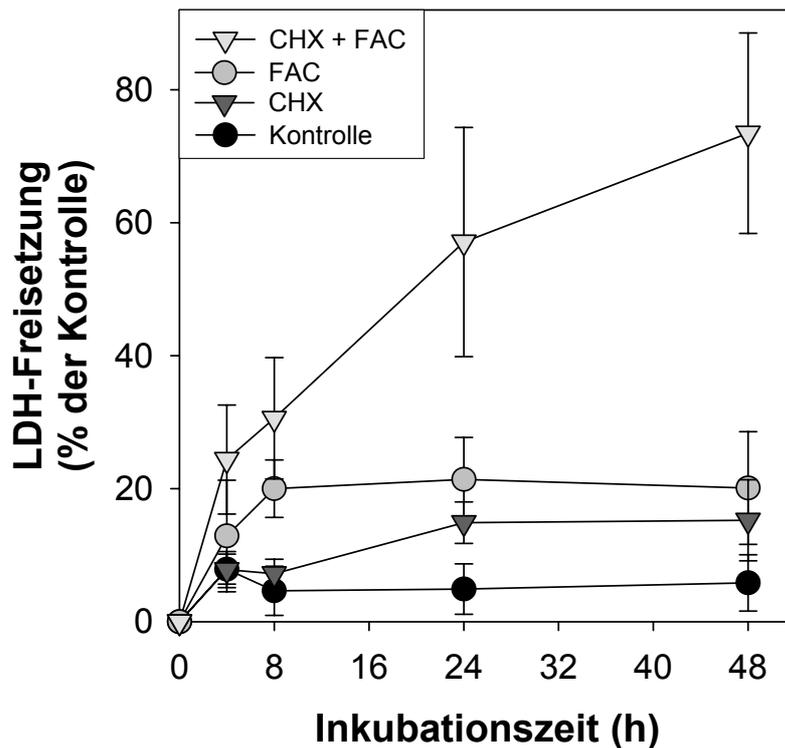


Abb. 35: LDH-Freisetzung bei Inkubation von APKs in Kulturmedium ohne oder mit FAC (100 μ M), CHX (10 μ M) oder FAC (100 μ M) plus CHX (10 μ M) für bis zu 48 h in Kulturmedium. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD einer Dreifachbestimmung. Der Proteingehalt der 16 d alten APK betrug 116 ± 10 μ g pro well einer 24-well-Zellkulturplatte.

Unter Kontrollbedingungen ohne FAC und CHX war allenfalls eine schwache Fluoreszenz der Zellen nach DRH123-Gabe zu erkennen (Abb. 36A-C). Das Gleiche galt für die Inkubation der Zellen mit CHX (Abb. 36G-I). Wurden die Zellen jedoch für 4 h mit 100 μ M FAC inkubiert, kam es nach Gabe von DRH123 zu einer starken Fluoreszenz-Anfärbung der Zellen (Abb. 36D). Nach längerer (8 h bzw. 24 h) Inkubation von APKs mit FAC war jedoch keine RH123-Fluoreszenz mehr zu erkennen (Abb. 36E,F). Dieser Befund deutet auf das transiente Vorkommen von Radikalen in Zellen von APKs in den ersten 4 bis 8 h der Inkubation mit FAC hin. Nach Inkubation der Zellen mit FAC und CHX und anschließender DRH123-Inkubation war zu allen Zeitpunkten eine intensive zelluläre Fluoreszenz sichtbar (Abb. 36J-L), was auf eine kontinuierliche Produktion von Radikalen unter diesen Bedingungen hinweist.

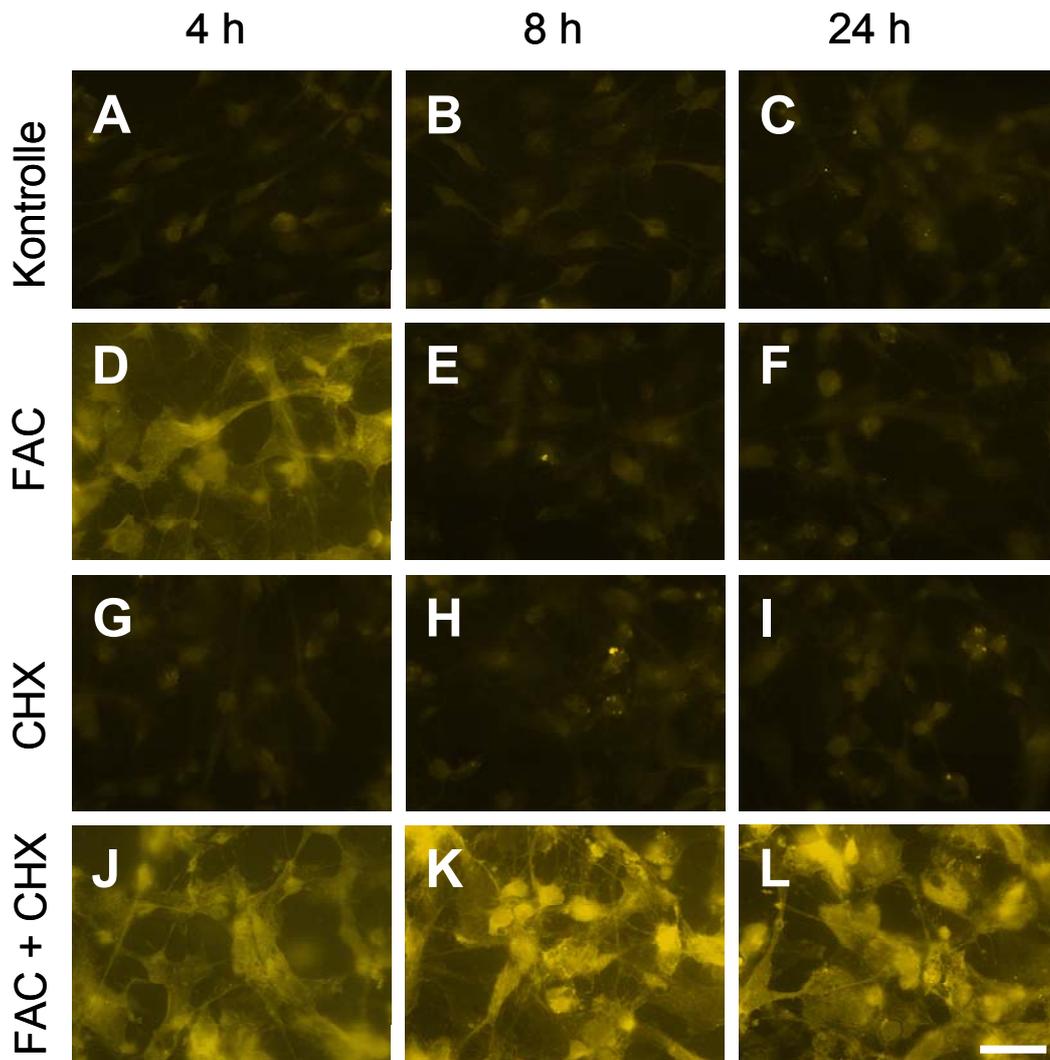


Abb. 36: Rhodamin 123-Anfärbung einer 10 d alten APK nach Inkubation für 4 h, 8 h oder 24 h in Kulturmedium (**A-C**) bzw. in Kulturmedium mit 100 μ M FAC (**D-F**), 10 μ M CHX (**G-I**) oder 100 μ M FAC plus 10 μ M CHX (**J-L**). Der Balken in L entspricht einer Länge von 50 μ m und gilt für alle Teilabbildungen.

3.6 Histochemische Anfärbungen von Eisen und Proteinen des Eisenstoffwechsels in Gehirnschnitten der Ratte

Das Vorkommen von Eisen, Ferritin, TfR und Transferrin wurde in neuronalen Zellen *in vivo* durch histochemische Anfärbungen von Hirnschnitten untersucht, die aus drei Wochen alten Ratten präpariert wurden. Für die Untersuchungen wurden zwei Gehirnregionen ausgewählt. Zum einen wurde das oligodendrocytenreiche *Corpus Callosum* untersucht. Zum anderen wurde der parietale Cortex analysiert, in dem vor allem Neuronen, Astrocyten und Microgliazellen aber weniger Oligodendrocyten zu finden sind.

Die Verteilung von Eisen in den untersuchten Gehirnregionen ist in Abb. 37A-D dargestellt. Typisch für die Verteilung von Eisen im parietalen Cortex war das Auftreten von Anhäufungen eisenpositiver Zellen (Abb. 37A, Pfeil). Solche Anhäufungen traten im gesamten Cortex auf. Außerdem wurden auch einzelne eisenpositive Zellen nachgewiesen. Bei höherer Vergrößerung war zu erkennen, dass die eisenpositiven Zellen mehrere primäre Fortsätze aufwiesen (Abb. 37B, Pfeile). Ob auch sekundäre Fortsätze angefärbt wurden, war auf Grund der Dicke der Schnitte nicht zu erkennen. Abb. 37C zeigt ein Übersichtsbild der Verteilung von Eisen im *Corpus Callosum*. In diesem Bereich war eine Vielzahl eisenpositiver Zellen zu erkennen, die mit unterschiedlicher Intensität angefärbt waren. Besonders viele eisenpositive Zellen befanden sich im Bereich der beiden Lateralventrikel (Abb. 37C, Pfeil). Eine große Anzahl von Zellen war nur schwach für Eisen angefärbt. Teilweise traten diese Zellen dabei in Ketten angeordnet auf (Abb. 37C, Pfeilspitzen). Bei 80-facher Vergrößerung (Abb. 37D) war zu erkennen, dass sich die unterschiedlich stark gefärbten Zellen auch in Ihrer Morphologie unterschieden. Die intensiv gefärbten Zellen (Abb. 37D, Pfeil) ähnelten in ihrer Größe und ihrer Morphologie den eisenpositiven Zellen, die auch im parietalen Cortex sichtbar waren (Abb. 37B, Pfeile). Die schwächer angefärbten Zellen waren dagegen wesentlich kleiner und besaßen dünnere Fortsätze, die zumeist vertikal oder horizontal zum Zellkörper verliefen (Abb. 37D, Pfeilspitze).

Die immunhistochemischen Anfärbungen gegen das Eisenspeicherprotein Ferritin (Abb. 37E-H) zeigten ein ähnliches Verteilungsmuster wie die Eisenfärbungen (Abb. 37A-D). Auch hier waren im parietalen Cortex Anhäufungen von Zellen zu finden, die ferritinpositiv waren (Abb. 37E, Pfeil). Die Morphologie dieser Zellen entsprach der Morphologie der eisenpositiven Zellen im parietalen Cortex (Abb. 37B, Pfeile). Es waren aber auch andere ferritinpositive Zellen zu erkennen, die wesentlich kleiner waren, und keine sichtbaren Fortsätze besaßen (Abb. 37F, Pfeilspitze). Im *Corpus Callosum* waren ferritinpositive Zellen sichtbar, die entweder einzeln (Abb. 37H, Pfeilspitze) oder in Ketten angeordnet auftraten (Abb. 37G,H, Pfeile). Fortsätze waren teilweise nur schwach angefärbt (Abb. 37H, Pfeilspitze).

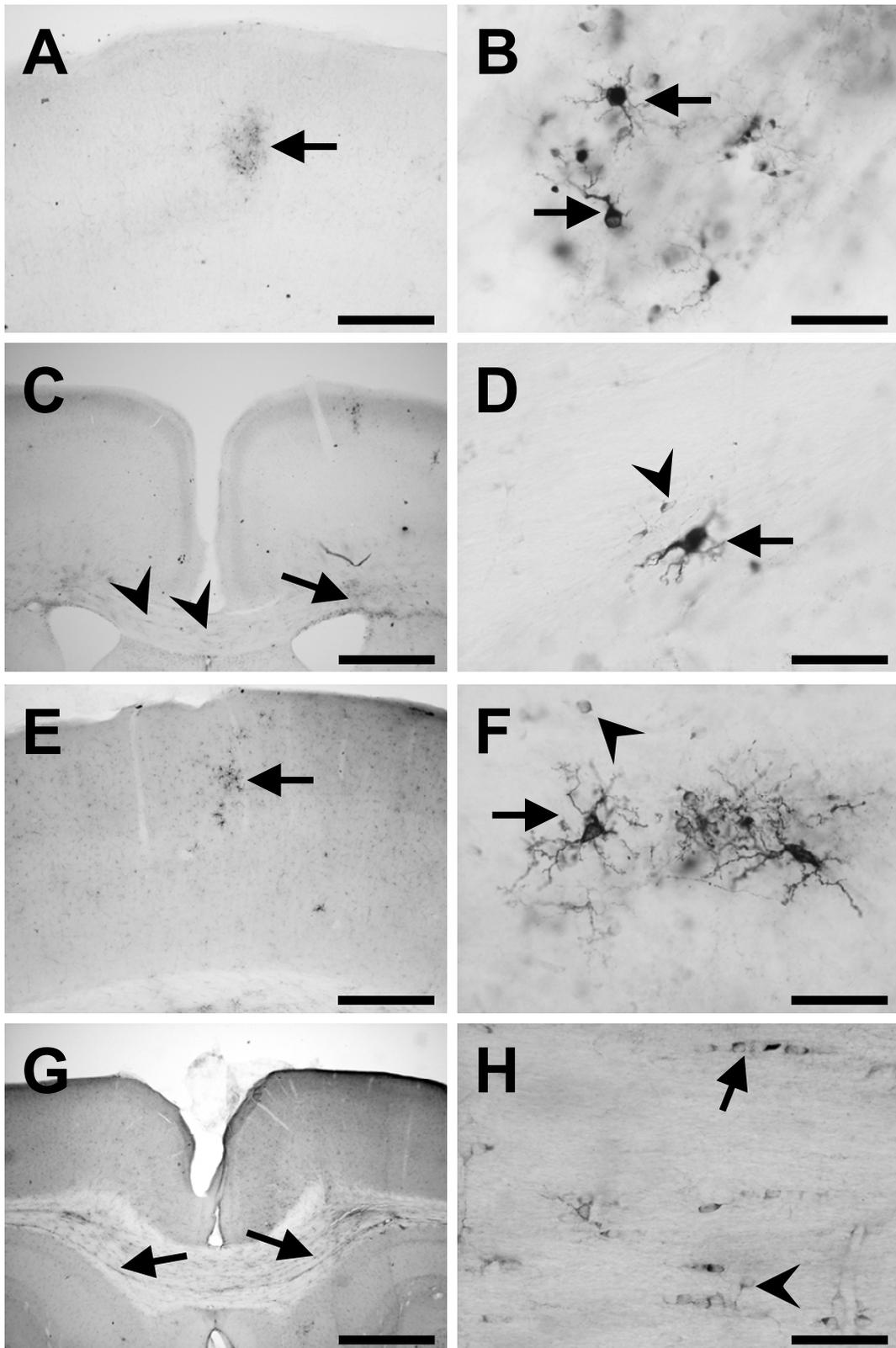


Abb. 37: Histochemische Anfärbung von Eisen (A-D) und Ferritin (E-H) im parietalen Cortex (A,B und E,F) und im *Corpus Callosum* (C,D und G,H) einer 3 Wochen alten Ratte. Die Balken in den Teilabbildungen entsprechen Längen von 1 mm (A,E), 0.5 mm (C,G) und 50 μ m (B,D,F,H).

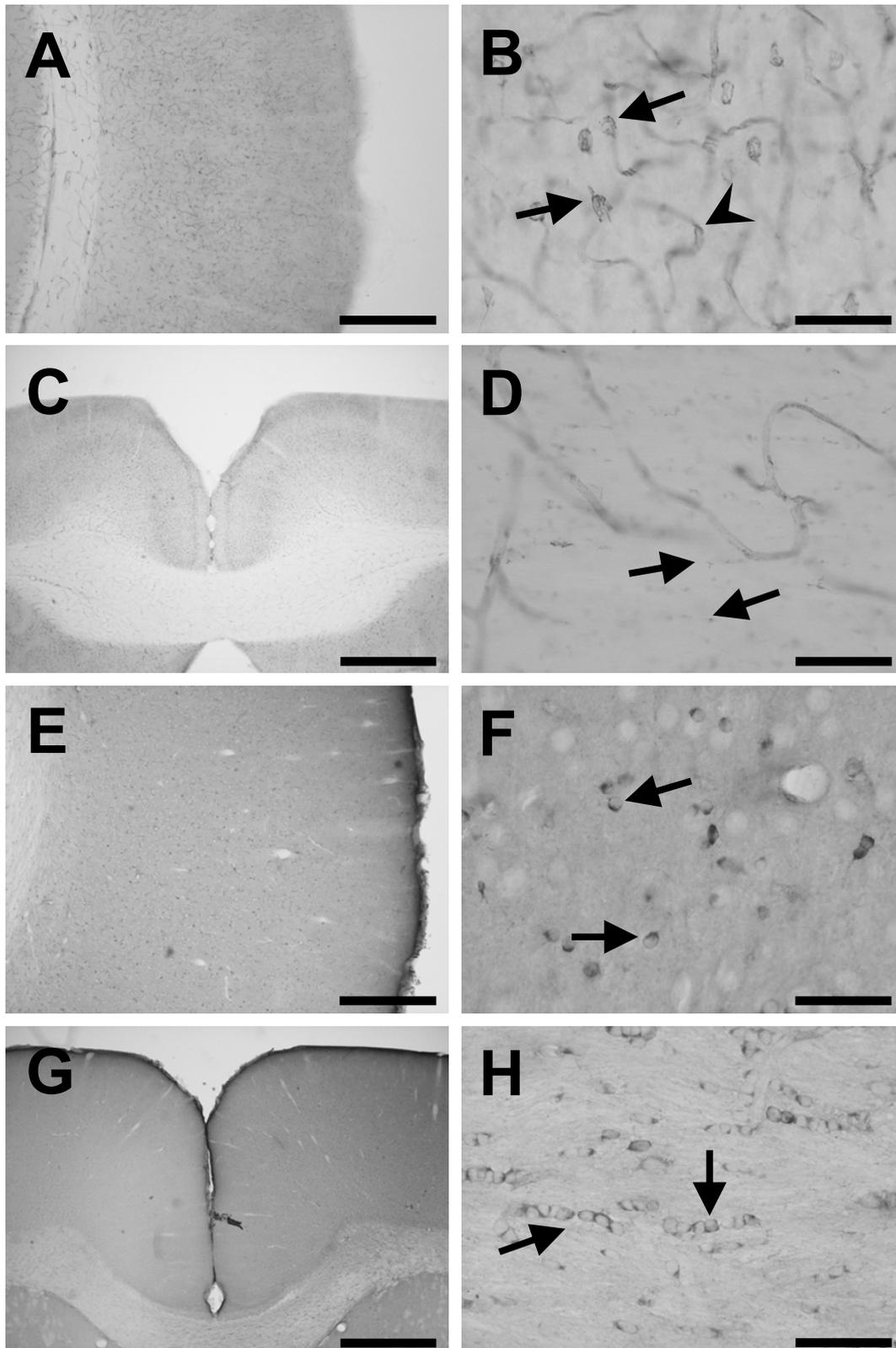


Abb. 38: Immunhistochemische Anfärbung von TfR (A-D) und Transferrin (E-H) im parietalen Cortex (A,B und E,F) und im *Corpus Callosum* (C,D und G,H) einer 3 Wochen alten Ratte. Die Balken in den Teilabbildungen entsprechen Längen von 1 mm (A,E), 0.5 mm (C,G) und 50 μ m (B,D,F,H).

Die immunhistochemische Anfärbung von Gehirnschnitten für TfR zeigte vor allem gefärbte Blutkapillaren, aber auch positive Zellen, die über den gesamten Cortex verteilt waren (Abb. 38A). Bei höherer Vergrößerung waren lamellenartige oder punktförmige Anfärbungen zu erkennen (Abb. 38B, Pfeile). Es waren keine Zellfortsätze angefärbt. Gelegentlich gab es TfR-positive Zellen, die mit Blutkapillaren assoziiert waren (Abb. 38B, Pfeilspitze). Im *Corpus Callosum* waren ebenfalls viele gefärbte Blutgefäße zu erkennen (Abb. 38D). Weitere TfR-positive Zellen waren nicht vorhanden (Abb. 38C,D).

Die Anfärbungen gegen Transferrin zeigten im parietalen Cortex eine gleichmäßige Verteilung positiver Zellen (Abb. 38E). Bei höherer Vergrößerung wurden kleine runde Zellen sichtbar, die transferrinpositiv waren (Abb. 38F, Pfeile). Zellfortsätze waren an diesen Zellen nicht zu erkennen. Im *Corpus Callosum* gab es viele transferrinpositive Zellen, die häufig in Reihe angeordnet waren (Abb. 38H, Pfeile). Fortsätze dieser Zellen waren jedoch nicht angefärbt.

3.7 Peroxidengiftung und Eisentoxizität in Astrogliakulturen von Wildtyp- und Glutathionperoxidase 1-defizienten Mäusen

GPx sind für die Entgiftung von H_2O_2 durch das Glutathionsystem erforderlich. Durch die Verfügbarkeit von GPx1(-/-)-Mäusen konnte die Auswirkung des Fehlens von GPx1 auf die Fähigkeit von Astrogliazellen zur Entgiftung von exogenem H_2O_2 untersucht werden. Weiterhin wurde der Einfluss von exogenem H_2O_2 auf die Vitalität von APKs aus Wildtyp- und GPx1(-/-)-Mäusen miteinander verglichen sowie der Einfluss einer Vorinkubation mit DFX auf die Vitalität der Zellen nach Peroxidgabe untersucht.

Die Untersuchungen an APKs aus GPx1(-/-)-Mäusen konnten für die vorliegende Arbeit nur an einer Kultur durchgeführt werden, da nur ein Mauswurf dieser Mäuse zur Verfügung gestellt wurde. Alle hier beschriebenen Ergebnisse wurden aber mittlerweile von Jeff Liddell im Labor von Prof. Stephen S. Robinson (Monash University, Australien) an mehreren GPx1(-/-)-APKs bestätigt.

3.7.1 Wasserstoffperoxidentgiftung und Peroxidtoxizität

Die Fähigkeit von APKs aus Wildtyp- und GPx1(-/-)-Mäusen zur Entgiftung von exogen appliziertem H₂O₂ wurde durch Messung der H₂O₂-Konzentration im Medium nach Zugabe von 100 µM H₂O₂ zu den Zellen bestimmt. Für APKs beider Mauslinien nahm die extrazelluläre Konzentration von H₂O₂ schnell ab (Abb. 39). Die Abnahme erfolgte nach einer Kinetik 1. Ordnung, wie an der Linearität der semilogarithmischen Darstellung zu erkennen ist (Abb. 39, kleine Teilabbildungen). Die aus den Halbwertzeiten von H₂O₂ und den Proteingehalten der Kulturen berechneten spezifischen Entgiftungsgeschwindigkeitskonstanten D (Dringen *et al.* 1999a) waren für unbehandelte APKs aus Wildtyp- und GPx1(-/-)-Mäusen nahezu identisch (Tabelle 5). Drei Stunden nach Beginn der Inkubation mit 100 µM H₂O₂ war bei beiden APKs allenfalls geringe LDH-Freisetzung nachweisbar (Tabelle 5).

Um den Einfluss des Glutathionsystems und der Catalase auf die Entgiftung von H₂O₂ in Astrogliazellen von Wildtyp- oder GPx1(-/-)-Mäusen zu untersuchen, wurden APKs aus diesen Mäusen vor der Inkubation mit 100 µM H₂O₂ entweder für 24 h mit 1 mM BSO zur Senkung des Glutathiongehaltes oder für 2 h mit 10 mM 3AT zur Hemmung der Catalase vorinkubiert. BSO-Vorinkubation verringerte den zellulären GSx-Gehalt von Wildtyp- bzw. GPx1(-/-)-APKs auf 16% bzw. 12% des Ausgangsgehalts (Tabelle 6). 3AT-Behandlung führt zur vollständigen Inaktivierung der Catalase in APKs (Dringen und Hamprecht 1997).

Vorinkubation von Wildtyp-APKs mit BSO oder 3AT führte zu einer erhöhten Halbwertzeit für H₂O₂ im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 39A, Tabelle 5). Entsprechend waren die D-Werte in BSO- oder 3AT-vorinkubierten Wildtyp-APKs signifikant geringer als in unbehandelten Wildtyp-APKs (Tabelle 5). In APKs von GPx1(-/-)-Mäusen hatte die Vorinkubation der Zellen mit BSO keinen Einfluss auf die Entgiftungsgeschwindigkeit von H₂O₂, während 3AT-Vorinkubation eine sehr deutliche Reduktion der Entgiftungsgeschwindigkeit verursachte (Abb. 39B, Tabelle 5). Vorinkubation mit BSO und anschließende Inkubation mit H₂O₂ für 3 h führte bei beiden APKs zu einer erhöhten LDH-Freisetzung, während Vorinkubation mit 3AT und anschließende H₂O₂-Inkubation nur die Vitalität von APKs aus GPx1(-/-)-Mäusen stark reduzierte (Tabelle 5). Unter dieser Bedingung wurde 74% der Gesamt-LDH-Aktivität im Inkubationsmedium gemessen (Tabelle 5).

