



Dissertation

**Putative Eisenregulation von Fractalkin (CX3CL1),
pathophysiologische Rolle von CX3CL1 in Plättchenmodellen
und Eisenhaushalt in der Megakaryopoese**

Charles Pierre Paul Breyer

Aus dem Labor für molekulare Hepatologie der
Medizinischen Klinik und Poliklinik 2
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Hermann Einsele

**Putative Eisenregulation von Fractalkin (CX3CL1), pathophysiologische Rolle
von CX3CL1 in Plättchenmodellen und Eisenhaushalt in der Megakaryopoese**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Charles Pierre Paul Breyer
aus Luxemburg

Würzburg, Oktober 2020



Referent: Prof. Dr. med. Andreas Geier
Koreferent/in: Prof. Dr. med. Thomas Dandekar
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2021

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Eisenhomöostase	1
1.1.1. Eisenhomöostase im Körper	2
1.1.2. Regulation der Eisenhomöostase	5
1.1.3. Erkrankungen der systemischen Eisenhomöostase	10
1.2. Fractalkin	14
1.2.1. Chemokine.....	14
1.2.2. CX3CL1	14
1.2.3. CX3CR1.....	15
1.2.4. Funktionen der CX3CL1/CX3CR1-Achse	16
2. Ziel dieser Arbeit.....	21
3. Material und Methoden.....	23
3.1. Verwendete Materialien.....	23
3.1.1. Zelllinien	23
3.1.2. Primäre Zellen und Versuchstiere.....	23
3.1.3. Medien und Zellkulturreagenzien.....	24
3.1.4. Lösungen, Puffer, Reagenzien	24
3.1.5. Verwendete Software und Geräte.....	26
3.1.6. Kits	27
3.1.7. Stimulantien	27
3.1.8. Antikörper	27
3.1.9. Primer	29
3.2. Methoden	31
3.2.1. <i>Hfe</i> - und <i>Hfe2-knockout</i> Mäuse	31
3.2.2. Zellbiologische Methoden.....	31
3.2.3. Molekularbiologische Methoden.....	35
3.2.4. Auswertung	40
4. Ergebnisse	41
4.1. Untersuchung der <i>Cx3cl1</i>-Expression in Mausmodellen der Eisenüberladung	41
4.2. Fractalkin-Expression und Eisenregulation in Endothelzellen	42
4.2.1. MS1-Endothelzellen	42
4.2.2. HUVEC.....	47
4.3. Eisenhaushalt und Fractalkin-Expression/-Regulation durch freie Eisenionen in Modellen der Megakaryopoese	50
4.3.1. Untersuchung der Megakaryopoese und des Eisenhaushalts im megakaryopoetischen Differenzierungsprozess	50
4.3.2. Einfluss von Eisen auf den letzten Tag der Megakaryopoese	55
4.3.3. CX3CL1/CX3CR1-Achse bei Megakaryozyten.....	56
5. Diskussion.....	61

5.1. Hepatische Fractalkin-Expression im Modell der Eisenüberladung in <i>Hfe/Hfe2</i> -defizienten Mäusen	61
5.2. Fractalkin-Expression und -Regulation in Endothelzellen	62
5.3. Eisenhaushalt in der Megakaryopoese.....	65
5.4. <i>CX3CL1/CX3CR1</i> -Expression in Megakaryozyten und pathophysiologische Rolle der Fractalkin-Achse	67
6. Zusammenfassung	70
7. Literaturverzeichnis	73
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	81
9. Abkürzungsverzeichnis.....	82
10. Primer-Effizienzen	84

1. Einleitung

1.1. Eisenhomöostase

Eisen ist ein essentielles Spurenelement mit lebensnotwendigen Funktionen in fast allen Spezies der sechs Reiche der Lebewesen, von Prokaryonten bis hin zu den Eukaryonten. Es präsentiert sich biochemisch in den zwei Formen des organischen und anorganischen Eisens. In der Natur kann es in acht verschiedenen Oxidationszuständen (von -2 bis +6) vorkommen, wobei physiologisch vor allem Fe^{2+} und Fe^{3+} von Bedeutung sind. Dabei spielt Fe^{2+} eine wichtige Rolle als Elektronendonator, während Fe^{3+} in biologischen Prozessen als anorganischer Elektronenakzeptor dient. Die Säugetier-Zelle macht sich diese Redox-Eigenschaften in mehreren enzymatischen Reaktionen und Transportprozessen zunutze. Hierin befindet sich Eisen in Proteinkomplexen, welche sich in drei Klassen einteilen lassen: die Eisen-Schwefel-Cluster, Häm-beinhaltende und Eisen-beinhaltende Proteine (1, 2). Zu den wichtigsten Eisen-vermittelten Funktionen gehören DNA-Biosynthese, oxidative Phosphorylierungen, Xenobiotika-Metabolismus und - die wohl wichtigsten Funktionen - der Sauerstoff-Transport und die Teilnahme an der mitochondrialen Atmungskette. Auf der anderen Seite führt das starke Redox-Potential von freiem Fe^{2+} in der Fenton Reaktion zur Generierung von toxischen reaktiven Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS) wie Hydroxyl-Radikalen. Dieser oxidative Stress kann zur Peroxidation von angrenzenden Lipiden, oxidativer Schädigung der DNA und anderen Makromolekülen und letztendlich zum Eisen-induzierten Zelltod führen (3). Um diese Schäden zu vermeiden, liegen freie ionische Formen von Eisen in Bindung an Proteine wie Ferritin und Transferrin vor. Das restliche Eisen, bezeichnet als „labiles“ Eisen, macht nur einen Bruchteil des Gesamt- Eisens aus und weist auf eng abgestimmte Zufluss-, Abfluss- und Speicher-Mechanismen hin.

Der Hauptspeicher von intrazellulärem Eisen bildet das sich vor allem in Leber, Milz und Knochenmark akkumulierende Ferritin. Ferritin ist aus einer Proteinhülle mit

zentralem Eisen-speichernden Kern aufgebaut, welche bis zu 4500 Eisenmoleküle beinhalten kann. Die Proteinhülle besteht aus 24 schweren (H) und leichten (L) Untereinheiten, wobei die H-Einheit Ferroxidase-Aktivität aufweist und dementsprechend Ferritin das Eisen in unreaktiver Fe^{3+} -Form speichert (4, 5). Plasmatisches Ferritin, welches mit den intrazellulären Beständen korreliert, wird klinisch als Eisenspeicher-Marker in Erkrankungen wie Eisenmangelanämie und Eisenüberladung in Kombination mit Transferrin/Transferrin-Sättigung eingesetzt. Des Weiteren ist Ferritin ein Akute-Phase-Protein und steigt im Rahmen bakterieller Entzündungen drastisch an, um die notwendige Eisenaufnahme der Erreger zu unterbinden. Ferner wirkt Ferritin inhibitorisch auf die Proliferation von humanen hämatopoetischen Progenitorzellen und immunsuppressiv gegen T-Lymphozyten (6, 7).

Im extrazellulären Blutplasma werden Eisenmoleküle durch Transferrin einerseits gespeichert und des Weiteren durch den Blutstrom zu den Zielzellen transportiert. Dieses sogenannte Transferrin-gebundene Eisen (*Transferrin-Bound-Iron*, TBI) wird vom nicht-Transferrin-gebundenen Eisen (*Non-Transferrin-Bound-Iron*, NTBI) unterschieden. Im Gegensatz zum Ferritin besitzt Transferrin eine Bindungskapazität von nur je 2 Fe^{3+} -Molekülen und ist physiologisch zu ca. 30% gesättigt (4). In seiner Transportfunktion spielt Transferrin eine zentrale Rolle in der Regulation der systemischen Eisenhomöostase und dient als plasmatischer Vermittler zwischen den vier beteiligten Zelltypen, nämlich duodener Enterozyt, Erythrozyt, Makrophage und Hepatozyt.

1.1.1. Eisenhomöostase im Körper

Im physiologischen menschlichen Organismus wird die Menge an Eisen durch ein komplexes und gut abgestimmtes Zusammenspiel aus Absorption, Verteilung, Speicherung, Mobilisation und Recycling auf etwa 4-5g konstant gehalten. Aktive Eisen-Exkretionsmechanismen sind nicht bekannt, die Elimination erfolgt durch Desquamation von Enterozyten (ca. 1-2mg pro Tag) und physiologischen Blutungen/Menstruation. Die Eisenaufnahme, welche für die tägliche Hämoglobin-

Synthese der Erythropoese einer Menge von 25-30mg entspricht, erfolgt nur zu 10% durch Ernährung (8). Diese Eisenabsorption findet primär in den duodenalen Enterozyten durch bis jetzt zwei identifizierte Mechanismen statt: Mit der Nahrung aufgenommenes Häm wird durch das *Heme Carrier Protein 1* (HCP1), welches reichlich an der luminalen Enterozytenmembran exprimiert ist, aufgenommen. Inorganisches Eisen wird luminal durch die Ferrireduktase duodenales Cytochrom B (dCytB) in Fe^{2+} umgewandelt und anschließend durch den divalenten Metall-Transporter DMT1 (kodiert durch das *SLC11A2* Gen) in die Enterozyten aufgenommen (3, 9). Neben der apikalen Enterozytenmembran befindet sich DMT1 intrazellulär in Endosomenmembranen und vermittelt die Freisetzung von Eisen in das Zytoplasma. Dabei ist DMT1 pH abhängig mit einem Aktivitäts-Optimum bei pH 5 (10). DMT1 kommt in den vorher angesprochenen vier Zelltypen, nämlich Enterozyt, Erythrozyt, Makrophage und Hepatozyt vor. Im Enterozyten wird das aufgenommene Eisen in Ferritin gespeichert, zum Protein-Metabolismus benutzt oder durch den einzigen bis jetzt bekannten Eisen-Exporter, Ferroportin (kodiert durch das *SLC40A1* Gen), in das Blutplasma gegeben. Für diese Ausschleusung ist die Mitwirkung der Ferroxidase Hephaestin notwendig. Die Zielzellen nehmen das im Plasma zum größten Teil an Transferrin gebundene Eisen mittels Transferrin Rezeptoren (TFRs) auf. Dabei interagiert der TFR nur mit durch Eisen beladenem Transferrin und bildet einen TFR-Transferrin Proteinkomplex. Diese Interaktion induziert eine endozytäre Internalisation des Komplexes. In dem sauren Milieu des gebildeten Lysosoms kommt es zur Freisetzung der Eisenmoleküle aus Transferrin. Anschließend wird das freie Eisen nach Reduktion durch eine endosomale Ferrireduktase per DMT1 der Zelle zum weiteren Gebrauch zur Verfügung gestellt und TFR/apo-Transferrin (eisenloses-Transferrin) durch Exozytose erneut in den Umlauf gebracht (11). Zwei Isoformen der TFRs sind in der Säugetier-Zelle bekannt, TFRC (TFR1) und TFR2. Die eben beschriebene Funktion der Eisenbereitstellung an Zielzellen erfolgt hauptsächlich durch den TFRC. Besonders in der Erythropoese ist TFRC für die Erythroblasten, welche im Gegensatz zu z.B. Hepatozyten und pankreatischen Zellen keine Alternative in Form einer NTBI-Aufnahme besitzen, der einzige Eisenzufuhr-Weg. Trotz einer Homologie zu dem TFRC

unterscheidet sich TFR2 funktionell durch eine ca. 25-fach erniedrigte Transferrin-Affinität. Ferner weist die mRNA von *TFR2* im Gegensatz zu *TFRC* kein *iron responsive element* (IRE) auf und ist primär in Hepatozyten und duodenalen Enterozyten exprimiert. Wegen diesen Unterschieden und der Tatsache, dass ein Verlust von *TFRC* sich in Mäusen durch eine schwere Anämie embryonisch letal äußert, die *TFR2* Mutation aber den Phänotyp einer Eisenüberladung hervorruft, wird dem *TFR2* neben seiner untergeordneten Rolle der Eisenaufnahme eine Funktion als Eisensensor für die Eisenhomöostase zugeschrieben; diese ist jedoch in ihren mechanistischen Details noch nicht ausreichend geklärt (12-14).

Neben der gut beschriebenen TBI-Aufnahme deutet steigende experimentelle Evidenz auf die Existenz von NTBI-Aufnahmewegen und deren mögliche pathophysiologische Rolle hin. Neben *DMT1* wurden mehrere neue Proteine als Komponenten der NTBI-Aufnahme identifiziert. Die *SLC39* Familie, auch *ZRT/IRT-like proteins* (ZIP) genannt, ist eine Gruppe von Transmembran- Zn^{2+} -Transporter mit 14 bekannten Mitgliedern. Studien haben gezeigt, dass *ZIP14* und *ZIP8* eine zusätzliche Rolle als NTBI-Transporter aufweisen. Der NTBI-Einfluss in der Leber scheint also u.a. durch *ZIP14* vermittelt zu werden, in Kardiomyozyten wird derzeit die Rolle von Kalziumkanälen im NTBI-Transport untersucht. Allgemein wird angenommen, dass im Eisenüberladungszustand eine überforderte Transferrin-Achse zu erhöhten NTBI-Spiegeln führt und die NTBI-Aufnahme in Leber, Pankreas und Herz einen ausschlaggebenden pathophysiologischen Mechanismus darstellt (15-18).

Der größte Teil des Eisens wird durch Recycling von alten Erythrozyten, dessen Lebenslänge nur ca. 120 Tage umfasst, im Retikuloendothelialen System (RES) zur Verfügung gestellt. Dabei erkennen die Makrophagen eine Kombination aus Altersabhängigen Markern wie Phosphatidylserin in der Membran, schlechte Membranflexibilität und molekularen Veränderungen, welche eine Phagozytose induziert. Im Phagolysosomen wird Häm durch Lyse des Erythrozyten freigesetzt und das Eisen durch die Häm Oxygenase 1 (HO1) extrahiert. Anschließend erfolgt der Transport ins Zytoplasma über *DMT1*, die Freisetzung aus dem Makrophagen über

Ferroportin und die Oxidation zu dem für die Bindung an Transferrin benötigten Fe^{3+} durch Coeruloplasmin (1).

Kommt es zuletzt im systemischen Umlauf zu einem gesteigerten Eisenspiegel, so wird überflüssiges Eisen gespeichert, wobei die Leber die wohl wichtigste Rolle spielt. Dabei können Hepatozyten Eisen in Form von Transferrin (TBI), molekularem Eisen (NTBI), Hämoglobin, Haptoglobin und Hämopexin aus dem Blut aufnehmen. Zusätzlich hat die Leber eine zentrale Funktion in der Regulation der systemischen Eisenhomöostase.

1.1.2. Regulation der Eisenhomöostase

1.1.2.1. HFE und HFE2

Das Hereditäre Hämochromatose (HH) auslösende Gen *HFE* kodiert das strukturell den MHC-Klasse I Proteinen ähnliche HFE-Protein. HFE-Expression wurde auf den epithelialen Zellen des Gastrointestinal-Trakts (GIT) vom Ösophagus bis zum Rektum, in Immunzellen einschließlich Makrophagen und Granulozyten und in der Leber in Hepatozyten, Kupffer-Zellen und Endothel festgestellt (19-21). HFE bindet den TfRc, was zu einer Reduzierung der Affinität von TfRc für Transferrin um den Faktor 5-10 führt und möglicherweise so die Eisenaufnahme reguliert (22). Ferner wird eine Rolle von HFE in der Regulation der Hpcidin-Expression angenommen, da HFE-Mutationen in der Maus und beim Menschen die Hpcidin-Expression herunterreguliert (23). Die genaue Funktion von HFE in einigen Zelltypen ist aber noch unklar.

HFE2, auch Hämojuvelin genannt, wurde initial als das für die Hämochromatose Typ 2b verantwortliche Gen gefunden. HFE2 wird eine Rolle als positiver Regulator in der Hpcidin-Expression als BMP-Korezeptor zugeschrieben (24, 25).

1.1.2.2. Hpcidin

Hpcidin (kodiert durch das *HAMP*-Gen) gilt als zentrales Schlüsselprotein in der Regulation der systemischen Eisenhomöostase und wird nach Produktion in den Hepatozyten in den Blutstrom freigesetzt. Mäuse mit fehlender Hpcidin Expression zeigten phänotypisch die Entwicklung einer schweren Eisenüberladungsstörung, eine Hpcidin-Überexpression führte dagegen zur Ausprägung einer Eisenmangelanämie.

Mechanistisch wurde gezeigt, dass Heparin an Ferroportin bindet, was eine Internalisation, Ubiquitinierung und lysosomale Degradation des Komplexes induziert. Diese Hemmung von Ferroportin führt in Enterozyten und Makrophagen zu einer Reduktion der systemischen Bereitstellung von Eisen (26).

Die komplexe Regulation der Heparin-Expression ist in ihren Einzelheiten noch nicht ausreichend geklärt, kann aber inhaltlich in drei Gruppen von Signalwegen gegliedert werden.