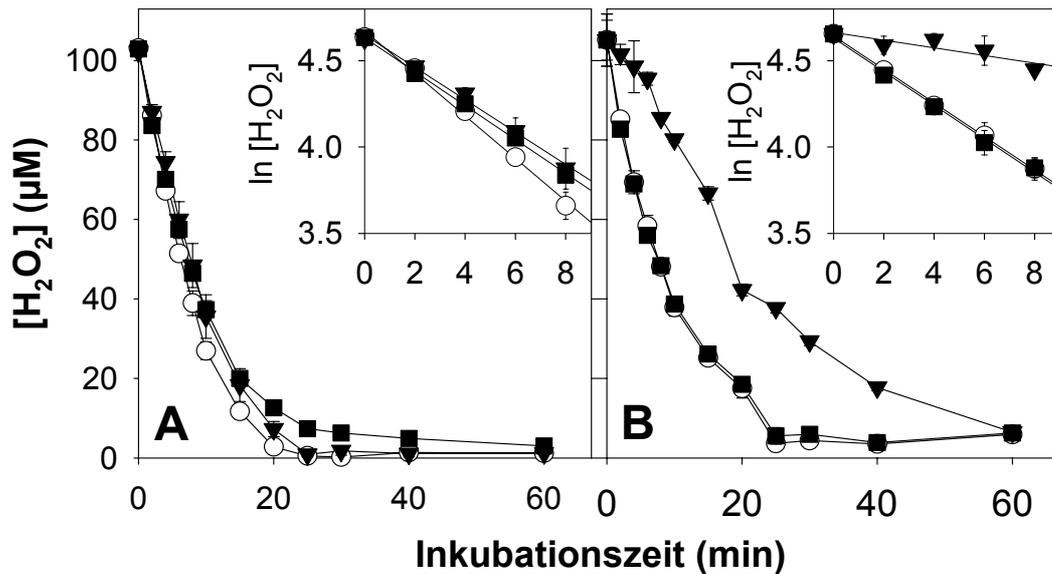


Abb. 39: Entgiftung von exogenem H_2O_2 durch 15 d alte APKs aus Wildtyp-**(A)** und GPx1(-/-)-Mäusen **(B)**. Die Zellen wurden entweder für 24 h in Kulturmedium ohne oder mit BSO (1 mM), bzw. für 2 h mit 3AT (10 mM) vorinkubiert. Die inserierten Teilabbildungen zeigen die semi-logarithmische Darstellung der Daten der Hauptabbildung für die ersten 8 min. Der Proteingehalt der APKs betrug $91 \pm 2 \mu\text{g}$ (Wildtyp) und $61 \pm 6 \mu\text{g}$ (GPx1(-/-)) pro well.

Um zu untersuchen, ob die H_2O_2 -Toxizität mit der durch Eisen verursachten Bildung hochreaktiver Hydroxylradikale im Zusammenhang steht, wurden APKs von Wildtyp- und GPx1(-/-)-Mäusen nach der BSO-Inkubation bzw. während der 3AT-Inkubation und vor der H_2O_2 -Inkubation für 2 h mit dem Eisenchelator DFX inkubiert. Dadurch sollte freies Eisen cheliert und die Bildung von Hydroxylradikalen durch die Fenton-Reaktion verhindert werden. Inkubation beider Kulturen mit DFX alleine oder in Kombination mit BSO oder 3AT hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Halbwertszeit von H_2O_2 oder die D-Werte (Tabelle 5). Hingegen hatte die Vorinkubation mit DFX bei anschließender Inkubation mit H_2O_2 einen großen Einfluss auf die Vitalität der Zellen. So konnte sowohl die durch BSO-Vorinkubation verursachte Toxizität von H_2O_2 in beiden APKs sowie die hohe LDH-Freisetzung 3AT-vorinkubierter APKs aus GPx1(-/-)-Mäusen nach H_2O_2 -Applikation vollständig verhindert werden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Halbwertzeiten und D-Werte der H₂O₂-Entgiftung sowie LDH-Freisetzung von Maus-APKs**Wildtyp**

Behandlung	ohne DFX				mit DFX			
	Halbwertzeit (min)	D (min ⁻¹ mg ⁻¹)	LDH (%)	n	Halbwertzeit (min)	D (min ⁻¹ mg ⁻¹)	LDH (%)	n
Kontrolle	5.4 ± 0.5	2.44 ± 0.88	8 ± 3	15(9)*	5.4 ± 0.5	1.89 ± 0.40	5 ± 3	9
BSO	6.9 ± 0.9	1.49 ± 0.12 ^a	25 ± 5 ^a	9	6.1 ± 0.3	1.52 ± 0.17	6 ± 4 ^b	6
3AT	8.2 ± 1.0 ^a	1.20 ± 0.11 ^a	7 ± 3	9	7.0 ± 0.5	1.45 ± 0.04	4 ± 3	6

GPx1(-/-)

Behandlung	ohne DFX				mit DFX			
	Halbwertzeit (min)	D (min ⁻¹ mg ⁻¹)	LDH (%)	n	Halbwertzeit (min)	D (min ⁻¹ mg ⁻¹)	LDH (%)	n
Kontrolle	7.1 ± 0.6	2.35 ± 0.18	10 ± 2	9(3)*	7.0 ± 0.2	2.31 ± 0.05	6 ± 4	3
BSO	7.5 ± 0.9	2.22 ± 0.11	39 ± 10	3	7.3 ± 0.7	2.31 ± 0.06	10 ± 7	3
3AT	22.3 ± 1.2 ^a	0.76 ± 0.01 ^a	74 ± 3 ^a	3	19.6 ± 1.4 ^a	0.89 ± 0.10 ^a	11 ± 2 ^b	3

eine 2-stündige Vorinkubation ohne oder mit 3AT (10 mM) und/oder DFX (2 mM). Keine der beschriebenen Vorinkubationen führte zu einer erhöhten LDH-Freisetzung während der Vorinkubation (Daten nicht gezeigt) Nach der jeweiligen Vorinkubation wurden die Zellen mit H₂O₂ (100 µM) inkubiert, wobei zu verschiedenen Zeitpunkten die H₂O₂-Konzentrationen im Medium gemessen wurde. Aus den Daten wurden die Halbwertzeiten für H₂O₂ und die D-Werte berechnet. Die LDH-Freisetzung wurde 3 h nach Gabe des H₂O₂ bestimmt. n gibt die Anzahl der gemessenen Einzeldaten an. *Bei den Kontrollen bezieht sich die n-Zahl in Klammern nur auf die Anzahl der gemessenen Werte für die LDH-Freisetzung. Alle mit dem Buchstaben a gekennzeichneten Werte sind signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle. Alle mit dem Buchstaben b gekennzeichneten Werte sind signifikant verschieden von der entsprechenden Bedingung ohne DFX. Die Statistik wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test gefolgt von *Dunn's Multiple Comparison Test* durchgeführt.

3.7.2 Glutathiongehalt und Glutathionoxidation

Um zu untersuchen, ob sich ein Fehlen der GPx1 auf den GSx-Gehalt von APKs auswirkt, wurden die Mengen an GSx in APKs von Wildtyp- und GPx1(-/-)-Mäusen miteinander verglichen. Es konnte kein Unterschied im spezifischen GSx-Gehalt zwischen diesen Kulturen festgestellt werden (Tabelle 6). Der Gehalt an GSSG in APKs beider Mauslinien lag unter der Nachweisgrenze des eingesetzten Tests (<1% des GSx-Gehaltes). Bei einer Vorinkubation von APKs mit BSO für 24 h kam es in den Kulturen beider Mauslinien zu einer deutlichen Verringerung des GSx-Gehalts (Tabelle 6). Im Gegensatz dazu beeinflusste eine Vorinkubation beider APKs mit 3AT (2 h, 10 mM), DFX (2 h, 2 mM) oder die Kombination dieser Substanzen den GSx-Gehalt in Wildtyp-APKs nicht (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 6: GSx-Gehalt in APKs von Wildtyp- und GPx1(-/-)-Mäusen

Kultur	GSx-Gehalt (nmol/mg Protein)			
	Kontrolle	n	24 h BSO	n
Wildtyp	62 ± 15	15	10 ± 3	6
GPx1(-/-)	67 ± 6	9	8 ± 2	6

Die GSx-Gehalte von APKs vor oder nach 24-stündiger Inkubation in Kulturmedium mit 1 mM BSO wurden aus vier (Wildtyp, Kontrolle), zwei (Wildtyp, BSO), zwei (GPx1(-/-), Kontrolle) bzw. einem Experiment (GPx1(-/-), BSO) bestimmt. n gibt die Summe der Einzeldaten aller Experimente einer Versuchsgruppe an.

Um zu untersuchen, ob GSH in APKs durch Zugabe von H₂O₂ oxidiert werden kann, wurden APKs beider Mauslinien mit H₂O₂ (100 µM) inkubiert und der Gehalt von GSSG nach 0 min, 2 min, 5 min und 15 min gemessen. In APKs von Wildtyp-Mäusen war nach Peroxidzugabe ein deutlicher Anstieg von GSSG zu beobachten (Abb. 40). In Proben, die nach 2 min Inkubation gewonnen wurden, waren über 50% des GSx als GSSG nachweisbar. Im Gegensatz dazu unterblieb in APKs von GPx1(-/-)-Mäusen der GSSG-Anstieg nach Peroxidgabe (Abb. 40).

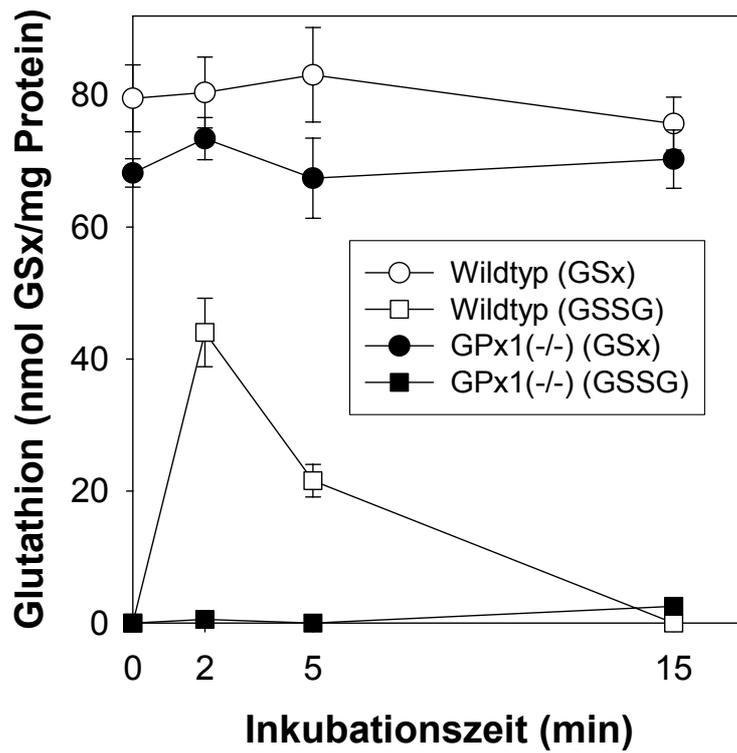


Abb. 40: Gesamtglutathion (GSx) und GSSG in APKs aus Wildtyp- und GPx1(-/-)-Mäusen während einer Inkubation mit 100 μM H₂O₂ in Inkubationspuffer. Der Proteingehalt der 17 d alten Wildtyp-APK betrug 102 ± 5 μg pro *well*. Die 18 d alte GPx1(-/-)-APK hatte einen Proteingehalt von 103 ± 8 μg Protein pro *well*.

4 Diskussion

Um den Eisenstoffwechsel neuraler Zellen untersuchen zu können, wurden Zellkulturen verwendet, die für Astrogliazellen, Microgliazellen, Oligodendrogliazellen oder Neuronen angereichert waren. Diese Zellkulturen wurden nach etablierten Methoden gewonnen (APKs: Hamprecht und Löffler 1985; MSKs: Hirrlinger *et al.* 2000; OSKs: Hirrlinger *et al.* 2002b; NPKs: Löffler *et al.* 1986). Morphologische Untersuchungen und immunocytochemische Anfärbungen zeigten, dass diese Kulturen stark mit dem jeweils zu erwartenden Zelltyp angereichert waren. Diese Ergebnisse bestätigen somit die Ergebnisse publizierter immunocytochemischer Anfärbungen (Löffler *et al.* 1986; Reinhart *et al.* 1990; Gutterer *et al.* 1999; Hirrlinger *et al.* 2000, 2002b).

4.1 Nachweismethoden für Eisen

Um den Eisenstoffwechsel neuraler Zellen zu untersuchen, wurden Methoden zum quantitativen und qualitativen Nachweis von Eisen in Zellkulturen etabliert. Die AAS-Bestimmung von Eisen wurde erfolgreich zur quantitativen Eisenbestimmung angewendet. Da diese Methode bei großen Mengen an zu messenden Proben sehr zeitaufwendig war und das Messgerät nicht jederzeit zur Verfügung stand, wurde eine kolorimetrische Methode etabliert, die auf der eisenchelierenden Fähigkeit von Ferrozin basiert. Die Ferrozinmethode erlaubte den Nachweis von Eisenmengen bis zu 30 nmol in einem Absorptionsbereich bis maximal 2.0. In diesem Bereich war der Anstieg der Absorption des Eisen(II)-Ferrozin-Komplexes proportional zur eingesetzten Eisenmenge. Der errechnete Extinktionskoeffizient für 550 nm betrug $26.98 \pm 0.96 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und stimmte damit sehr genau mit dem publizierten Extinktionskoeffizienten von $27.9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Berlett *et al.* 2001) bei 562 nm überein. Für den optimalen Nachweis von Eisen war ein 3-facher Überschuss an Ferrozin im Verhältnis zu Eisen nötig, was bei einer Stöchiometrie von 3:1 (Ferrozin:Eisen, Carter 1971) den Erwartungen entspricht. Eisen(II)salze und Eisen(III)salze ließen sich mit der Ferrozinmethode gleichermaßen gut messen, da Fe^{3+} durch den großen Überschuss an Ascorbat im Reaktionsansatz vollständig zum durch Ferrozin chelierbaren Fe^{2+} reduziert wurde.

Mit Ausnahme von Kupfer hatten andere divalente Kationen keinen Einfluss auf die

Eisenbestimmung. Da die Eisenkonzentration in Astrogliazellen und im Gehirn wesentlich höher ist als die Kupferkonzentration (Tholey *et al.* 1988; Lovell *et al.* 1998), ist eine Störung der Eisenbestimmung in kultivierten Gehirnzellen durch Kupfer unwahrscheinlich.

Die Ferrozin-Methode zur Eisenbestimmung von APK-Lysaten wurde in Eppendorfgläsern oder direkt in den *wells* von *24-well*-Platten durchgeführt und mit der AAS-Bestimmung von Eisen validiert. Anwendung dieser drei Methoden zur Eisenbestimmung unbehandelter APKs und mit FAC inkubierter APKs führten zu identischen Werten der gemessenen zellulären Eisengehalte. Somit war eine geeignete Methode zur Bestimmung zellulärer Eisengehalte von Zellkulturen auf *24-well*-Platten etabliert worden. Diese Methode ermöglichte im Vergleich zur AAS-Bestimmung von Eisen bei großen Mengen an zu messenden Proben eine schnellere Durchführung der Messung und erlaubte dadurch einen höheren Probendurchsatz. Außerdem veränderte sich das Signal bei der AAS (Schreiberausschlag) im Vergleich zum Signal bei der Ferrozin-Methode (Absorption) nur in einem sehr engen Bereich linear mit der Eisenmenge, so dass zu messende Proben für die AAS häufig verdünnt werden mussten.

Zum Nachweis von Eisen in Zellkulturen mit zellulärer Auflösung wurde die von Nguyen-Legros *et al.* (1980) publizierte modifizierte Perls-Färbung für die Anwendung in kultivierten Zellen optimiert. Ohne die Bildung des Eisen-Ferrocyanid-Produktes im ersten Anfärbungsschritt kam es zu keiner Oxidation von DAB durch H_2O_2 und damit zu keiner Anfärbung der Zellen. Somit wurde die Spezifität dieser Reaktion für Eisen nachgewiesen. Damit stand eine geeignete Methode zum cytochemischen Nachweis von Eisen(III) zur Verfügung.

4.2 Eisengehalte neuraler Zellkulturen

Mit Hilfe der Ferrozin-Methode wurden die Eisengehalte neuraler Zellkulturen bestimmt. Der spezifische Eisengehalt unbehandelter APKs, die auf 50 mm-Zellkulturschalen gewachsen waren, betrug 9.8 ± 1.4 nmol Eisen/mg Protein. Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem durch AAS bestimmten Eisengehalt von APKs (7.6 ± 2.0 ; Riemer *et al.* 2004) und dem Gehalt anderer Astrogliaulturen überein (2.9 bis 9.6 nmol Eisen/mg Protein) (Xu *et al.* 1999), ist jedoch deutlich höher als die von

Thorburne und Juurlink (1999) mit der von Fish (1988) beschriebenen Ferrozin-Methode gemessenen Eisengehalte von Astrogliakulturen (<0.25 nmol Eisen/mg Protein). Unbehandelte NPKs und OSKs hatten ähnliche spezifische Eisengehalte wie APKs. Von den untersuchten neuronalen Zellkulturen hatten MSKs die höchsten spezifischen Eisengehalte. Der spezifische Eisengehalt unbehandelter OSKs betrug 18.2 ± 2.3 nmol Eisen/mg Protein und ist damit höher als Literaturdaten für oligodendrogliale Vorläuferzellen (3 nmol Eisen/mg Protein, Thorburne und Juurlink 1996; 1 nmol Eisen/mg Protein, Morath und Pröschel 2001). Im Unterschied zu Astrogliazellen und Oligodendrogliazellen wurden in der Literatur keine Daten für spezifische Eisengehalte kultivierter Microgliazellen und Neuronen gefunden. Die Diskrepanzen der beschriebenen Eisengehalte von Astrogliazellen und Oligodendrogliazellen sind vermutlich auf verschiedene Methoden der Zellpräparation, auf unterschiedliche Entwicklungsstadien der Zellen und/oder auf unterschiedliche Kultur- und Messbedingungen zurückzuführen. So wurden von Thorburne und Juurlink (1999) Astrogliakulturen verwendet, die speziell mit Typ-2-Astrogliazellen angereichert waren (Juurlink und Hertz 1991). Auch die von Thorburne und Juurlink verwendeten Kulturen oligodendroglialer Vorläuferzellen unterscheiden sich wesentlich von OSKs. So exprimierten 99% dieser Vorläuferzellen das Gangliosid GQ1c, das als Marker für unreife Oligodendrogliazellen gilt, jedoch enthielten sie kein GalC (Thorburne und Juurlink 1999). Im Unterschied dazu enthielten OSKs ca. 87% GalC-positive Zellen (Hirrlinger *et al.* 2002b). Unterschiede im Eisengehalt zwischen oligodendroglialen Vorläuferzellen und OSKs sind also möglicherweise auf die verschiedenen Entwicklungsstadien dieser Zellen zurückzuführen. Diese Möglichkeit wird durch *in vivo*-Untersuchungen an Rattengehirnen unterstützt, welche die Abhängigkeit des Vorkommens eisenpositiver Oligodendrocyten vom Entwicklungsstadium gezeigt haben (Connor *et al.* 1995).

Der cytochemische Nachweis von Eisen in unbehandelten neuronalen Zellkulturen führte in MSKs zu Anfärbung nahezu aller Zellen, während in den anderen Zellkulturtypen nur vereinzelt eisenpositive Zellen auftraten. Die Anfärbung nahezu aller Microgliazellen bestätigt die Ergebnisse der quantitativen Analyse für Eisen, die für MSKs den höchsten spezifischen Eisengehalt ergab. In OSKs, APKs und NPKs waren vereinzelt Zellen angefärbt. Die eisenpositiven Zellen in APKs und OSKs

hatten eine ähnliche Morphologie wie Microgliazellen, konnten durch Verwendung eines immunocytochemischen Markers (CD11b) aber nicht identifiziert werden, weil die gekoppelte Durchführung von Eisenfärbung und Immunfluoreszenz nicht funktionierte. Zellen mit eindeutiger Morphologie von Oligodendrogliazellen oder Astrogliazellen waren nicht eisenpositiv.

Der hohe Eisengehalt von MSKs im Vergleich zu den anderen untersuchten Kulturen ist möglicherweise auf die Fähigkeit von Microgliazellen zur Phagozytose zurückzuführen. So könnten Microgliazellen Eisen durch Phagozytose vorhandener Erythrocyten erhalten haben. Da auch APKs Microgliazellen enthalten (Gutterer *et al.* 1999), könnte dies ebenfalls zum Unterschied im zellulären Eisengehalt zwischen APKs und den von Thorburne und Juurlink verwendeten Astroglia-kulturen beitragen. Es ist also nicht auszuschließen, dass es sich bei den Eisenwerten von MSKs und APKs um Kulturartefakte handelt.

Zum Nachweis von Eisen in neuronalen Zellen *in vivo* wurden Gehirnschnitte drei Wochen alter Ratten auf Eisen gefärbt. Die Ergebnisse der histochemischen Anfärbungen von Gehirnschnitten der Ratte stimmen überwiegend mit den von Connor und Mitarbeitern publizierten Ergebnissen zur Verteilung von Eisen in Gehirnschnitten von Ratten (Connor *et al.* 1995) überein. Im parietalen Cortex zeigten sich Anhäufungen eisenpositiver Zellen, bei denen es sich ihrer Morphologie nach um Microglia handeln könnte (Connor *et al.* 1995). Als Ursache dieser Anhäufungen eisenpositiver Zellen in einigen Hirnregionen wurden kleine Blutungen postuliert, nach denen Microgliazellen Eisen aus Erythrocyten akkumulieren (Connor *et al.* 1995). Weitere eisenpositive Zellen waren im parietalen Cortex nicht zu erkennen. Im *Corpus Callosum* waren eisenpositive Zellen zu finden, die in ihrer Morphologie Oligodendrocyten oder Microglia glichen (Connor und Menzies 1990; Connor *et al.* 1990; Benkovic und Connor 1993). Das Auftreten eisenpositiver Microglia im Gehirn vor Beginn der Myelinisierung und unter pathologischen Bedingungen wurde bereits häufig beschrieben (Benkovic und Connor 1993; Connor *et al.* 1995; Jefferies *et al.* 1996; LeVine 1997). Mit Beginn der Myelinisierung treten zum ersten Mal auch eisenpositive Oligodendrocyten auf (Connor *et al.* 1995). Im adulten Stadium sind Oligodendrocyten der überwiegende eisenpositive Zelltyp im Gehirn (Connor *et al.* 1990; Benkovic und Connor 1993; Connor *et al.* 1995). Da die

Myelinisierung im Gehirn drei Wochen alter Ratten bereits fortgeschritten ist (Kanfer *et al.* 1989), waren eisenpositive Oligodendrocyten zu erwarten.

4.3 Ferritin, Transferrinrezeptor und Transferrin in neuronalen Zellen

Das Vorkommen von Ferritin in neuronalen Zellen wurde für die untersuchten neuronalen Zellkulturtypen durch immunocytochemische Anfärbungen und durch *Western Blot*-Analyse nachgewiesen. Der Nachweis von Ferritin war bereits für kultivierte Astrogliazellen (Regan *et al.* 2002), Oligodendrogliazellen (Qi und Dawson 1994) und für eine Zelllinie mit microglialen Eigenschaften (Cheepsunthorn *et al.* 2001) erbracht worden. Das Vorkommen von Ferritin in kultivierten Neuronen wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben. Intensive Signale für Ferritin wurden in immunocytochemischen Anfärbungen und in den *Western Blot*-Analysen unbehandelter Microgliazellen und Oligodendrogliazellen gefunden, also in den Zellkulturen, die auch die höchsten spezifischen Eisengehalte aufwiesen. Ebenso zeigte die immunhistochemische Anfärbung von Gehirnschnitten der Ratte ein ähnliches Anfärbungsmuster für Ferritin wie die histochemische Anfärbung von Eisen. Es traten Anhäufungen ferritinpositiver Zellen in parietalen Cortex und in Ketten angeordnete ferritinpositive Zellen im *Corpus Callosum* auf. Das Auftreten von in Ketten angeordneten Zellen ist typisch für die Verteilung von Oligodendrocyten im *Corpus Callosum*, so dass es sich bei diesen ferritinpositiven Zellen wahrscheinlich um Oligodendrocyten handelt. Die in vorliegender Arbeit gezeigten Ergebnisse weisen somit nach, dass neurale Zellen mit den höchsten Eisengehalten in Kultur und Gehirn auch die größte Menge an Ferritin enthalten.

TfR wurden ebenfalls in allen untersuchten neuronalen Zellkulturen immunocytochemisch und durch *Western Blot*-Analyse nachgewiesen. Diese Daten bestätigen das Vorkommen von TfR in kultivierten Neuronen (Oh *et al.* 1986) und das von Qian und Mitarbeitern postulierte Vorkommen von TfR auf der Plasmamembran kultivierter Astrogliazellen (Qian *et al.* 1999). Das Vorkommen von TfR in kultivierten Oligodendrogliazellen und Microgliazellen wurde in vorliegender Arbeit erstmals beschrieben.

Histochemische Anfärbungen von Gehirnschnitten auf TfR stellten vor allem Blutkapillaren in beiden untersuchten Hirnregionen und vermutlich Neuronen (Moos

1996) im parietalen Cortex dar. Ob es sich bei der Anfärbung der Blutkapillaren um TfR-positive Endothelzellen oder um Endfüßchen von Astrocyten handelte, war bei der verwendeten Auflösung nicht zu erkennen. Diese Ergebnisse bestätigen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die TfR ebenfalls auf Blutkapillaren und Neuronen nachwiesen (Jefferies *et al.* 1984; Connor und Menzies 1995; Moos 1996). Im Gegensatz zur Situation in Kultur konnte TfR in Astrocyten oder Microglia *in situ* nicht nachgewiesen werden. Ursache für diese Diskrepanz könnte das Alter der verwendeten Ratten sein. In den ersten zwei Wochen nach der Geburt treten im Gehirn TfR-positive Astrocyten und Microglia auf (Connor und Menzies 1995; Kaur und Ling 1995), aber nicht mehr in drei Wochen alten Ratten (vorliegende Arbeit, Connor und Menzies 1995; Kaur und Ling 1995). Da neurale Zellkulturen aus Gehirnen embryonaler bzw. neugeborener Ratten gewonnen wurden, steht das Vorkommen von TfR in Astrogliazellen und Microgliazellen somit nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen der immunhistochemischen Anfärbungen von Gehirnschnitten drei Wochen alter Ratten.