- a) Untersuchungen unterstützen die Hypothese der Rolle von HFE als Schalter zwischen den beiden Transferrin-Rezeptoren TFR1 und TFR2 (**Abb. 1**): Transferrin-TFR1 Bindung soll demnach zu einer Dissoziation des TFR1-HFE Komplexes und einer Interaktion zwischen TFR2 und HFE führen. Die dadurch verbesserte Stabilisation von TFR2 sowie BMP6-BMPRII mit seinem Korezeptor HFE2 sollen demnach eine Phosphorylierung von SMAD1/5/8 und über Rekrutierung von SMAD1/5/8 und SMAD4 an den proximalen Promotor eine erhöhte Heparin-Expression induzieren. Neulich konnten die sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC) als weitere Schlüsselregulatoren der Eisenhomöostase in der Leber identifiziert werden, da eine Hemmung des BMP-Signalwegs spezifisch in LSECs in Mäusen zu einer Eisenüberladung führte. Der BMP/SMAD-Weg ist demnach der wichtigste Mechanismus zur Regulation der Eisenhomöostase durch systemische Eisenverfügbarkeit (27-29).
- b) Des Weiteren wird Heparin als Akute-Phase Protein in inflammatorischen Zuständen induziert. Dabei wurde der die Heparin-Expression hervorrufende Effekt von IL-6 über den JAK-STAT3 Weg ausgiebig erforscht (30).
- c) Zuletzt wird Heparin über hypoxische und erythropoetische, bis jetzt noch nicht ausreichend beschriebene Signal-Mechanismen reguliert.

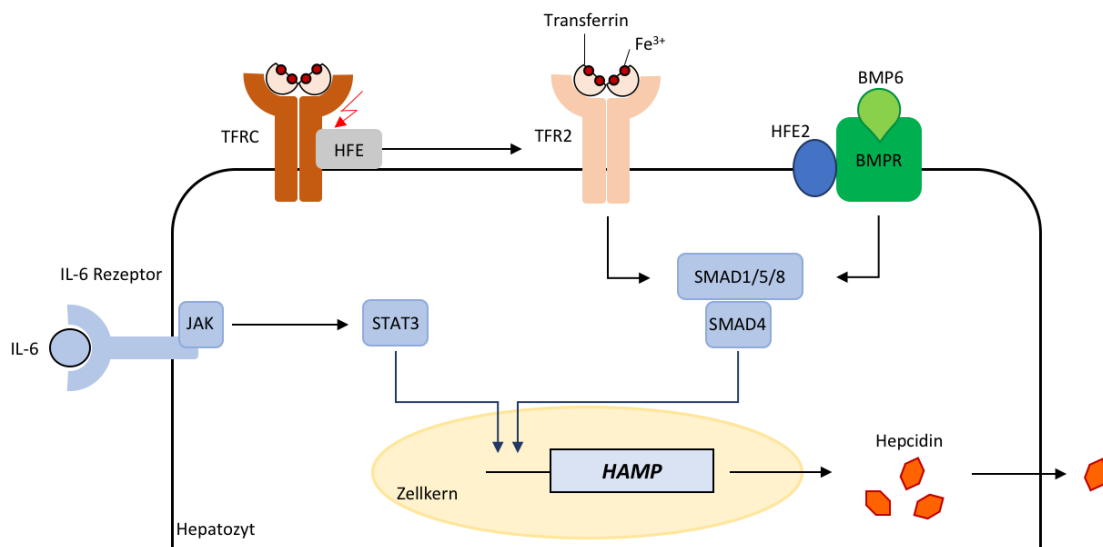


Abbildung 1: Hepcidin-Regulation im Hepatozyten

Transferrin-TFRC Bindung soll zu einer Dissoziation des TFRC-HFE Komplexes und einer Interaktion zwischen TFR2 und HFE führen. Ferner wird durch erhöhte Eisenspiegel die BMP6-Expression im Hepatozyten gesteigert. Die HFE-bedingte, verbesserte Stabilisation von TFR2 sowie BMP6-BMPR mit seinem Korezeptor HFE2 sollen demnach eine Phosphorylierung von SMAD1/5/8 und über Rekrutierung von SMAD1/5/8 und SMAD4 an den proximalen Promotor eine erhöhte Hepcidin-Expression induzieren. Zusätzlich wird Hepcidin als Akute-Phase Protein in inflammatorischen Zuständen durch IL-6 über den JAK-STAT3 Weg induziert.

1.1.2.3. IRP/IRE

Iron Regulatory Proteins (IRPs) regulieren posttranskriptional die Expression von bestimmten, hauptsächlich am Eisenmetabolismus beteiligten Genen, indem sie an sogenannte *Iron Responsive Elements* (IREs) der mRNAs binden. Die zwei Mitglieder der IRP-Familie, IRP1 und IRP2, sind dabei unerlässlich für das Überleben des Organismus, wie es der letale Phänotyp bei *Irp1*^{-/-} und *Irp2*^{-/-} doppelt defizienten Mäusen zeigt. IREs befinden sich in der 5' oder 3'-untranslatierten Region (UTR) der mRNA und weisen eine *stem-loop*-Struktur auf. Dabei besteht die Schlinge aus einer 6 Nukleotide umfassenden Sequenz mit folgender Abfolge 5'-CAGUGX-3' (X steht hierbei für A, C oder U).

IRPs werden durch Bedingungen wie niedriger zellulärer Eisenspiegel, H_2O_2 oder Hypoxie aktiviert und binden an IREs (**Abb. 2**). Bindet ein IRP dabei an ein in der 5'-UTR lokalisiertes IRE der mRNA des Zielgens, kommt es durch Hemmung der Bildung des für die Translation wichtigen Präinitiations-Komplexes zu einer Inhibierung der jeweiligen Gen-Expression. Gene mit IRE in der 5'-UTR sind u.a. diejenigen, die für Ferritin, Ferroportin, 5-Aminolävulinsäure-Synthase 2 (ALAS2, katalysiert den ersten Schritt der Häm-Biosynthese) und Hypoxie induzierter Faktor 2α (HIF2 α) kodieren. Bindet ein aktives IRP dagegen ein IRE in der 3'-UTR eines Zielgens, wie bei den Genen für TFRC und DMT1 der Fall ist, kommt es durch eine mRNA-Stabilisierung zu einer erhöhten Expression. Die Lokalisation des IRE im 5'- oder 3'-Bereich der Zielgen-mRNA legt demnach fest, ob es zu einer stimulierenden oder reprimierenden Aktivität kommt. Über diesen Mechanismus können IRPs die zelluläre Eisenabsorption also erhöhen und Speicherung/Abfluss von Eisen hemmen, um einen passenden intrazellulären Eisenspiegel aufrecht zu erhalten.

Ist die zelluläre Eisenkonzentration jedoch erhöht, werden die IRPs inaktiviert. Dabei kommt es zur Degradation von IRP2; IRP1 wechselt seine Funktion zu einer zytosolischen, in ihrer Funktion der mitochondrialen entsprechenden Aconitase. Hoher Eisenspiegel führt also dazu, dass mRNAs mit 5'-UTR-IRE nicht mehr blockiert werden (erhöhte Translation) und mRNAs mit 3'-UTR-IRE destabilisiert werden (reduzierte Translation) (3, 31, 32).

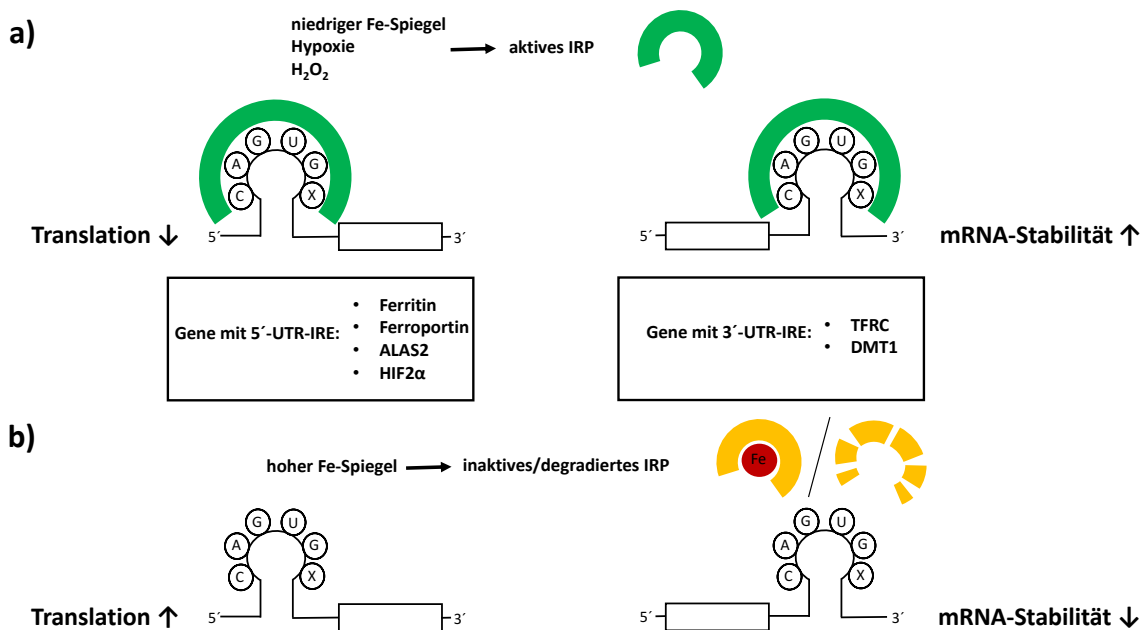


Abbildung 2: Schematische Darstellung der IRP/IRE-Regulation

Auswirkung der Eisenkonzentration und Zellstress auf die Regulation IRE-haltiger Gene. a) Niedrige Fe-Spiegel, Hypoxie und H₂O₂ führen durch Bindung des aktiven IRP (grün) in Abhängigkeit von der Lokalisierung des IRE im 5' oder 3' Bereich zu einer gegenläufigen Regulation der Translation/mRNA-Stabilität. b) Hoher Fe-Spiegel dagegen inaktiviert oder degradiert IRPs (gelb), welche folglich nicht mehr IREs binden. Demensprechend kommt es zu einer verstärkten Translation von mRNA mit einer 5'-IRE und einer Destabilisierung von mRNA mit IRE im 3'-Bereich.

Der exakte Mechanismus ist im vorausgegangenen Text ausführlich beschrieben.

Modifiziert nach: (3)

1.1.2.4. HIF

Eine transkriptionale Regulation erfolgt durch den, unter Hypoxie und niedrigen Eisenspiegeln induzierten Transkriptionsfaktor Hypoxie induzierter Faktor (HIF). HIF besitzt eine in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration regulierte α -Untereinheit und eine konstitutiv exprimierte β -Untereinheit. Sinkende Sauerstoffspiegel und niedrige Eisenkonzentration führen demnach zu einer Stabilisierung/Aktivierung von HIFs, welche *Hypoxia Responsive Elements* (HRE) in Promotoren binden und eine Regulation der Zielgene hervorrufen. Die verschiedenen HIFs (HIF1 α , HIF2 α und HIF3 α) beeinflussen dabei die Expression von verschiedenen, aber auch überlappenden

Zielgenen (33, 34). Dazu gehören Gene, die u.a. für DMT1 und dCytB (34), TFRC (35) und Hpcidin (36) kodieren.

1.1.3. Erkrankungen der systemischen Eisenhomöostase

1.1.3.1. Eisenmangelanämie

Die Eisenmangelanämie (EMA) steht auf Platz 9 von 26, von der *World Health Organization* (WHO) im *Global Burden of Disease 2000* eingeschätzten, globalen Risikofaktoren. Von allen Anämien zeigt der Eisenmangel als Ursache die häufigste Prävalenz mit einem Anteil von ca. 50% aller Anämien auf (37). Die WHO definiert die EMA ab einer Hämoglobinkonzentration <12g/dL bei Frauen und <13g/dL bei Männern. Ätiologie sind unzureichende Eisenaufnahme mit der Ernährung, erhöhter Eisen-Bedarf in Wachstumsperioden (Kinder, Schwangerschaft) und chronischer Blutverlust. Klinisch äußert sich die Erkrankung in Müdigkeit, schlechter mentaler Leistung, neurologischer Symptomatik (*Restless-Legs-Syndrom*, *Pica*) und kognitiver Dysfunktion (38). Neben den Veränderungen der Erythrozyten kann bei der EMA auch die Plättchen-Zahl verändert sein. Dabei berichten Studien bei moderater EMA über reaktive Thrombozytose; Thrombozytopenie scheint seltener, bei einer schlimmeren EMA, vorzukommen. Die Mechanismen dieser Veränderungen sind nicht ausreichend geklärt, in allen Fällen führte eine adäquate Eisensubstitution jedoch zu einer Normalisierung der Plättchenanzahl (39-41).

1.1.3.2. Hämochromatose

Der Begriff „Hämochromatose“ wurde 1889 durch Friedrich Daniel von Recklinghausen zur Beschreibung von den hämatogenen Pigmenten zugeschriebener, bronzefarbener Morphologie von Organen geprägt. Nach der von Joseph H. Sheldon 1935 vorgeschlagenen Hypothese einer hereditären Erkrankung dauerte es 60 Jahre bis Feder *et al.* 1996 diese auf eine vererbte pathogene Variante von HFE (C282Y) zurückführen konnten. Später wurde die gestörte Funktion von weiteren Genen wie *HFE2*, *HAMP*, *TFR2* und *SLC40A1* als Ursache von Hereditärer Hämochromatose gefunden (42).

Die HH hat eine geschlechterspezifische Penetranz, die zwischen 1% bei Frauen und bis zu 30% bei Männern variieren kann. Klassische Symptomtrias bildet die Erkrankung der Leber, Diabetes Mellitus (DM) und Hyperpigmentierung der Haut, wobei die Leber als Hauptspeicherorgan am frühesten betroffen ist und von Inflammation über die Fibrose zu einer Leberzirrhose fortschreiten kann. Ferner führen Eisenablagerungen in Herz, Gelenken und Hypophyse zu entsprechenden Krankheitsbildern. Bei Verdacht auf HH (hohe Transferrinsättigung und erhöhtes Serumferritin) sollte im weiteren klinischen Vorgehen ein Gentest für HFE und die seltenen Formen der HH erfolgen. Ist Ferritin $>1000\mu\text{g/L}$ erhöht, sollte durch nichtinvasive Verfahren (z.B. transiente Elastografie) oder Leberpunktion das Leberfibrosestadium bestimmt werden. Bei letzterer kann unter unklarer Genetik eine Eisenquantifizierung durch Bestimmung des Lebereisenindex und damit die Diagnose gesichert werden. Therapeutisch werden Aderlässe durchgeführt, bei Patienten im Frühstadium (ohne Zirrhose oder DM) wird damit eine normale Lebenserwartung erreicht. In besonderen Fällen kann eine medikamentöse Therapie mit Eisenchelatoren in Erwägung gezogen werden (43, 44).

1.1.3.3. Einteilung der Hereditären Hämochromatose

Die HFE-bedingte HH Typ 1 ist eine der häufigsten vererbaren metabolischen Erkrankungen und kommt am häufigsten in kaukasischen Populationen vor. Bis jetzt konnten zwei auslösende Mutationen, C282Y und H36D, identifiziert werden. Die Prävalenz der C282Y Homozygotie in weißen Individuen befinden sich zwischen 1:200 und 1:300, und C282Y Homozygotie macht 80% aller Hämochromatosefälle bei Patienten nordeuropäischer Abstammung aus. Die Veränderung des HFE-Proteins beeinflusst dessen Interaktion mit TFR1. Pathophysiologisch zeigt sich eine erhöhte intestinale Eisen-Absorption und verstärkte basolaterale Eisensekretion aus Enterozyten ins Plasma. Des Weiteren haben Patienten mit HFE-bedingter HH trotz Eisenüberladung eine reduzierte Hemojuvelin-Expression, die genaue Ursache dafür ist noch immer unklar (42, 45, 46).

Die schwerer und schneller verlaufende juvenile Hämochromatose (HH Typ 2) wird in der Regel schon ab dem 2. Lebensjahrzehnt symptomatisch. Schlimme kardiale

Dysfunktion, Leberzirrhose, endokrine Störung, Diabetes und Arthropathie sind dabei deutlich häufiger als bei den anderen HH Typen. In Subtyp A der juvenilen Hämochromatose ist *HFE2* mutiert, bei dem Subtyp B das *HAMP*-Gen. Wie bei der HFE-bedingten HH kommt es durch gesteigerte diätetische Eisenabsorption zur Eisenüberladung. Die Hepcidin-Expression ist reprimiert und kann teilweise unter den nachweisbaren Spiegel sinken (47, 48).

Eine autosomal rezessive Mutation in *TFR2* führt zur HH Typ 3, welche als „intermediäre“ Erkrankung zwischen juveniler und Typ 1 HH bezeichnet werden kann. Die Ausprägung der Erkrankung erfolgt im jungen Erwachsenenalter (> 30. Lebensjahr) und gleicht in ihrer Symptomatik und ihrem Verlauf der HH Typ 1 (48).

Zuletzt resultieren Mutationen in Ferroportin in der autosomal dominant vererbten HH Typ 4. Ferroportin Mutationen führen in der Regel zu keinen schweren pathologischen Symptomen. In einigen Fällen führen erhöhte Plasma-Eisenspiegel zu einer Akkumulation im Leberparenchym, in den meisten Fällen kommt es jedoch zu einer Akkumulation im RES und Plasmaspiegel bleiben niedrig. Bis jetzt wurden mehrere Ferroportin-Mutationen identifiziert, die entweder die Transportfunktion (Typ 4A) oder die Hepcidin-Bindungsfähigkeit (Typ 4B) beeinträchtigen. HH Typ 4 ist die häufigste nicht-HFE bedingte Form der primären Eisenüberladung (49). In **Tabelle 1** sind die Charakteristika der verschiedenen Typen der HH zusammengefasst.

HH Typ	mutiertes Gen	Vererbung	Hepcidin	Ferritin	Transferrin-Sättigung	Phänotyp
1	<i>HFE</i>	autosomal rezessiv	Niedrig	↑	hoch	Parenchymale Leberüberladung,
2A	<i>HFE2</i>	autosomal rezessiv	sehr niedrig	↑	hoch	schwere parenchymale Leberüberladung, kardiale Dysfunktion, Leberzirrhose, endokrine Störung, Diabetes, Arthropathie
2B	<i>HAMP</i> (Hepcidin)	autosomal rezessiv	sehr niedrig bis abwesend	↑	hoch	

3	<i>TFR2</i>	autosomal rezessiv	niedrig	↑	hoch	Parenchymale Leberüberladung
4A	<i>SLC40A1</i> (Transportfunktion)	autosomal dominant	niedrig bis normal	↑	niedrig bis normal	Überladung von Leberparenchym und RES
4B	<i>SLC40A1</i> (Hepcidin-Resistenz)	autosomal dominant	hoch	↑	hoch	Parenchymale Leberüberladung

Tabelle 1: Verschiedene Typen der HH, modifiziert nach (49, 50)

1.2. Fractalkin

1.2.1. Chemokine

Chemokine bilden eine große Familie von kleinen, in der Regel 7-15kDa schweren, Zytokinen. Zusammen mit ihren Rezeptoren vermitteln sie u.a. Aufenthalt und Migration aller Immunzellen. Strukturell sind die Chemokine durch Sequenzhomologie und ein gemeinsames, konserviertes Cysteine umfassendes Motiv charakterisiert. Die strukturelle Einteilung erfolgt nach der Anzahl an Aminosäuren, welche sich zwischen den ersten zwei N-terminal auftretenden Cysteinen befinden, und umfasst folgende vier Gruppen: C-, CC-, CXC- und CX3C-. Die meisten Chemokine sind „inflammatorisch“; ihre Produktion erfolgt nur im Rahmen einer Inflammation oder Infektion und wird durch Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen induziert. Sie werden funktionell von den sogenannten „homöostatischen“ Chemokinen unterschieden, welche Rollen in der Kontrolle von Zellmigration während Gewebeentwicklung und -erhaltung spielen (51, 52).

1.2.2. CX3CL1

CX3CL1, auch Fractalkin genannt, ist das einzige bis jetzt bekannte Mitglied der CX3C-Familie. Ferner ist es der einzige zu diesem Zeitpunkt bekannte Ligand des Rezeptors CX3CR1. Fractalkin offenbart sich, sowohl in Struktur als auch in Funktion, als besonderes, von anderen Chemokinen klar zu unterscheidendes Chemokin.

1.2.2.1. Struktur und Funktion

Das CX3CL1-Protein besteht, im Gegensatz zu den sonst nur selten über 100 Aminosäure langen Chemokinen, aus 373 Aminosäuren. Bei der membranständigen Form von CX3CL1 handelt es sich um ein transmembranäres Glykoprotein, welches aus vier Regionen besteht: eine kurze intrazelluläre Domäne, ein transmembranäres Segment, ein Muzin-ähnlicher Bereich und schließlich die N-terminale, CX3C-Motiv enthaltende Chemokin-Domäne. Diese membran-verankerte Form besitzt die für ein Chemokin erstaunliche Fähigkeit, die Adhäsion von CX3CR1⁺-Zellen unabhängig der klassischen Wege wie Integrine oder Selektine auszulösen. Interessanterweise kommt

CX3CL1, wie es auch bei CXCL16 der Fall ist, neben seiner membranären auch in löslicher Form vor. Die lösliche, chemotaktisch wirkende und ca. 95kDa schwere Form ergibt sich durch enzymatische Abspaltung von dem membranären Protein durch Metalloproteasen wie ADAM10 und ADAM17 (53-55).

1.2.2.2. CX3CL1-Expression

CX3CL1 wird in zahlreichen Organen wie Gehirn, endokrinen Organen (Schilddrüse, Nebenschilddrüsen, Nebennieren), Knochenmark, sekundär lymphatischen Organen, Skelett- und glatter Muskulatur, Herz, Leber, Gallenblase, GIT, Niere, Ovar, Brustdrüse, Hoden, Prostata und Haut exprimiert. Die CX3CL1 Expression in den verschiedenen Geweben kann konstitutiv oder induzierbar sein. Dabei wurde die stark induzierbare Expression bis jetzt hauptsächlich in glatten Muskelzellen und Endothelzellen nachgewiesen, eine konstitutive Expression findet sich v.a. in Monozyten und natürlichen Killerzellen (56, 57).

Die Regulation der Expression erfolgt auf verschiedenen Ebenen: Neben einer transkriptionalen und translationalen Regulation besteht die Möglichkeit einer Regulation der enzymatischen Abspaltung und so Freisetzung der löslichen Form. Beide, CX3CL1-Expression und Abspaltung, werden durch proinflammatorische Stimuli wie LPS, IFN γ , TNF α und IL-1 β induziert. Weiterhin führt eine Stimulation der Metalloproteasen-Produktion zu einer verstärkten CX3CL1 Abspaltung. Zuletzt wird die Expression des membranständigen CX3CL1-Anteils durch Endozytose reguliert. Das internalisierte CX3CL1 kann so gespeichert und im Rahmen einer Inflammation schnell auf der Membran präsentiert werden, ohne dass die akute Reaktion durch Neusynthese zeitlich verzögert wird (58-60).

1.2.3. CX3CR1

1998 konnten Combadiere *et al.* dem bis dahin „Waise“ gebliebenen Chemokin β *receptor-like 1* (CMK-BRL1) eine spezifische Fractalkin-Bindung nachweisen, was zur Umbenennung zu CX3CR1 führte (61). Klassisch für die Chemokin-Rezeptoren handelt es sich auch bei CX3CR1 um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor. Beim Menschen

kommen fünf Varianten von CX3CR1 vor, welche sich in ihren transmembranären Regionen unterscheiden. Dieser genetische Polymorphismus wurde mit Veränderungen der CX3CL1/CX3CR1-Funktion (v.a. Adhäsion) in Verbindung gesetzt und verschiedene Varianten haben protektive oder negative Auswirkungen auf verschiedene Erkrankungen. Populations-Studien haben z.B. eine statistische Assoziation der CX3CR1-M280 Variante mit einer verringerten Prävalenz von Atherosklerose, koronarer Endothel-Dysfunktion und akutem Koronar-Syndrom gezeigt (62).

1.2.3.1. CX3CR1-Expression

Beim Menschen wird CX3CR1 hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen, v.a. Leukozyten exprimiert. Dazu gehören Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, NK-Zellen, einige Lymphozyten-Unterpopulationen (z.B. zytotoxische T-Zellen), neutrophile Granulozyten und Blutplättchen. CX3CR1 wird aber auch von nicht blutbildenden Zellen wie glatten Muskelzellen und Endothelzellen exprimiert (63, 64).

1.2.4. Funktionen der CX3CL1/CX3CR1-Achse

Allgemein wirkt das lösliche CX3CL1 chemotaktisch auf CX3CR1⁺-Zellen und ermöglicht deren Rekrutierung an den Ort der CX3CL1-Produktion. Des Weiteren leitet CX3CL1 eine Adhäsion und damit die Transmigration von CX3CR1⁺-Zellen durch das Endothel in das Zielgewebe ein. Dabei kann die Adhäsion wegen der Besonderheit dieses Chemokins über zwei Wege erfolgen: Zuerst kann lösliches CX3CL1, wie es auch bei fast allen anderen Chemokinen der Fall ist, durch Rezeptorbindung eine Aktivierung des Integrin-Systems und damit eine Adhäsion an Zellen, welche entsprechende Rezeptoren (ICAM, VCAM) besitzen, auslösen. Die zweite, CX3CL1-spezifische Adhäsion, entsteht durch die membranäre, als direktes Adhäsionsmolekül wirkende Form von CX3CL1 (65, 66). Zuletzt wurde Fractalkin in mehreren verschiedenen Krankheitsmodellen eine antiapoptotische Wirkung zugeschrieben, was zu einer Progression der Erkrankung (z.B. bei Atherosklerose) führte oder protektive Effekte (z.B. bei Inflammation der Leber) hatte (67).

Die CX3CL1/CX3CR1-Achse besitzt vielseitige (patho)-physiologische Funktionen. Im Knochenumsatz wird CX3CL1 von den Osteoblasten exprimiert, was eine Rekrutierung von CX3CR1⁺-Osteoklasten-Vorläufern induziert und eine wichtige Rolle in der nachfolgenden Differenzierung zu Osteoklasten spielt (68). Im zentralen Nervensystem wird CX3CL1 und CX3CR1 in Neuronen, Mikroglia und Astrozyten exprimiert. Der CX3CL1/CX3CR1 Signalweg führt dabei zu einer Abschwächung der mikroglialen Aktivität und schränkt die Neurotoxizität im inflammatorischen Zustand ein. In diesem Kontext wird die Neuron-Mikroglia-Kommunikation in neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson untersucht (69). In einem Mausmodell von Alzheimer konnte z.B. die Defizienz von CX3CR1 in Mikroglia einen Neuronenverlust verhindern (70). Des Weiteren wurde CX3CR1 als Humanes Immundefizienz-Virus (HIV)-Korezeptor identifiziert, ist aber für die Zellinfektion nicht unerlässlich. Neben der Korezeptor-Funktion konnte der CX3CL1/CX3CR1-Achse aber eine Beteiligung an dem Verlauf der viralen HIV-Infektion nachgewiesen werden (71, 72).

1.2.4.1. Inflammation

Unter inflammatorischen Bedingungen führt die induzierte CX3CL1-Expression des vaskulären Endothels zu einer Rekrutierung von spezifischen CX3CR1⁺-Leukozyten-Unterpopulationen. Die membranäre Fractalkin-Form ermöglicht anschließend die Adhäsion und Diapedese durch die endotheliale Barriere in das Zielgewebe (73). Neben der Adhäsion kann die Interaktion des membranären Endothel-CX3CL1 mit seinem Rezeptor zu einem aktivierenden Signal in der CX3CR1⁺-Zelle führen. CX3CL1-Bindung führt so in zytotoxischen Zellen wie die NK-Zellen zur Degranulation mit anschließenden zytotoxischen Schäden am Endothel sowie zu einer IFN γ -Produktion. Dies induziert wiederum eine verstärkte Chemokin-Sekretion und CX3CL1-Produktion in den Endothelzellen. Diese parakrine *Feedback*-Schleife ermöglicht es, die Inflammation und Immunantwort aufrechtzuerhalten (74).

In zahlreichen Pathologien konnte eine Beteiligung der CX3CL1/CX3CR1-Achse am inflammatorischen Prozess gezeigt werden. Bei Morbus Crohn-Patienten wurde eine erhöhte CX3CL1-Expression in entzündeten Läsionen im Vergleich zu nicht-

entzündetem mukosalem Kolongewebe gefunden (75). Untersuchungen der rheumatoiden Arthritis zeigten eine Hochregulation der Matrix-Metalloproteinase-2 in durch Fractalkin stimulierten synovialen Fibroblasten (76). In rezenten Arbeiten war Fractalkin und CX3CR1 in allergischen Erkrankungen erhöht. Bei allergischem Asthma kontrolliert CX3CR1 das Überleben von TH1- und TH2-Zellen in der entzündeten Lunge, bei der atopischen Dermatitis führt CX3CR1 zur Retention der TH1- und TH2-Zellen am Ort der Inflammation (77). Schließlich konnte auch bei Leberschäden eine verstärkte Expression von Fractalkin und seinem Rezeptor beobachtet werden (78).

1.2.4.2. Tumor

Der Fractalkin-Achse wird abhängig von der Art des Tumors und aufgrund ihrer verschiedenen Funktionen eine pro- oder anti-tumorale Wirkung zugeschrieben.

Prostata-, Mamma- und Pankreas-Karzinome (CA) zeigen eine Überexpression von CX3CR1. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Fractalkin-Achse in diesen Karzinomen die Krebszellen metastatisch in Richtung Knochen und Gehirn dirigieren. Der im Knochen u.a. durch Osteoblasten und im ZNS durch Neuronen freigesetzte CX3CL1-Gradient führt dabei zu einer Attraktion von CX3CR1⁺-Tumorzellen und die Adhäsions-Komponente fördert eine erfolgreiche Transmigration und Einnistung in dem sekundären Krankheitsherd. Im Mausmodell des Mamma-CA führte die Beimpfung von CX3CL1^{-/-} Tieren mit Tumorzellen zu einer stark reduzierten skelettalen Dissemination verglichen mit den Wildtypen. CX3CR1, CX3CL1 und Metalloproteasen sind demnach potentielle Angriffspunkte zur Hemmung der Dissemination von CX3CR1⁺-Tumoren. Auf der anderen Seite sind hohe CX3CL1-Spiegel in Mamma-, kolorektalem und hepatozellulärem-CA Biomarker für eine gute Prognose. Diese anti-tumoralen Effekte lassen sich durch die verstärkte Attraktion von Immunzellen, v.a. zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen, erklären (79, 80).

1.2.4.3. Atherosklerose

Im Verlauf der Atherosklerose sind komplexe Chemokin-Mechanismen an den verschiedenen Stadien der Erkrankung beteiligt. Zahlreiche Studien zeigen die

Mitwirkung von Fractalkin als wichtigen Mediator in allen Schritten der Atherogenese. Die wichtigsten beteiligten Zellen sind dabei vaskuläre Endothelzelle, Monozyt, T-Zelle, glatte Muskelzelle und Thrombozyt (**Abb. 3**).

Babendreyer *et al.* zeigten, dass statisch kultivierte Endothelzellen unter niedriger Scherbelastung eine stark induzierbare CX3CL1-Expression aufzeigen. Dagegen war die CX3CL1-Induktion in Zellen unter hohen Scherkonditionen stark reduziert. Im frühen Stadium der vaskulären Inflammation verstärkt also eine niedrige Scherbelastung, welche typischerweise in für Atherosklerose-prädisponierenden Orten durch Rückfluss und Turbulenzen vorkommt, die endotheliale CX3CL1-Expression und damit die Rekrutierung von Monozyten (81). Interessanterweise zeigte Fractalkin im Flusskammerversuch eine maximale Leukozytenadhäsion bei 2 dynes/cm² und minimale bei arteriellen 10 dynes/cm². Allerdings verdoppelte die Koimmobilisation von CX3CL1 und VCAM-1, verglichen mit VCAM-1 alleine, die Anzahl der adhärenen Zellen bei 10 dynes/cm² (82). Ferner wurde die Rolle von den CX3CR1-exprimierenden Plättchen in der Fractalkin-assoziierten Monozyten-Adhäsion am Endothel untersucht. CX3CL1-induzierte Plättchenaktivierung führte zur Degranulation und P-Selektin-Expression auf der Plättchen-Oberfläche, was eine lokale Akkumulation von Leukozyten unter arteriellen Scherkonditionen verstärkt ermöglicht und deshalb einen essentiellen Schritt in der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen darstellt (83). Ferner ist die Fractalkin-Achse an der Progression der atherosklerotischen Plaques beteiligt. In diesem Kontext wurde eine CX3CR1-Expression in glatten Muskelzellen in der Neointima von atherosklerotischen Plaques nachgewiesen. Zusätzlich wanderten *in vitro* kultivierte primäre, koronare glatte Muskelzellen Richtung CX3CL1 (84). Schließlich hat Fractalkin einen zytotoxischen Effekt auf das Endothel und wirkt jedoch antiapoptotisch und proliferativ auf vaskuläre Zellen, was Plaque-Komponenten verändert und die Stabilität der Plaques beeinflusst (85).

Die CX3CL1/CX3CR1-Achse in der Atherogenese wurde auch *in vivo* untersucht. CX3CR1/Apolipoprotein E doppelt defiziente Mäuse zeigten eine reduzierte Bildung von atherosklerotischen Läsionen (86). Des Weiteren wurde Fractalkin in mehreren

klinischen Studien als potentieller diagnostischer oder prognostischer Biomarker in kardiovaskulären Erkrankungen untersucht; jedoch handelt es sich dabei größtenteils um kleinere, monozentrische Studien, großangelegte Studien fehlen (87).

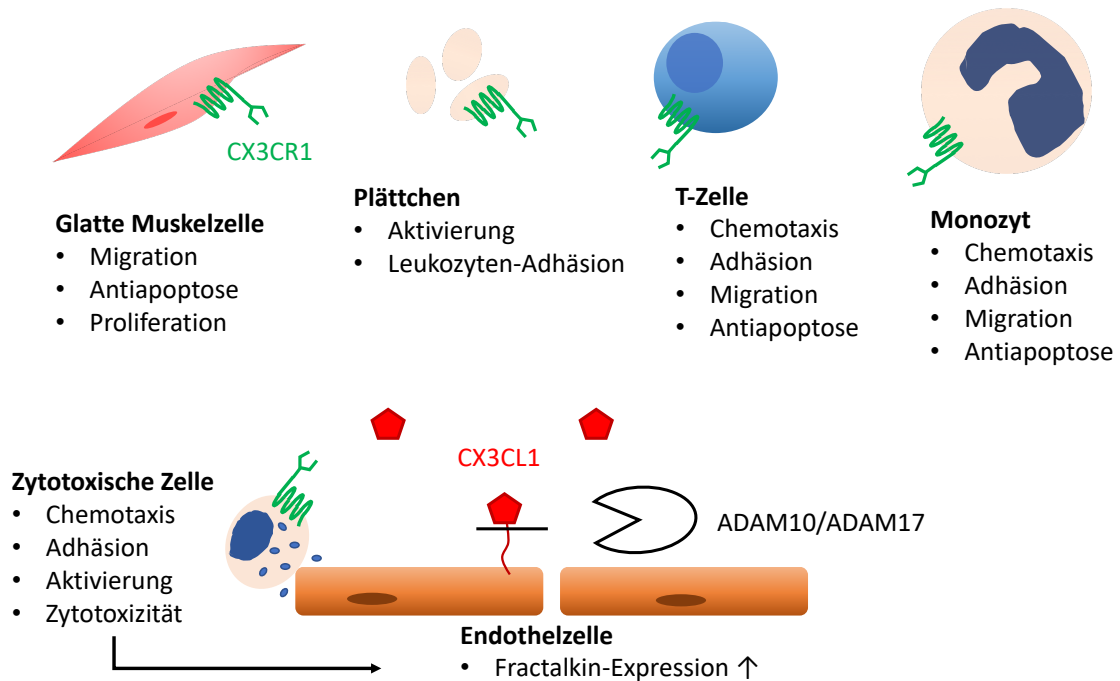


Abbildung 3: CX3CL1/CX3CR1-Achse in den an der Atherogenese beteiligten Zellen

Membranständiges, endotheliales CX3CL1 wird von Metalloproteasen wie ADAM10/ADAM17 abgespalten. Das entstandene lösliche CX3CL1 wirkt chemotaktisch auf CX3CR1⁺-Zellen und löst die für die einzelnen Zelltypen aufgeführten Funktionen aus. Zytotoxische Zellen-vermittelte Schädigung des Endothels führt dabei wiederum zu erhöhter Fractalkin-Expression.