Histochemische Anfärbungen von Transferrin identifizierten vor allem transferrinpositive Oligodendrocyten im *Corpus Callosum* und im parietalen Cortex. Dies stimmt mit Literaturdaten überein, die zeigten, dass Oligodendrocyten die höchste Menge an Transferrin enthalten (Connor *et al.* 1990; Benkovic und Connor 1993; Moos *et al.* 2000). Im Gegensatz zum beschriebenen Nachweis transferrinpositiver Neuronen im Gehirn (Dwork *et al.* 1988; Connor *et al.* 1990; Moos *et al.* 2000) wurde in vorliegender Arbeit kein Transferrinsignal in Neuronen gefunden. Banden der molekularen Masse von Transferrin konnten in allen untersuchten Kulturen durch *Western Blot*-Analyse nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis würde somit das Vorkommen von Transferrin in Kulturen von Astrogliazellen und Oligodendrogliazellen bestätigen (Espinosa de los Monteros *et al.* 1988, 1990). Da die Spezifität des verwendeten Antikörpers angezweifelt werden muss, weil Präinkubation des Antikörpers mit Transferrin kein verändertes Signal in *Western Blot*-Analysen ergab, ist die Aussagekraft der hier vorgestellten Daten zum Vorkommen von Transferrin in neuronalen Zellen gering. Somit könnte auch das starke Transferrinsignal im Zellkern nach immunocytochemischen Anfärbungen von Microgliazellen und Oligodendrogliazellen, auf das es in der Literatur keine Hinweise

gab, auf Kreuzreaktivitäten des eingesetzten kommerziellen Antikörpers zurückzuführen sein.

Da Oligodendrocyten mit Beginn der Myelinisierung hohe Mengen an Eisen akkumulieren (Connor *et al.* 1995; Connor und Menzies 1996) und kultivierte Oligodendrogliazellen verschiedene myelinspezifische Marker (MBP, GalC) exprimieren (Mirsky *et al.* 1980; Hirrlinger *et al.* 2002b), wurde vermutet, dass Oligodendrogliazellen in Kultur viel Eisen enthalten. Jedoch war der spezifische Eisengehalt in OSKs geringer als der in MSKs und nicht signifikant verschieden vom spezifischen Eisengehalt in APKs und NPKs. Möglicherweise befinden sich Oligodendrogliazellen in OSKs trotz des Vorkommens myelinspezifischer Marker nicht in dem Entwicklungsstadium, das sie bei der Myelinisierung und der damit einhergehenden Eisenakkumulation *in vivo* erreichen. Alternativ dazu könnte diesen Zellen in Kultur auch die geeignete Form von Eisen nicht zur Verfügung stehen, aus der sie im Gehirn Eisen akkumulieren. Dies könnte ferritingspeichertes Eisen sein, dass kultivierte Oligodendroglia-Progenitorzellen über einen endocytotischen Prozess aufnehmen können (Hulet *et al.* 2000). Auch Oligodendrocyten im Gehirn besitzen Bindungsstellen für Ferritin (Hulet *et al.* 1999). Der hohe Eisengehalt von MSKs im Vergleich mit OSKs könnte auch auf mögliche phagozytotische Prozesse der Microgliazellen zurückzuführen sein.

Trotz eines geringen Eisengehaltes wurde in OSKs eine ähnliche Ferritinmenge nachgewiesen wie in MSKs. Das Vorkommen großer Mengen an Ferritin in Zellen von OSKs könnte eine protektive Maßnahme sein, um das Vorkommen redoxaktiven Eisens so gering wie möglich zu halten. Dies könnte für Oligodendrocyten von großer Bedeutung sein, weil diese Zellen große Mengen an Membranen mit einem hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren bilden, die leicht zum Ziel von Lipidperoxidation werden können (Halliwell und Gutteridge 1997). Außerdem besitzen Oligodendrocyten einen intensiven oxidativen Metabolismus (Juurlink 1997), der die Bildung von RSS begünstigt.

4.4 Eisenakkumulation in neuronalen Zellen

Astrogliazellen können sowohl transferringebundenes Eisen als auch nichtproteingebundenes Eisen aufnehmen (Takeda *et al.* 1998; Qian *et al.* 2000;

Jeong und David 2003; Hoepken *et al.* 2004). Diese Zellen exprimieren eine Vielzahl von Eisentransportern, die an diesen Aufnahmeprozessen beteiligt sein könnten (siehe 2.3.2). Der am besten beschriebene Mechanismus für die Aufnahme von Eisen in Zellen ist die TfR-vermittelte Endocytose des Eisen-Transferrin-Komplexes (Hentze *et al.* 2004), der auch für Astrogliazellen postuliert wurde (Qian *et al.* 2000). Um verschiedene Mechanismen der Eisenaufnahme von Astrogliazellen zu untersuchen, wurden APKs bei variierter Konzentration des löslichen Eisensalzes FAC in serumhaltigen oder serumfreien Medium inkubiert. FAC wurde bereits in mehreren Studien als Eisenquelle verwendet (Parkes *et al.* 1995; Bishop und Robinson 2001; Hirsh *et al.* 2002). Für die in vorliegender Arbeit beschriebenen Experimente wurde FAC in Konzentrationen bis zu 1 mM eingesetzt, was die physiologischen und pathologischen Konzentrationsbereiche für das Gehirn einschließt. Während der Gehalt an transferringebundenem Eisen im Plasma zwischen 9 und 30 μM (Bishop und Robinson 2001) und die Konzentration von Eisen im der Cerebrospinalflüssigkeit bei ca. 1 μM (Gruener *et al.* 1991) liegt, ist die Konzentration im cerebralen Cortex ca. 650 μM (3.81 mg/100 g Frischgewebe) (Hallgren und Sourander 1958). Bei AD wurden in den neuritischen Plaques sogar Eisenkonzentrationen von bis zu 1 mM gemessen (Lovell *et al.* 1998).

Zellen in APKs akkumulierten wesentlich mehr Eisen aus serumfreiem Medium als aus serumhaltigem Medium. Bereits 3 h nach Gabe von 100 μM Eisen als FAC in serumfreiem Medium war der spezifische Eisengehalt der Zellen im Vergleich zum Ausgangswert 20-fach erhöht, während sich der Eisengehalt bei entsprechenden Inkubationsbedingungen in serumhaltigem Medium lediglich verdoppelt hatte. Eine intensive Eisenakkumulation von Gliazellen in Abwesenheit von Serum oder Transferrin ist bereits beschrieben worden (12-fach; Takeda *et al.* 1998). Auch andere Zellen, z.B. Hep3B- oder HepG2-Zellen sowie kultivierte Hepatocyten sind in der Lage, ähnlich hohe Eisenmengen zu akkumulieren (Baker *et al.* 1998; Hirsh *et al.* 2002). Die Mechanismen der transferrinunabhängigen Eisenaufnahme von APKs wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. An der Eisenaufnahme von APKs aus serumhaltigen Medium könnten verschiedene Mechanismen beteiligt sein, da Eisen im Serum an Transferrin, Serumalbumin, Ferritin oder niedermolekulare Substanzen gebunden sein könnte (Aisen *et al.* 1966; Lipschitz *et al.* 1974).

Bei der Inkubation von APKs mit FAC in serumfreien oder serumhaltigen Medium kam es zu einem allenfalls geringfügigen Zelltod. Deshalb wurde vermutet, dass Eisen in beiden Fällen in redoxinaktiver, nicht toxischer Form von den Zellen gespeichert wurde. Die *Western Blot*-Analysen zeigten für beide Bedingungen einen Anstieg des Ferritingehaltes. Trotz der sehr unterschiedlichen Eisengehalte war jedoch zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ein Unterschied in der Intensität des Signals für Ferritin in Homogenatüberständen von APKs zu finden, die in serumhaltigem oder serumfreiem Medium inkubiert worden waren. Möglicherweise speichern Astrogliazellen in Abwesenheit von Serum akkumuliertes Eisen in einer anderen Form, z.B. als Citratkomplex, so dass eine toxische Wirkung von Eisen verhindert wird. Astrogliazellen sind in der Lage, in großen Mengen Citrat zu synthetisieren und freizusetzen (Sonnwald *et al.* 1991; Westergaard *et al.* 1994), das in wässriger Umgebung verschiedene Kationen binden kann (Field *et al.* 1975). Von Astrocyten freigesetztem Citrat wird eine wichtige Rolle bei der extrazellulären Bindung divalenter Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} zugeschrieben (Westergaard *et al.* 1994). Möglicherweise kann astrogliales Citrat aber auch als Eisenchelator dienen, um die Zellen vor eisenvermittelter Toxizität zu schützen.

Um die transferrinvermittelte Eisenaufnahme in neuronalen Zellen zu untersuchen, wurden Zellkulturen mit Eisen und Transferrin in äquimolaren Konzentrationen inkubiert. Alle untersuchten Zellkulturen waren in der Lage transferringebundenes Eisen aufzunehmen. Für Astrogliazellen wurden somit Literaturdaten für eine transferrinabhängige Eisenaufnahme bestätigt (Qian *et al.* 1999). Entsprechende Daten für die anderen neuronalen Zelltypen konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Vier Stunden nach Gabe von Transferrin und FAC war bei allen untersuchten Zellkulturen der spezifische zelluläre Eisengehalt verdoppelt. Da MSKs und NPKs die größte Menge an TfR besitzen, sollten diese Zellen große Mengen an transferringebundenem Eisen aufnehmen können. MSKs enthalten denn auch im Vergleich mit den anderen untersuchten Kulturen große Mengen an TfR, Ferritin und Eisen und nehmen trotz des hohen Eisengehalts transferringebundenes Eisen auf. Somit scheinen Microgliazellen Regulationsmechanismen für die Expression von TfR und Ferritin zu besitzen, die eine gleichzeitige starke Expression beider Proteine erlauben. Diese Vermutung wird durch Literaturdaten von Untersuchungen an Phagozyten unterstützt (Testa *et al.* 1989; Byrd und Horwitz 1993). In diesen Zellen

wird durch Zugabe von FAC oder transferrinegebundenem Eisen ins Kulturmedium sowohl die TfR- als auch die Ferritinexpression gesteigert. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch ungeklärt.

Alle untersuchten Zelltypen nahmen transferrinegebundenes Eisen langsamer auf als nicht proteingebundenes Eisen. Die Mechanismen der transferrinunabhängigen Eisenaufnahme wurden in vorliegender Arbeit nicht untersucht. An der transferrinunabhängigen Eisenaufnahme könnte DMT1 beteiligt sein, der in Astrocyten, Microglia, Oligodendrocyten und Neuronen exprimiert wird (Moos *et al.* 2000; Wang *et al.* 2001; Burdo *et al.* 2001). Außerdem gibt es einen bisher nicht näher charakterisierten Eisentransporter für trivalente Metallionen (Attieh *et al.* 1999). Phagocytotische oder pinocytotische Prozesse (Chang *et al.* 2000) könnten bei der Eisenaufnahme von Microglia und Astrocyten ebenfalls eine Rolle spielen.

4.5 Modulation des Ferritin- und Transferrinrezeptorgehaltes durch Eisenüberschuss oder Eisenmangel

Der bekannteste Mechanismus zur Regulation des intrazellulären Eisenstoffwechsels ist die posttranskriptionale Kontrolle der Expression von Ferritin und TfR über IRP1 und IRP2. Das Vorkommen der mRNAs für die beiden IRPs sowie für Ferritin und TfR wurden durch RT-PCR und durch immunocytochemische Anfärbungen und *Western Blot*-Analysen der untersuchten neuronalen Zellkulturen nachgewiesen.

Um den Einfluss von Eisenmangel und Eisenüberschuss auf das Vorkommen von Ferritin und TfR in APKs zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem Eisensalz FAC oder mit dem Eisenchelator DFX inkubiert. Die Behandlung von APKs mit FAC führte zu erhöhtem zellulärem Eisengehalt und zu einem Anstieg der Zahl eisenpositiver Zellen, während DFX-Behandlung den zellulären Eisengehalt nicht beeinflusste. Auch wenn die Mechanismen der Eisenaufnahme bei Inkubation von APKs mit FAC in serumhaltigem Medium in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt wurden, ermöglichte der Anstieg des zellulären Eisengehalts dennoch die Untersuchung des Einflusses des zellulären Eisengehalts auf die Expression von Ferritin und TfR.

Inkubation von APKs mit FAC führte zu einem Anstieg des Ferritingehalts und einer Verringerung des TfR-Gehaltes, während Inkubation von APKs mit DFX einen

Anstieg des TfR-Gehaltes zur Folge hatte. Der Anstieg des Ferritingehaltes nach Eisengabe ist schon für Zellen *in vitro* beschrieben worden. So führte eine Inkubation von Astrogliazellen mit Hämin oder Hämoglobin zu einer schnellen Steigerung der Ferritingehalts. Bereits nach 2 h Inkubation mit Hämin war eine deutliche Zunahme des Ferritingehalts sichtbar (Regan *et al.* 2002), während bei Inkubation von APKs mit FAC erst nach ca. 4 h ein schwacher Anstieg des Ferritingehalts zu beobachten war (Hoepken *et al.* 2004). Eine Steigerung des Ferritingehalts durch Gabe verschiedener Eisenverbindungen wurde ebenfalls für kultivierte Hepatocyten (FAC) (Goto *et al.* 1983) und Fibroblasten (Hämin) (Eisenstein *et al.* 1991) sowie *in vivo* an Rattenleber (Chen *et al.* 1997) und Rattenhirn (Bishop und Robinson 2001) gezeigt.

Die Inkubation von APKs mit FAC führte zu einer zeitabhängigen Verringerung des zellulären TfR-Gehaltes. Eine entsprechende Verringerung der TfR-vermittelten Eisenaufnahme oder des TfR-Gehaltes nach Inkubation mit Eisen wurde bereits für verschiedene Zelllinien (HeLa, RD4) beschrieben (Ward *et al.* 1982a/b; Iwai *et al.* 1995).

Durch Inkubation von APKs mit dem Eisenchelator DFX wurde der Einfluss von Eisenmangel auf den zellulären Gehalt von TfR untersucht. DFX steigerte die Menge an TfR in APKs, obwohl keine Senkung des intrazellulären Eisengehaltes nach Inkubation mit DFX gemessen werden konnte. Literaturdaten zeigen, dass die Synthese von TfR gesteigert wird, wenn die intrazelluläre Eisenkonzentration verringert wird (Kroos *et al.* 1996; Tong *et al.* 2002). Vermutlich kann DFX nach Bindung intrazellulären Eisens die Zellen nicht verlassen und der durch AAS gemessene intrazelluläre Eisengehalt nach Inkubation der APKs mit DFX spiegelte vor allem DFX-gebundenes Eisen wider. Ein gesteigerter TfR-Gehalt wurde bereits für K562-Zellen nach Gabe von DFX (Bridges und Cudkowicz 1984; Rouault *et al.* 1985) und für Rattenhirn bei perinataler Eisenarmut (Siddappa *et al.* 2003) beschrieben.

Die Regulation des Vorkommens von Ferritin und TfR in APKs wird vermutlich über IRP1 oder IRP2 reguliert. Die mRNA dieser Proteine wurde für APKs nachgewiesen. Neben der posttranskriptionalen Kontrolle der TfR-Expression durch IRPs wird aber auch eine transkriptionale Kontrolle der Expression von TfR diskutiert (Rao *et al.*

1986; Tong *et al.* 2002). Untersuchungen zur Beteiligung von IRPs an der Regulation der Synthese von Ferritin und TfR hätten den Rahmen vorliegender Arbeit gesprengt.

Die Steigerung des Ferritingehaltes während der Inkubation von APKs mit FAC konnte durch den Proteinsyntheseinhibitor CHX vollständig verhindert werden. Dennoch kam es unter diesen Bedingungen zu einem starken Anstieg des zellulären Eisengehalts. Begleiterscheinung einer gleichzeitigen Inkubation von APKs mit FAC und CHX war eine gesteigerte LDH-Freisetzung, die nach 24 h nahezu 60% der Gesamt-LDH betrug. Ursache dieser verstärkten Zellschädigung ist vermutlich eine erhöhte Bildung von Radikalen. Während bei Inkubation mit FAC nur nach 4 h ein transientes Vorkommen von Radikalen zu beobachten war, konnte bei Zellen, die gleichzeitig mit FAC und CHX inkubiert wurden, zu allen untersuchten Zeitpunkten ein im Vergleich zur Kontrolle erhöhter Radikalspiegel nachgewiesen werden. Somit stellt die Synthese von Ferritin bei Inkubation von APKs mit FAC vermutlich einen protektiven Mechanismus der Zellen dar, der die eisenvermittelte Bildung von Radikalen verhindern soll. Eine entsprechende protektive Wirkung des Ferritins ist bereits für mit Hämin behandelte Astrogliazellen beschrieben worden (Regan *et al.* 2002). Der transiente Nachweis von Radikalen nach 4 h Inkubation von APKs mit FAC ist möglicherweise die Konsequenz einer im Vergleich zur Ferritinsynthese stärkeren Eisenaufnahme in den ersten 8 h, was zu einer Dispersität zwischen zellulärem Eisengehalt und Eisenspeicherkapazität führen könnte. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass an der starken Zellschädigung nach Inkubation von APKs mit FAC und CHX weitere Mechanismen beteiligt sind, da CHX die Synthese aller Proteine verhindert. Durch Behandlung der Zellen mit CHX könnte es deshalb auch zur Verarmung anderer für die Entgiftung von Radikalen wichtiger Enzyme kommen, oder die Synthese anderer protektiver Proteine, die durch Inkubation von APKs mit FAC hoch reguliert werden, könnte unterdrückt sein.

4.6 Peroxidentgiftung und eisenvermittelte Toxizität von H₂O₂

In Zellen kann es durch die Reduktion von H₂O₂ durch Fe²⁺ zur Bildung hochreaktiver Hydroxylradikale kommen. Um die Bildung dieser Radikale zu verhindern, muss Eisen redoxinaktiv gespeichert und H₂O₂ effektiv entgiftet werden. Astrogliazellen benutzen zwei antioxidative Systeme zur Entgiftung von H₂O₂, das Glutathionsystem und die Catalase. Die Bedeutung beider Systeme für die Entgiftung von H₂O₂ in

Astrocyten sowie die Bedeutung von Eisen bei der Peroxidtoxizität dieser Zellen wurde vergleichend an APKs aus Wildtyp- und GPx1(-/-)-Mäusen untersucht. Während Catalase als diffusionskontrolliertes Enzym zur effektiven Beseitigung von H₂O₂ von hohen Konzentrationen beiträgt (Aebi 1984), ist GPx1 sehr wichtig für den Schutz vor oxidativer Schädigung durch Peroxide in geringen Konzentrationen (Dringen *et al.* 2004).

Wie bereits an APKs aus Rattenhirnen gezeigt (Dringen und Hamprecht 1997) entgiften auch APKs aus Mäusehirnen H₂O₂ mit einer Kinetik 1. Ordnung. Die errechneten D-Werte für die H₂O₂-Entgiftung in APKs von Wildtyp- oder GPx1(-/-)-Mäusen waren nahezu identisch, aber etwas höher als die für APKs aus Rattenhirnen bestimmten D-Werte ($1.5 \pm 0.28 \text{ min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$; Hirrlinger *et al.* 2002b). Die Verringerung des Glutathiongehaltes in Wildtyp-APKs führte zu einer geringfügigen Verlangsamung der H₂O₂-Entgiftung, was bereits für Ratten-APKs gezeigt worden war (Dringen und Hamprecht 1997; Liddell *et al.* 2004), hatte aber keinen Einfluss auf die H₂O₂-Entgiftung in GPx1(-/-)-APKs. Überraschenderweise war nur in APKs von Wildtyp-Mäusen eine Bildung von GSSG während der Inkubation mit H₂O₂ zu beobachten. Die transiente Akkumulation von GSSG bei der Entgiftung von H₂O₂ ist bereits für APKs aus Rattenhirnen gezeigt worden (Dringen und Hamprecht 1997). Die in vorliegender Arbeit beschriebenen Daten zeigen somit, dass GPx1 für die Akkumulation von GSSG in APKs nach H₂O₂-Gabe verantwortlich ist. Das Glutathionsystem hatte bei der H₂O₂-Entgiftung durch GPx1(-/-)-APKs eine geringere Effektivität als in Wildtyp-APKs. Entsprechend dazu führte die Hemmung der Catalase in GPx1(-/-)-APKs zu einer wesentlich stärkeren Verlangsamung der H₂O₂-Entgiftung als in APKs aus Wildtyp-Mäusen. Diese Befunde deuten darauf hin, dass APKs aus GPx1(-/-)-Mäusen auf Grund der fehlenden Aktivität von GPx1 für die H₂O₂-Entgiftung verstärkt auf Catalase angewiesen sind. Da sich die H₂O₂-Entgiftungsraten unbehandelter Wildtyp-APKs und GPx(-/-)-APKs nicht unterscheiden, kompensiert anscheinend eine verstärkte Beteiligung der Catalase an der H₂O₂-Entgiftung die fehlende Aktivität der GPx1 in GPx1(-/-)-APKs vollständig.

Die Bedeutung der Catalase an der H₂O₂-Entgiftung wird auch durch Vitalitätsdaten für APKs aus Wildtyp- und GPx1(-/-)-Mäusen nach Inkubation mit H₂O₂ deutlich. In beiden APK-Typen war 3 h nach der Applikation von H₂O₂ keine erhöhte Freisetzung

von LDH messbar. Diese Befunde bestätigen Daten für Ratten-APKs, die auch 24 h nach Inkubation mit H_2O_2 (100 μM) allenfalls eine geringfügige LDH-Freisetzung aufwiesen (Liddell *et al.* 2004). Während Wildtyp-APKs nach Vorinkubation mit dem Catalase-Inhibitor 3AT und anschließender H_2O_2 -Inkubation nicht geschädigt waren, gelangten in GPx1(-/-)-APKs unter gleichen Bedingungen über 70% der zellulären LDH ins Medium. Diese Daten zeigen, dass Catalase essentiell für das Überleben von APKs nach Peroxidapplikation ist, wenn GPx1 nicht zur Verfügung steht, und dass Catalase einen Ausfall der GPx1 kompensieren kann.

Vorinkubation beider APKs mit BSO, dem Inhibitor der GSH-Synthese, und anschließende Inkubation mit H_2O_2 führte 3 h nach der H_2O_2 -Applikation zu erhöhter Freisetzung von LDH. Dieser Verlust der Vitalität war bei GPx1(-/-)-APKs ($39 \pm 10\%$) ähnlich wie in den Wildtyp-APKs ($25 \pm 5\%$). Dies lässt vermuten, dass GSH auch in GPx1(-/-)-APKs eine wichtige Funktion wahrnimmt. So spielt GSH eine wichtige Rolle als Kofaktor von Enzymen bei Isomerisierungsreaktionen (Meister und Anderson 1983), bei der Aufrechterhaltung des Thiol-Redoxpotentials (Cotgreave und Gerdes 1998) sowie beim Transport von Metallen (Ballatori 1994) und ist Speicher- und Transportform für Cystein (Meister und Anderson 1983).

Die Bedeutung von GPx1 bei der Entgiftung von RSS wurde bereits für Neuronenkulturen aus GPx1(-/-)-Mäusen gezeigt, deren Zellen durch H_2O_2 stärker geschädigt wurden als Neuronen aus Wildtyp-Mäusen (de Haan *et al.* 1998). Zudem ist das Gehirn bei GPx1(-/-)-Mäusen durch Ischämie/Reperfusion (Crack *et al.* 2001) und durch Kältebehandlung (Flentjar *et al.* 2002) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen stärker geschädigt worden.

Eisen kann die Toxizität von Peroxiden in Gehirnzellen erhöhen (Abe und Saito 1998; Robb und Connor 1998; Ying *et al.* 1999) und Eisenchelatoren können neurale Zellen vor oxidativem Stress schützen (Vollgraf *et al.* 1999; Liddell *et al.* 2004). Vorinkubation von APKs mit dem Eisenchelator DFX beeinflusste die Entgiftungsgeschwindigkeit von H_2O_2 nicht, verhinderte jedoch die LDH-Freisetzung nach H_2O_2 -Gabe zu BSO-vorinkubierten APKs beider Mauslinien sowie die hohe LDH-Freisetzung aus 3AT-vorinkubierten GPx1(-/-)-APKs vollständig. Diese Daten zur protektiven Wirkung von DFX auf H_2O_2 -vorinkubierte Maus-APKs bestätigen

Literaturdaten für Ratten-APKs (Liddell *et al.* 2004). Die Toxizität von H₂O₂ auf APKs, deren antioxidative Mechanismen beeinflusst waren, scheint also vom Vorkommen chelierbaren Eisens abzuhängen, wahrscheinlich durch die eisenvermittelte Bildung toxischer Hydroxylradikale.

4.7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass alle untersuchten neuronalen Zellkulturen Ferritin und TfR sowie die mRNAs für IRP1 und IRP2 enthalten. Das Vorkommen von Transferrin sollte durch die Verwendung eines anderen spezifischen Antikörpers für Transferrin überprüft werden, da hier die Ergebnisse nicht eindeutig waren. Durch Verwendung von Antikörpern, die spezifisch für H- oder L-Ferritin sind, sollte untersucht werden, welche Ferritin-Untereinheiten in den verschiedenen neuronalen Zellen vorkommen und nach Inkubation mit Eisen verstärkt synthetisiert werden. Ebenso könnte das Vorkommen von IRPs in neuronalen Zellkulturen mit geeigneten Antikörpern untersucht werden.

In allen Zellkulturen konnte mit der Ferrozin-Methode Eisen nachgewiesen werden. Da die Empfindlichkeit der modifizierten Perlsfärbung nur den cytochemischen Nachweis von Eisen in Microgliazellen ermöglichte, wäre eine weitere Optimierung der Methode zum Nachweis von Eisen in neuronalen Zellen sinnvoll. So könnte durch die Verwendung von Triton X-100 nach der Fixierung und vor der Perlsfärbung versucht werden, die Zugänglichkeit zellulären Eisens für die verschiedenen Reagenzien zur Eisenfärbung zu verbessern. Diese Optimierung der Methode wurde bereits erfolgreich für die Anfärbung von Eisen in Gehirnschnitten eingesetzt (LeVine 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Gesamteisengehalt der Zellkulturen bestimmt und die Anfärbung einzelner Zellen der Kulturen durch die modifizierte Perlsfärbung ermöglicht. Die intrazelluläre Verteilung von Eisen könnte durch Verwendung zellgängiger, eisenspezifischer Fluoreszenzfarbstoffe untersucht werden. Bei Bindung von Eisen an diese Farbstoffe wird deren Fluoreszenz verringert, so dass eine Erhöhung der Eisenkonzentration anhand verminderter Fluoreszenz nachgewiesen werden kann (Petrat *et al.* 2000). Diese Fluoreszenzfarbstoffe können

sogar spezifisch in einzelne Zellorganellen transportiert werden und erlauben somit die Detektion von Eisen in Organellen (Petrat *et al.* 2001; Petrat *et al.* 2002).