Modifiziert nach: (87)

2. Ziel dieser Arbeit

Gene mit konservierter, Spezies-übergreifender IRE-Sequenz in ihrer mRNA haben physiologisch sehr wichtige, teilweise für das Überleben unentbehrliche, Funktionen. Dieser Arbeit vorausgehend wurde von der AG Dandekar (Lehrstuhl für Bioinformatik, Universität Würzburg) in Kooperation mit der AG Nieswandt (Lehrstuhl für Experimentelle Biomedizin I, Universitätsklinikum Würzburg) durch bioinformatische Analysen ein bei Mensch, Schimpanse, Orang-Utan, Ratte und Maus konserviertes, putatives IRE im Gen von Fractalkin gefunden (unpublizierte Daten). Ferner wurde in einigen Arbeiten eine veränderte CX3CL1-Expression unter hypoxischen Bedingungen beschrieben (88-90). Die Bedeutung veränderter Eisenkonzentrationen für die Fractalkin-Expression, potentiell reguliert durch das putative IRE, wurde dagegen noch nicht untersucht und ist Gegenstand dieser Arbeit.

Ferner deutet die Arbeit von Wandzik *et al.* (91) im Zellkultur-Modell der K562-Zelllinie auf eine wichtige Rolle von Eisen in der Megakaryopoese hin, allerdings wurden primäre Megakaryozyten und einige Eisenhaushaltgene in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht. Da Eisenmangel eine reaktive Thrombozytose, in gravierenden Fällen aber auch eine Thrombozytopenie hervorrufen kann (92), allgemein der Eisenhaushalt und beteiligte Eisenhaushaltgene im Kontext der Megakaryopoese aber sehr schlecht untersucht sind, sollen in dieser Arbeit in den genutzten Modellen die Expression von Eisenhaushaltgenen in der Megakaryopoese sowie der Einfluss von Eisen auf die megakaryopoetische Differenzierung untersucht werden.

Schließlich soll die pathophysiologische Rolle der CX3CL1/CX3CR1-Achse in Inflammation in Hinsicht der Beteiligung von Blutplättchen analysiert werden. Obwohl die Rolle von CX3CR1 in Plättchen bereits im Kontext von kardiovaskulären Erkrankungen untersucht wurde, wurde bis zu diesem Zeitpunkt die Mitwirkung der Plättchen-Fractalkin-Achse in allgemein inflammatorischen Erkrankungen nur selten postuliert und ist schlecht erforscht. In dieser Arbeit wird untersucht, ob Plättchen neben einer schon beschriebenen geringen konstitutiven CX3CL1-Expression, welcher

keine große Funktion zugeordnet wird, auch eine induzierbare Expression aufweisen und diese eine verstärkende parakrine/autokrine Wirkung auf den inflammatorischen Prozess in Zuständen akuter und/oder chronischer Entzündung haben könnte.

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Materialien

3.1.1. Zelllinien

Zellen	Morphologie/Kultureigenschaften	Organismus
MS1	Endothelzellen, adhären	<i>Mus musculus</i>
K562	Lymphoblasten, in Suspension	<i>Homo sapiens sapiens</i>

3.1.2. Primäre Zellen und Versuchstiere

Die benutzten primären Megakaryozyten wurden aus Knochenmark von Mäusen gewonnen und zur Differenzierung entsprechend kultiviert.

Die HUVECs samt Kulturmedium wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Marc Schmidt der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Würzburg zur Verfügung gestellt.

Versuch	Beschreibung der benutzten Mäuse	Anzahl und Geschlecht	Alter bei Ernte
MK-Differenzierungs-Zeitreihe	C57BL/6J	10, weiblich	15 Wochen
Einfluss von FeCl ₃ /DFX an den letzten Tagen der MK-Differenzierung	C57BL/6JRj (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle)	10, männlich	12 Wochen
Zytokin-Stimulation und FeCl ₃ /DFX-Behandlung reifer MKs	C57BL/6JRj (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle)	15, weiblich	10 Wochen
Untersuchung von Lebergewebe	-B6.129S6- <i>Hfe</i> ^{tm2Nca} /J (Artikel-Nr. 017784, Jackson Laboratory, Bar Harbor) und Wildtyp -129S- <i>Hfe</i> ^{tm1Nca} /J (Artikel-Nr. 017788, Jackson Laboratory, Bar Harbor) und Wildtyp	2 Wildtyp, 5 <i>Knock-Out</i> , männlich 6 Wildtyp, 4 <i>Knock-Out</i> , männlich	4 Monate 3 Monate

3.1.3. Medien und Zellkulturreagenzien

- Gibco® DMEM (1X) + GlutaMAX™-I (Life Technologies, Carlsbad)
 - + 4,5g/L D-Glucose
 - + Pyruvat
- Gibco® DMEM (1X) (Life Technologies, Carlsbad)
 - + 4,5g/L D-Glucose
 - - L-Glutamine
 - – Pyruvat
- Gibco® RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMAX™-I (Life Technologies, Carlsbad)
- StemPro®-34 SFM (1X) (Life Technologies, Carlsbad)
- Fetal Bovine Serum: FBS Superior (Biochrom GmbH, Berlin)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)
- Trypsin-EDTA Lösung (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)
- L-Glutamin Lösung (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)
- Penicillin-Streptomycin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)
- Trypan Blue Stain (NanoEnTek, Seoul)
- EDTA (AppliChem, Darmstadt)

3.1.4. Lösungen, Puffer, Reagenzien

- Bond-Breaker™ TCEP Lösung (Thermo Fisher Scientific, Waltham)
- TCEP HCl Lösung (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)
- recombinante DNase (Machery Nagel, Düren)
- FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche, Mannheim)
- SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems, Foster)
- Biotinylated Protein Ladder (Cell Signaling Technology, Danvers)
- PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham)

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien zur Herstellung der folgenden Puffer von Sigma Aldrich (St. Louis, MO), AppliChem (Darmstadt) oder Carl Roth (Karlsruhe) bezogen.

- FACS-Puffer
 - 1 Flasche DPBS
 - 25mL FBS
 - 0,1% Na-Azid
- Zell-Lysis -Puffer
 - 10mL Triton X 100 Lysis-Puffer
 - 20mM Tris-HCl (pH 7,5)
 - 150mM NaCl
 - 10mM NaF
 - 1mM EDTA
 - 1% Triton X 100
 - pro 10 ml: 1 Tablette cOmplete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, Mannheim)
 - pro 10 ml: 1 Tablette PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, Mannheim)
- Laemmli-Puffer (2X)
 - 0,125M Tris (pH 6,8)
 - 4% SDS
 - 20% Glycerin
 - 10% β -Mercaptoethanol
 - 0,004% Bromphenolblau
- Bis-Tris HCl Gel Puffer (pH 6,8)
 - 1,25M Bis-Tris HCl
- MOPS-SDS Laufpuffer
 - 250mM Tris
 - 250mM MOPS
 - 5mM EDTA
 - 0,5% SDS
 - 5mM Natrium Bisulfite (frisch vor dem Lauf hinzugeben)

- Anode-Puffer I (pH 10,4)
 - 300mM Tris
 - 20% Methanol
- Anode-Puffer II (pH 10,4)
 - 25mM Tris
 - 20% Methanol
- Kathoden-Puffer
 - 40mM 6-Aminocapron-Säure
 - 20% Methanol
- TBS-Tween Puffer 10X (pH 7,6)
 - 1,37M NaCl
 - 200mM Tris
 - 1% Tween
- Stripping-Puffer (pH 6,7)
 - 62,5mM Tris
 - 2% SDS

3.1.5. Verwendete Software und Geräte

- Nanodrop 2000 + Nanodrop 2000/2000c v1.4.2-Software (Thermo Fisher Scientific, Waltham)
- peqSTAR Thermocycler (Peqlab Biotechnologie, Erlangen)
- ViiA™7 Real-Time PCR System + ViiA™7 v1.2.1-Software (Applied Biosystems, Foster)
- ChemiDoc™MP Imaging System + Image Lab v5.2.1 (Bio-Rad, Hercules)
- FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes) + Cellquest
- EVE™ Automatic cell counter (NanoEnTek, Seoul)
- Homogeniser VDI12 (VWR International, Radnor)
- PerlPrimer v1.1.21
- Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Foster)
- Microsoft Office 2010 Paket
- Graphpad Prism v6

3.1.6. Kits

- NucleoSpin[®] RNA-isolation Kit (Macherey-Nagel, Düren)
- High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster)

3.1.7. Stimulantien

- Animal-Free[™] Recombinant Mouse SCF (R&D Systems, Minneapolis)
- Thrombopoetin, von Prof. Harald Schulze (Lehrstuhl für Experimentelle Biomedizin I, Universitätsklinikum Würzburg) zur Verfügung gestellt
- Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) (Merck KGaA, Darmstadt)
- Eisen (III)-chlorid Hexahydrat granuliert (Carl Roth, Karlsruhe)
- Deferoxamine Mesylate (DFX), Produkt-Nummer D9533 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)
- Recombinantes murines IFN γ (PeproTech, Rocky Hill)
- Recombinantes murines IL-1 β (PeproTech, Rocky Hill)
- Recombinantes murines TNF α (PeproTech, Rocky Hill)
- Recombinantes humanes IFN γ (PeproTech, Rocky Hill)
- Recombinantes humanes TNF α (Knoll AG)
- Recombinantes humanes IL-1 β (PeproTech, Rocky Hill)
- Recombinantes humanes IL-4 (PeproTech, Rocky Hill)

3.1.8. Antikörper

Primär-Antikörper

Antikörper	Klonalität	Wirts-Spezies	Anbieter	Benutzte Menge (FACS)/Verdünnung (WB)	Verwendung und Kopplung (FACS)
α-Cx3cl1	Monoklonal (IgG2A)	Ratte	R&D Systems	5 μ L/10 ⁶ Zellen	FACS, Alexa Fluor 488
Isotyp-Kontrolle	Monoklonal (IgG2A)	Ratte	R&D Systems	5 μ L/10 ⁶ Zellen	FACS, Alexa Fluor 488

α-CD41a	Monoklonal (IgG1)	Maus	Becton Dickinson	10μL/10 ⁶ Zellen	FACS, Phycoerythrin (PE)
Isotyp-Kontrolle	Monoklonal (IgG1)	Maus	Santa Cruz	10μL/10 ⁶ Zellen	FACS, Phycoerythrin (PE)
α-Cx3cl1	Polyklonal	Kaninchen	Thermo Fisher Scientific	1:1000	WB
α-Tubulin	Monoklonal (IgG1)	Maus	Sigma Aldrich	1:2000	WB
α-pY701-STAT1	Monoklonal (IgG)	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1:1000	WB
α-pS727-STAT1	Monoklonal (IgG)	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1:1000	WB
α-STAT1	Polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1:1000	WB
α-Phospho-p38 (Thr180, Tyr182)	Polyklonal	Kaninchen	Thermo Fisher Scientific	1:1000	WB
α-p38	Monoklonal (IgG)	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1:1000	WB
α-IκBα	Polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1:1000	WB

Sekundär-Antikörper

Antikörper	Klonalität	Wirts-Spezies	Anbieter	Verdünnung für Western-Blot	Gekoppelt
α-Kaninchen	Monoklonal (IgG)	Ziege	Cell Signaling Technology	1:4000	Horseradish Peroxidase (HRP)
α-Maus	Monoklonal (IgG)	Pferd	Cell Signaling Technology	1:4000	Horseradish Peroxidase (HRP)
α-Biotin		Ziege	Cell Signaling Technology	1:4000	Horseradish Peroxidase (HRP)

3.1.9. Primer

Murine Primer

Gen	Sequenz <i>forward</i>	Sequenz <i>reverse</i>
mCcl2	CATCCACGTGTTGGCTCA	GATCATCTTGCTGGTGAATGAGT
mCrp	GGAGTCTGCTACGGGGATTG	CCTTGTGCAGACTTTTCCGC
mCx3cl1	CCGCGTTCTTCCATTTGTGT	AAGCCACTGGGATTCGTGAG
mCx3cr1	AGAAGTCCCTTCCCATCTGCT	GCCACAATGTCGCCAAA
mSele	CAAATCCCAGTCTGCAAAGCT	GACATTTTCATGTTGCCCTGCT
mGp1ba	CTCTGTTCTCCAAAGGACTGTCT	TCACAGTTTACTTCCAGCAGGC
mHamp	CCAGTGTGGTATCTGTTGCAAAC	AATCGTCTTTATTTCAAGGTCATTGG
mHfe	CCATGATTATCGGAATCATCAGTG	CACAGTCTGTTAAGACATAGCCACC
mHfe2	CTGGCTGGATAGGTATGG	GGATCTTGCACTGGGAGT
mIcam1	GCCCACGCTACCTCTGCTC	GATGGATACCTGAGCATCACCA
mItga2b	GCCCTTCTTCCATTCGCC	GCTCACACTCCACCACCGTA
mRplp0	GAAACTGCTGCCTCACATCCG	CTGGCACAGTGACCTCACACG
mSlc11a2	AATCCTATTCTAAGAGCACAGACCCT	GCTGTAGGCAGGGTTGATGG
mSaa2	ACTTCCATGCTCGGGGGA	ACTGCGATGTCTGTTG
mSlc40a1	TCCTGTGAACAAGCTCCC	TTGCTGAGGTCAGGTAGT

mTfrC	GCCGAGCTATAAGCTTTGGGT	CTGGCTTGATCCATCATTCTCAG
mTfr2	TGCATCGAGGGCTTTGC	GACCATGGAAGAGAAGGTCCG
mZip14	CCTGGCTATTGGTGCCTCC	CAGCATTGAGCAGGATGACG

Humane Primer

Gen	Sequenz <i>forward</i>	Sequenz <i>reverse</i>
hCX3CL1	CGCGCAATCATCTTGGAGAC	GTGCCGCCATTCGAGTTAG
hCX3CR1	CCTGCAAGAACCACAAGAAAGC	AACACGATGACCACCAGAAGG
hEGR1	GCCCTACGAGCACCTGACC	TGGTTTGGCTGGGGTAACTG
hGP1BA	TGTGACAAGAGGAATCTGACAGC	TTGCCAGGGAGAAGGTGTACA
hGP1BB	CAACACGGGCCTGCAAAC	AGGAGTTCTGTCCCACGTGG
hHFE	GCTGGATAACCTTGGCTGTACC	GCAATTCCACTGATGACTCCAAT
hHFE2	TTCCTCTTTCCTCAGCAACCC	CAAAGCCACAGAACAAAGAGCC
hHPRT	TGGGAGGCCATCACATTGTA	AGCAGGTCAGCAAAGAATTTATAG
hITGA2B	GGAGAATGAGACCAGGGTGGT	GGCTGTTCTTGCTCCGTATCTG
hSLC40A1	CATGGATGGGTTCTCACTTCT	TGCTAGTTTGCTTCTGTCTTCTCC
hTFRC	ACCCATGATGTTGAATTGAACCT	GCCATTTCTTTATGTCTGCTC

3.2. Methoden

3.2.1. *Hfe*- und *Hfe2-knockout* Mäuse

Die *Hfe*- und *Hfe2-knockout* Mäuse wurden von Jackson Laboratory (Bar Harbor) erworben. Dabei wurden in den *Hfe-knockout* Tieren Teile von Exon 3 und das ganze Exon 4, bei den *Hfe2-knockout* Tieren Exon 3 und der kodierende Bereich von Exon 4 durch einen Zielvektor per Cre/loxP-Rekombinations-System ausgewechselt. Die Versuchstiere wurden in Käfigen mit Pappeleinstreu, welches einmal wöchentlich gewechselt wurde, bei konstant 21-24°C gehalten. Eine Beleuchtungsanlage sorgte per Zeitschalter für einen alternierenden Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden.