Neben der Aufnahme von transferringebundenem Eisen waren alle neuronalen Kulturen auch zur transferrinunabhängigen Eisenaufnahme befähigt. Die Mechanismen der transferrinunabhängigen Eisenaufnahme könnten durch Nachweis potentieller Transportproteine und durch den Einsatz von Inhibitoren solcher Transporter untersucht werden. So könnte eine Beteiligung von DMT1 an der transferrinunabhängigen Eisenaufnahme durch Veränderung des pH-Wertes im Medium oder durch Zugabe anderer divalenter Kationen, die von DMT1 transportiert werden, überprüft werden.

An APKs wurde der Einfluss von Eisenüberschuss und Eisenmangel auf das Vorkommen von Ferritin und TfR untersucht. An der Regulation der Synthese von Ferritin und TfR sind vor allem IRPs beteiligt (Aziz und Munro 1987; Casey *et al.* 1988). Um die Beteiligung von IRPs an der Regulation der Synthese von Ferritin und TfR in neuronalen Zellen zu beweisen, könnte Bindung von IRPs an IREs (Leibold und Munro 1988; Mullner *et al.* 1989) oder die enzymatische Aktivität der cytosolischen Aconitase nach Eisengabe oder Eisenentzug untersucht werden (Drapier und Hibbs 1986).

Da über die Interaktion verschiedener Gehirnzellen beim Eisenstoffwechsel wenig bekannt ist, sollten potentielle Interaktionen durch Kokulturen verschiedener Gehirnzelltypen (Dringen *et al.* 1999b; Gaillard *et al.* 2000) untersucht werden. Schwerpunkt solcher Untersuchungen könnte die Funktion von Astrogliazellen als Lieferant von Eisen für andere Gehirnzellen sein. Eine wichtige Rolle der Astrocyten bei der Verteilung von Eisen im Gehirn kann postuliert werden, weil Astrocyten vermutlich das über die Blut-Hirn-Schranke aufgenommene Eisen von den Endothelzellen aufnehmen und Eisen über Ferroportin/Ceruloplasmin abgeben können (Jeong und David 2003).

Eisen und Transferrin spielen anscheinend eine besondere Rolle bei der Entwicklung von Oligodendrocyten und deren Fähigkeit zur Myelinbildung. Durch Eisenchelatoren oder Eisenkomplexe könnte die Fähigkeit zur Myelinbildung von

Oligodendrogliazellen in Kultur modifiziert werden. Ein mögliches Zusammenspiel von Microgliazellen und Oligodendrogliazellen beim Eisenstoffwechsel, das durch die Verschiebung von Eisen aus Microgliazellen zu Oligodendrocyten während der Myelinisierung als wahrscheinlich gilt (Connor *et al.*, 1995; Connor und Menzies 1996), könnte ebenfalls durch ein entsprechendes Kokulturmodell untersucht werden.

5 Experimenteller Teil

5.1 Material

Deckgläschen	Roth (Karlsruhe); Langenbrinck (Emmendingen)
Einmal-Sterilfilter	Renner (Darmstadt)
Fotopapier	Image Film SO-163, Kodak (Stuttgart)
Kupfernetze	Stork Veco (Eerbeek, Niederlande)
Nitrocellulose-Membran	Millipore Corp. (Bedford, USA); Bio-Rad (München)
Nylonnetze	Scrynell, 20, 135 und 250 µm Maschenweite, Züricher Beuteltuchfabrik (Rüschlikon, Schweiz); 132 und 211 µm Maschenweite, Sefar GmbH (Wasserburg)
Objektträger	Neolab (Heidelberg)
Plastikwaren	Brand (Wertheim), Nunc (Wiesbaden) und BD biosciences (Heidelberg)
sterile Zellkulturartikel	Nunc (Wiesbaden) und Greiner (Frickenhausen)
Papiertücher	Hakle-Kimberly (Mainz)

5.2 Geräte

Agarosegelkammern	Typ B1 Owl Separation Systems (Portsmouth, USA); Typ 40-1214 Peqlab (Erlangen)
Atomabsorptions-spektrometer	Perkin Elmer 400, Perkin Elmer (Rodgau-Jügesheim)
Autoklav	Typ 669, Aigner (München); HC2(MK1-94), Siltex (East Benteleigh, Australien)
<i>Blot</i> -Apparatur	Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad (München)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen); Cubestar, Hoshizaki (Singapur)
Elektrophorese-Apparatur	Mini Protean III Elektroporesis Cell, Bio-Rad (München)
ELISA-Reader	MRX TC Revelation, Dynex Technologies (Denkendorf); Multiskan Ascent, Thermo Labsystem (Helsinki, Finnland)
Folienschweißgerät	Super Poly 281, Audion Elektro (AJ Weesp, Niederlande)
Haemocytometer	nach Neubauer, Bachofer (Reutlingen)
Lyophilisator	Alpha I-12, Christ (Osterode/Harz)
Magnetrührer	Ikamag RCT und Ikamag RO, Bachhofer (Reutlingen); Selby (Australien)
Membranpumpe	Bosco Medical (Wynnum, Australien)
Mikroskope	Phasenkontrastmikroskop IM, Fluoreszenzmikroskope IM 35 und Axiovert 200, Elektronenmikroskop EM10, Zeiss (Oberkochen); IIX50-S8F4-Zellmikroskop und AX60-Fluoreszenzmikroskop, Olympus (Japan)

Ölpumpe	Drehschieberölpumpe Typ 317, Dürr-Dental (Bietigheim); Clements (Sydney, Australien)
Osmometer	Osmometer Automatic, Knauer (Eppelheim)
pH-Meter	PHM 92 Lab-pH-Meter, Radiometer (Kopenhagen, Dänemark); TPS (Sprinwood, Australien)
Photoapparate	OM2 und OM4, Olympus Optical (Tokyo, Japan)
Pipettoren	Finnpipetten, Labsystem Oy (Helsinki, Finnland); Vielkanaldispenser Biohit Proline 1200, Biohit Oy (Helsinki, Finnland); Multipette Pro und Pipetten Research, Eppendorf (Hamburg)
Schüttler	Vortex Genie, Bender & Hobein (München); Typ TMR, Infors (Bottmingen, Schweiz); Unimax 1010 und Inkubator 1000, Heidolph (Kelheim); Ratek Instruments (Australien)
Spannungsquelle	Consort E861, Fisher Bioblock Scientific (Tournai, Belgien)
sterile Werkbank	LaminAir HLB 2448 und TL 2448, Heraeus (Hanau) Biological Safety Cabinet Class II, AES Environmental (Australien)
Taumelroller	RM 5 V, Fröbel Labor Technik (Wasserburg)
Thermocycler	Mastercycler Gradient, Eppendorf (Hamburg)
Ultramikrotom	Ultracut R, Leica (Bensheim)
Vibratom	Technical Products International (St. Louis, USA)
Waagen	Typ 1205, 1405, 1712 und BP121S, Sartorius (Göttingen) und Typ P 1200, Mettler (Albstadt)
Wasserbad	Eigenbau Werkstatt des Interfakultären Instituts für Biochemie (Tübingen); Julabo, Juchheim Labortechnik (Seelbach über Lahr); Grant Instruments (Cambridge, England); TWB22T, Thermoline L+M (Smithfield, Australien)
Wasserreinigungsanlage	Purelab Plus, USF Elga (Ramsbach-Baumbach); Modulab Type II, Continental Water Systems (Australien)
<i>Western Blot</i> -Kammer	Bio-Rad Laboratories (München)
Zellinkubator	Typ B 5060EK CO ₂ , Cytoperm 2 und HERA cell, Heraeus (Hanau)
Zentrifugen	Tischzentrifuge 5415C, Biofuge A und Biofuge pico, Eppendorf (Hamburg); Zellzentrifuge Varifuge K, Biofuge primo, Heraeus (Hanau); GS-15R, Beckman (Palo Alto, USA)

5.3 Reagenzien und Chemikalien

5-Brom-4-chlor-indolylphosphat (BCIP) und 4-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) waren von Applichem (Darmstadt). DMEM wurde bei Life Technologies (Eggenstein) oder Gibco Invitrogen (Carlsbad, USA) gekauft. Ziegennormalserum wurde von Life Technologies (Eggenstein) erworben. Rindertransferrin (Apoform) und FCS wurden bei Invitrogen (Karlsruhe) gekauft. Paraformaldehyd (PFA) wurde von Fluka (Buchs) oder ProSciTech (Thuringow Central, Australien) erworben. FAC, Glycerin, Natriumdodecylsulfat (SDS) und Natriumselenit wurden von Fluka (Buchs) bezogen. NADH war von Applichem (Darmstadt) oder von Sigma (Steinheim). NADPH, GR, Dihydrorhodamin 123, 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), Ferrozin, Neocuproin, L-Ascorbat, Ammoniumcitrat, DFX und CHX waren von Sigma (Steinheim oder Melbourne, Australien). Triton X-100 wurde bei Serva (Heidelberg) oder bei Ajax Finechem (Seven Hills, Australien) erworben. Ferritin und Araldit wurden von Serva (Heidelberg) bezogen. Kaliumhexacyanoferrat(II) wurde bei E. Merck (Darmstadt) oder bei ICN (Aurora, USA) gekauft. Glutardialdehyd war von Paesel (Frankfurt am Main). Pioloform wurde bei Wacker-Chemie (Burghausen) gekauft. DAPI und das *High-Pure PCR Product Purification Kit* waren von Roche Diagnostics (Mannheim). Der 100bp DNA-Marker war von Peqlab (Erlangen). *Primer* wurden bei der MWG-Biotech AG (Ebersberg) in Auftrag gegeben. Die *Random Hexamer Primer* und der RNase-Inhibitor RNasin für die RT-Reaktion waren von Promega (Mannheim). Die Reverse Transkriptase mit zugehörigem Puffer, die dNTPs und die rekombinante Taq-Polymerase mit zugehörigem Puffer und MgCl₂-Lösung waren von Fermentas (St. Leon-Rot). Immu-Mount war von Shandon (Pittsburgh, PA, USA). Histolen wurde von Australian Biostain (Traralgon, Australien) gekauft. Die verwendeten Molekulargewichtsmarker (*BenchMark prestained protein ladder* und *PeqGold prestained protein marker*) wurden von Invitrogen (Karlsruhe) bzw. von Peqlab (Erlangen) bezogen. Milchpulver wurde von der Humana Milchunion (Herford) gekauft. Die in Australien verwendeten Chemikalien Calciumchlorid, Magnesiumchlorid, Natriumhydroxid und Aceton waren von Ajax Finechem (Seven Hills, Australien) und Natriumdihydrogenphosphat, Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumchlorid, Natriumchlorid, Wasserstoffperoxid sowie DePex waren von BDH Merck (Kilsyth, Australien).

Nicht gesondert aufgeführte Reagenzien und Chemikalien wurden von Roche Diagnostics (Mannheim), E. Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Steinheim) bezogen. Sie besaßen den höchsten erhältlichen Reinheitsgrad.

Antikörper

In dieser Arbeit wurden die in der Tabelle 7 dargestellten Antikörper verwendet.

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Antikörper

Antikörper	Spezies	Beschreibung	Verdünnung	Lieferant
α -GFAP	Kaninchen	Serum	1:200	Dako (Hamburg)
Ox42 (CD11b)	Maus	monoklonal	1:10	Serotec (Oxford, UK)
α -GalC	Maus	monoklonal	1:5	von Prof. Hamprecht zur Verfügung gestellt
α -GAP43	Maus	monoklonal	1:100	Sigma (Steinheim)
α -Ferritin	Kaninchen	Serum	1:500	Dako (Hamburg)
α -TfR	Maus	monoklonal	1:500	Zymed Lab. (San Francisco, USA)
α -Transferrin	Kaninchen	Serum	1:500	ICN Pharm. Inc. (Aurora, Ohio, USA)
α -Kaninchen-IgG Alexa Fluor 488	Ziege	monoklonal	1:1000	Molecular Probes (Leiden)
α -Maus-IgG Alexa Fluor 568	Ziege	monoklonal	1:1000	Molecular Probes (Leiden)
α -Maus-IgG-FITC	Kaninchen	monoklonal	1:100	Jackson (West Grove, USA)
α -Maus-IgG-AP	Ziege	monoklonal	1:5000	Jackson (West Grove, USA)
α -Kaninchen-IgG-AP	Ziege	monoklonal	1:5000	Boehringer (Mannheim)
α -Maus-IgG-Biotin	Esel	monoklonal	1:300	Amersham (Buckinghamshire, USA)
α -Kaninchen-IgG-Biotin	Schaf	monoklonal	1:300	Amersham Buckinghamshire, USA)

Der verwendete Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplex wurde von Amersham (Buckinghamshire, England) erworben.

5.4 Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden Lösungen in doppeltionisiertem Wasser angesetzt.

5.4.1 Zellkulturen

5.4.1.1 Allgemeine Techniken

Alle zur Zellkultur verwendeten Medien und Lösungen wurden routinemäßig auf Sterilität überprüft und auf Mycoplasmenfreiheit untersucht. Diese Arbeiten wurden von Technischen Assistentinnen des Arbeitskreises von Prof. Hamprecht (Tübingen) durchgeführt und sind von Möller (1989) beschrieben worden. Vor dem Ansäen wurden die Zellzahl und die Lebensfähigkeit der Zellen mit der Methode des Nigrosinausschlusses bestimmt (Kaltenbach *et al.* 1958). Für immunocytochemische Anfärbungen wurden Zellen auf sterile Deckgläschen (18 mm x 18 mm) in Plastik Kulturschalen (50 mm Durchmesser) angesät (Reinhart *et al.* 1990).

5.4.1.2 Astrogliareiche Primärkulturen

APKs wurden aus den Gehirnen neugeborener Wistar-Ratten, C57-Black-6-Mäusen oder C57-Black-6-GPx1(-/-)-Mäusen (de Haan *et al.* 1998) angelegt und in Kulturmedium (90% DMEM / 10% FCS / 20 U/ml Penicillin G / 20 µg/ml Streptomycinsulfat) kultiviert (Hamprecht und Löffler 1985). Für APKs aus Mäusen wurde zum Anlegen der Kulturen Medium mit doppeltem Gehalt an Penicillin und Streptomycin verwendet, ab dem ersten Medienwechsel wurde Medium mit einfachem Gehalt an Penicillin und Streptomycin verwendet. Drei Millionen lebende Zellen wurden auf 50 mm-Zellkulturschalen in 5 ml Kulturmedium, 300000 lebende Zellen pro well einer 24-well-Zellkulturplatte in 2 ml Kulturmedium oder 30 Millionen lebende Zellen in 175 cm²-Zellkulturflaschen in 50 ml Kulturmedium angesät. Die Kulturen wurden für die Experimente in einem Alter von 14 d bis 21 d verwendet. Für immunocytochemische Anfärbungen wurden Kulturen in einem Alter von 8 d bis 14 d eingesetzt.

5.4.1.3 Oligodendroglareiche Sekundärkulturen

OSKs wurden nach einer Modifikation (Hirrlinger *et al.* 2002b) der Methode von Richter-Landsberg und Vollgraf (1998) gewonnen. Dabei wurden APKs in 175 cm²-

Plastikzellkulturflaschen (5.4.1.2) in einem Kulturalter von 15 d bis 21 d verwendet. Die Zellkulturflaschen wurden bei 37°C 2 h lang bei 190 Upm auf einem Rotationsschüttler (Unimax 1010 mit Inkubator 1000) geschüttelt. Das Medium wurde entfernt. Die Zellen wurden mit 15 ml frischem Kulturmedium gewaschen. Anschließend wurden erneut 50 ml Kulturmedium auf die Zellen gegeben und die Kulturflaschen 17 h lang bei 220 Upm und 37°C geschüttelt. Danach wurde die Zellsuspension in sterilen Zentrifugenröhrchen gesammelt und 10 min lang bei 500 g (4°C) zentrifugiert. Die so erhaltenen Zelniederschläge wurden in je 2 ml OSK-Medium (DMEM mit Transferrin (5 µg/ml), Insulin (5 µg/ml) und Natriumselenit (25 ng/ml)) resuspendiert. In der vereinigten Zellsuspension wurde die Zellzahl bestimmt. Pro *well* einer 24-*well*-Platte wurden 200000 lebende Zellen in 1 ml OSK-Medium, pro 50 mm-Kulturschale 1 Million lebende Zellen in 5 ml OSK-Medium angesät. Alle verwendeten Kulturgefäße waren zuvor mit einer sterilen 0.01%igen (w/v) Poly-D-Lysin-Lösung in Wasser (24-*well*-Platte: 0.3 ml; 50 mm-Kulturschale: 3 ml) über Nacht beschichtet worden, um das Anheften der Oligodendroglia-Vorläufer an die Kulturschalen zu verbessern. Nach der Beschichtung wurden die Kulturgefäße sorgfältig mit DMEM gewaschen, bevor die Zellsuspension angesät wurde. Die Hälfte des OSK-Mediums wurde am dritten Kulturtag erneuert. Experimente wurden am sechsten Kulturtag durchgeführt.

5.4.1.4 Microgliareiche Sekundärkulturen

MSKs wurden nach einer Modifikation (Hirrlinger *et al.* 2000) der Verfahren von Giulian und Baker (1986) sowie Colton und Gilbert (1987) gewonnen. Von APKs in 175 cm²-Zellkulturflaschen wurden durch zehnmaliges seitliches Klopfen mit der Hand Microgliazellen abgeschüttelt. Die abgelösten Zellen wurden mit dem Medium in sterile Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation (500 g, 15 min, 4°C) wurde das Medium bis auf ca. 1 bis 2 ml abgesaugt. Die Zellen wurden resuspendiert und die Zellsuspensionen aus mehreren Röhrchen wurden vereinigt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden 1.5 Millionen Zellen pro 50 mm Kulturschale und 300000 Zellen pro *well* einer 24-*well*-Zellkulturplatte angesät. Nach einer Inkubationszeit von 15 min im Zellinkubator bei 37°C wurde dreimal mit 5 ml (50 mm Kulturschale) bzw. 1 ml (*well* einer 24-*well*-Platte) Kulturmedium gewaschen, um nicht haftende Zellen zu entfernen. Beim dritten Waschschrift wurde dabei das Medium auf eine Mischung aus 50% gliakonditioniertem Medium und 50%

Kulturmedium gewechselt. Die Kulturen wurden in einem Alter von drei Tagen verwendet. Zur Gewinnung des für die MSKs verwendeten konditionierten Mediums wurde der Überstand der während der Präparation der MSK durchgeführten Zentrifugation durch 0.2 µm-Sterilfilter filtriert und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

5.4.1.5 Neuronenreiche Primärkulturen

NPKs wurden nach der Methode von Löffler *et al.* (1986) präpariert. Es wurden 3 Millionen lebende Zellen pro 50 mm-Zellkulturschale in 5 ml Kulturmedium oder 500000 lebende Zellen pro *well* einer 24-*well*-Zellkulturplatte in 2 ml Kulturmedium angesät. Alle verwendeten Kulturgefäße waren zuvor mit einer sterilen 0.01%igen (w/v) Poly-D-Lysin-Lösung in Wasser (24-*well*-Platte: 0.3 ml; 50 mm-Kulturschale: 3 ml) über Nacht beschichtet worden.

5.4.2 Anfärbungen

5.4.2.1 Immuncytochemische Anfärbungen

Die anzufärbenden Zellen wurden auf Deckgläschen (18 mm x 18 mm) kultiviert. Alle Waschschriffe wurden in einem Volumen von 1 ml, die Inkubationsschritte ohne Antikörper in einem Volumen von 0.5 ml durchgeführt. Die Inkubation mit Antikörpern erfolgte in einem Volumen von 80 µl. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur (Rt) mit 3.5% (w/v) PFA in phosphatgepuffertes physiologischer Kochsalzlösung (PBS; 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.4, 150 mM NaCl) 10 min lang fixiert. Nach zweimaligem zehnmütigen Waschen in PBS wurden die Zellen 5 min lang in 0.1%igem (w/v) Glycin in PBS inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Inkubation mit 0.3%igem (w/v) Triton X-100 / 0.1%igem (w/v) Glycin in PBS 10 min lang permeabilisiert. Die immuncytochemischen Anfärbungen wurden bei Rt durchgeführt. Nach jeder Inkubation mit Antikörpern wurden die Zellen dreimal mit PBS je 5 min lang gewaschen. Die Antikörper wurden in PBS mit 10% Ziegennormalserum verdünnt. Die fixierten Zellen wurden mit den Primärantikörpern 2 h lang und danach mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörpern 30 min lang unter Lichtausschluss inkubiert. Die Verdünnungen der eingesetzten Antikörper sind in Tabelle 7 angegeben. Die Deckgläschen aller Präparate wurden anschließend in Immu-Mount eingebettet, bevor die Anfärbung im Fluoreszenzmikroskop untersucht

wurde. Für die Anfärbung mit α -GalC wurden die Zellen vor der Fixierung und der Permeabilisierung mit HEPES-Medium (25 mM HEPES in DMEM, 330 milliosmolar durch Zugabe von NaCl) gewaschen und 1 h lang bei Rt mit anti-GalC (1:5 in HEPES-Medium) inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut zweimal mit HEPES-Medium gewaschen und wie oben beschrieben fixiert, permeabilisiert und mit dem Sekundärantikörper behandelt.

5.4.2.2 Chromatinanfärbung

Chromatinanfärbungen zellulärer DNA wurden verwendet, um die Zellkerne aller Zellen in einem Präparat sichtbar zu machen. Die Zellen wurden nach Durchführung der immunocytochemischen Anfärbung (5.4.2.1) 5 min lang mit 1 μ g/ml 4',6-Diamino-2-phenylindol (DAPI) in PBS inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und in Immu-Mount eingebettet.

5.4.2.3 Immunhistochemische Anfärbung von Hirnschnitten

Die Gehirne wurde freundlicherweise von Prof. Stephen Robinson (Melbourne, Australien) präpariert. Dazu wurden drei Wochen alte Wistar-Ratten zunächst mit Natrium-Pentobarbital (200 mg/kg Körpergewicht, intraperitoneal) getötet und anschließend mit 4% (w/v) PFA in Kaliumphosphatpuffer (KPi, 0.1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7.4) perfundiert. Die Gehirne wurden entnommen und 4 h lang in 4% (w/v) PFA in KPi fixiert. Nach der Fixierung wurden die Gehirne mit Hilfe eines Vibratoms in Schnitte von 100 μ m Dicke geschnitten. Die Hirnschnitte wurden anschließend in *wells* von 24-*well*-Zellkulturplatten gelegt; alle weiteren Schritte wurden in diesen *wells* durchgeführt. Alle Wasch- und Inkubationsschritte mit Ausnahme der Antikörper-Inkubationen wurden in einem Volumen von 1 ml durchgeführt. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte in einem Volumen von 0.5 ml. Die Schnitte wurden zunächst dreimal 20 min lang in PBS gewaschen und anschließend mit einer Blockierungslösung aus 1% (w/v) BSA, 1% (w/v) Triton X-100 und 1% (w/v) Ethanolamin in PBS inkubiert. Es folgten drei weitere 20-minütige Waschschrte in PBS für. Anschließend wurde die Inkubation mit den ersten Antikörpern in einer Lösung aus 1% (w/v) BSA, 0.5% (w/v) Triton X-100 und 0.05% (w/v) Natriumazid in PBS durchgeführt. Nach 18-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Gehirnschnitte dreimal in PBS jeweils 20 min lang bei 37°C gewaschen und danach 3 h lang mit dem zweiten Antikörper (1:300) (37°C) in 1% (w/v) BSA in

PBS inkubiert. Es folgten drei weitere 20-minütige Waschschrte mit PBS. Anschließend wurde 3 h lang mit dem Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplex (1:300) in PBS (37°C) inkubiert. Die Hirnschnitte wurden daraufhin 10 min lang mit 0.05% (w/v) DAB und 0.01% Nickelsulfat (DAB-Ni-Sulfat) in KPi und danach weitere 10 min mit DAB-Ni-Sulfat plus H₂O₂ (0.005%) in KPi inkubiert. Nach weiteren drei Waschschrten von 20 min mit KPi wurden die Gehirnschnitte mit 70% Ethanol gewaschen, auf Objektträger transferiert, bei 50°C im Ofen getrocknet, mit 100% Ethanol und ein wenig Aceton dehydratisiert, mit Histolen gereinigt und anschließend in DePex eingebettet.

5.4.2.4 Eisen(III)färbungen

Mit Hilfe einer Modifikation der Methode von Nguyen-Legros *et al.* (1980) wurde Eisen(III) histochemisch in Hirnschnitten nachgewiesen. Die Methode beruht auf zwei Schritten. Im ersten Schritt entsteht nach der Methode von Perls (1867) durch Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat(II) im sauren Millieu unlösliches Berliner Blau (Perls-Färbung). Da dieser Komplex in Hirnschnitten kaum sichtbar war, wurde von Nguyen-Legros ein Intensivierungsschritt entwickelt. Die Intensivierung wurde erreicht durch Reaktion mit DAB und H₂O₂, was die Bildung eines unlöslichen braunen Farbstoffes verursachte.