3.2.2. Zellbiologische Methoden

3.2.2.1. Zellkultur

Die MS1-Endothelzellen wurden in einem Medium bestehend aus DMEM GlutaMAX bzw. DMEM mit selbst hinzugefügtem L-Glutamin (1%) und 10% FBS sowie 1% Penicillin-Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Dabei war zu beobachten, dass die Zellen eine Präferenz zu DMEM GlutaMax zeigten, insbesondere bei länger offenem Medium. Neu aufgetaute Zellen wurden also in DMEM GlutaMax kultiviert um ein gutes Wachstum zu garantieren. Die Zellen wurden in 10cm Kulturschalen (10mL Medium je Schale) passagiert und für Versuche auf 6-*well*-Platten (3mL Medium je *well*) in einer Zelldichte von $1,5-3 \times 10^5$ Zellen/mL ausgesät. Mindestens jeden zweiten Tag wurden die Zellen je nach Zellzahl im Verhältnis 1:3-1:9 gesplittet. Dazu wurde erst das alte Medium abgesaugt, die Zellen vorsichtig mit PBS ab gespült und mit 1 mL Trypsin-EDTA Lösung für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Durch leichtes Klopfen wurden die Zellen gelöst und anschließend in neuem Medium resuspendiert. Die Zellernte erfolgte nach Absaugen des Mediums und PBS-Abspülung durch direkte Zugabe des jeweiligen Lysis-Puffers für die RNA- oder Proteinaufbereitung in die *wells*.

Die K562-Zellen wurden in Flaschen in 20mL RPMI GlutaMAX-Medium mit Zusatz von 10% FBS und 1% Penicillin-Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen mussten nur alle 2-4 Tage im Verhältnis 1:2-1:5 gesplittet werden. Für Versuche

wurden die Zellen auf 12-*well*-Platten ausgesät (1mL Medium je *well*). Dabei wurden die Zellen, die zur Differenzierung angeregt werden sollten, in einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen/mL, die undifferenzierten Kontroll- Zellen in einer Konzentration von $1,5 \times 10^5$ Zellen/mL ausgesät. Die Differenzierung erfolgte durch Stimulation mit 100nM PMA und dauerte 4 Tage. Die Zellernte sowie das Splitten erfolgte durch Abzentrifugieren der Zellen, Absaugen des Überstands und erneutem Waschen in 1mL PBS.

Die HUVEC-Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^5 Zellen pro *well* auf 6-*well*-Platten ausgesät. Die Kultivierung und Zellernte erfolgten analog zu den MS1-Zellen.

Für die Zytokin-Stimulationen wurden bei -20°C gelagerte Zytokin-Aliquots aufgetaut und, wenn nötig, mit PBS zu entsprechenden Konzentrationen vorverdünnt. Die FeCl_3 -Lösung wurde für jeden Versuch frisch mit destilliertem H_2O zu einer Stockkonzentration von 100mM angesetzt. Für die Versuche mit gleichzeitiger Zytokin- und FeCl_3 /DFX-Stimulation wurden die MS1- und K562-Zellen 16h mit FeCl_3 /DFX vorinkubiert und anschließend für weitere 8h das entsprechende inflammatorische Zytokin hinzugefügt. Bei den HUVEC und primären Megakaryozyten erfolgte nur eine 30-minütige Vorinkubation mit FeCl_3 /DFX und bei den HUVECs eine 20-stündige Zytokin-Stimulation.

3.2.2.2. Primäre Megakaryozyten-Versuche

3.2.2.2.1. Gewinnung und Kultivierung von primären Megakaryozyten

Für jeden Versuchsansatz wurden die Femora von jeweils fünf geernteten Mäusen vom Weichteilgewebe freipräpariert. Nach Abtrennung der proximalen und distalen Knochenenden wurde das Knochenmark mit einer 22-27g Kanüle mit 1mL StemPro-34 Medium pro Maus aus dem Knochen ausgespült. Zwecks Homogenisierung der Zellsuspension wurde die Zell-Lösung mit der gleichen Spritze erst fünfmal hoch- und runterpipettiert, dann mit einer neuen, diesmal obligat 22g Kanüle, erneut zehnmal. Die so erhaltene Einzellsuspension wurde durch ein $100\mu\text{m}$ Zellsieb in ein Falcon überführt. Anschließend wurden 2,5mL Zellsuspension zusammen mit je 7,5mL StemPro-34 Medium auf zwei 10cm Kulturschalen gegeben. Nach Stimulation mit $5\mu\text{L}$

SCF pro Kulturschale wurden die Zellen für 2 Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach 2 Tagen wurde ein Mediumwechsel durch Abzentrifugieren bei 200g in 15mL Falcons für 5min durchgeführt. Das Zellpellet wurde in frisches 10mL Medium aufgenommen und diesmal mit 5µL SCF und 50µL TPO für zwei Tage inkubiert. Nach 2 Tagen wurde auf gleiche Weise ein Mediumwechsel durchgeführt, die Zellen in einem Verhältnis von 1:2 aufgeteilt und mit 50µL TPO pro Schale für weitere 2 Tage zur finalen Differenzierung angeregt.

3.2.2.2.2. Aufbau der verschiedenen Versuche

Für die verschiedenen Tage der Differenzierung und/oder anschließende Versuche mit reifen Megakaryozyten wurden die Zellen je nach Versuch unterschiedlich behandelt und kultiviert.

Zur Untersuchung der einzelnen Schritte des Differenzierungsprozesses wurde sofort nach Zellernte und täglich für die ersten 4 Tage des Versuchs 500µL Zellsuspension entnommen. Um vergleichbare Proben für jeden Tag zu erhalten wurden an Tag 5 und 6 von je 2 Platten (Zelldichte zu diesem Zeitpunkt ja um den Faktor 2 verdünnt) 500µL Zellsuspension gepoolt (**Abb. 4a**).

Um den Einfluss von Eisen auf den letzten Tag der Differenzierung zu analysieren wurden die Zellen nach Tag 2 von einer 10cm Kulturschale auf je 3 *wells* von einer 6-*well*-Platte übertragen. Die Aufteilung nach Tag 4 erfolgte dementsprechend auf im Ganzen 6 *wells* einer 6-*well*-Platte. Für den letzten Tag mit TPO-Behandlung wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen FeCl₃/DFX für 24h inkubiert (**Abb. 4b**).

Schließlich wurden im letzten Versuch reife Megakaryozyten nach Tag 6 auf 12-*well*-Platten verteilt. Die Zellen wurden 30 Minuten mit FeCl₃/DFX vorinkubiert und anschließend für 16h mit den jeweiligen Zytokinen stimuliert (**Abb. 4c**).

3.2.2.2.3. Zellernte

Im ersten MK- Versuch wurden in Analogie zu den K562-Zellen alle geernteten Zellen in 1,5mL Eppendorfgefäße abzentrifugiert. Nach Waschen mit PBS stand das Zellpellet

sofort der weiteren Verarbeitung und Untersuchung zur Verfügung. Bei den weiteren zwei Versuchen wurden die reifen Zellen durch einen BSA-Gradienten aufgereinigt. Dazu wurde für jede Probe in einem 15mL Falcon vorsichtig auf 1,5mL 3%-BSA/PBS-Lösung weitere 1,5mL einer 1,5% BSA/PBS-Lösung aufgeschichtet. Die Proben wurden durch Abzentrifugieren und Absaugen von überflüssigem Medium zu 1mL konzentrierter Zellsuspension reduziert und vorsichtig auf den BSA-Gradienten pipettiert. Nach 30 Minuten hatten sich die größeren Megakaryozyten als Zellpellet abgesetzt und konnten von ungewollten und toten Zellen getrennt werden.

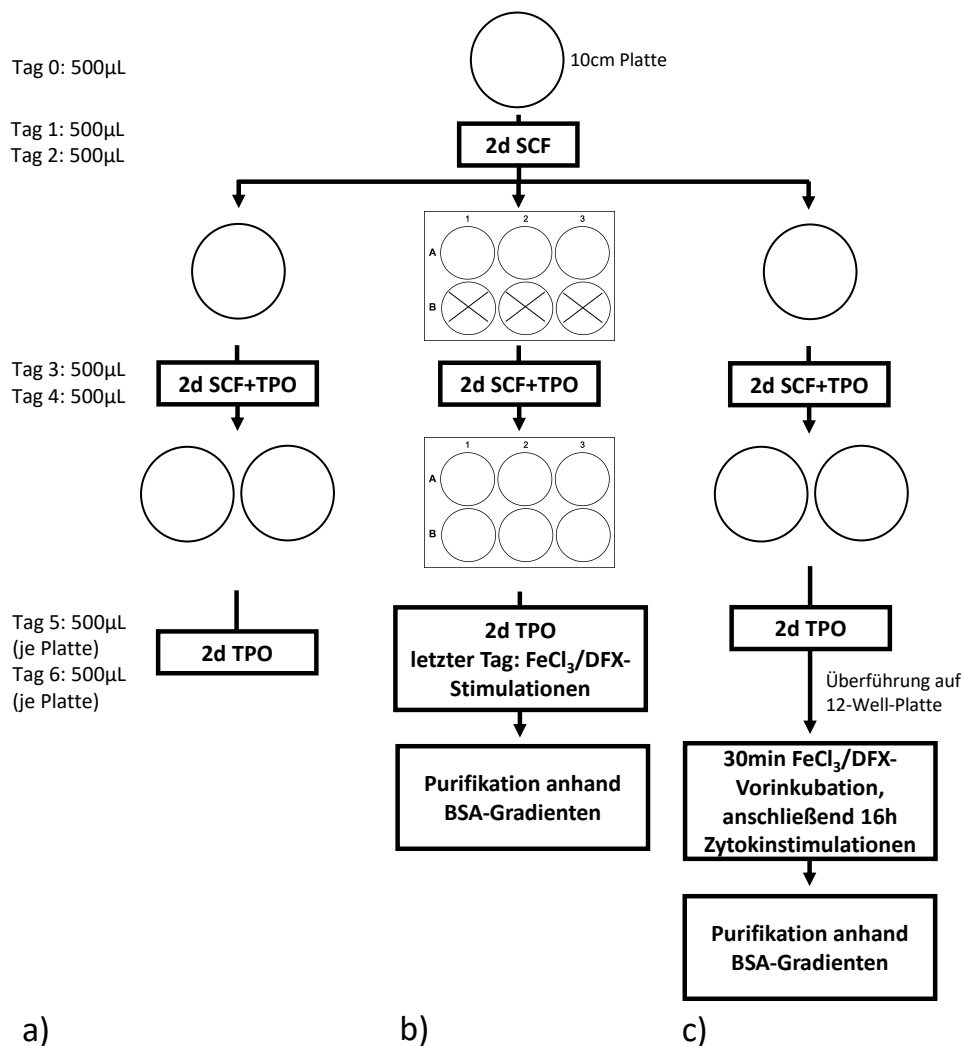


Abbildung 4: Aufbau der verschiedenen Megakaryozytenversuche

3.2.2.3. Zellzählung

Die Bestimmung der Vitalität und Zelldichte erfolgte anhand dem EVE™ *Automatic cell counter* (NanoEnTek, Seoul). Die Zellsuspension wurde durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und anschließend 10µL der Lösung mit 10µL Trypanblau gemischt und auf die Zählramme gegeben. Die Auswertung wurde automatisch vom Gerät durchgeführt. Alle Zellzählungen erfolgten in Duplikaten und die arithmetischen Mittelwerte wurden bestimmt.

3.2.3. Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1. RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde mit dem NucleoSpin® RNA-Isolationskit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben durchgeführt. Je Probe wurden 350µL RA1-Puffer mit 8µL TCEP als Lysis-Puffer auf die sich in 1,5mL Eppendorfgefäßen befindenden Proben gegeben. Um eine ausreichende Bedeckung zu erreichen wurde für MS1- und HUVEC-Versuche die doppelte Menge Lysis-Puffer auf die 6-*well*-Platten gegeben. Für die Aufbereitung des murinen Lebergewebes wurden 20mg Proben in flüssigem Stickstoff zugeschnitten, in 2mL Eppendorfgefäßen in Lysis-Puffer gegeben und mit dem Homogenisierer VDI12 (VWR International, Radnor) zerkleinert. Zwischen verschiedenen Proben wurde der Homogenisierer mit Isopropanol und destilliertem H₂O gespült. Die RNA-Extraktion wurde anschließend nach dem Protokoll durchgeführt.

3.2.3.2. RNA-Konzentrationsmessung

Nach jeder RNA-Isolation wurde die gewonnene RNA-Konzentration mittels Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham) gemessen. Vor der Bestimmung der Proben selbst wurde eine Kontroll-Messung mit destilliertem H₂O zur Überprüfung der „Blank“-Funktion durchgeführt. Die Messungen erfolgten in Duplikaten.

3.2.3.3. Reverse Transkription

Die Reverse Transkription wurde mit dem *High Capacity cDNA Reverse Transcription* Kit (Applied Biosystems, Foster) durchgeführt. Je Probe wurde, wenn möglich, 1000ng RNA in 10,5µL wässriger Lösung umgeschrieben, ansonsten wurde entsprechend der Probe mit der niedrigsten RNA-Konzentration weniger (200-650ng) für den gesamten Versuch umgeschrieben. Der benutzte Mastermix setzte sich je Probe wie folgt zusammen:

2µL 10 x RT-Puffer
0,8 µL 100mM dNTPs
2µL 10 x Random Primer
0,5µL MultiScribe Reverse Transkriptase
4,2µL H ₂ O

Die Umschreibung im peqSTAR Thermocycler (Peqlab Biotechnologie, Erlangen) erfolgte mit den im Handbuch des Kits angegebenen Einstellungen. Die cDNA wurde 1:3 mit RNase freiem H₂O verdünnt und gleich weiterbenutzt oder bei -20°C gelagert.

3.2.3.4. Primer Design

Die eingesetzten Primer waren entweder schon im Labor vorhanden oder wurden selbst neu designet. Dabei wurden die entsprechenden Nukleinsäure-Sequenzen (<http://www.ensembl.org/index.html>) in die PerlPrimer Software eingegeben (93) und nach passenden Primervorschlägen gesucht. Diese wurden dann nochmal auf Schmelztemperatur in der Primer Express™ Software (Applied Biosystems) überprüft. Gefundene Primer wurden anschließend auf ihre Selektivität getestet (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

3.2.3.5. Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR wurde zur Bestimmung von cDNA-Gehalt der Proben benutzt. Die Analyse erfolgte auf 384-well Platten, wobei jedes well mit folgendem Ansatz beladen wurde:

5µL <i>FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)/ SYBR® Select Master Mix</i>
3µL H ₂ O
0,5µL Primer <i>forward</i>
0,5µL Primer <i>reverse</i>
1µL cDNA-Probe

Jede Probe wurde in technischen Duplikaten aufgetragen. Die quantitative Real-Time PCR wurde abhängig vom benutzten Mastermix nach folgenden Programmen durchgeführt:

FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)			SYBR® Select Master Mix		
1x	50°C	2min	1x	50°C	2min
	95°C	10min		95°C	2min
40x	95°C	10s	40x	95°C	1s
	60°C	30s		60°C	30s
1x	95°C	15s	1x	95°C	15s
	60°C	1min		60°C	1min
	95°C	15s		95°C	15s

3.2.3.6. Durchflusszytometrie

Zur Untersuchung der adhärenen MS1 Zellen wurden diese durch 10mM EDTA-PBS-Lösung von den Platten gelöst. Durch Auf- und Abpipettieren wurde eine wie bei den K562 vorhandene Einzelzellsuspension erreicht. Vor Durchführung der Zellzählung wurden 3mL Zellsuspension mit 1,5mL FACS-Puffer in FACS-Röhrchen abzentrifugiert (5min, 1250rpm, 4°C). Pro Röhrchen wurden 5×10^5 Zellen aufgeteilt, mit 2mL FACS-Puffer gewaschen und in 100µL FACS-Puffer aufgenommen. Die Färbung wurde mit Antikörpern in angegebener Menge für 30min im dunklen 4°C-Kühlschrank durchgeführt. Nach erneutem Waschen mit FACS-Puffer konnte die Messung erfolgen.

3.2.3.7. Herstellung von Zelllysaten

Auf den 6-*well*-Platten wurde das Kulturmedium abgesaugt und je *well* 200µL Lysis-Puffer (vorher auf Eis gestellt) hinzugegeben. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von der Platte gelöst. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen in 1,5mL Eppendorfgefäße überführt, gut gevortext und für 30min auf Eis gestellt (jede 10min vortexen). Nach Abzentrifugieren (10min, maximale RPM, 4°C) wurde der Überstand mit den darin gelösten Proteinen in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Proben wurden entweder sofort weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

3.2.3.8. Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte durch Elektrophorese in einem zweischichtigen, aus 5% Sammelgel und 10% Trenngel bestehenden Acrylamidgel.

<u>Zusammensetzung Trenngel 10%:</u>	<u>Zusammensetzung Sammelgel 5%:</u>
7,6mL destilliertes H ₂ O	10,76mL destilliertes H ₂ O
6,66mL 30% Acrylamid/Bis Solution	3,32mL 30% Acrylamid/Bis Solution 37.5:1
37.5:1	
5,72mL Bis-Tris HCl Gel Puffer	5,72mL Bis-Tris HCl Gel Puffer
200µL 10% APS	200µL 10% APS
8µL TEMED	20µL TEMED

Hierfür wurden die Zelllysate mit 4xLaemmli-Puffer für 5min bei 95°C aufgekocht und zusammen mit der *Biotinylated Protein Ladder* (Cell Signaling Technology, Danvers) und der *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Waltham) in die Taschen des Gels in der mit MOPS-SDS Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 100V für 1,5 Stunden oder bis der Marker die gewünschte Höhe erreicht hatte.

3.2.3.9. Western Blot und Färbung

Nach Auftrennung der Proteine wurden diese in einer *Semidry Blotting* Kammer auf eine Nitrozellulose Membran (GE Healthcare, Little Chalfont) übertragen. Die Membran wurde für 30s in Methanol aktiviert, Membran und Gel in entsprechendem Puffer equilibriert und mit in Puffer getränkten Whatman-Papier Chromatography 3MM Chr (GE Healthcare, Little Chalfont) nach folgendem Schema aufgebaut.