Eisenfärbung von Hirnschnitten

Hirnschnitte wurden präpariert wie in Kapitel 5.4.2.3 beschrieben. Die Waschschrte erfolgten in einem Volumen von 1 ml. Alle Inkubationsschrte wurden in einem Volumen von 0.5 ml durchgeführt. Nach der Präparation wurden die Hirnschnitte in *wells* von 24-*well*-Zellkulturplatten gelegt, und alle weiteren Schritte in diesen *wells* durchgeführt. Die Hirnschnitte wurden zunächst 30 min lang mit 4% (w/v) PFA in KPi nachfixiert. Nach zweimaligem Waschen mit KPi wurden die Schnitte 30 min lang mit 5% (w/v) Kaliumhexacyanoferrat(II) in KPi behandelt und anschließend nochmals mit 5% (w/v) Kaliumhexacyanoferrat(II) in KPi plus HCl (Endkonzentration 5%) inkubiert. Danach wurden die Schnitte zweimal 10 min lang mit KPi gewaschen. Es folgte die Verstärkung des Signals durch Behandlung mit DAB-Ni-Sulfat. Die Schnitte wurden zunächst 15 min lang mit DAB-Ni-Sulfat in KPi behandelt und anschließend nochmals mit DAB-Ni-Sulfat plus 0.005% H₂O₂. Danach wurden die Hirnschnitte

erneut zweimal mit KPi gewaschen, anschließend mit 100% Ethanol dehydratisiert, getrocknet und eingebettet.

Eisenfärbung von Zellkulturen

Die anzufärbenden Zellen wurden in 24-well-Platten oder 50 mm-Kulturschalen kultiviert. Die Waschschriffe wurden in Volumina von 1 ml bzw. 5 ml durchgeführt. Alle anderen Inkubationsschritte erfolgten in Volumina von 0.5 ml (*wells*) bzw. 3 ml (50 mm-Kulturschalen). Zunächst wurden die Zellen zweimal 5 min lang mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie bei Rt mit 3.5% PFA (w/v) in PBS 30 min lang fixiert. Die Perls-Reaktion wurde wie bei der Eisenfärbung von Gehirnschnitten durchgeführt, mit der Ausnahme, dass im zweiten Teilschritt eine Kaliumhexacyanoferrat(II)-HCl-Lösung mit einer Endkonzentration von 1% HCl (statt 5% HCl) verwendet wurde. Anschließend wurden die Zellen zweimal 10 min lang mit KPi gewaschen. Die Zellen wurden daraufhin 15 min lang mit 0.05% (w/v) DAB in KPi behandelt und anschließend nochmals mit 0.05% (w/v) DAB plus 0.005% H₂O₂. Zuletzt wurden die Zellen erneut mit KPi gewaschen und anschließend fotografiert.

5.4.2.5 Rhodaminfärbung

Mit Hilfe der Rhodaminfärbung lassen sich intrazelluläre Radikale nachweisen. Hier wurde mit einer Modifikation der von Almeida *et al.* (2002) beschriebenen Methode gearbeitet. Die Zellen wurden auf Deckgläschen (18 mm x 18 mm) kultiviert. Nach Durchführung der verschiedenen Inkubationen wurden die Zellen dreimal mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 1 h lang mit 0.5 ml 2.5 µg/ml DRH123 in PBS bei 37°C inkubiert. Bei Anwesenheit von Radikalen wird DRH123 oxidiert und es entsteht das fluoreszierende RH123. Anschließend wurden die Zellen zweimal 5 min lang mit 1 ml PBS gewaschen und dann 10 min lang mit 3.5% (w/v) PFA in PBS fixiert. Nach der Fixierung wurde dreimal gewaschen, bevor die Präparate in Immu-Mount eingebettet wurden. Nach dem Trocknen wurden die Präparate fotografiert.

5.4.2.6 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Untersuchung von APKs wurde freundlicherweise von Herrn Prof. H. Wolburg (Universität Tübingen) durchgeführt. Die in 50 mm-Schalen gewachsenen Zellen wurden zunächst mit 2.5% Glutardialdehyd in 0.1 M

Cacodylatpuffer, pH 7.4 3 h lang bei Rt fixiert. Nach mehreren Waschschritten mit Cacodylatpuffer wurden die Zellen abgeschabt und zentrifugiert. Die Zellniederschläge wurden anschließend in 1% Cacodylat-gepuffertem Osmiumtetroxid 2 h lang fixiert und nach erneutem Waschen schrittweise mit 50, 70, 80, 96 und 100% Ethylalkohol jeweils ca. 30 min lang entwässert. Dem 70%igen Ethylalkohol war zur Blockkontrastierung Uranylacetat (gesättigt) beigemischt. Anschließend wurden die Zellen 48 h lang bei 60°C in Araldit eingebettet. Die ausgehärteten Aralditblöcke wurden danach mit einem Ultramikrotom in Ultradünnschnitte (50 nm) geschnitten, auf Pioloform-beschichtete Kupfernetzchen aufgebracht und mit Bleicitrat kontrastiert. Die fertigen Ultradünnschnitte wurden im Elektronenmikroskop untersucht und fotografiert. Die ausgewählten Bilder wurden digitalisiert und mit Adobe Photoshop nachbearbeitet.

5.4.3 Westernblot-Analysen

Gewinnung der Proteinproben

Für die Gewinnung von Proteinproben wurden Zellen auf 50 mm-Zellkulturschalen kultiviert. Der Zellrasen wurde mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen und nach zehnmütiger Lyse in 400 µl Lyselösung (H₂O mit Proteaseinhibitoren (1 µM Leupeptin, 0.3 µM Aprotinin, 100 µM Phenylmethylsulfonylfluorid und 1 µM Pepstatin)) auf Eis von der Kulturschale abgeschabt. Das Lysat wurde aliquotiert und zentrifugiert (500 g, 10 min, 4°C). Die Überstände wurden in Plastikreaktionsgefäße überführt und wie die Niederschläge bei -80°C eingefroren. Nach dem Gefrieren wurden alle Proben lyophilisiert. Die Lyophilisate wurden anschließend bei -80°C gelagert. An je einem aliquoten Teil wurde der Proteingehalt bestimmt. Neben den selbstständig hergestellten Lyophilisaten aller verwendeten Zelltypen wurden zudem weitere Zellyophilisate von NPKs und MSKs verwendet, die von Dr. J. Hirrlinger gewonnen und bei -80°C gelagert worden waren.

Probenvorbereitung

Zur Durchführung der *Western Blot*-Analysen wurden in jedem Versuch identische Proteinmengen und Volumina pro Tasche aufgetragen. Die Proteinproben wurden in Ladepuffer (62.5 mM Tris/HCl pH 6.8, 10% (w/v) Glycerin, 0.004% (w/v) Bromphenolblau, 2% (w/v) SDS, modifiziert nach Laemmli (1970)) gelöst. Zur Reduktion von Disulfidbrücken wurde jeweils 1 µl Mercaptoethanol zu 20 µl Probe gegeben. Zur vollständigen Denaturierung wurden die Proben in einem kochenden

Wasserbad 5 bis 7 min lang inkubiert. Die Proben wurden auf Eis gekühlt, kurz zentrifugiert und vollständig auf ein Gel aufgetragen. Zur Untersuchung nativer Proteine wurde ein Ladepuffer ohne SDS verwendet und die Proben wurden weder mit Mercaptoethanol versetzt noch gekocht. Zur Analyse der Beteiligung von Disulfidbrücken an der Dimer-Bildung des TfR wurden Proben unter nicht-reduzierenden Bedingungen gekocht.

Gelelektrophorese

Proteine können nach ihrer molaren Masse mit der Methode der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt werden (Laemmli 1970). Für die Identifizierung von Ferritin wurden SDS-Polyacrylamid-Gele (Angaben für zwei Gele) mit einem 12%igen Trenngel (6 ml Acrylamid (30% w/v) / Bisacrylamid (0.8% w/v)-Mischung (AA/BA), 1.875 ml Trenngelpuffer (3 M Tris/HCl pH 8.9), 6.9 ml H₂O, 150 µl SDS (10% w/v in H₂O), 25 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und 50 µl Ammoniumperoxodisulfat (APS) (10% w/v in H₂O) hergestellt. Für die Auftrennung des TfR wurden 8%ige Polyacrylamid-SDS-Trenngele (4 ml AA/BA, 1.875 ml Trenngelpuffer; 8.9 ml H₂O, 150 µl SDS, 25 µl TEMED und 50 µl APS) verwendet. Die Sammelgele enthielten 4.2% Acrylamid (0.7 ml AA/BA, 0.63 ml Sammelgelpuffer (0.5 M Tris/HCl pH 6.8), 3.6 ml H₂O, 50 µl SDS, 10 µl TEMED und 20 µl APS). Die aufgetragenen Proben wurden elektrophoretisch 1.5 bis 2.5 h lang bei 16 mA konstanter Stromstärke pro Gel in Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1% (w/v) SDS, pH 8.5) nach ihrer molaren Masse aufgetrennt.

Zur Auftrennung von Proteinen im nativen Gel wurde ein 6%iges Trenngel ohne SDS (3 ml AA/BA, 1.875 ml Trenngelpuffer, 10.05 ml H₂O, 25 µl TEMED und 50 µl APS) hergestellt. Die aufgetragenen Proben wurden elektrophoretisch 3 h lang bei konstanten 160 Volt in Laufpuffer ohne SDS (25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8.5) aufgetrennt.

Elektrotransfer

Die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden bei einer angelegten Spannung von 100 V während einer Stunde bei 4°C in *Blot*puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8.3, 20% (v/v) Methanol) auf eine Nitrocellulosemembran transferiert.

Immunodetektion

Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden durch zweistündige Inkubation mit 5% (w/v) Milchpulver und 0.05% (w/v) Tween-20 in PBS abgesättigt. Die Membranen wurden danach in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und über Nacht auf dem Taumelroller bei 4°C mit 3 ml Antikörperlösung (alle primären Antikörper 1:500 verdünnt) in PBS mit Milchpulver (5% w/v) und Tween-20 (0.05% w/v) inkubiert. Bei den *Blots* der nativen Gele erfolgte die Antikörperinkubation 3 h lang bei Rt. Nach viermaligem Waschen (jeweils 5 min lang) mit 30 ml Waschpuffer (0.05% Tween-20 in PBS) wurden die Membranen 1 h lang (2 h lang bei den Membranen der nativen Gele) mit dem Sekundärantikörper α -Kaninchen-IgG-AP oder α -Maus-IgG-AP (1:5000) in 5 ml PBS auf dem Taumelroller bei Rt inkubiert. Nach erneuter Behandlung mit Waschpuffer (4 x 5 min) wurden die Membranen in 0.2 M Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, pH 9.5 mit 40 μ M NBT und 41 μ M BCIP inkubiert. NBT wurde in 50% Dimethylformamid / 50% H₂O, BCIP in 100% Dimethylformamid stets frisch gelöst. In dieser Nachweisreaktion katalysiert die an den Sekundärantikörper gebundene AP die Freisetzung eines Indolderivates, das zu einem unlöslichen violetten Farbstoff autoxidiert. Es traten nach 2 bis 15 min violette Verfärbungen an den Stellen der Membran auf, die einer Proteinbande im Gel entsprachen, an die der AP-tragende Sekundärantikörper über den Primärantikörper gebunden hatte. Die Färbereaktion wurde durch Waschen mit 20 mM EDTA in PBS gestoppt. Die Membran wurde zur Vermeidung schnellen Ausbleichens dunkel gelagert.

5.4.4 Detektion von Eisen in Polyacrylamidgelen

Um die Eisenbeladung von Ferritin zu untersuchen, wurden die löslichen Fraktionen von Astrogliahomogenaten parallel auf zwei nativen Gelen aufgetrennt, wie in Kapitel 5.4.3 beschrieben. Eines der Gele wurde einem Elektrotransfer mit anschließender Immunodetektion von Ferritin unterzogen. Im anderen Gel wurde das Vorkommen von Eisen mit einer modifizierten Perls-Färbung untersucht. Nach kurzem Waschen mit KPi wurde das Gel 10 min lang mit 5% (w/v) Kaliumhexacyanoferrat(II) in KPi und anschließend 10 min lang mit 5% (w/v) Kaliumhexacyanoferrat(II) in KPi plus HCl (Endkonzentration 1%) behandelt. Es folgten zwei Waschschrte mit KPi (jeweils 5 min). Das Gel wurde dann 10 min lang mit 0.05% (w/v) DAB in KPi und dann 10 min lang mit 0.05% (w/v) DAB plus 0.005% H₂O₂ in KPi inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen des Gels (jeweils 5 min) wurde das Ergebnis sofort

fotografisch dokumentiert. Zum Nachweis der Speicherung von Eisen in Ferritin wurde die Laufstrecke der angefärbten Bande mit der Laufstrecke des durch *Western Blot*-Analyse nachgewiesenen Ferritins verglichen.

5.4.5 Bestimmungsmethoden

5.4.5.1 Kolorimetrische Eisenbestimmung

Die Quantifizierung von Eisen wurde nach einer Modifikation (Riemer *et al.* 2004) der von Fish (1988) beschriebenen Methode durchgeführt. Diese Methode basiert auf zwei Schritten. Im ersten Schritt wird Eisen durch die Behandlung mit salzsaurer Kaliumpermanganat-Lösung aus Komplexen und Proteinen freigesetzt. Im zweiten Schritt wird das freigesetzte Eisen durch den Eisenchelator Ferrozin gebunden. Die Absorption des Ferrozin-Eisen-Komplexes lässt sich bei 550 nm messen. Da Ferrozin spezifisch für Fe^{2+} ist, wird dem System noch Ascorbat zugesetzt, das Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert. Der Kupferchelator Neocuproin verhindert zudem, dass Ferrozin Kupfer bindet und Kupferionen den Eisennachweis verfälschen.

Die kolorimetrische Eisenbestimmung wurde in zwei verschiedenen Varianten durchgeführt. Die erste Variante diente dazu, die kolorimetrische Eisenbestimmung direkt mit AAS-Daten zu vergleichen. Dazu wurden die Zellen aus den *wells* von 24-*well*-Zellkulturplatten zunächst mit 200 μl 50 mM NaOH 2 h lang lysiert. Anschließend wurden davon 100 μl für die kolorimetrische Eisenbestimmung, 10 μl für die AAS und 50 μl für die Proteinbestimmung verwendet. Für die kolorimetrische Eisenbestimmung wurden 100 μl Zelllysat mit 100 μl 10 mM HCl und 100 μl des Freisetzungsreagenz (4.5% (w/v) Kaliumpermanganat-Lösung und 1.4 M HCl im Verhältnis 1:1) in einem Eppendorf-Gefäß gemischt und 2 h lang bei 60°C im Wasserbad erhitzt. Anschließend wurden in jedes Eppendorfgefäß 30 μl des Detektionsreagenz (6.5 mM Ferrozin, 6.55 mM Neocuproin, 2.5 M Ammoniumacetat, 1 M Ascorbat) pipettiert. Nach 30 min Inkubation bei Rt wurden jeweils 280 μl der zu untersuchenden Proben in *wells* von Microtiterplatten pipettiert. Sodann wurde die Absorption bei 550 nm gemessen. Als Standard wurde Eisen(III)chlorid verwendet. Für den Vergleich der basalen Eisengehalte verschiedener neuraler Zelltypen wurden Zellkulturen aus 50 mm-Kulturschalen verwendet. Eisen wurde nach der oben beschriebenen Methode bestimmt, mit dem Unterschied, dass die Zellen in 800

μl (APK) bzw. 400 μl (OSK, MSK, NPK) 50 mM NaOH lysiert wurden. An einem Lysat wurde jeweils Protein und Eisen bestimmt.

Nach der erfolgreichen Validierung durch AAS wurde die kolorimetrische Eisenbestimmung für Zellkulturen in 24-*well*-Zellkulturplatten vereinfacht. Alle Schritte der Eisenbestimmung wurden direkt in den *wells* durchgeführt. Nach dem Waschen der Zellen mit PBS wurden jeweils 200 μl 50 mM NaOH, 10 mM HCl und Freisetzungsreagenz in die *wells* pipettiert, bevor 2 h lang bei 60°C auf dem Wasserbad inkubiert wurde. Anschließend wurden in jedes *well* 60 μl Detektionsreagenz gegeben. Nach 30 min Inkubationszeit wurden jeweils 280 μl der zu untersuchenden Proben in *wells* von Microtiterplatten pipettiert. Sodann wurde die Absorption bei 550 nm gemessen.

5.4.5.2 Atomabsorptionsspektrometrische Eisenbestimmung

Die auf 50 mm-Schalen oder 24-*well*-Zellkulturplatten gewachsenen Zellen wurden zweimal mit eiskalter PBS und anschließend mit 800 μl (50 mm-Schale) bzw. 200 μl (*well* einer 24-*well*-Platte) 50 mM NaOH 2 h lang bei Rt lysiert. Dieses Lysat wurde sowohl für die Eisen- als auch für die Proteinbestimmung verwendet. Für die Eisenbestimmung wurden 10 μl Probe in das Atomabsorptionsspektrometer eingeführt. Durch Erhitzung auf 100°C wurden die Proben getrocknet und anschließend bei 1400°C eingeäschert. Danach wurden die Proben bei 2400°C atomisiert und die Absorption bei 248.3 nm gemessen (Slavin 1988). Die Menge an Eisen in einer Probe wurde durch den Vergleich mit Standardmengen von Eisen(II)sulfat (0 bis 75 pmol) errechnet.

5.4.5.3 Wasserstoffperoxid

Der H_2O_2 -Gehalt von Inkubationsmedien wurde mit einem Test im Microtitermaßstab bestimmt (Dringen und Hamprecht 1997; Dringen *et al.* 1998a). Zehn Microliter der H_2O_2 -haltigen Lösungen oder der Lösungen des Standards wurden mit 170 μl 25 mM Schwefelsäure in einem *well* einer Microtiterplatte verdünnt. Nach Zugabe von 180 μl Reaktionsmischung (0.5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$, 200 mM Xylenorange und 200 mM Sorbitol in 25 mM H_2SO_4) wurde 60 min lang bei Rt inkubiert und dann die Extinktion bei 550 nm im *ELISA-Reader* gemessen. Der gebildete Komplex aus Xylenorange und Fe^{3+} besitzt ein breites Absorptionsmaximum zwischen 500 nm und 575 nm

(Michaels und Hunt 1978). Die gemessenen Extinktionen der Proben wurden mit denen der Standardkonzentrationen an H_2O_2 verglichen. Die Absorption des gebildeten Komplexes aus Fe^{3+} und Xylenolorange ist proportional zur Konzentration von H_2O_2 im Bereich von 0 bis 250 μM H_2O_2 in der Lösung (Dringen *et al.* 1998a).

5.4.5.4 Glutathion und Glutathiondisulfid

Der GSx-Gehalt (Menge an GSH plus zweifache Menge an GSSG) wurde nach der Modifikation (Dringen und Hamprecht 1996) der Tietze-Methode (Tietze 1969) in Microtiterplatten bestimmt. Das Testprinzip beruht auf der Reduktion von 5,5'-Dithio-bis(nitrobenzoesäure) durch GSH zu 5-Thio-2-nitrobenzoat, dessen Entstehung photometrisch bei 405 nm verfolgt werden kann. Um diese Nachweisreaktion spezifisch für GSH zu machen, wurden der Reaktionsmischung NADPH und GR zugesetzt, die entstandenes GSSG wieder zu GSH reduzieren. Die Bedingungen wurden so gewählt, dass nur die Menge an GSx im Testansatz limitierend für die Reaktionsgeschwindigkeit ist. Der Extinktionsanstieg pro Zeiteinheit ist somit ein Maß für den GSx-Gehalt einer Probe, der durch Vergleich mit GSx-Standards berechnet wird. Zur Bestimmung von GSx in Zelllysaten wurden die Zellen nach kurzem Waschen mit eiskalter PBS 10 min lang mit 1% (w/v) Sulfosalicylsäure lysiert. Anschließend wurden die Lysate in Reaktionsgefäße überführt und 1 min lang mit 13000 g zentrifugiert. 10 μl des Überstandes wurden mit H_2O auf 100 μl Volumen in *wells* einer Microtiterplatte verdünnt, bevor 100 μl Reaktionsmischung (0.3 mM 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure, 0.4 mM NADPH, 1 mM EDTA in 0.1 M Natriumphosphatpuffer pH 7.5) zugegeben wurden. Der Anstieg der Extinktion bei 405 nm pro *well* wurde mit dem *ELISA-Reader* gemessen und mit dem von GSx-Standards verglichen.

Der Gehalt an GSSG in den Proben wurde nach vorheriger Derivatisierung von GSH mit 2-Vinylpyridin (Griffith 1980) bestimmt. Dazu wurden zur Bestimmung des GSSG-Gehaltes in den Zellen je 130 μl der Lysatüberstände in 1% (w/v) Sulfosalicylsäure mit 5 μl 2-Vinylpyridin versetzt. Anschließend wurde mit 0.2 M Tris ein pH-Wert zwischen 5 und 7 eingestellt (Griffith 1980). Nach einstündiger Inkubation bei Rt wurden je 10 μl zur GSx-Bestimmung nach dem oben beschriebenen Verfahren eingesetzt. Aus den Extinktionsänderungen pro Zeiteinheit der Ansätze mit GSx-

Standards wurde eine Eichgerade erstellt, die zur Auswertung der Proben herangezogen wurde.

5.4.5.5 Zellvitalität

Die Zellvitalität wurde durch die Messung der Aktivität der LDH im Inkubationsmedium bestimmt. Dazu wurde der Test von Vassault (1983), adaptiert auf Microtiterplattenmaßstab (Dringen *et al.* 1998a), verwendet. Ein aliquoter Teil des Inkubationsmediums wurde mit 80 mM Tris/HCl-Puffer, 200 mM NaCl, pH 7.2, in einem *well* einer Microtiterplatte auf ein Volumen von 180 µl verdünnt. Nach Zugabe von 180 µl Reaktionsmischung (3.2 mM Pyruvat, 0.4 mM NADH, 200 mM NaCl in 80 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.2) wurde der Abfall der Absorption bei 340 nm mit dem ELISA-Reader aufgezeichnet. Die LDH-Aktivität des aliquoten Teils des Inkubationsmediums wurde mit der Aktivität im Inkubationsmedium nach völliger Lyse der Zellen (30 min Inkubation bei Rt nach Zugabe von Triton X-100 zu einer Endkonzentration von 1% (w/v)) verglichen. Null Prozent Lebensfähigkeit entspricht 100% LDH-Aktivität im Inkubationsmedium.

5.4.5.6 Protein

Der Proteingehalt von Zellkulturen wurde nach der Methode von Lowry *et al.* (1951) bestimmt. Dabei wurde BSA als Standardprotein verwendet. Das Protein von Zellen auf 24-*well*-Zellkulturplatten wurde in 0.2 ml (APK) oder 0.1 ml (NPK, OSK, MSK) 0.5 M NaOH solubilisiert. Das Protein aus 50 mm-Schalen wurde in 800 µl (APK) oder 400 µl (NPK, OSK, MSK) 0.5 M NaOH solubilisiert.

5.4.6 Molekularbiologische Methoden

5.4.6.1 Sequenzanalyse und Primerdesign

Als Grundlage von Sequenzvergleichen wurden cDNA-Sequenzen aus der *Genbank*-Datenbank der *National Institutes of Health* herangezogen. Sequenzen wurden mit Hilfe des „Blast“-Programmpaketes (Altschul *et al.* 1997; Tatusova und Madden 1999) miteinander und mit der Datenbank verglichen.

Zum Design von PCR-Primern zur Amplifikation von cDNAs für Proteine des Eisenstoffwechsels wurden die bekannten Ratten-cDNA-Sequenzen verwendet

(*Accession numbers* siehe Tabelle 8). Aus diesen cDNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms *Primer3* (Rozen und Skaletsky 2000) *Primer* gesucht, die Amplifikationsprodukte von 200 bis 500 bp Länge einschlossen. Dabei wurden die Zielsequenzen, sofern möglich, innerhalb eines offenen Leserahmens gewählt, um die Wahrscheinlichkeit von Fehlern durch spezies- oder linienspezifische Mutationen zu verringern. Um das Risiko der Amplifikation anderer Gene möglichst gering zu halten, wurden alle verwendeten PCR-*Primer* durch Vergleich mit der „*Genbank*“-Datenbank auf Komplementarität zu anderen bekannten Sequenzen überprüft. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *Primer* sind in Tabelle 8 aufgeführt.

5.4.6.2 Reverse Transkription

RNA wurde von Dr. Johannes Hirrlinger aus APKs, MSKs, OSKs und NPKs sowie aus Leber und Hirn adulter Ratten gewonnen (Hirrlinger *et al.* 2002a) und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Ein μg Gesamt-RNA wurde in $11.5 \mu\text{l}$ H_2O und mit $1 \mu\text{g}$ *Random-Hexamer-Primer* für 5 min bei 70°C inkubiert und sofort auf Eis überführt. Nach Zugabe von $4 \mu\text{l}$ 5fach RT-Puffer vom Hersteller der Reversen Transkriptase, $2 \mu\text{l}$ dNTPs (je 10 mM) und $0.5 \mu\text{l}$ RNAsin auf ein Volumen von $19 \mu\text{l}$ wurde 5 min lang bei Rt inkubiert. Danach wurde mit 200 U Reverse Transkriptase zu einem Gesamtvolumen von $20 \mu\text{l}$ aufgefüllt und nach 10 min Inkubation bei 25°C 1 h lang bei 37°C revers transkribiert. Anschließend wurde die Reaktion durch zehnmünütige Inkubation bei 70°C gestoppt. Die erhaltenen einzelsträngigen cDNAs wurden mit dem „*High-Pure PCR Product Purification Kit*“ nach der Anleitung des Herstellers gereinigt und in $50 \mu\text{l}$ Elutionspuffer (1 mM Tris/HCl, $\text{pH } 8.5$) aufgenommen.