Anode

1. 5x Whatman-Papier getränkt in Anode-Puffer I
2. 3x Whatman-Papier getränkt in Anode-Puffer II
3. Nitrozellulose Blotting Membran in Anode-Puffer II
4. Gel in Kathoden-Puffer
5. 5x Whatman-Papier getränkt in Kathoden-Puffer

Kathode

Die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte für 1 Stunde bei 0,8mA pro cm² Gelfläche. Anschließend wurde die Membran für 15min bei Raumtemperatur mit 10% BSA-1xTBST Lösung geblockt und zweimal mit 1xTBST gewaschen. Der Primärantikörper wurde über Nacht bei 4°C in 5% BSA-1xTBST Lösung auf die Membran gegeben. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal gewaschen (einmal 15min, zweimal 5min in 1xTBST) und mit einer Sekundärantikörper-1xTBST Lösung für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreifachen Waschen erfolgte die Detektion mit *Clarity™ Western ECL Substrate* (Bio-Rad, Hercules) im *ChemiDoc™MP Imaging System* (Bio-Rad, Hercules).

Für zweite Detektionen wurde die Membran für 20min bei 70°C in Stripping-Puffer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen konnte die Membran erneut geblockt und mit neuen Antikörper-Lösungen wie beschrieben angefärbt werden.

3.2.4. Auswertung

Die Auswertung der quantitativen Real-Time PCR erfolgte nach der Delta-Delta-CT Methode. Dabei wurden „*undetermined*“-Werte zur quantitativen Auswertung auf den maximalen CT-Wert von 40 gesetzt. Für jeden Primer wurde die Funktion in einem Primer-Effizienz Test überprüft. Die statistische Auswertung wurde mit dem gepaartem *Student's t-test* durchgeführt, dabei wurden Ergebnisse mit $p < 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet. In den Ergebnissen werden Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (SEM) dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchung der *Cx3cl1*-Expression in Mausmodellen der Eisenüberladung

Die Proteine HFE und HFE2 (HJV) spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Eisenhaushalts und Mutationen in ihren Genen äußern sich phänotypisch in einer Eisenüberladungsstörung. Zur Untersuchung einer potentiellen Eisenregulation von *Cx3cl1* wurde das Lebergewebe im murinen *in-vivo*-Modell von *Hfe*- und *Hfe2*-*knockout* Tieren untersucht.

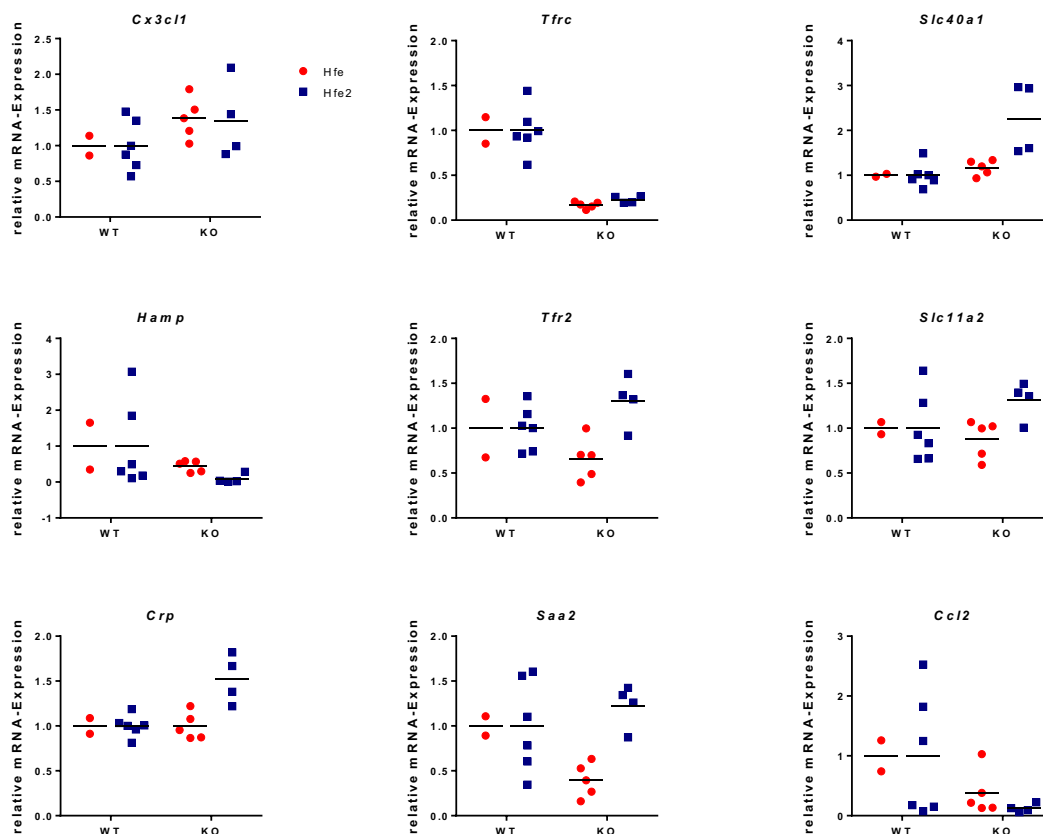


Abbildung 5: Gen-Expression in Lebergewebe von *Hfe*- und *Hfe2*-*knockout* Mäusen im Vergleich zu Wildtypen

Die *Cx3cl1*, Eisengen- und Entzündungsgen-Expression wurde mithilfe der RT-qPCR analysiert und gegen *Rplp0* normalisiert. Individuelle Werte und Mittelwerte sind abgebildet, der Mittelwert der Wildtypen wurde gleich 1 gesetzt. Die *Hfe* WT und KO Tiere sind rot, die *Hfe2* blau abgebildet.

Die Expression von Fractalkin und den restlichen untersuchten Genen (Transferrinrezeptor 1, *Tfrc*; Transferrinrezeptor 2, *Tfr2*; Ferroportin, *Slc40a1*; Hepcidin, *Hamp*; Divalenter Metallionen Transporter 1, *Slc11a2*) erfolgte in der Real-Time qPCR (**Abb. 5**). Diese zeigte eine stark reduzierte Expression von *Tfrc* in beiden *knockout* Modellen. Die *Slc40a1*-Expression war in den *Hfe2^{-/-}* Tieren deutlich, in den *Hfe^{-/-}* geringer erhöht. Für *Hamp* wurde bei beiden *knockout* Tieren eine vergleichbar reduzierte mRNA-Expression gefunden. Bei der *Tfr2* und *Slc11a2*-Expression wichen beide Modelle voneinander ab. Die *Hfe^{-/-}* Mäuse zeigten ein erniedrigtes Expressionsmuster von *Tfr2* und *Slc11a2* im Vergleich zu ihren Wildtyp-Kontrollen, die *Hfe2^{-/-}* wiesen dagegen eine 1,3-fach erhöhte Expression von *Tfr2* und *Slc11a2* auf. Interessanterweise zeigte sich bei beiden *knockout* Tieren eine ca. 1,3-fach erhöhte *Cx3cl1*-Expression. Um einen Eindruck des Entzündungsstatus der Lebern zu bekommen wurde die Gene für das C-reaktive Protein (*Crp*), Serum-Amyloid A2 (*Saa2*) und CC-Chemokinligand 2 (*Ccl2*) untersucht. Die *Hfe^{-/-}* Tiere zeigten keinen Unterschied in der mRNA-Expression von *Crp*; *Saa2* und *Ccl2* waren sogar reduziert exprimiert. Bei den *Hfe2^{-/-}* Mäusen zeigte sich dagegen eine leichte Erhöhung der *Crp* und *Saa2*-Expression, *Ccl2* war dagegen wie bei den *Hfe^{-/-}* Mäusen reduziert exprimiert.

4.2. Fractalkin-Expression und Eisenregulation in Endothelzellen

4.2.1. MS1-Endothelzellen

Da Endothelzellen unter Stimulation mit Zytokinen im Rahmen von Entzündung vermehrt entzündliche Chemokine exprimieren und Fractalkin initial als induzierbares Chemokin auf Endothelzellen nachgewiesen wurde (53), wurden anschließend Endothelzellen in Zellkulturversuchen untersucht. Die für die folgenden Versuche benutzten MS1-Endothelzellen sind murine, immortalisierte sinusoidale Endothelzellen aus den Langerhans-Inseln des Pankreas. Um diese Zelllinie in Bezug auf den Beitrag einer veränderten Eisenkonzentration auf die Expression von Fractalkin zu untersuchen, wurden zuerst die mRNA-Spiegel mittels Real-Time qPCR analysiert.

Als Erstes wurde mit zwei Zytokinen, die eine prominente Rolle in Entzündungsprozessen spielen, auf eine induzierbare *Cx3c1*-Expression gescreent. Zeitgleich wurde die Stimulationsdauer, die zur stärksten *Cx3c1*-Expression führte, bestimmt. In **Abbildung 6** ist zu erkennen, dass die Stimulation mit IL-1 β und IFN γ zu einem deutlichen Anstieg der mRNA-Spiegel von *Cx3c1* führte. Dabei war IFN γ deutlich potenter und eine eingesetzte Konzentration von 500U/mL IFN γ reichte völlig aus. Zeitlich gesehen stieg die *Cx3c1*-Expression bis zu einer Stimulation von 8h Stunden auf über 10-fache Expression an und schien bei 16-stündiger Stimulation nicht viel weiter zu steigen. Als Kontrolle –vor allem für IL-1 β - wurde die Expression der Gene für E-Selektin (*Sele*) und das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (*Icam1*) mitbestimmt. Beide zeigten eine schnelle und starke Reaktion auf IL-1 β Stimulation, die Expression nach IFN γ -Stimulation fiel deutlich schwächer aus, stieg jedoch kontinuierlich bis zu einer ca. 2-fachen *Sele* und ca. 5-fachen *Icam1*-Expression nach 16h an.

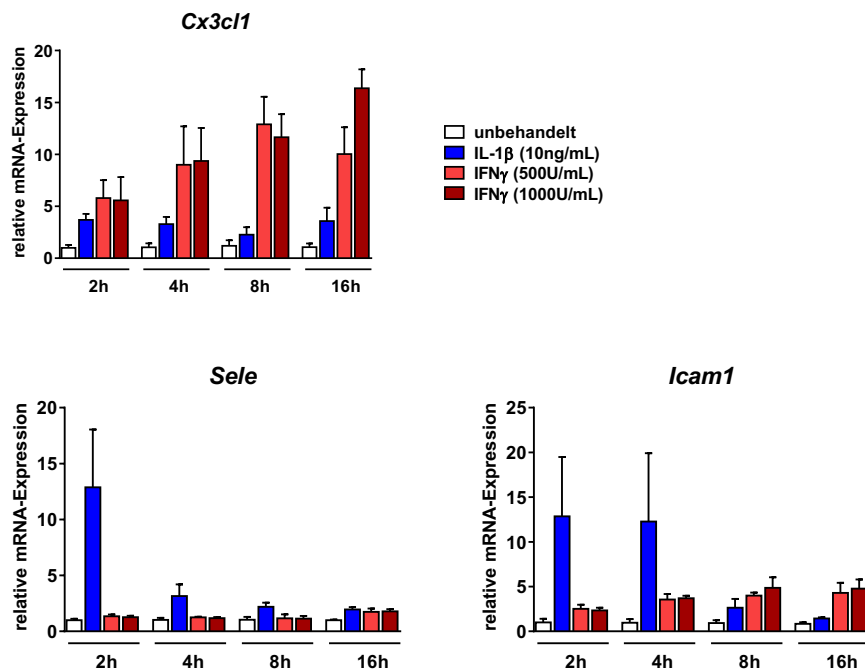


Abbildung 6: Einfluss von IL-1 β und IFN γ auf die *Cx3c1*-Expression in MS1-Endothelzellen

Die *Cx3c1*, *Sele* und *Icam1*-Expression wurde mithilfe der RT-qPCR analysiert und gegen *Rplp0* normalisiert. Mittelwerte mit Standardabweichung (SEM) für n=3, der Mittelwert der unbehandelten Proben wurden gleich 1 gesetzt. Die Zellen wurden für 2h, 4h, 8h und 16h mit IL-1 β und IFN γ stimuliert. Nach der RNA-Extraktion wurde 1 μ g RNA revers transkribiert und für die RT-qPCR eingesetzt.

Anschließend, um den Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen freier Eisenionen im Kulturmedium auf die *Cx3cl1*-Expression zu untersuchen, wurden die MS1 Zellen mit Desferoxamine Mesylate (DFX; 100µM) und verschiedenen Konzentrationen Eisenchlorid (FeCl₃; 1-20µM) für 16h vorinkubiert und anschließend mit IFN γ (500U/mL) für 8h stimuliert (**Abb. 7**).

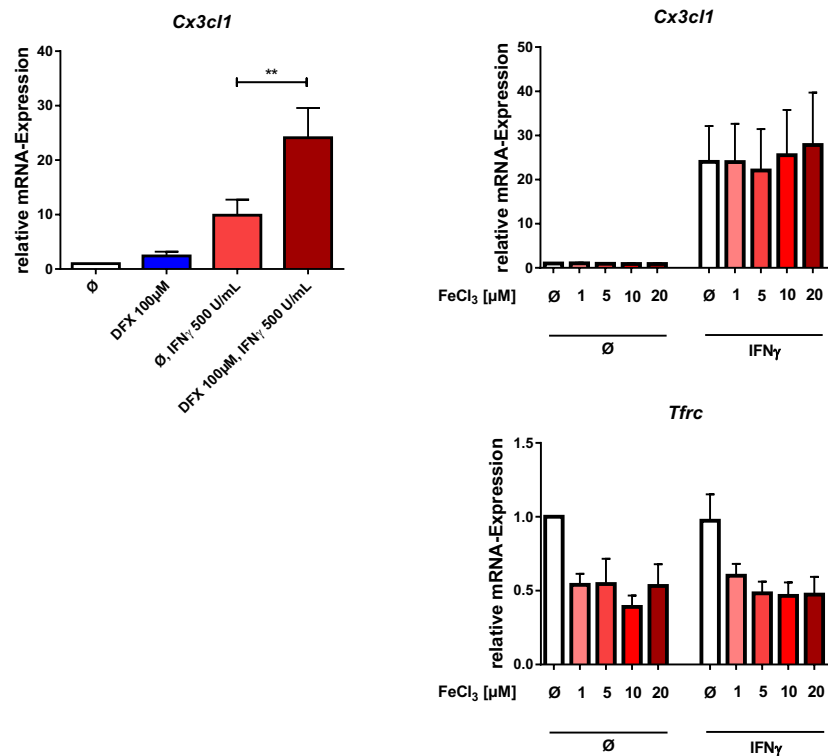


Abbildung 7: Einfluss von DFX/FeCl₃ auf die Zytokin-induzierte *Cx3cl1*-Expression in MS1-Endothelzellen

Die *Cx3cl1* und *Tfrc*-Expression wurde mithilfe der RT-qPCR analysiert und gegen *Rplp0* normalisiert. Mittelwerte mit Standardabweichung (SEM) für n=5 bei DFX, n=3 bei FeCl₃, die unbehandelten und unstimulierten Proben wurden gleich 1 gesetzt. Die Zellen wurden 16h mit DFX/FeCl₃ vorinkubiert und anschließend für 8h mit IFN γ stimuliert. Nach der RNA-Extraktion wurde 1µg RNA revers transkribiert und für die RT-qPCR eingesetzt.

Die alleinige Vorinkubation mit DFX führte zu einer 2,4-fachen Erhöhung der *Cx3cl1*-Expression, IFN γ zu einer 10-fachen. Deutlich wurde der verstärkende Effekt von DFX durch Kombination von DFX und IFN γ was eine ca. 24-fach erhöhte *Cx3cl1*-Expression hervorrief. FeCl₃ dagegen zeigte selbst bei sehr hohen Konzentrationen keinen Einfluss auf die konstitutive und durch IFN γ -induzierbare *Cx3cl1*-Expression. *Tfrc* wurde zur

Überprüfung der Eisenbehandlung analysiert und zeigte einen deutlichen Effekt schon bei $1\mu\text{M}$ FeCl_3 , wurde aber selbst nicht durch $\text{IFN}\gamma$ in seiner Expression beeinflusst. Die Herunterregulation von *Tfrc* wurde durch höhere FeCl_3 -Konzentrationen nicht viel weiter verstärkt.

Um die auf RNA-Ebene beobachteten Regulationen auf Proteinebene zu untersuchen, erfolgte eine Proteinanalyse mithilfe der Durchflusszytometrie (**Abb. 8**). Dabei konnten keine Unterschiede der Proteinexpression weder nach Stimulation mit DFX, FeCl_3 und $\text{IFN}\gamma$ alleine, noch nach kombinierter Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ und DFX/ FeCl_3 beobachtet werden (**Abb. 8a**). Da in Versuchen von Schulz *et al.* (83) erst die Kostimulation mit $\text{IFN}\gamma$ + $\text{TNF}\alpha$ zu einer starken Proteinexpression führte, wurde in einem angepassten Versuch (**Abb. 8b**) die CX3CL1-Proteinexpression nach $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ + $\text{TNF}\alpha$ untersucht. Auch hier ließ sich keine induzierbare Proteinexpression feststellen.