5.4.6.3 Polymerasekettenreaktion

PCRs wurden in einem Ansatz aus 1.5 mM MgCl_2 , 1.25 U Taq DNA Polymerase, $0.5 \mu\text{M}$ *Primern*, je 0.2 mM dNTPs und $2 \mu\text{l}$ der gereinigten cDNA (5.4.6.2) in $50 \mu\text{l}$ PCR-Puffer (vom Hersteller der Polymerase als 10-fach konzentrierte Stammlösung geliefert) durchgeführt. Nach 2 min Denaturierung bei 94°C und 35 Zyklen mit je 1 min Denaturierung (94°C), 2 min Anlagerung (58°C bzw. 60°C bei *Primern* für Transferrin-cDNA) und 1 min DNA-Synthese (72°C) gefolgt von einer abschließenden Synthesephase von 10 min bei 72°C wurden die PCR-Produkte auf

einem Gel aus 2% (w/v) Agarose in Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat-Puffer (40 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA, pH 8.0) analysiert.

Tabelle 8: PCR-Primer für die Amplifikation der cDNAs von Proteinen des Eisenstoffwechsels.

Genprodukt	Accession number	Sequenz	Produktgröße (bp)
L-Ferritin	NM_022500	V: TGGAGAAGAACCTGAACCAG R: CAAAGAGATACTCGCCCAGA	219
H-Ferritin	RNU58829	V: GTCTTGTTATTTTGACCGGG R: CGTCAGCTTAGCTCTCATCA	443
TfR	M58040	V: GCTCGTGGGAGACTACTTCCG R: GCATTTGCAACTCCCTGAAT	311
Transferrin	D38380	V: GGCATCAGACTCCAGCATCA R: TACCATCAGGGCACAGCAGC	395
IRP1	NM_017321.1	V: CTGCAGGACTTTACGGGCGT R: CAGCTTGTAGCCAATCATCT	489
IRP2	NM_022863.1	V: AGGGAGGCAATGAAAACCTCT R: AATGAAAGGGACACAGGACA	307
β-Aktin	V01217	V: GGGTCAGAAGGACTCCTACG R: GGTCTCAAACATGATCTGGG	237

V: Vorwärts-Primer, R: Rückwärts-Primer

6 Literaturreferenzen

- Aasa R., Malmstroem B. G. und Saltmann P. (1963) The specific binding of iron(III) and copper(II) to transferrin and conalbumin. *Biochim Biophys Acta* **75**, 203-222.
- Abbott N. J. (2002) Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Biol Chem* **275**, 19906-19912.
- Abboud S. und Haile D. J. (2000) A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* **275**, 19906-19912.
- Abe K. und Saito H. (1998) Characterization of t-butyl hydroperoxide toxicity in cultured rat cortical neurones and astrocytes. *Pharmacol Toxicol* **83**, 40-46.
- Aebi H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* **105**, 121-126.
- Agrawal R., Sharma P. K. und Rao G. S. (2001) Release of iron from ferritin by metabolites of benzene and superoxide radical generating agents. *Toxicology* **168**, 223-230.
- Aisen P. (1998) Transferrin, the transferrin receptor, and the uptake of iron by cells. *Met Ions Biol Syst* **35**, 585-631.
- Aisen P., Leibman A. und Reich H. A. (1966) Studies of the binding of iron to transferrin and conalbumin. *J Biol Chem* **241**, 1666-1671.
- Aisen P., Aasa R. und Redfield A. G. (1969) The chromium, manganese, and cobalt complexes of transferrin. *J Biol Chem* **244**, 4628-4633.
- Almeida A., Delgado-Esteban M., Bolanos J. P. und Medina J. M. (2002) Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurones but not in astrocytes in primary culture. *J Neurochem* **81**, 207-217.
- Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. und Lipman D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Alvarez-Buylla A. und Garcia-Verdugo J. M. (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* **22**, 629-634.
- Anderson B. F., Baker H. M., Dodson E. J., Norris G. E., Rumball S. V., Waters J. M. und Baker E. N. (1987) Structure of human lactoferrin at 3.2-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 1769-1773.
- Anderson B. F., Baker H. M., Norris G. E., Rice D. W. und Baker E. N. (1989) Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol* **209**, 711-734.
- Anderson C. M. und Swanson R. A. (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* **32**, 1-14.
- Andrews N. C. (1999) The iron transporter DMT1. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 991-994.
- Araque A., Martin E. D., Perea G., Arellano J. I. und Buno W. (2002) Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neurosci* **22**, 2443-2450.

- Attieh Z. K., Mukhopadhyay C. K., Seshadri V., Tripoulas N. A. und Fox P. L. (1999) Ceruloplasmin ferroxidase activity stimulates iron uptake by a trivalent cation-specific transport mechanism. *J Biol Chem* **274**, 1116-1123
- Aziz N. und Munro H. N. (1987) Iron regulates ferritin mRNA translation through a segment of its 5' untranslated region. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 8478-8482.
- Babcock G. T. (1999) How oxygen is activated and reduced in respiration. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 12971-12973.
- Bailey S., Evans R. W., Garratt R. C., Gorinsky B., Hasnain S., Horsburgh C., Jhoti H., Lindley P. F., Mydin A. und Sarra R. (1988) Molecular structure of serum transferrin at 3.3-Å resolution. *Biochemistry* **27**, 5804-5812.
- Bains J. S. und Shaw C. A. (1997) Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Brain Res Rev* **25**, 335-358.
- Baker E., Baker S. M. und Morgan E. H. (1998) Characterisation of non-transferrin-bound iron (ferric citrate) uptake by rat hepatocytes in culture. *Biochim Biophys Acta* **1380**, 21-30.
- Baker E. N., Baker H. M., Smith C. A., Stebbins M. R., Kahn M., Hellstrom K. E. und Hellstrom I. (1992) Human melanotransferrin (p97) has only one functional iron-binding site. *FEBS Lett* **298**, 215-218.
- Ballatori N. (1994) Glutathione mercaptides as transport forms of metals. *Adv Pharmacol* **27**, 271-298.
- Banks W. A., Kastin A. J., Fasold M. B., Barrera C. M. und Augereau G. (1988) Studies of the slow bidirectional transport of iron and transferrin across the blood-brain barrier. *Brain Res Bull* **21**, 881-885.
- Baquer N. Z., Hothersall J. S. und McLean P. (1988) Function and regulation of the pentose phosphate pathway in brain. *Curr Top Cell Regul* **29**, 265-289.
- Bartzokis G., Tishler T. A., Shin I. S., Lu P. H. und Cummings J. L. (2004) Brain ferritin iron as a risk factor for age at onset in neurodegenerative diseases. *Ann NY Acad Sci* **1012**, 224-236.
- Baud O., Greene A. E., Li J., Wang H., Volpe J. J. und Rosenberg P. A. (2004) Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *J Neurosci* **24**, 1531-1540.
- Bauer H., Bauer H. C., Haseloff R. F. und Blasig I. E. (2005) The role of glia in the formation and function of the blood-brain barrier. In *Neuroglia*; 2. Auflage (Hrsg.: Kettenmann H. und Ransom B.R.) S. 325-333, Oxford University Press, New York.
- Baumann N. und Pham-Dinh D. (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* **81**, 871-927.
- Bauminger E. R., Harrison P. M., Hechel D., Hodson N. W., Nowik I., Treffry A. und Yewdall S. J. (1993) Iron (II) oxidation and early intermediates of iron-core formation in recombinant human H-chain ferritin. *Biochem J* **296**, 709-719.
- Ben Shachar D., Eshel G., Riederer P. und Youdim M. B. (1992) Role of iron and iron chelation in dopaminergic-induced neurodegeneration: implication for Parkinson's disease. *Ann Neurol* **32** Suppl, S105-S110.

- Benkovic S. A. und Connor J. R. (1993) Ferritin, transferrin, and iron in selected regions of the adult and aged rat brain. *J Comp Neurol* **338**, 97-113.
- Bennett M. V., Contreras J. E., Bukauskas F. F. und Saez J. C. (2003) New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci* **26**, 610-617.
- Berlett B. S., Levine R. L., Chock P. B., Chevion M. und Stadtman E. R. (2001) Antioxidant activity of Ferrozine-iron-amino acid complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 451-456.
- Biemond P., Swaak A. J., Beindorff C. M. und Koster J. F. (1986) Superoxide-dependent and -independent mechanisms of iron mobilization from ferritin by xanthine oxidase. Implications for oxygen-free-radical-induced tissue destruction during ischaemia and inflammation. *Biochem J* **239**, 169-173.
- Bishop G. M. und Robinson S. R. (2001) Quantitative analysis of cell death and ferritin expression in response to cortical iron: implications for hypoxia-ischemia and stroke. *Brain Res* **907**, 175-187.
- Bloch B., Popovici T., Levin M. J., Tuil D. und Kahn A. (1985) Transferrin gene expression visualized in oligodendrocytes of the rat brain by using in situ hybridization and immunohistochemistry. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 6706-6710.
- Bock E., Moller M., Nissen C. und Sensenbrenner M. (1977) Glial fibrillary acidic protein in primary astroglial cell cultures derived from newborn rat brain. *FEBS Lett* **83**, 207-211.
- Bokoch G. M. und Knaus U. G. (2003) NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem Sci* **28**, 502-508.
- Boulet M. (1997) Micronutrient deficiencies. Reports from the field -- Africa. *Glob Impacts* **13**.
- Bridges K. R. und Cudkowicz A. (1984) Effect of iron chelators on the transferrin receptor in K562 cells. *J Biol Chem* **259**, 12970-12977.
- Bukato G., Kochan Z. und Swierczynski J. (1995) Different regulatory properties of the cytosolic and mitochondrial forms of malic enzyme isolated from human brain. *Int J Biochem Cell Biol* **27**, 1003-1008.
- Burdo J. R. und Connor J. R. (2003) Brain iron uptake and homeostatic mechanisms: an overview. *Biometals* **16**, 63-75.
- Burdo J. R., Menzies S. L., Simpson I. A., Garrick L. M., Garrick M. D., Dolan K. G., Haile D. J., Beard J. L. und Connor J. R. (2001) Distribution of divalent metal transporter 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat. *J Neurosci Res* **66**, 1198-1207.
- Butt A.M. (2005) Structure and function of oligodendrocytes. In *Neuroglia*, 2. Auflage (Hrsg.: Kettenmann H. und Ransom B.R.) S. 48-59, Oxford University Press, New York.
- Byrd T. F. und Horwitz M. A. (1993) Regulation of transferrin receptor expression and ferritin content in human mononuclear phagocytes. Coordinate upregulation by iron transferrin and downregulation by interferon gamma. *J Clin Invest* **91**, 969-976.

- Carter P. (1971) Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Anal Biochem* **40**, 450-458.
- Casaccia-Bonnet P. (2000) Cell death in the oligodendrocyte lineage: a molecular perspective of life/death decisions in development and disease. *Glia* **29**, 124-135.
- Casey J. L., Hentze M. W., Koeller D. M., Caughman S. W., Rouault T. A., Klausner R. D. und Harford J. B. (1988) Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. *Science* **240**, 924-928.
- Cerretti F. und Cerretti G. (1980) Improved direct specific determination of serum iron and total iron-binding capacity. *Clin Chem* **26**, 327-331.
- Chang G. H., Barbaro N. M. und Rieper R. O. (2000) Phosphatidylserine-dependent phagocytosis of apoptotic glioma cells by normal human microglia, astrocytes, and glioma cells. *Neurooncology* **2**, 174-183.
- Changeux J. P. (1986) Coexistence of neuronal messengers and molecular selection. *Prog Brain Res* **68**, 373-403.
- Chasteen N. D. und Harrison P. M. (1999) Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *J Struct Biol* **126**, 182-194.
- Cheepsunthorn P., Palmer C. und Connor J. R. (1998) Cellular distribution of ferritin subunits in postnatal rat brain. *J Comp Neurol* **400**, 73-86.
- Cheepsunthorn P., Radov L., Menzies S., Reid J. und Connor J. R. (2001) Characterization of a novel brain-derived microglial cell line isolated from neonatal rat brain. *Glia* **35**, 53-62.
- Chen O. S., Schalinske K. L. und Eisenstein R. S. (1997) Dietary iron intake modulates the activity of iron regulatory proteins and the abundance of ferritin and mitochondrial aconitase in rat liver. *J Nutr* **127**, 238-248.
- Cheng Y., Zak O., Aisen P., Harrison S. C. und Walz T. (2004) Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell* **116**, 565-576.
- Clarke D.D. und Sokoloff L. (1999) Circulation and energy metabolism. In *Basic Neurochemistry, Molecular, cellular and medical aspects* (Hrsg.: Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Fisher S.K und Uhler M.D.) S. 637-670, Lippincott Williams und Wilkins, Philadelphia, PA, USA.
- Cohen G. (2000) Oxidative stress, mitochondrial respiration, and Parkinson's disease. *Ann NY Acad Sci* **899**, 112-120.
- Collman J. P., Brauman J. I., Doxsee K. M., Halbert T. R. und Suslick K. S. (1978a) Model compounds for the T state of hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**, 564-568.
- Collman J. P., Brauman J. I., Rose E. und Suslick K. S. (1978b) Cooperativity in O₂ binding to iron porphyrins. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**, 1052-1055.
- Colton C. A. und Gilbert D. L. (1987) Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett* **223**, 284-288.
- Connor J. R. und Menzies S. L. (1990) Altered cellular distribution of iron in the central nervous system of myelin deficient rats. *Neuroscience* **34**, 265-271.
- Connor J. R. und Menzies S. L. (1995) Cellular management of iron in the brain. *J Neurol Sci* **134** Suppl, 33-44.

- Connor J. R. und Menzies S. L. (1996) Relationship of iron to oligodendrocytes and myelination. *Glia* **17**, 83-93.
- Connor J. R., Phillips T. M., Lakshman M. R., Barron K. D., Fine R. E. und Csiza C. K. (1987) Regional variation in the levels of transferrin in the CNS of normal and myelin-deficient rats. *J Neurochem* **49**, 1523-1529.
- Connor J. R., Menzies S. L., St Martin S. M. und Mufson E. J. (1990) Cellular distribution of transferrin, ferritin, and iron in normal and aged human brains. *J Neurosci Res* **27**, 595-611.
- Connor J. R., Menzies S. L., St Martin S. M. und Mufson E. J. (1992a) A histochemical study of iron, transferrin, and ferritin in Alzheimer's diseased brains. *J Neurosci Res* **31**, 75-83.
- Connor J. R., Snyder B. S., Beard J. L., Fine R. E. und Mufson E. J. (1992b) Regional distribution of iron and iron-regulatory proteins in the brain in aging and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* **31**, 327-335.
- Connor J. R., Boeshore K. L., Benkovic S. A. und Menzies S. L. (1994) Isoforms of ferritin have a specific cellular distribution in the brain. *J Neurosci Res* **37**, 461-465.
- Connor J. R., Pavlick G., Karli D., Menzies S. L. und Palmer C. (1995) A histochemical study of iron-positive cells in the developing rat brain. *J Comp Neurol* **355**, 111-123.
- Connor J. R., Menzies S. L., Burdo J. R. und Boyer P. J. (2001) Iron and iron management proteins in neurobiology. *Pediatr Neurol* **25**, 118-129.
- Conrad M. E. und Umbreit J. N. (2000) Iron absorption and transport - an update. *Am J Hematol* **64**, 287-298.
- Cook S. F. (1929). The structure and composition of hemosiderin. *J Biol Chem* **82**, 595-609.
- Cooper A. J. und Kristal B. S. (1997) Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol Chem* **378**, 793-802.
- Corsi B., Cozzi A., Arosio P., Drysdale J., Santambrogio P., Campanella A., Biasiotto G., Albertini A. und Levi S. (2002) Human mitochondrial ferritin expressed in HeLa cells incorporates iron and affects cellular iron metabolism. *J Biol Chem* **277**, 22430-22437.
- Cotgreave I. A. und Gerdes R. G. (1998) Recent trends in glutathione biochemistry – glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem Biophys Res Commun* **242**, 1-9
- Crack P. J., Taylor J. M., Flentjar N. J., de Haan J., Hertzog P., Iannello R. C. und Kola I. (2001) Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to ischemia/reperfusion injury. *J Neurochem* **78**, 1389-1399.
- Crichton R. R. (2001) *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism*. John Wiley Sons, New York
- Crichton R. R., Wilmet S., Legssyer R. und Ward R. J. (2002) Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J Inorg Biochem* **91**, 9-18.

- de Deungria M., Rao R., Wobken J. D., Luciana M., Nelson C. A. und Georgieff M. K. (2000) Perinatal iron deficiency decreases cytochrome C oxidase (CytOx) activity in selected regions of neonatal rat brain. *Pediatr Res* **48**, 169-176.
- de Haan J. B., Bladier C., Griffiths P., Kelner M., O'Shea R. D., Cheung N. S., Bronson R. T., Silvestro M. J., Wild S., Zheng S. S., Beart P. M., Hertzog P. J. und Kola I. (1998) Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* **273**, 22528-22536.
- de Jong G., Ammerlaan C. C., van Noort W. L., van Eijk H. G., van Landeghem G. L., D'Haese P. C. und de Broe M. E. (1995) An in vitro study on the binding of Al(III) to human serum transferrin with the isoelectric focusing technique. *Biometals* **8**, 352-356.
- Deane R., Zheng W. und Zlokovic B. V. (2004) Brain capillary endothelium and choroid plexus epithelium regulate transport of transferrin-bound and free iron into the rat brain. *J Neurochem* **88**, 813-820.
- Demeule M., Poirier J., Jodoin J., Bertrand Y., Desrosiers R. R., Dagenais C., Nguyen T., Lanthier J., Gabathuler R., Kennard M., Jefferies W. A., Karkan D., Tsai S., Fenart L., Cecchelli R. und Beliveau R. (2002) High transcytosis of melanotransferrin (P97) across the blood-brain barrier. *J Neurochem* **83**, 924-933.
- Dexter D. T., Wells F. R., Agid F., Agid Y., Lees A. J., Jenner P. und Marsden C. D. (1987) Increased nigral iron content in postmortem parkinsonian brain. *Lancet* **2**, 1219-1220.
- Dexter D. T., Wells F. R., Lees A. J., Agid F., Agid Y., Jenner P. und Marsden C. D. (1989) Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem* **52**, 1830-1836.
- Dexter D. T., Carayon A., Javoy-Agid F., Agid Y., Wells F. R., Daniel S. E., Lees A. J., Jenner P. und Marsden C. D. (1991) Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain* **114**, 1953-1975.
- Dickinson T.K. und Connor J.R. (1995) Cellular distribution of iron, transferrin, and ferritin in the hypotransferrinemic (Hp) mouse brain. *J Comp Neurol* **355**, 67-80
- Donovan A., Brownlie A., Zhou Y., Shepard J., Pratt S. J., Moynihan J., Paw B. H., Drejer A., Barut B., Zapata A., Law T. C., Brugnara C., Lux S. E., Pinkus G. S., Pinkus J. L., Kingsley P. D., Palis J., Fleming M. D., Andrews N. C. und Zon L. I. (2000) Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* **403**, 776-781.
- Drapier J. C. und Hibbs J. B., Jr. (1986) Murine cytotoxic activated macrophages inhibit aconitase in tumor cells. Inhibition involves the iron-sulfur prosthetic group and is reversible. *J Clin Invest* **78**, 790-797.
- Dringen R. (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* **62**, 649-671.
- Dringen R. (2005) Oxidative and anti-oxidative potential of brain microglial cells. *Antioxid Redox Signal*, in press.

- Dringen R. und Hamprecht B. (1996) Glutathione content as an indicator for the presence of metabolic pathways of amino acids in astroglial cultures. *J Neurochem* **67**, 1375-1382.
- Dringen R. und Hamprecht B. (1997) Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. *Brain Res* **759**, 67-75.
- Dringen R. und Hirrlinger J. (2003) Glutathione pathways in the brain. *Biol Chem* **384**, 505-516.
- Dringen R., Kranich O. und Hamprecht B. (1997) The γ -glutamyl transpeptidase inhibitor acivicin preserves glutathione released by astroglial cells in culture. *Neurochem Res* **22**, 727-733.
- Dringen R., Kussmaul L. und Hamprecht B. (1998a) Detoxification of exogenous hydrogen peroxide and organic hydroperoxides by cultured astroglial cells assessed by microtiter plate assay. *Brain Res Brain Res Protoc* **2**, 223-228.
- Dringen R., Kussmaul L. und Hamprecht B. (1998b) Rapid clearance of tertiary butyl hydroperoxide by cultured astroglial cells via oxidation of glutathione. *Glia* **23**, 139-145.
- Dringen R., Kussmaul L., Gutterer J. M., Hirrlinger J. und Hamprecht B. (1999a) The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. *J Neurochem* **72**, 2523-2530.
- Dringen R., Pfeiffer B. und Hamprecht B. (1999b) Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J Neurosci* **19**, 562-569.
- Dringen R., Gutterer J. M., Gros C. und Hirrlinger J. (2001) Aminopeptidase N mediates the utilization of the GSH precursor CysGly by cultured neurons. *J Neurosci Res* **66**, 1003-1008.
- Dringen R., Pawlowski P. G. und Hirrlinger J. (2004) Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res* **30**.
- Dwork A. J., Schon E. A. und Herbert J. (1988) Nonidentical distribution of transferrin and ferric iron in human brain. *Neuroscience* **27**, 333-345.
- Eisenstein R. S. (2000) Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu Rev Nutr* **20**, 627-662.
- Eisenstein R. S., Garcia-Mayol D., Pettingell W. und Munro H. N. (1991) Regulation of ferritin and heme oxygenase synthesis in rat fibroblasts by different forms of iron. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 688-692.
- Espinosa de los Monteros. A., Chiapelli F., Fisher R. S. und de Vellis J. (1988) Transferrin: an early marker of oligodendrocytes in culture. *Int J Dev Neurosci* **6**, 167-175.
- Espinosa de los Monteros. A., Kumar S., Scully S., Cole R. und de Vellis J. (1990) Transferrin gene expression and secretion by rat brain cells in vitro. *J Neurosci Res* **25**, 576-580.
- Fellin T. und Carmignoto G. (2004) Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J Physiol* **559**, 3-15.

- Ferguson-Miller S. und Babcock G. T. (1996) Heme/Copper terminal oxidases. *Chem Rev* **96**, 2889-2908.
- Field T. B., Coburn J., McCourt J. L. und McBryde W. A. E. (1975) Composition and stability of some metal citrate and diclycolate complexes in aqueous solution. *Anal Chim Acta* **74**, 101-106.
- Fillebeen C., Descamps L., Dehouck M. P., Fenart L., Benaissa M., Spik G., Cecchelli R. und Pierce A. (1999) Receptor-mediated transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier. *J Biol Chem* **274**, 7011-7017.
- Fischbach F. A. und Anderegg J. W. (1965) An X-ray scattering study of ferritin and apoferritin. *J Mol Biol* **14**, 458-473.
- Fish W. W. (1988) Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods Enzymol* **158**, 357-364.
- Fleming M. D., Romano M. A., Su M. A., Garrick L. M., Garrick M. D. und Andrews N. C. (1998) Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 1148-1153.
- Flentjar N. J., Crack P. J., Boyd R., Malin M., de Haan J. B., Hertzog P., Kola I. und Iannello R. (2002) Mice lacking glutathione peroxidase-1 activity show increased TUNEL staining and an accelerated inflammatory response in brain following a cold-induced injury. *Exp Neurol* **177**, 9-20.
- Fornstedt B. (1990) Role of catechol autooxidation in the degeneration of dopamine neurons. *Acta Neurol Scand Suppl* **129**, 12-14.
- Frazer D. M., Vulpe C. D., McKie A. T., Wilkins S. J., Trinder D., Cleghorn G. J. und Anderson G. J. (2001) Cloning and gastrointestinal expression of rat hephaestin: relationship to other iron transport proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**, G931-G939.
- Gage F. H. (2002) Neurogenesis in the adult brain. *J Neurosci* **22**, 612-613.
- Gaillard P. J., van d. S., I, Voorwinden L. H., Vu D., Nielsen J. L., de Boer A. G. und Breimer D. D. (2000) Astrocytes increase the functional expression of P-glycoprotein in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Pharm Res* **17**, 1198-1205.
- Giulian D. (1987) Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. *J Neurosci Res* **18**, 155-3.
- Giulian D. und Baker T. J. (1985) Peptides released by ameboid microglia regulate astroglial proliferation. *J Cell Biol* **101**, 2411-2415.
- Giulian D. und Baker T. J. (1986) Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci* **6**, 2163-2178.
- Gocht A., Keith A. B., Candy J. M. und Morris C. M. (1993) Iron uptake in the brain of the myelin-deficient rat. *Neurosci Lett* **154**, 187-190.
- Goldbaum O. und Richter-Landsberg C. (2001) Stress proteins in oligodendrocytes: differential effects of heat shock and oxidative stress. *J Neurochem* **78**, 1233-1242.

- Good P. F., Perl D. P., Bierer L. M. und Schmeidler J. (1992) Selective accumulation of aluminum and iron in the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: a laser microprobe (LAMMA) study. *Ann Neurol* **31**, 286-292.
- Goto Y., Paterson M. und Listowsky I. (1983) Iron uptake and regulation of ferritin synthesis by hepatoma cells in hormone-supplemented serum-free media. *J Biol Chem* **258**, 5248-5255.
- Gotz M. E., Double K., Gerlach M., Youdim M. B. und Riederer P. (2004) The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann NY Acad Sci* **1012**, 193-208.
- Graham R. M., Morgan E. H. und Baker E. (1998) Ferric citrate uptake by cultured rat hepatocytes is inhibited in the presence of transferrin. *Eur J Biochem* **253**, 139-145.
- Griffith O. W. (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* **106**, 207-212.
- Griffith O. W. und Meister A. (1979) Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 5606-5610.
- Griffiths P. D., Dobson B. R., Jones G. R. und Clarke D. T. (1999) Iron in the basal ganglia in Parkinson's disease. An in vitro study using extended X-ray absorption fine structure and cryo-electron microscopy. *Brain* **122**, 667-673.
- Grootveld M., Bell J. D., Halliwell B., Aruoma O. I., Bomford A. und Sadler P. J. (1989) Non-transferrin-bound iron in plasma or serum from patients with idiopathic hemochromatosis. Characterization by high performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem* **264**, 4417-4422.
- Gruener N., Gozlan O., Goldstein T., Davis J., Besner I. und Iancu T. C. (1991) Iron, transferrin, and ferritin in cerebrospinal fluid of children. *Clin Chem* **37**, 263-265.
- Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Quinlan M., Tung Y. C., Zaidi M. S. und Wisniewski H. M. (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* **261**, 6084-6089.
- Gunshin H., Mackenzie B., Berger U. V., Gunshin Y., Romero M. F., Boron W. F., Nussberger S., Gollan J. L. und Hediger M. A. (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **388**, 482-488.
- Guo B., Yu Y. und Leibold E. A. (1994) Iron regulates cytoplasmic levels of a novel iron-responsive element-binding protein without aconitase activity. *J Biol Chem* **269**, 24252-24260.
- Guo B., Phillips J. D., Yu Y. und Leibold E. A. (1995) Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. *J Biol Chem* **270**, 21645-21651.
- Gutierrez J. A., Inman R. S., Akompong T., Yu J. und Wessling-Resnick M. (1998) Metabolic depletion inhibits the uptake of nontransferrin-bound iron by K562 cells. *J Cell Physiol* **177**, 585-592.
- Gutterer J. M., Dringen R., Hirrlinger J. und Hamprecht B. (1999) Purification of glutathione reductase from bovine brain, generation of an antiserum, and immunocytochemical localization of the enzyme in neural cells. *J Neurochem* **73**, 1422-1430.