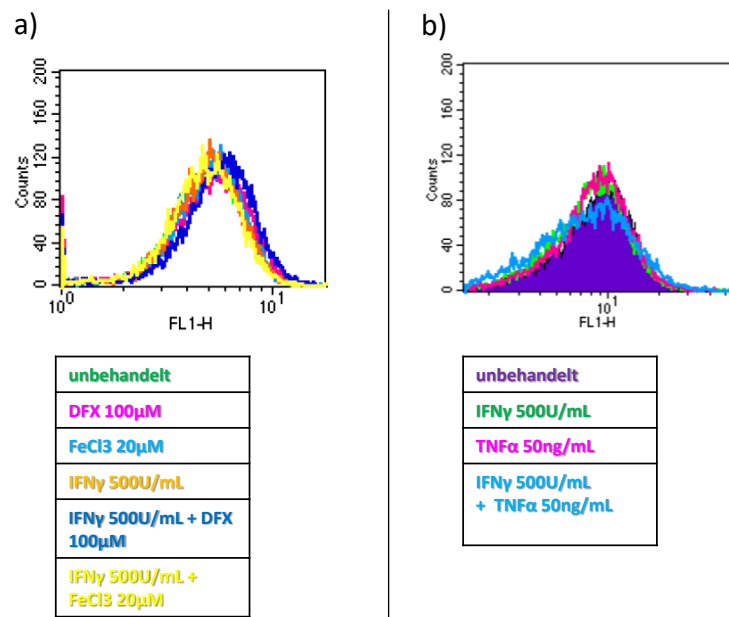


Abbildung 8: CX3CL1-Expression in der Durchflusszytometrie von MS1-Endothelzellen nach $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, DFX und FeCl_3 Behandlung

CX3CL1 Protein-Expression in der Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden 16h mit DFX/ FeCl_3 vorinkubiert und/oder für 8h mit den entsprechenden Zytokinen stimuliert. (n=1)

Nachfolgend wurde die CX3CL1-Proteinexpression und die durch verschiedene Zytokine hervorgerufene Signalkaskade im Western Blot untersucht. Wie in **Abbildung 9a** zu sehen ist, zeigte sich im Western Blot nach Stimulationen mit IFN γ , TNF α und IFN γ +TNF α sowie zusätzlich DFX/FeCl $_3$ -Behandlung keine CX3CL1-Bande. Eine Gegenfärbung mit α -Tubulin war durch zu langer Zeitperiode zwischen erster und zweiter Anfärbung oder unvollständiges Strippen nicht erfolgreich, die unspezifische Hintergrundfärbung zeigt aber deutlich eine homogene Beladung der Nitrozellulose Membran mit aufgetrennten Proteinen.

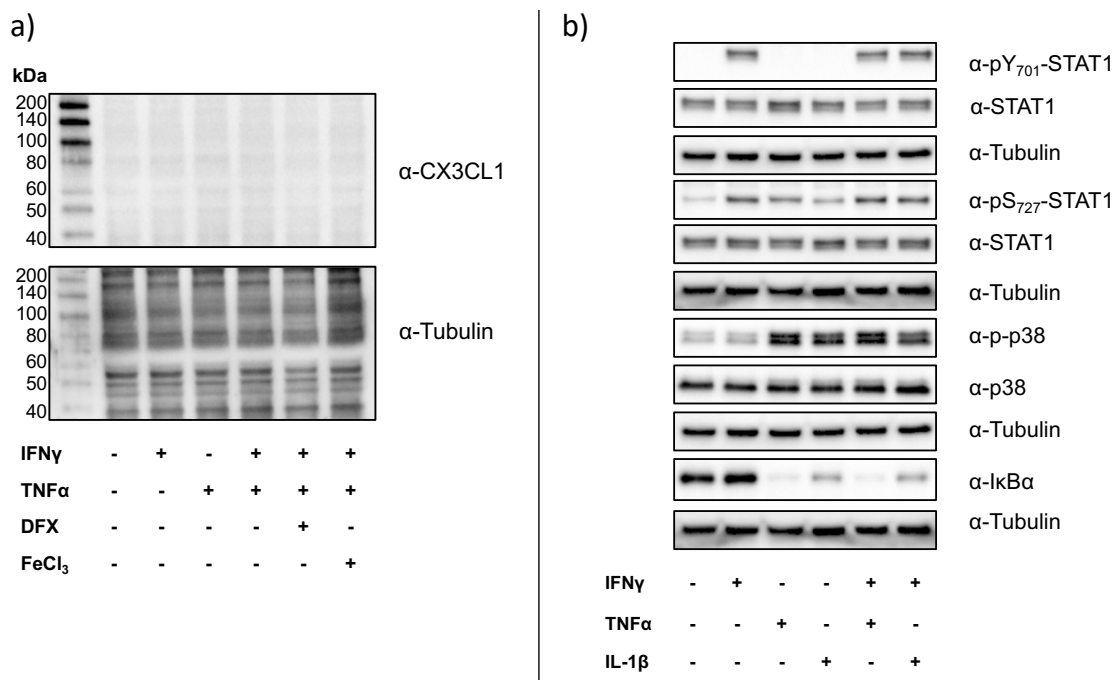


Abbildung 9: CX3CL1-Expression und Signalkaskade in MS1-Endothelzellen im Western Blot

Western Blot-Analyse aus Zelllysaten. a) Die Zellen wurden 30min mit 100 μ M DFX und 20 μ M FeCl $_3$ vorinkubiert, 20h mit IFN γ 500U/mL und 50ng/mL TNF α stimuliert, lysiert und die CX3CL1-Expression mithilfe eines Western Blots untersucht. Der dargestellte Western Blot wurde nur einmal durchgeführt. b) Die Zellen wurden 15 min mit 500U/mL IFN γ , 50ng/mL TNF α und 10ng/mL IL-1 β stimuliert, lysiert und die Signalwege mithilfe eines Western Blots auf die Aktivierung der angegebenen Signalproteine untersucht. Der dargestellte Western Blot ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Um festzustellen ob die Zytokinsignale bei den MS1-Zellen ankamen, wurde anschließend die Signalkaskade nach 20min Stimulation mit jeweils IFN γ , TNF α , IL-1 β und die Kombination aus IFN γ mit jeweils TNF α oder IL-1 β analysiert (**Abb. 9b**). Als Beladungskontrolle wurde für jedes Gel eine Gegenfärbung gegen α -Tubulin durchgeführt. Unter IFN γ -Stimulation zeigte sich eine Phosphorylierung von Tyrosin 701 und Serin 727 von STAT1. Im Gegensatz zum Tyrosin 701 wurde das Serin 727 von STAT1 auch durch eine TNF α - oder IL-1 β -Stimulation phosphoryliert, allerdings in geringerem Maße als mit IFN γ . Die Färbung vom gesamten STAT1 zeigte eine gleichmäßige Expression in allen Proben. Die Serin-/Threoninkinase p38 war besonders nach TNF α , IL-1 β sowie unter den Kombinations-Konditionen, phosphoryliert. Des Weiteren zeigte sich eine Degradation von I κ B α nach TNF α - und IL-1 β -Stimulation, welche bei TNF α stärker ausfiel.

4.2.2. HUVEC

Der MS1-Endothelzelllinie wurden primäre, aus der menschlichen Nabelschnur isolierte, venöse Endothelzellen (HUVECs) gegenübergestellt. In Analogie zu den MS1-Versuchen wurde zunächst der Einfluss von FeCl $_3$ und DFX auf die *CX3CL1*-Expression in der Real-Time qPCR untersucht (**Abb. 10**). Nach Stimulation mit IFN γ und TNF α zeigte sich eine sehr starke, 250- bis 300-fache Induktion der Fractalkin-Expression im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen. Des Weiteren führte die Stimulation von IFN γ kombiniert mit TNF α zu einer potenten Verstärkung dieses Effekts. Nach Vorinkubation mit DFX konnte in diesen zur starken *CX3CL1*-Expression induzierten Zellen eine Reduzierung der *CX3CL1*-Expression um die Hälfte von einer ca. 12000- auf eine 6000-fache relative Expression beobachtet werden. FeCl $_3$ zeigte dagegen keinen großen Einfluss auf die IFN γ /TNF α -induzierbare *CX3CL1*-Expression. Als Positivkontrolle für die FeCl $_3$ /DFX-Behandlung wurden erneut die bekannten Zielgene *TFRC* und *SLC40A1* untersucht. *TFRC* wurde unter Eisenmangel nach Chelatierung hochreguliert und ein Eisenüberschuss führte zu einer Inhibierung der *TFRC*-Expression. Die Stimulation mit IFN γ oder TNF α alleine zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die *TFRC*-Expression. Die Expression von *SLC40A1* war sowohl durch IFN γ

als auch durch TNF α stark reprimiert, wobei der Effekt von TNF α deutlich stärker ausgeprägt war. Dadurch war ein möglicher Einfluss der Eisenkonzentration nicht mehr evaluierbar.

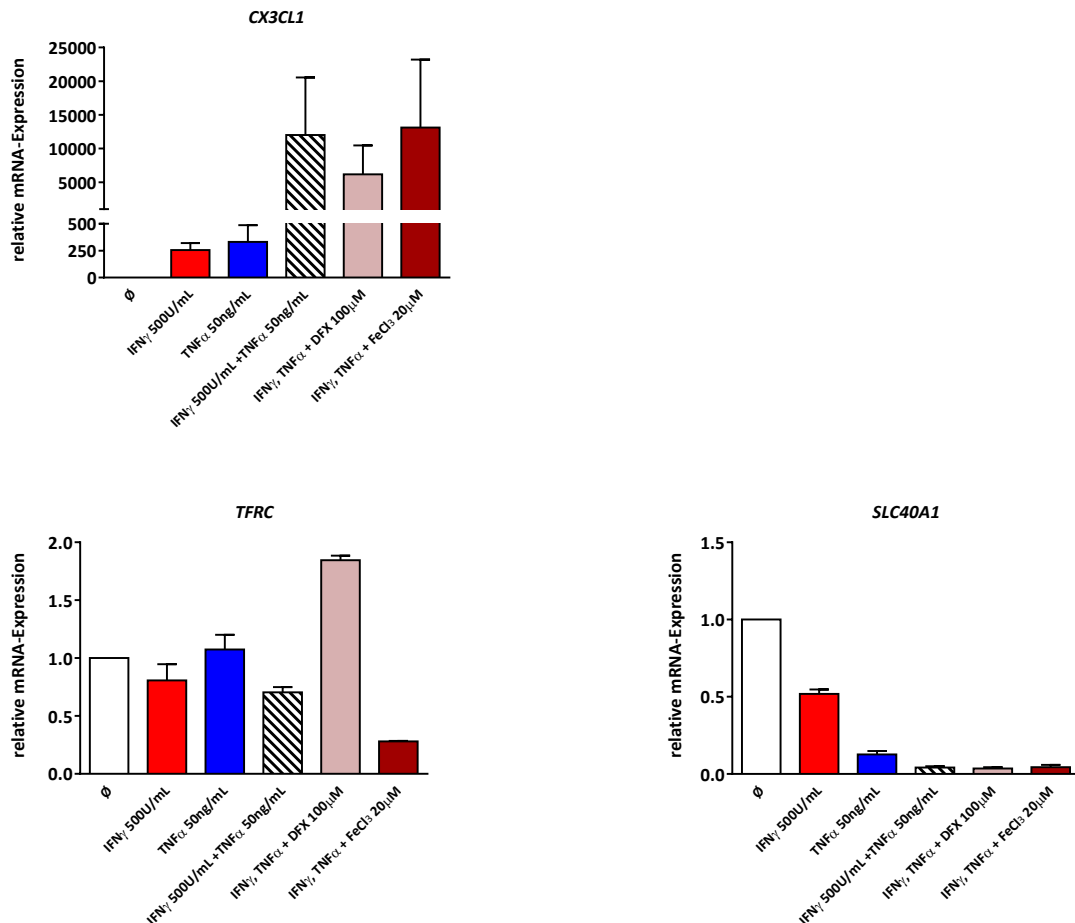


Abbildung 10: Einfluss von DFX/FeCl $_3$ auf die CX3CL1-Expression in HUVECs

Die CX3CL1, TFRC und SLC40A1-Expression wurde mithilfe der RT-qPCR analysiert und gegen HPRT normalisiert. Mittelwerte mit Standardabweichung (SEM) für n=2, die unbehandelten und unstimulierten Proben wurden gleich 1 gesetzt. Die Zellen wurden 30min mit 100 μ M DFX/20 μ M FeCl $_3$ vorinkubiert und anschließend für 8h mit 500U/mL IFN γ und 50ng/mL TNF α stimuliert. Nach der RNA-Extraktion wurde 1 μ g RNA revers transkribiert und für die RT-qPCR eingesetzt. Es ist zu beachten, dass die CX3CL1-Expression aufgrund der starken Potenz der IFN γ +TNF α -Kostimulation mit Skalbruch sowie Änderung der Skalenabstände abgebildet ist.

Anschließend wurde die Protein-Expression unter den gleichen wie in der Real-Time qPCR untersuchten Konditionen analysiert. Wie in **Abbildung 11a** zu erkennen ist, zeigte sich eine nur sehr schwache CX3CL1-Bande nach Stimulation mit IFN γ und TNF α

alleine. Die quantitative Auswertung zeigte entsprechend eine 2-fach erhöhte Proteinexpression. Dagegen führte die Kostimulation mit IFN γ und TNF α zu einer starken Proteinexpression. Die Inkubation mit DFX äußerte sich in einer Reduzierung der CX3CL1-Expression um ca. die Hälfte, die FeCl $_3$ -Behandlung zeigte keine große Veränderung. Eine Gegenfärbung erfolgte mit α -Tubulin und wurde in Beziehung zur der CX3CL1-Expression zur Quantifizierung benutzt. Die im Western Blot gefundenen Ergebnisse der Proteinexpression stehen im Verhältnis zu den in der Real-Time qPCR gefundenen Effekten auf RNA-Ebene

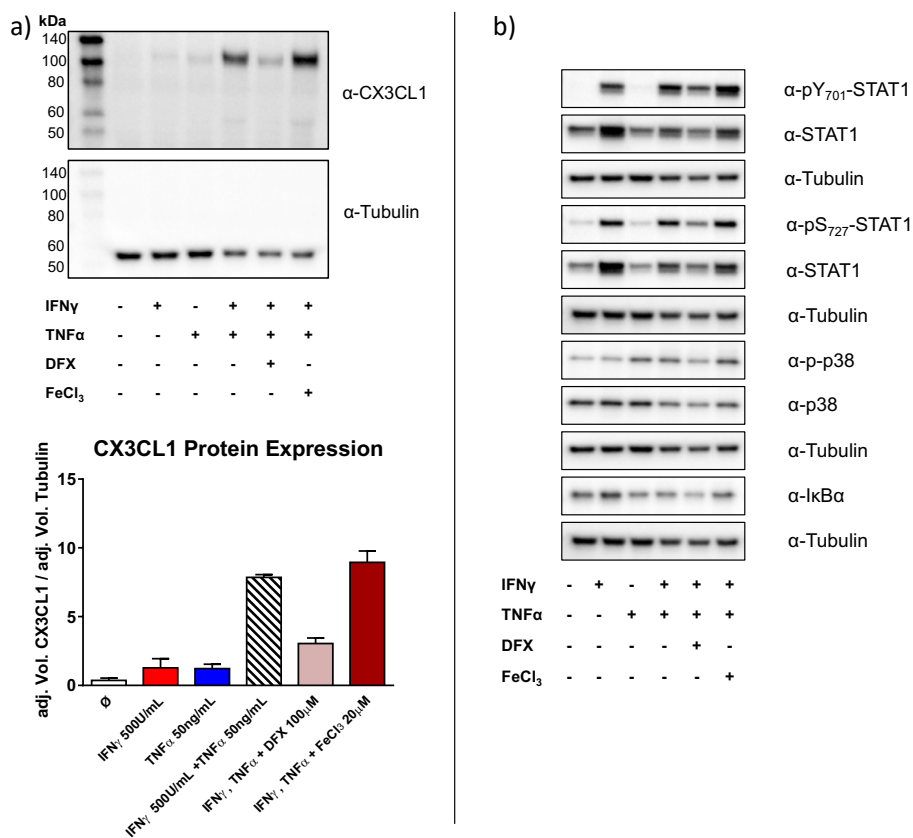


Abbildung 11: CX3CL1-Expression und Signalkaskade in HUVECs im Western Blot

Western Blot-Analyse aus Zelllysaten. Die Zellen wurden 30min mit 100 μ M DFX und 20 μ M FeCl $_3$ vorinkubiert, 20h mit IFN γ 500U/mL und 50ng/mL TNF α stimuliert und die Zellen lysiert. a) Die CX3CL1-Expression wurde im Western Blot dargestellt und zusätzlich quantitativ im Verhältnis zum Tubulin ausgewertet. Normalisierung gegen die unbehandelte, unstimulierte Probe. b) In einem weiteren Western Blot wurden die Signalwege auf die Aktivierung der angegebenen Signalproteine untersucht. Die dargestellten Western Blots sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Zusätzlich wurde die Signalkaskade auf ein Korrelat des DFX-Effektes mit den gleichen Proben untersucht (**Abb. 11b**). Im Western Blot zeigte sich eine durch IFN γ hervorgerufene Tyrosin 701- und Serin 727-Phosphorylierung von STAT1. Beide Phosphorylierungen waren weniger ausgeprägt bei DFX-Behandlung. Das gesamte STAT1 war nach alleiniger IFN γ -Stimulation höher exprimiert als nach kombinierter IFN γ - und TNF α -Stimulation. Unter DFX-Inkubation zeigte sich eine reduziert vorhandene Expression von STAT1. Die Behandlung mit FeCl $_3$ hatte keinen Einfluss auf die Tyrosin- oder Serinphosphorylierung von STAT1. Das phosphorylierte p38 ließ sich auf die TNF α -Stimulationen zurückschließen. Auch hier zeigte die DFX-Behandlung eine etwas reduzierte Expression von phosphoryliertem p38. In der p38-Färbung waren die mit IFN γ und TNF α kostimulierten Proben reduziert exprimiert. Schließlich war eine TNF α -bedingte I κ B α -Degeneration zu beobachten, welche durch DFX-Behandlung stärker ausfiel.