- Haber F. und Willstätter R. (1931) Unpaarigkeit und Radikalketten im Reaktionsmechanismus organischer und enzymatischer Vorgänge. *Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft* **64**, 2844-2856.
- Haber F. und Weiss J. (1932) Über die Katalyse des Hydroperoxides. *Naturwiss* **51**, 948-950.
- Hallgren B. und Sourander P. (1958) The effect of age on the non-haemin iron in the human brain. *J Neurochem* **3**, 41-51.
- Halliwell B. (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* **59**, 1609-1623.
- Halliwell B. (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* **18**, 685-716.
- Halliwell B. und Gutteridge J. M. (1997) Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. *J Neurochem* **69**, 1330-1331.
- Halliwell B. und Gutteridge J.M.C (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York.
- Hamprecht B. und Löffler F. (1985) Primary glial cultures as a model for studying hormone action. *Methods Enzymol* **109**, 341-345.
- Han J., Day J. R., Connor J. R. und Beard J. L. (2002) H and L ferritin subunit mRNA expression differs in brains of control and iron-deficient rats. *J Nutr* **132**, 2769-2774.
- Hanson E. S., Foot L. M. und Leibold E. A. (1999) Hypoxia post-translationally activates iron-regulatory protein 2. *J Biol Chem* **274**, 5047-5052.
- Harris L. R., Cake M. H. und Macey D. J. (1994) Iron release from ferritin and its sensitivity to superoxide ions differs among vertebrates. *Biochem J* **301**, 385-389.
- Harris Z. L. (2003) Aceruloplasminemia. *J Neurol Sci* **207**, 108-109.
- Harris Z. L., Durley A. P., Man T. K. und Gitlin J. D. (1999) Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 10812-10817.
- Harrison P. M., Hempstead P. D., Artymiuk P. J. und Andrews S. C. (1998) Structure-function relationships in the ferritins. *Met Ions Biol Syst* **35**, 435-477.
- Henderson B. R., Seiser C. und Kuhn L. C. (1993) Characterization of a second RNA-binding protein in rodents with specificity for iron-responsive elements. *J Biol Chem* **268**, 27327-27334.
- Hentze M. W., Muckenthaler M. U. und Andrews N. C. (2004) Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* **117**, 285-297.
- Hertz L. (2004) Intercellular metabolic compartmentation in the brain: past, present and future. *Neurochem Int* **45**, 285-296
- Hill J. M. und Switzer R. C. (1984) The regional distribution and cellular localization of iron in the rat brain. *Neuroscience* **11**, 595-603.
- Hirling H., Henderson B. R. und Kuhn L. C. (1994) Mutational analysis of the [4Fe-4S]-cluster converting iron regulatory factor from its RNA-binding form to cytoplasmic aconitase. *EMBO J* **13**, 453-461.

- Hirose J., Fujiwara H., Magarifuchi T., Iguti Y., Iwamoto H., Kominami S. und Hiromi K. (1996) Copper binding selectivity of N- and C-sites in serum (human)- and ovo-transferrin. *Biochim Biophys Acta* **1296**, 103-111.
- Hirrlinger J., Gutterer J. M., Kussmaul L., Hamprecht B. und Dringen R. (2000) Microglial cells in culture express a prominent glutathione system for the defense against reactive oxygen species. *Dev Neurosci* **22**, 384-392.
- Hirrlinger J., Konig J. und Dringen R. (2002a) Expression of mRNAs of multidrug resistance proteins (Mrps) in cultured rat astrocytes, oligodendrocytes, microglial cells and neurones. *J Neurochem* **82**, 716-719.
- Hirrlinger J., Resch A., Gutterer J. M. und Dringen R. (2002b) Oligodendroglial cells in culture effectively dispose of exogenous hydrogen peroxide: comparison with cultured neurones, astroglial and microglial cells. *J Neurochem* **82**, 635-644.
- Hirrlinger J., Schulz J. B. und Dringen R. (2002c) Effects of dopamine on the glutathione metabolism of cultured astroglial cells: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem* **82**, 458-467.
- Hirsh M., Konijn A. M. und Iancu T. C. (2002) Acquisition, storage and release of iron by cultured human hepatoma cells. *J Hepatol* **36**, 30-38.
- Ho Y. S., Magnenat J. L., Bronson R. T., Cao J., Gargano M., Sugawara M. und Funk C. D. (1997) Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J Biol Chem* **272**, 16644-16651.
- Hoepken H. H., Korten T., Robinson S. R. und Dringen R. (2004) Iron accumulation, iron-mediated toxicity and altered levels of ferritin and transferrin receptor in cultured astrocytes during incubation with ferric ammonium citrate. *J Neurochem* **88**, 1194-1202.
- Hoffbrand A. V., Ganeshaguru K., Hooton J. W. und Tattersall M. H. (1976) Effect of iron deficiency and desferrioxamine on DNA synthesis in human cells. *Br J Haematol* **33**, 517-526.
- Hökfelt T., Holets V. R., Staines W., Meister B., Melander T., Schalling M., Schultzberg M., Freedman J., Bjorklund H., Olson L., Lindh B., Elfvin L. G., Lundberg J. M., Lindgren J. A., Samuelsson B., Pernow B., Terenius L., Post C., Everitt B. und Goldstein M. (1986) Coexistence of neuronal messengers - an overview. *Prog Brain Res* **68**, 33-70.
- Holm R. H., Kennepohl P. und Solomon E. I. (1996) Structural and functional aspects of metal sites in biology. *Chem Rev* **96**, 2239-2314.
- Holmberg C. G. und Laurell C. B. (1947) Investigations in serum copper. Nature of serum copper and its relation to the iron-binding protein in human serum. *Acta Chem Scand* **1**, 944-950.
- Huang X., Moir R. D., Tanzi R. E., Bush A. I. und Rogers J. T. (2004) Redox-active metals, oxidative stress, and Alzheimer's disease pathology. *Ann N Y Acad Sci* **1012**, 153-163.
- Hulet S. W., Hess E. J., Debinski W., Arosio P., Bruce K., Powers S. und Connor J. R. (1999) Characterization and distribution of ferritin binding sites in the adult mouse brain. *J Neurochem* **72**, 868-874.

- Hulet S. W., Heyliger S. O., Powers S. und Connor J. R. (2000) Oligodendrocyte progenitor cells internalize ferritin via clathrin-dependent receptor mediated endocytosis. *J Neurosci Res* **61**, 52-60.
- Hwang I. K., Yoon D. K., Yoo K. Y., Eum W. S., Bahn J. H., Kim D. W., Kang J. H., Kwon H. Y., Kang T. C., Choi S. Y. und Won M. H. (2004) Ischemia-related change of ceruloplasmin immunoreactivity in neurons and astrocytes in the gerbil hippocampus and dentate gyrus. *Neurochem Int* **44**, 601-607.
- Idzerda R. L., Huebers H., Finch C. A. und McKnight G. S. (1986) Rat transferrin gene expression: tissue-specific regulation by iron deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 3723-3727.
- Inoue M., Sato E. F., Nishikawa M., Park A. M., Kira Y., Imada I. und Utsumi K. (2003) Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem* **10**, 2495-2505.
- Iwai K., Klausner R. D. und Rouault T. A. (1995) Requirements for iron-regulated degradation of the RNA binding protein, iron regulatory protein 2. *EMBO J* **14**, 5350-5357.
- Jacobson R. D., Virag I. und Skene J. H. (1986) A protein associated with axon growth, GAP-43, is widely distributed and developmentally regulated in rat CNS. *J Neurosci* **6**, 1843-1855.
- Jefferies W. A., Brandon M. R., Hunt S. V., Williams A. F., Gatter K. C. und Mason D. Y. (1984) Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature* **312**, 162-163.
- Jefferies W. A., Food M. R., Gabathuler R., Rothenberger S., Yamada T., Yasuhara O. und McGeer P. L. (1996) Reactive microglia specifically associated with amyloid plaques in Alzheimer's disease brain tissue express melanotransferrin. *Brain Res* **712**, 122-126.
- Jellinger K., Paulus W., Grundke-Iqbal I., Riederer P. und Youdim M. B. (1990) Brain iron and ferritin in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* **2**, 327-340.
- Jellinger K. A. (1999) The role of iron in neurodegeneration: prospects for pharmacotherapy of Parkinson's disease. *Drugs Aging* **14**, 115-140.
- Jeong S. Y. und David S. (2003) Glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is required for iron efflux from cells in the central nervous system. *J Biol Chem* **278**, 27144-27148.
- Jing S. Q. und Trowbridge I. S. (1987) Identification of the intermolecular disulfide bonds of the human transferrin receptor and its lipid-attachment site. *EMBO J* **6**, 327-331.
- Juurlink B. H. und Hertz L. (1991) Establishment of highly enriched type-2 astrocyte cultures and quantitative determination of intense glutamine synthetase activity in these cells. *J Neurosci Res* **30**, 531-539.
- Juurlink B. H., Thorburne S. K. und Hertz L. (1998) Peroxide-scavenging deficit underlies oligodendrocyte susceptibility to oxidative stress. *Glia* **22**, 371-378.
- Kakhlon O. und Cabantchik Z. I. (2002) The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic Biol Med* **33**, 1037-1046.

- Kaltenbach J. P., Kaltenbach M. H. und Lyons W. B. (1958) Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. *Exp Cell Res* **15**, 112-117.
- Kanfer J., Parenty M., Goujet-Zalc C., Monge M., Bernier L., Campagnoni A. T., Dautigny A. und Zalc B. (1989) Developmental expression of myelin proteolipid, basic protein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase transcripts in different rat brain regions. *J Mol Neurosci* **1**, 39-46
- Katz J. H. (1961) Iron and protein kinetics studied by means of doubly labeled human crystalline transferrin. *J Clin Invest* **40**, 2143-2152.
- Kaur C. und Ling E. A. (1995) Transient expression of transferrin receptors and localisation of iron in amoeboid microglia in postnatal rats. *J Anat* **186**, 165-173.
- Kaur D. und Andersen J. (2004) Does cellular iron dysregulation play a causative role in Parkinson's disease? *Ageing Res Rev* **3**, 327-343.
- Ke Y. und Theil E. C. (2002) An mRNA loop/bulge in the ferritin iron-responsive element forms in vivo and Was detected by radical probing with Cu-1,10-phenanthroline and iron regulatory protein footprinting. *J Biol Chem* **277**, 2373-2376.
- Keegan B. M. und Noseworthy J. H. (2002) Multiple sclerosis. *Annu Rev Med* **53**, 285-302.
- Kettenmann H. und Ransom B.R. (Hrsg.) (2005) *Neuroglia*; 2. Auflage Oxford University Press, New York.
- Kettenmann H. und Steinhäuser C. (2005) Receptors for Neurotransmitters and Hormones. In *Neuroglia*; 2. Auflage (Hrsg.: Kettenmann H. und Ransom B.R.) S. 131-145, Oxford University Press, New York.
- Keyer K. und Imlay J. A. (1996) Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 13635-13640.
- Kirchhoff F., Dringen R. und Giaume C. (2001) Pathways of neuron-astrocyte interactions and their possible role in neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **251**, 159-169.
- Klomp L. W., Farhangrazi Z. S., Dugan L. L. und Gitlin J. D. (1996) Ceruloplasmin gene expression in the murine central nervous system. *J Clin Invest* **98**, 207-215.
- Koeppen A. H. und Dickson A. C. (2001) Iron in the Hallervorden-Spatz syndrome. *Pediatr Neurol* **25**, 148-155.
- Kohno H. und Tokunaga R. (1985) Transferrin and iron uptake by rat reticulocytes. *J Biochem (Tokyo)* **97**, 1181-1188.
- Koppenol W. H. (2001) The Haber-Weiss cycle--70 years later. *Redox Rep* **6**, 229-234.
- Korshunov S. S., Skulachev V. P. und Starkov A. A. (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* **416**, 15-18.
- Kosman D. J. (2003) Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. *Mol Microbiol* **47**, 1185-1197.
- Kranich O., Hamprecht B. und Dringen R. (1996) Different preferences in the utilization of amino acids for glutathione synthesis in cultured neurons and astroglial cells derived from rat brain. *Neurosci Lett* **219**, 211-214.

- Kranich O., Dringen R., Sandberg M. und Hamprecht B. (1998) Utilization of cysteine and cysteine precursors for the synthesis of glutathione in astroglial cultures: preference for cystine. *Glia* **22**, 11-18.
- Kroos M. J., Starreveld J. S., Verrijt C. E., van Eijk H. G. und van Dijk J. P. (1996) Regulation of transferrin receptor synthesis by human cytotrophoblast cells in culture. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **65**, 231-234.
- Kruszewski M. (2003) Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat Res* **531**, 81-92.
- Kuffler S. W. und Nicholls J. G. (1966) The physiology of neuroglial cells. *Ergeb Physiol* **57**, 1-90.
- Kurokawa H., Mikami B. und Hirose M. (1995) Crystal structure of diferric hen ovotransferrin at 2.4 Å resolution. *J Mol Biol* **254**, 196-207.
- Kurz T., Leake A., von Zglinicki T. und Brunk U. T. (2004) Lysosomal redox-active iron is important for oxidative stress-induced DNA damage. *Ann NY Acad Sci* **1019**, 285-288.
- Kusmaul L., Hamprecht B. und Dringen R. (1999) The detoxification of cumene hydroperoxide by the glutathione system of cultured astroglial cells hinges on hexose availability for the regeneration of NADPH. *J Neurochem* **73**, 1246-1253.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lassmann H., Zimprich F., Vass K. und Hickey W. F. (1991) Microglial cells are a component of the perivascular glia limitans. *J Neurosci Res* **28**, 236-243.
- Laufberger V. (1937) Sur la cristallisation de la ferritine. *Bull Soc Chim Biol* **19**, 1575-1582
- Le N. T. und Richardson D. R. (2002) Ferroportin1: a new iron export molecule? *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 103-108.
- Lee P. L., Gelbart T., West C., Halloran C. und Beutler E. (1998) The human Nramp2 gene: characterization of the gene structure, alternative splicing, promoter region and polymorphisms. *Blood Cells Mol Dis* **24**, 199-215.
- Leibold E. A. und Munro H. N. (1988) Cytoplasmic protein binds in vitro to a highly conserved sequence in the 5' untranslated region of ferritin heavy- and light-subunit mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 2171-2175.
- Leibold E. A., Gahring L. C. und Rogers S. W. (2001) Immunolocalization of iron regulatory protein expression in the murine central nervous system. *Histochem Cell Biol* **115**, 195-203.
- Levi S., Girelli D., Perrone F., Pasti M., Beaumont C., Corrocher R., Albertini A. und Arosio P. (1998) Analysis of ferritins in lymphoblastoid cell lines and in the lens of subjects with hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome. *Blood* **91**, 4180-4187.
- LeVine S. M. (1997) Iron deposits in multiple sclerosis and Alzheimer's disease brains. *Brain Res* **760**, 298-303.

- LeVine S. M. und Chakrabarty A. (2004) The role of iron in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Ann NY Acad Sci* **1012**, 252-266.
- Liddell J. R., Robinson S. R. und Dringen R. (2004) Endogenous glutathione and catalase protect cultured rat astrocytes from the iron-mediated toxicity of hydrogen peroxide. *Neurosci Lett* **364**, 164-167.
- Lie D. C., Song H., Colamarino S. A., Ming G. L. und Gage F. H. (2004) Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**, 399-421.
- Lin H. H. und Connor J. R. (1989) The development of the transferrin-transferrin receptor system in relation to astrocytes, MBP and galactocerebroside in normal and myelin-deficient rat optic nerves. *Brain Res Dev Brain Res* **49**, 281-293.
- Lipschitz D. A., und Cook J. D. und Finch C. A. (1974) A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores. *N Engl J Med* **290**, 1213-1216.
- Lis A., Barone T. A., Paradkar P. N., Plunkett R. J. und Roth J. A. (2004) Expression and localization of different forms of DMT1 in normal and tumor astroglial cells. *Brain Res Mol Brain Res* **122**, 62-70.
- Löffler F., Lohmann S. M., Walckhoff B., Walter U. und Hamprecht B. (1986) Immunocytochemical characterization of neuron-rich primary cultures of embryonic rat brain cells by established neuronal and glial markers and by monospecific antisera against cyclic nucleotide-dependent protein kinases and the synaptic vesicle protein synapsin I. *Brain Res* **363**, 205-221.
- los Monteros A. E., Korsak R. A., Tran T., Vu D., de Vellis J. und Edmond J. (2000) Dietary iron and the integrity of the developing rat brain: a study with the artificially-reared rat pup. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* **46**, 501-515.
- Lovell M. A., Robertson J. D., Teesdale W. J., Campbell J. L. und Markesbery W. R. (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci* **158**, 47-52.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., und Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- Margoliash E. und Novogrodsky A. (1958) A study of the inhibition of catalase by 3-amino-1,2,4-triazole. *Biochem J* **68**, 468-475.
- Martini L. A., Tchack L. und Wood R. J. (2002) Iron treatment downregulates DMT1 and IREG1 mRNA expression in Caco-2 cells. *J Nutr* **132**, 693-696.
- Masters C. L., Simms G., Weinman N. A., Multhaup G., McDonald B. L. und Beyreuther K. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 4245-4249.
- McClelland A., Kuhn L. C. und Ruddle F. H. (1984) The human transferrin receptor gene: genomic organization, and the complete primary structure of the receptor deduced from a cDNA sequence. *Cell* **39**, 267-274.
- McKie A. T., Marciani P., Rolfs A., Brennan K., Wehr K., Barrow D., Miret S., Bomford A., Peters T. J., Farzaneh F., Hediger M. A., Hentze M. W. und Simpson R. J. (2000) A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* **5**, 299-309.

- McKie A. T., Barrow D., Latunde-Dada G. O., Rolfs A., Sager G., Mudaly E., Mudaly M., Richardson C., Barlow D., Bomford A., Peters T. J., Raja K. B., Shirali S., Hediger M. A., Farzaneh F. und Simpson R. J. (2001) An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* **291**, 1755-1759.
- Meister A. (1974) Glutathione synthesis. *The Enzymes* **10**, 671-697.
- Meister A. und Anderson M. E. (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* **52**, 711-760.
- Michaels H. B. und Hunt J. W. (1978) Determination of peroxides and hydroperoxides in irradiated solutions of nucleic acid constituents and DNA. *Anal Biochem* **87**, 135-140.
- Minich T., Yokota S. und Dringen R. (2003) Cytosolic and mitochondrial isoforms of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenases are expressed in cultured rat neurons, astrocytes, oligodendrocytes and microglial cells. *J Neurochem* **86**, 605-614.
- Mirsky R., Winter J., Abney E. R., Pruss R. M., Gavrilovic J. und Raff M. C. (1980) Myelin-specific proteins and glycolipids in rat Schwann cells and oligodendrocytes in culture. *J Cell Biol* **84**, 483-494.
- Miyajima H. (2003) Aceruloplasminemia, an iron metabolic disorder. *Neuropathology* **23**, 345-350.
- Möller A. (1989) Untersuchungen über das Enzym Creatinkinase und sein Substrat Creatin an glialen und neuronalen Zellkulturen des Gehirns. Dissertation, Universität Frankfurt am Main.
- Mollgard K., Dziegielewska K. M., Saunders N. R., Zakut H. und Soreq H. (1988) Synthesis and localization of plasma proteins in the developing human brain. Integrity of the fetal blood-brain barrier to endogenous proteins of hepatic origin. *Dev Biol* **128**, 207-221.
- Morimura T., Neuchrist C., Kitz K., Budka H., Scheiner O., Kraft D und Lassmann H (1990) Monocyte subpopulations in human gliomas: expression of Fc and complement receptors and correlation with tumor proliferation. *Acta Neuropathol* **80**, 287-294.
- Moore S. A. (2001) Polyunsaturated fatty acid synthesis and release by brain-derived cells in vitro. *J Mol Neurosci* **16**, 195-200.
- Moos T. (1996) Immunohistochemical localization of intraneuronal transferrin receptor immunoreactivity in the adult mouse central nervous system. *J Comp Neurol* **375**, 675-692.
- Moos T. und Morgan E. H. (2000) Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier systems. *Cell Mol Neurobiol* **20**, 77-95.
- Moos T., Trinder D. und Morgan E. H. (2000) Cellular distribution of ferric iron, ferritin, transferrin and divalent metal transporter 1 (DMT1) in substantia nigra and basal ganglia of normal and beta2-microglobulin deficient mouse brain. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **46**, 549-561.
- Morath D. J. und Mayer-Proschel M. (2001) Iron modulates the differentiation of a distinct population of glial precursor cells into oligodendrocytes. *Dev Biol* **237**, 232-243.

- Morgan E. H. und Baker E. (1988) Role of transferrin receptors and endocytosis in iron uptake by hepatic and erythroid cells. *Ann NY Acad Sci* **526**, 65-82.
- Mullner E. W., Neupert B., und Kuhn L. C. (1989) A specific mRNA binding factor regulates the iron-dependent stability of cytoplasmic transferrin receptor mRNA. *Cell* **58**, 373-382.
- Mullner E. W., Rothenberger S., Muller A. M., und Kuhn L. C. (1992) In vivo and in vitro modulation of the mRNA-binding activity of iron-regulatory factor. Tissue distribution and effects of cell proliferation, iron levels and redox state. *Eur J Biochem* **208**, 597-605.
- Nedergaard M., Ransom B. und Goldman S. A. (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* **26**, 523-530.
- Neilands J. B. (1993) Siderophores. *Arch Biochem Biophys* **302**, 1-3.
- Nelson P. T., Soma L. A. und Lavi E. (2002) Microglia in diseases of the central nervous system. *Ann Med* **34**, 491-500.
- Neumann H. (2005) Antigen processing, presentation, and T-cell interaction. In *Neuroglia*, 2. Auflage (Hrsg.: Kettenmann H. und Ransom B.R.) S. 314-324, Oxford University Press, New York.
- Newman E. A. (2003) New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* **26**, 536-542.
- Newman E.A. (2005) Glial and synaptic transmission. In *Neuroglia*; 2. Auflage (Hrsg.: Kettenmann H. und Ransom B.R.) S. 355-366, Oxford University Press, New York.
- Nguyen-Legros J., Bizot J., Bolesse M. und Pulicani J. P. (1980) "Diaminobenzidine black" as a new histochemical demonstration of exogenous iron. *Histochemistry* **66**, 239-244.
- Nicotra A., Pierucci F., Parvez H. und Senatori O. (2004) Monoamine oxidase expression during development and aging. *Neurotoxicology* **25**, 155-165.
- Nunes R., Beloqui O., Potter B. J. und Berk P. D. (1984) Iron uptake from transferrin by isolated hepatocytes: effect of ethanol. *Biochem Biophys Res Commun* **125**, 824-830.
- Nyholm S., Mann G. J., Johansson A. G., Bergeron R. J., Graslund A. und Thelander L. (1993) Role of ribonucleotide reductase in inhibition of mammalian cell growth by potent iron chelators. *J Biol Chem* **268**, 26200-26205.
- Oh T. H., Markelonis G. J., Royal G. M. und Bregman B. S. (1986) Immunocytochemical distribution of transferrin and its receptor in the developing chicken nervous system. *Brain Res* **395**, 207-220.
- Pantopoulos K. (2004) Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann NY Acad Sci* **1012**, 1-13.
- Pantopoulos K., Weiss G. und Hentze M. W. (1996) Nitric oxide and oxidative stress (H₂O₂) control mammalian iron metabolism by different pathways. *Mol Cell Biol* **16**, 3781-3788.
- Pardridge W. M., Eisenberg J. und Yang J. (1987) Human blood-brain barrier transferrin receptor. *Metabolism* **36**, 892-895.

- Parkes J. G., Randell E. W., Olivieri N. F. und Templeton D. M. (1995) Modulation by iron loading and chelation of the uptake of non-transferrin-bound iron by human liver cells. *Biochim Biophys Acta* **1243**, 373-380.
- Patel B.N. und David S. (1997) A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes. *J Biol Chem* **272**, 20185-20190.
- Patel B. N., Dunn R. J. und David S. (2000) Alternative RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin in mammalian brain. *J Biol Chem* **275**, 4305-4310.
- Paul T. (2000) Effect of a prolonged superoxide flux on transferrin and ferritin. *Arch Biochem Biophys* **382**, 253-261.
- Pearce R. K., Owen A., Daniel S., Jenner P. und Marsden C. D. (1997) Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. *J Neural Transm* **104**, 661-677.
- Perls M. (1867) Nachweis von Eisenoxyd in gewissen Pigmenten. *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* **39**, 42-48
- Perry G., Cash A. D. und Smith M. A. (2002) Alzheimer disease and oxidative stress. *J Biomed Biotechnol* **2**, 120-123.
- Perutz M. F. (1979) Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron. *Annu Rev Biochem* **48**, 327-386.
- Petrat F., De Groot H. und Rauen U. (2000) Determination of the chelatable iron pool of single intact cells by laser scanning microscopy. *Arch Biochem Biophys* **376**, 74-81.
- Petrat F., De Groot H. und Rauen U. (2001) Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopic study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells. *Biochem J* **356**, 61-69.
- Petrat F., De Groot H., Sustmann R. und Rauen U. (2002) The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity. *Biol Chem* **383**, 489-502.
- Pfriege F. W. und Steinmetz C. (2003) Les astrocytes, nouvelles stars du cerveau. *La Recherche* **361**, 50-54.
- Pinero D., Jones B. und Beard J. (2001) Variations in dietary iron alter behavior in developing rats. *J Nutr* **131**, 311-318.
- Pitt D., Nagelmeier I. E., Wilson H. C. und Raine C. S. (2003) Glutamate uptake by oligodendrocytes: Implications for excitotoxicity in multiple sclerosis. *Neurology* **61**, 1113-1120.
- Ponka P. (2004) Hereditary causes of disturbed iron homeostasis in the central nervous system. *Ann NY Acad Sci* **1012**, 267-281.
- Porter J. T. und McCarthy K. D. (1997) Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol* **51**, 439-455.
- Porter N. A. (1984) Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* **105**, 273-282.
- Prohaska J. R. und Gybina A. A. (2004) Intracellular copper transport in mammals. *J Nutr* **134**, 1003-1006.

- Puccio H. und Koenig M. (2002) Friedreich ataxia: a paradigm for mitochondrial diseases. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 272-277.
- Qi Y. und Dawson G. (1994) Hypoxia specifically and reversibly induces the synthesis of ferritin in oligodendrocytes and human oligodendrogliomas. *J Neurochem* **63**, 1485-1490.
- Qian Z. M. und Shen X. (2001) Brain iron transport and neurodegeneration. *Trends Mol Med* **7**, 103-108.
- Qian Z. M., To Y., Tang P. L. und Feng Y. M. (1999) Transferrin receptors on the plasma membrane of cultured rat astrocytes. *Exp Brain Res* **129**, 473-476.
- Qian Z. M., Liao Q. K., To Y., Ke Y., Tsoi Y. K., Wang G. F. und Ho K. P. (2000) Transferrin-bound and transferrin free iron uptake by cultured rat astrocytes. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **46**, 541-548.
- Raine C.S. (1999) Neurocellular anatomy. In *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects* (Hrsg.: Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Fisher S.K und Uhler M.D.) S. 3-30, Lippincott Williams und Wilkins, Philadelphia, USA.
- Ransom B.R. und Ye Z.-C. (2005) Gap junctions and hemichannels. In *Neuroglia*; 2. Auflage (Hrsg.: Kettenmann H. und Ransom B.R.) S. 177-189, Oxford University Press, New York.
- Ranscht B., Clapshaw P. A., Price J., Noble M. und Seifert W. (1982) Development of oligodendrocytes and Schwann cells studied with a monoclonal antibody against galactocerebroside. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**, 2709-2713.
- Rao K., Harford J. B., Rouault T., McClelland A., Ruddle F. H. und Klausner R. D. (1986) Transcriptional regulation by iron of the gene for the transferrin receptor. *Mol Cell Biol* **6**, 236-240.
- Rao R. und Georgieff M. K. (2002) Perinatal aspects of iron metabolism. *Acta Paediatr Suppl* **91**, 124-129.
- Rao R., de Ungria M., Sullivan D., Wu P., Wobken J. D., Nelson C. A. und Georgieff M. K. (1999) Perinatal brain iron deficiency increases the vulnerability of rat hippocampus to hypoxic ischemic insult. *J Nutr* **129**, 199-206.
- Regan R. F., Kumar N., Gao F. und Guo Y. (2002) Ferritin induction protects cortical astrocytes from heme-mediated oxidative injury. *Neuroscience* **113**, 985-994.
- Reinhart P. H., Pfeiffer B., Spengler S. und Hamprecht B. (1990) Purification of glycogen phosphorylase from bovine brain and immunocytochemical examination of rat glial primary cultures using monoclonal antibodies raised against this enzyme. *J Neurochem* **54**, 1474-1483.
- Rich P. R. (1984) Electron and proton transfers through quinones and cytochrome bc complexes. *Biochim Biophys Acta* **768**, 53-79.
- Richardson D. R. und Baker E. (1994) Two saturable mechanisms of iron uptake from transferrin in human melanoma cells: the effect of transferrin concentration, chelators, and metabolic probes on transferrin and iron uptake. *J Cell Physiol* **161**, 160-168.
- Richman P. G. und Meister A. (1975) Regulation of γ -glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem* **250**, 1422-1426.

- Richter G. W. (1978) The iron-loaded cell--the cytopathology of iron storage. A review. *Am J Pathol* **91**, 362-404.
- Richter-Landsberg C. und Vollgraf U. (1998) Mode of cell injury and death after hydrogen peroxide exposure in cultured oligodendroglia cells. *Exp Cell Res* **244**, 218-229.
- Riederer P., Sofic E., Rausch W. D., Schmidt B., Reynolds G. P., Jellinger K. und Youdim M. B. (1989) Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J Neurochem* **52**, 515-520.
- Riederer P., Dirr A., Goetz M., Sofic E., Jellinger K. und Youdim M. B. (1992) Distribution of iron in different brain regions and subcellular compartments in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **32**, S101-S104.
- Riemer J., Hoepken H. H., Czerwinska H., Robinson S. R. und Dringen R. (2004) Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Anal Biochem* **331**, 370-375.
- Robb S. J. und Connor J. R. (1998) An in vitro model for analysis of oxidative death in primary mouse astrocytes. *Brain Res* **788**, 125-132.
- Robson K. J., Merryweather-Clarke A. T., Cadet E., Viprakasit V., Zaahl M. G., Pointon J. J., Weatherall D. J. und Rochette J. (2004) Recent advances in understanding haemochromatosis: a transition state. *J Med Genet* **41**, 721-730
- Rose T. M., Plowman G. D., Teplow D. B., Dreyer W. J., Hellstrom K. E. und Brown J. P. (1986) Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97 (melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 1261-1265.
- Rossi F. (1986) The $O_2^{\cdot-}$ -forming NADPH oxidase of the phagocytes: nature, mechanisms of activation and function. *Biochim Biophys Acta* **853**, 65-89.
- Rothenberger S., Food M. R., Gabathuler R., Kennard M. L., Yamada T., Yasuhara O., McGeer P. L. und Jefferies W. A. (1996) Coincident expression and distribution of melanotransferrin and transferrin receptor in human brain capillary endothelium. *Brain Res* **712**, 117-121.
- Rouault T. A. (2001) Systemic iron metabolism: a review and implications for brain iron metabolism. *Pediatr Neurol* **25**, 130-137.
- Rouault T., Rao K., Harford J., Mattia E., und Klausner R. D. (1985) Hemin, chelatable iron, and the regulation of transferrin receptor biosynthesis. *J Biol Chem* **260**, 14862-14866.
- Rouault T. A., Hentze M. W., Caughman S. W., Harford J. B. und Klausner R. D. (1988) Binding of a cytosolic protein to the iron-responsive element of human ferritin messenger RNA. *Science* **241**, 1207-1210.
- Royall J. A. und Ischiropoulos H. (1993) Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* **302**, 348-355.
- Rozen S. und Skaletsky H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**, 365-386.

- Sagara J., Miura K. und Bannai S. (1993a) Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension. *J Neurochem* **61**, 1667-1671.
- Sagara J. I., Miura K. und Bannai S. (1993b) Maintenance of neuronal glutathione by glial cells. *J Neurochem* **61**, 1672-1676.
- Samaniego F., Chin J., Iwai K., Rouault T. A. und Klausner R. D. (1994) Molecular characterization of a second iron-responsive element binding protein, iron regulatory protein 2. Structure, function, and post-translational regulation. *J Biol Chem* **269**, 30904-30910.
- Sankarapandi S., Zweier J. L., Mukherjee G., Quinn M. T. und Huso D. L. (1998) Measurement and characterization of superoxide generation in microglial cells: evidence for an NADPH oxidase-dependent pathway. *Arch Biochem Biophys* **353**, 312-321.
- Schade A. L. und Caroline L. (1944) Raw hen egg white and the role of iron in growth inhibition of *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **100**, 14-15.
- Schade A. L. und Caroline L. (1946) An iron-binding component in human blood plasma. *Science* **104**, 340-341
- Scheiber-Mojdehkar B., Zimmermann I., Dresow B. und Goldenberg H. (1999) Differential response of non-transferrin bound iron uptake in rat liver cells on long-term and short-term treatment with iron. *J Hepatol* **31**, 61-70.
- Schneider C., Owen M. J., Banville D. und Williams J. G. (1984) Primary structure of human transferrin receptor deduced from the mRNA sequence. *Nature* **311**, 675-678.
- Schulz J. B., Lindenau J., Seyfried J. und Dichgans J. (2000) Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* **267**, 4904-4911.
- Shah P. M. (1991) Prevention of mental handicaps in children in primary health care. *Bull World Health Organ* **69**, 779-789.
- Shoden A., Gabrio B. W. und Finch C. A. (1953) The relationship between ferritin and hemosiderin in rabbits and man. *J Biol Chem* **204**, 823-830.
- Siddappa A. J., Rao R. B., Wobken J. D., Casperson K., Leibold E. A., Connor J. R. und Georgieff M. K. (2003) Iron deficiency alters iron regulatory protein and iron transport protein expression in the perinatal rat brain. *Pediatr Res* **53**, 800-807.
- Siegel M. R. und Sisler H. D. (1963) Inhibition of protein synthesis *in vitro* by cycloheximide. *Nature* **200**, 675-676.
- Simpson R. J., Mohamad-Ghaffer A. und Khan R. (1998) Glutathione and duodenal reduction and absorption of iron. *Biochem Soc Trans* **26**, S352.
- Skarlatos S., Yoshikawa T. und Pardridge W. M. (1995) Transport of ¹²⁵I transferrin through the rat blood-brain barrier. *Brain Res* **683**, 164-171.
- Slavin W. (1988) Atomic absorption spectrometry. *Methods Enzymol* **158**, 117-145.
- Smith K. J., Kapoor R. und Felts P. A. (1999) Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain Pathol* **9**, 69-92.

- Smith M. A., Wehr K., Harris P. L., Siedlak S. L., Connor J. R. und Perry G. (1998) Abnormal localization of iron regulatory protein in Alzheimer's disease. *Brain Res* **788**, 232-236.
- Sofic E., Lange K. W., Jellinger K. und Riederer P. (1992) Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **142**, 128-130.
- Sokolova T., Gutterer J. M., Hirrlinger J., Hamprecht B. und Dringen R. (2001) Catalase in astroglia-rich primary cultures from rat brain: immunocytochemical localization and inactivation during the disposal of hydrogen peroxide. *Neurosci Lett* **297**, 129-132.
- Somjen G. G. (1988) Nervenkitz: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia* **1**, 2-9.
- Sonderer B., Wild P., Wyler R., Fontana A., Peterhans E. und Schwyzer M. (1987) Murine glia cells in culture can be stimulated to generate reactive oxygen. *J Leukoc Biol* **42**, 463-473.
- Sonnewald U., Westergaard N., Krane J., Unsgard G., Petersen S. B. und Schousboe A. (1991) First direct demonstration of preferential release of citrate from astrocytes using ¹³CNMR spectroscopy of cultured neurons and astrocytes. *Neurosci Lett* **128**, 235-239.
- Sono M., Roach M. P., Coulter E. D. und Dawson J. H. (1996) Heme-containing oxygenases. *Chem Rev* **96**, 2841-2888.
- Streit W.J. (2005) Microglial cells. In *Neuroglia*; 2. Auflage (Hrsg.: Kettenmann H. und Ransom B.R.) S. 60-71, Oxford University Press, New York.
- Stubbe J. (1998) Ribonucleotide reductases in the twenty-first century. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 2723-2724.
- Stubbe J. und Der Donk W. A. (1998) Protein radicals in enzyme catalysis. *Chem Rev* **98**, 2661-2662.
- Takeda A., Devenyi A. und Connor J. R. (1998) Evidence for non-transferrin-mediated uptake and release of iron and manganese in glial cell cultures from hypotransferrinemic mice. *J Neurosci Res* **51**, 454-462.
- Tallkvist J., Bowlus C. L. und Lonnerdal B. (2003) Effect of iron treatment on nickel absorption and gene expression of the divalent metal transporter (DMT1) by human intestinal Caco-2 cells. *Pharmacol Toxicol* **92**, 121-124.
- Tappel A. L. (1984) Selenium--glutathione peroxidase: properties and synthesis. *Curr Top Cell Regul* **24**, 87-97.
- Tatusova T. A. und Madden T. L. (1999) BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett* **174**, 247-250.
- Testa U., Petrini M., Quaranta M. T., Pelosi-Testa E., Mastroberardino G., Camagna A., Boccoli G., Sargiacomo M., Isacchi G. und Cozzi A. (1989) Iron up-modulates the expression of transferrin receptors during monocyte-macrophage maturation. *J Biol Chem* **264**, 13181-13187.
- Tholey G., Ledig M., Mandel P., Sargentini L., Frivold A. H., Leroy M., Grippo A. A. und Wedler F. C. (1988) Concentrations of physiologically important metal ions in glial cells cultured from chick cerebral cortex. *Neurochem Res* **13**, 45-50.

- Thompson K. J., Shoham S. und Connor J. R. (2001) Iron and neurodegenerative disorders. *Brain Res Bull* **55**, 155-164.
- Thompson K. J., Fried M. G., Ye Z., Boyer P. und Connor J. R. (2002) Regulation, mechanisms and proposed function of ferritin translocation to cell nuclei. *J Cell Sci* **115**, 2165-2177.
- Thorburne S. K. und Juurlink B. H. (1996) Low glutathione and high iron govern the susceptibility of oligodendroglial precursors to oxidative stress. *J Neurochem* **67**, 1014-1022.
- Tietze F. (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* **27**, 502-522.
- Todorich B. M. und Connor J. R. (2004) Redox metals in Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* **1012**, 171-178.
- Tong X., Kawabata H. und Koeffler H. P. (2002) Iron deficiency can upregulate expression of transferrin receptor at both the mRNA and protein level. *Br J Haematol* **116**, 458-464.
- Torti F. M. und Torti S. V. (2002) Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* **99**, 3505-3516.
- Trapp G. A. (1983) Plasma aluminum is bound to transferrin. *Life Sci* **33**, 311-316.
- Treffry A., Zhao Z., Quail M. A., Guest J. R. und Harrison P. M. (1995) Iron(II) oxidation by H chain ferritin: evidence from site-directed mutagenesis that a transient blue species is formed at the dinuclear iron center. *Biochemistry* **34**, 15204-15213.
- Trinder D., Morgan E. H. und Baker E. (1988) The effects of an antibody to the rat transferrin receptor and of rat serum albumin on the uptake of diferric transferrin by rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* **943**, 440-446.
- Trinder D., Zak O. und Aisen P. (1996) Transferrin receptor-independent uptake of diferric transferrin by human hepatoma cells with antisense inhibition of receptor expression. *Hepatology* **23**, 1512-1520.
- Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E., Tomizaki T., Yamaguchi H., Shinzawa-Itoh K., Nakashima R., Yaono R. und Yoshikawa S. (1995) Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* **269**, 1069-1074.
- Ursini F., Maiorino M., Brigelius-Flohe R., Aumann K. D., Roveri A., Schomburg D. und Flohe L. (1995) Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* **252**, 38-53.
- van Calker D. und Hamprecht B. (1980) Effects of neurohormones on glial cells. *Adv Cell Neurobiol* **1**, 31-67.
- van Campen D. (1972) Effect of histidine and ascorbic acid on the absorption and retention of ⁵⁹Fe by iron-depleted rats. *J Nutr* **102**, 165-170.
- van Rossum D. und Hanisch U. K. (2004) Microglia. *Metab Brain Dis* **19**, 393-411.
- Vassault A. (1983) Lactate dehydrogenase: UV-method with pyruvate and NADH. In *Methods of Enzymatic Analysis* (Hrsg.: Bergmeyer H.U.) S. 118-126, Verlag Chemie, Weinheim

- Verkhatsky A., Orkand R. K. und Kettenmann H. (1998) Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev* **78**, 99-141.
- Vignais P. V. (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1428-1459.
- Vollgraf U., Wegner M. und Richter-Landsberg C. (1999) Activation of AP-1 and nuclear factor- κ B transcription factors is involved in hydrogen peroxide-induced apoptotic cell death of oligodendrocytes. *J Neurochem* **73**, 2501-2509.
- Wang X. S., Ong W. Y. und Connor J. R. (2001) A light and electron microscopic study of the iron transporter protein DMT-1 in the monkey cerebral neocortex and hippocampus. *J Neurocytol* **30**, 353-360.
- Ward J. H., Kushner J. P., und Kaplan J. (1982a) Regulation of HeLa cell transferrin receptors. *J Biol Chem* **257**, 10317-10323.
- Ward J. H., Kushner J. P. und Kaplan J. (1982b) Transferrin receptors of human fibroblasts. Analysis of receptor properties and regulation. *Biochem J* **208**, 19-26.
- Weiss J. und Humphrey C. W. (1949) Reaction between hydrogen peroxide and iron salts. *Nature* **163**, 691.
- Westergaard N., Sonnewald U., Unsgard G., Peng L., Hertz L. und Schousboe A. (1994) Uptake, release, and metabolism of citrate in neurons and astrocytes in primary cultures. *J Neurochem* **62**, 1727-1733.
- Wu L. J., Leenders A. G., Cooperman S., Meyron-Holtz E., Smith S., Land W., Tsai R. Y., Berger U. V., Sheng Z. H. und Rouault T. A. (2004) Expression of the iron transporter ferroportin in synaptic vesicles and the blood-brain barrier. *Brain Res* **1001**, 108-117.
- Xu L., Koumenis I. L., Tilly J. L. und Giffard R. G. (1999) Overexpression of bcl-xL protects astrocytes from glucose deprivation and is associated with higher glutathione, ferritin, and iron levels. *Anesthesiology* **91**, 1036-1046.
- Xu X., Pin S., Gathinji M., Fuchs R. und Harris Z. L. (2004) Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis. *Ann NY Acad Sci* **1012**, 299-305.
- Yang F., Naylor S. L., Lum J. B., Cutshaw S., McCombs J. L., Naberhaus H., McGill J. R., Adrian G. S., Moore C. M., Barnett D. R. und Bowman B. H. (1986) Characterization, mapping, and expression of the human ceruloplasmin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 3257-3261.
- Ying W., Han S. K., Miller J. W. und Swanson R. A. (1999) Acidosis potentiates oxidative neuronal death by multiple mechanisms. *J Neurochem* **73**, 1549-1556.
- Youdim M. B. und Riederer P. (1993) The role of iron in senescence of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* **40**, 57-67.
- Young S. P., Bomford A. und Williams R. (1984) The effect of the iron saturation of transferrin on its binding and uptake by rabbit reticulocytes. *Biochem J* **219**, 505-510.

- Zhang J., Graham D. G., Montine T. J. und Ho Y. S. (2000) Enhanced N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity in mice deficient in CuZn-superoxide dismutase or glutathione peroxidase. *J Neuropathol Exp Neurol* **59**, 53-61.
- Zhang Y. und Pardridge W. M. (2001) Rapid transferrin efflux from brain to blood across the blood-brain barrier. *J Neurochem* **76**, 1597-1600.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte des Eisenstoffwechsels neuraler Zellen in Kultur untersucht. Die eingesetzten Kulturmodelle für Astrocyten, Neuronen, Microglia und Oligodendrocyten wurden immunocytochemisch charakterisiert und bezüglich des Vorkommens von Eisen, Ferritin, Transferrinrezeptor (TfR) und Transferrin miteinander verglichen. Eisen konnte quantitativ in allen untersuchten Kulturen nachgewiesen werden, wobei Microgliazellen den höchsten spezifischen Eisengehalt aufwiesen. Durch die modifizierte Perlsfärbung zur Detektion von Eisen(III) konnte nur Microgliazellen eindeutig Eisen(III) zugewiesen werden. Ferritin und TfR sowie die mRNAs für Ferritin, TfR, Transferrin und die eisenregulatorischen Proteine 1 und 2 wurden für alle untersuchten Zellkulturtypen nachgewiesen.

Durch histochemische Anfärbungen von Rattengehirnschnitten wurden Eisen und Ferritin überwiegend in Microglia aber auch in Oligodendrocyten nachgewiesen, TfR trat vor allem auf Blutkapillaren oder den umgebenen Zellen auf und Transferrin wurde ausschließlich in Oligodendrocyten nachgewiesen.

Für die untersuchten Zellkulturen konnte sowohl eine transferrinabhängige als auch eine transferrinunabhängige Eisenaufnahme nachgewiesen werden, wobei die transferrinunabhängige Eisenaufnahme in allen Zelltypen zu einer wesentlich stärkeren Eisenakkumulation führte als die transferrinabhängige Eisenaufnahme. Die größten Eisenmengen wurden unter beiden Inkubationsbedingungen von Microgliazellen aufgenommen.

In Astrogliazellen führte die Inkubation mit Eisen zu einer Steigerung des Vorkommens von Ferritin und zu einer Verringerung des Vorkommens von TfR. Inkubation der Zellen mit dem Eisenchelator Deferoxamin steigerte den TfR-Gehalt, verhinderte bei gleichzeitiger Gabe von Eisen die Eisenakkumulation und führte zur Verhinderung der eisenabhängigen Steigerung des Ferritingehaltes.

Koinkubation von Astrogliazellen mit Eisen und Cycloheximid führte zu einem erhöhten zellulären Eisengehalt ohne Steigerung des Ferritingehaltes. Diese Inkubationsbedingungen waren durch starke Bildung von Radikalen und erhöhten Zelltod gekennzeichnet. Die fehlende Steigerung des Ferritingehaltes unter diesen

Bedingungen könnte zu einer erhöhten Konzentration redoxaktiven Eisens und damit zur Bildung von Hydroxylradikalen durch die Fenton-Reaktion geführt haben.

Der Vergleich der H_2O_2 -Entgiftungsgeschwindigkeit von Astrogliazellen aus Wildtyp-Mäusen und Glutathionperoxidase 1 (GPx1)-defizienten Mäusen ergab nahezu identische spezifische Entgiftungsgeschwindigkeitskonstanten. In beiden Kulturtypen ergaben sich ähnliche GSx-Werte, die durch Inkubation der Zellen mit dem Inhibitor der Glutathionsynthese Buthioninsulfoximin um mehr als 80% verringert wurden. Bei Inkubation mit H_2O_2 kam es nur in Kulturen von Astrogliazellen aus Wildtyp-Mäusen zur Bildung von Glutathiondisulfid. Die Senkung des Glutathiongehaltes führte nur in Astrogliakulturen aus Wildtyp-Mäusen zu einer Verlangsamung der H_2O_2 -Entgiftung, jedoch wurde bei den Astrogliakulturen beider Mauslinien drei Stunden nach der H_2O_2 -Applikation erhöhter Zelltod festgestellt. Die Hemmung der Catalase durch 3-Amino-1,2,4-triazol führte insbesondere in Astrogliakulturen aus GPx1-defizienten Mäusen zur Verlangsamung der H_2O_2 -Entgiftung. Dies hatte in GPx1-defizienten Astrogliakulturen starken Zelltod zur Folge, während in Astrogliakulturen aus Wildtyp-Mäusen keine erhöhte LDH-Freisetzung gemessen wurde. Die Toxizität von H_2O_2 auf Wildtyp- und GPx1-defizienten Astrogliakulturen nach Vorinkubation mit Buthioninsulfoximin oder 3-Amino-1,2,4-triazol konnte durch Inkubation mit dem Eisenchelator Deferoxamin vollständig verhindert werden. Dies weist darauf hin, dass Eisen an der Toxizität von H_2O_2 beteiligt ist.

Meine akademischen Lehrer waren

Prof. Dr. J. Ammermüller
Prof. Dr. F. Bairlein
Prof. Dr. H. Cypionka
Prof. Dr. H. U. Dahms
Prof. Dr. R. Dringen
Prof. Dr. W. Eber
Dr. A. Gerlach
Dr. T. Glatzel
Prof. Dr. V. Haeseler
Prof. Dr. B. Hamprecht
Dr. P. Harmand
Prof. Dr. T. Höpner
Prof. Dr. U. Janssen-Bienhold
Prof. Dr. P. P. Jaros
Prof. Dr. P. U. Klinger
Prof. Dr. B. Kollmeier
Prof. Dr. W. E. Krumbein
Prof. Dr. J. Martens
Prof. Dr. K. Petersen
Prof. Dr. C. Richter-Landsberg
Dr. E. Rhiel
Dr. C. Ritzau
Prof. Dr. H. K. Schminke
Prof. Dr. H. Stabenau
Prof. Dr. E. Vareschi
Prof. Dr. W. Wackernagel
Prof. Dr. Reto Weiler
Prof. Dr. A. Willig
Prof. Dr. Witte
Prof. Dr. E. Zeeck

Lebenslauf

Hans-Hermann Höpken

27.01.1974	geboren in Brake (Unterweser)
07.1980 – 06.1984	Grundschule Strückhausen
07.1994 – 06.1986	Orientierungsstufe Brake-Süd
07.1986 – 05.1993	Gymnasium Brake (Unterweser)
07.1993 – 09.1994	Zivildienst bei der evangelischen Kirche Brake
10.1994 – 02.2001	Studium der Biologie an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
01.2000 – 02.2001	Diplomarbeit an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg unter der Anleitung von Prof. Dr. Christiane Richter-Landsberg mit dem Titel „Vergleichende Analyse von OLN-93-Zellen mit ht τ 40- und Δ 280K-transfizierten OLN-93-Zellen“.
08.02.2001	Diplom in Biologie
08.2001 – 09.2004	Ausführung des experimentellen Teils der Dissertation am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. Ralf Dringen mit dem Titel „Untersuchungen zum Eisenstoffwechsel neuraler Zellen“