4.3. Eisenhaushalt und Fractalkin-Expression/-Regulation durch freie Eisenionen in Modellen der Megakaryopoese

Zur Untersuchung des megakaryopoetischen Eisenhaushalts und einer potentiellen Rolle der Fractalkin/CX3CR1-Achse in Megakaryozyten sowie derer eventuellen Beeinflussung durch unterschiedliche Konzentrationen an freien Eisenionen wurden der K562-Zelllinie primäre Megakaryozyten, kultiviert aus Knochenmark von Mäusen, gegenübergestellt. Bei den K562 Zellen handelt es sich um menschliche Knochenmark-Zellen mit chronisch-myeloisch-leukämischen Hintergrund (CML), welche durch Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) zur megakaryopoetischen Differenzierung angeregt werden können (94).

4.3.1. Untersuchung der Megakaryopoese und des Eisenhaushalts im megakaryopoetischen Differenzierungsprozess

4.3.1.1. K562

Die megakaryopoetische K562-Differenzierung wurde durch Zellzählung, Morphologie, Durchflusszytometrie und Real-Time qPCR objektiviert. In **Tabelle 2** sind die

durchschnittlichen Zellzahlen und Vitalitäten von je sechs unstimulierten und sechs mit PMA stimulierten Proben zusammengefasst. Es zeigte sich eine deutlich niedrigere Zellzahl der differenzierten Zellen, welche aufgrund ihrer Differenzierung aufhörten zu proliferieren. Ebenfalls zeigten die differenzierten Zellen eine niedrigere Vitalität.

unbehandelt	Gesamt (Zellen/mL)	$1,35 \times 10^6 \pm 2,35 \times 10^5$
	Lebendig (Zellen/mL)	$1,14 \times 10^6 \pm 1,45 \times 10^5$
	Tot (Zellen/mL)	$8,62 \times 10^4 \pm 2,41 \times 10^4$
	Vitalität (%)	$92,83 \pm 1,17$
PMA 100nM	Gesamt (Zellen/mL)	$3,58 \times 10^5 \pm 5,35 \times 10^4$
	Lebendig (Zellen/mL)	$2,81 \times 10^5 \pm 3,98 \times 10^4$
	Tot (Zellen/mL)	$7,71 \times 10^4 \pm 2,15 \times 10^4$
	Vitalität (%)	$78,83 \pm 3,60$

Tabelle 2: Durchschnittliche Zellzählung von unstimulierten und PMA-differenzierten K562-Zellen (n=6)

Morphologisch konnten megakaryopoetische Merkmale in Zellgrößenzunahme, großen runden, in der Lichtmikroskopie bläulich durchschimmernden Zellkernen, sowie charakteristischem Randsaum beobachtet werden (**Abb. 12a**). In der Durchflusszytometrie wurden die Zellen nach Färbung mit Antikörpern gegen den Megakaryozyten- und Plättchenmarker Integrin alpha-IIb (*ITGA2B*, CD41a) untersucht (**Abb. 12b**). Ferner wurden die Megakaryozytenmarker Glykoprotein Ib alpha- und beta-Untereinheit (*GP1BA*, *GP1BB*), *ITGA2B* sowie selektierte Eisenhaushalt-Gene (*HFE*, *HFE2*, *SLC40A1*, *TFRC*) auf RNA-Ebene per Real-Time qPCR untersucht (**Abb. 13**). Die PMA-stimulierten Zellen zeigten hier eine signifikante Augmentation der *GP1BB* und *ITGA2B*-Expression, die *GP1BA*-Expression war auch tendenziell erhöht. Was die Eisenhaushalt-Gene betrifft, so konnte eine deutlich erhöhte *HFE* und *HFE2* Expression festgestellt werden. *SLC40A1* war signifikant herunterreguliert und *TFRC* gering erhöht.

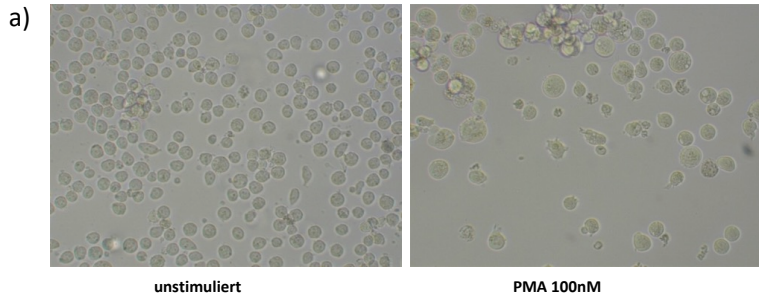


Abbildung 12:
unstimulierte und PMA-differenzierte K562-Zellen

Die Zellen wurden 4 Tage mit 100nM PMA zur Differenzierung angeregt.
a) Lichtmikroskopisches Bild, 20x Vergrößerung.

b) Durchflusszytometrie-Analyse, die anti-CD41a Färbung ist grün dargestellt.

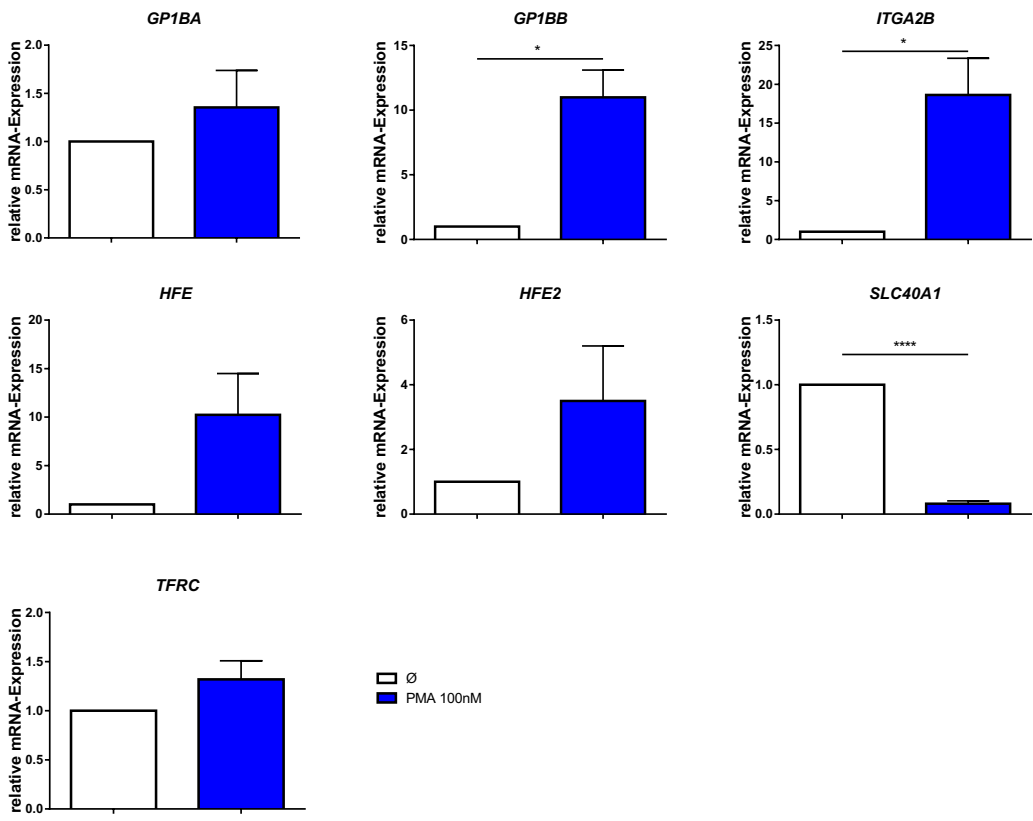
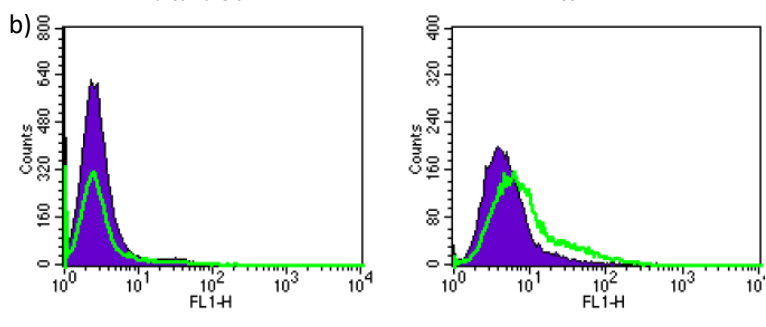


Abbildung 13: Gen-Expression in unstimulierten und PMA-differenzierten K562-Zellen

Die Megakaryozytenmarker und Eisengene-Expression wurde mithilfe der RT-qPCR analysiert und gegen *HPRT* normalisiert. Mittelwerte mit Standardabweichung (SEM) für n=3, die unbehandelten Proben wurden gleich 1 gesetzt. Die Zellen wurden 4 Tage mit 100nM PMA zur Differenzierung angeregt. Die unbehandelten Proben sind weiß, die stimulierten Proben blau dargestellt.

4.3.1.2. Primäre Megakaryozyten

Der Fortschritt der Kultivierung der primären Megakaryozyten wurde bei der Untersuchung der Megakaryopoese täglich durch Abnahme einer Probe verfolgt. In **Abbildung 14** kann man die kultivierten Zellen an Tag 6 des Differenzierungsprozesses erkennen. Am Anfang der Kultivierung befanden sich viele kleine, nicht sicher zu unterscheidende, Knochenmarkszellen in Zellsuspension. Durch SCF-Stimulation wurden die pluripotenten Stammzellen zur Proliferation und mit TPO zur megakaryopoetischen Differenzierung angeregt. Zum Ende der Versuche zeigten sich deutliche, große Megakaryozyten welche teilweise, wie beschrieben (95), von einer Wolke von abgesonderten Proplättchen umgeben waren.

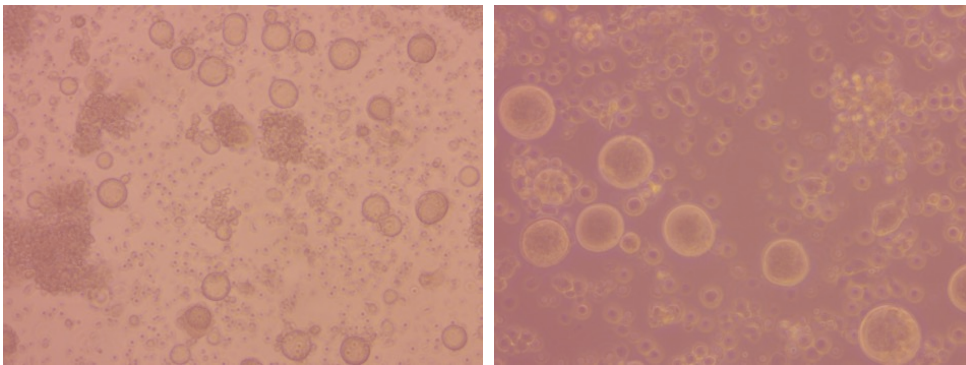


Abbildung 14: primäre Megakaryozyten an Tag 6 der Kultivierung

Lichtmikroskopisches Bild, links 20x, rechts 40x Vergrößerung

Die Expression der Megakaryozytenmarker und der Eisenhaushaltgene wurde durch Real-Time qPCR ermittelt (**Abb. 15**). Die Expression der Megakaryozytenmarker *Gp1ba* und *Itga2b* veränderten sich in den ersten 2 Tagen unter alleiniger SCF-Stimulation nur gering. Die stärkste Erhöhung dieser Marker fiel nach Tag 5 und 6, also der alleinigen Stimulation mit TPO ohne SCF, auf. Wie bei den K562-Zellen war *Hfe2* bei den differenzierten Zellen hochreguliert und die Expression von *Slc40a1* stark reduziert. Dagegen unterschieden sich die primären Megakaryozyten in ihrer *Hfe*-Expression von den K562: hier zeigte sich ein Trend zu eher erniedrigter *Hfe*-Expression der differenzierten Megakaryozyten im Vergleich zu den undifferenzierten Zellen zu Versuchsbeginn. Schließlich zeigte die *Tfrc*-Expression keine größeren Veränderungen.

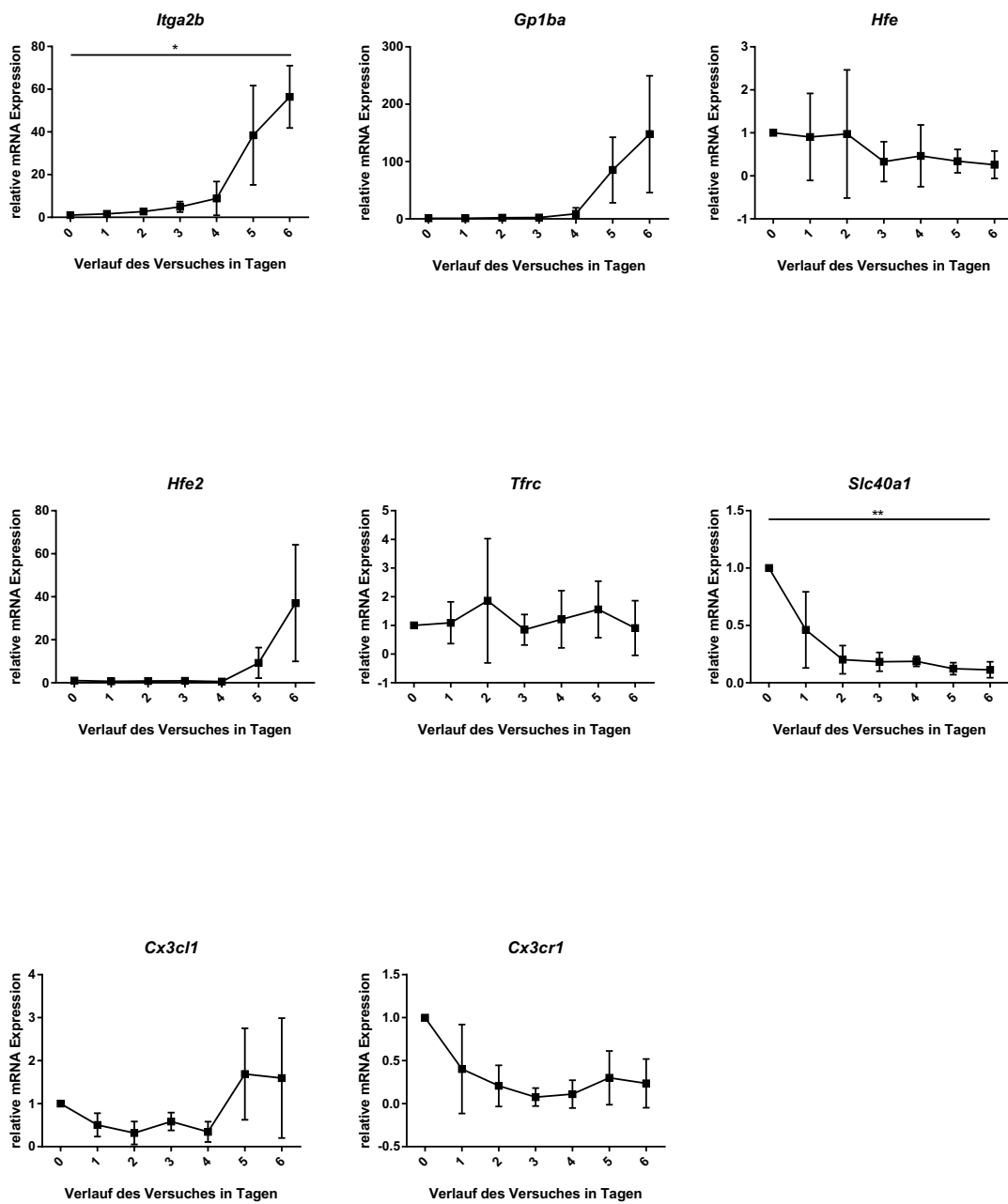


Abbildung 15: Zeitreihe des Differenzierungsprozesses von primären Megakaryozyten

Die Megakaryozytenmarker, selektierte Eisengene, *Cx3cl1* und *Cx3cr1*-Expressionen wurden mithilfe der RT-qPCR analysiert und gegen *Rplp0* normalisiert. Mittelwerte mit Standardabweichung (SEM) für n=3, die Proben an Tag 0 wurden gleich 1 gesetzt. Die Zellen wurden 6 Tage nach angegebenem Protokoll kultiviert und der Differenzierungsprozess durch tägliche Probeentnahme verfolgt.

4.3.2. Einfluss von Eisen auf den letzten Tag der Megakaryopoese

Die Ergebnisse der reduzierten Ferroportin-Expression, sowohl bei K562 und in den primären Megakaryozyten, die gering erhöhte *Tfrc*-Expression in den K562-Zellen sowie die Veränderungen in *Hfe*- und *Hfe2*-Expressionen deuteten auf eine potentiell wichtige Rolle von Eisen in der Megakaryopoese hin. Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Versuchsansatz der Einfluss von DFX und FeCl₃ auf den letzten Tag der Megakaryopoese, bei dem sich in der Zeitreihe starke Veränderungen der Megakaryozytenmarker und *Hfe2* gezeigt hatten, untersucht. Die Zellen wurden vor der Ernte lichtmikroskopisch auf Morphologie verglichen, dabei fielen keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben auf.

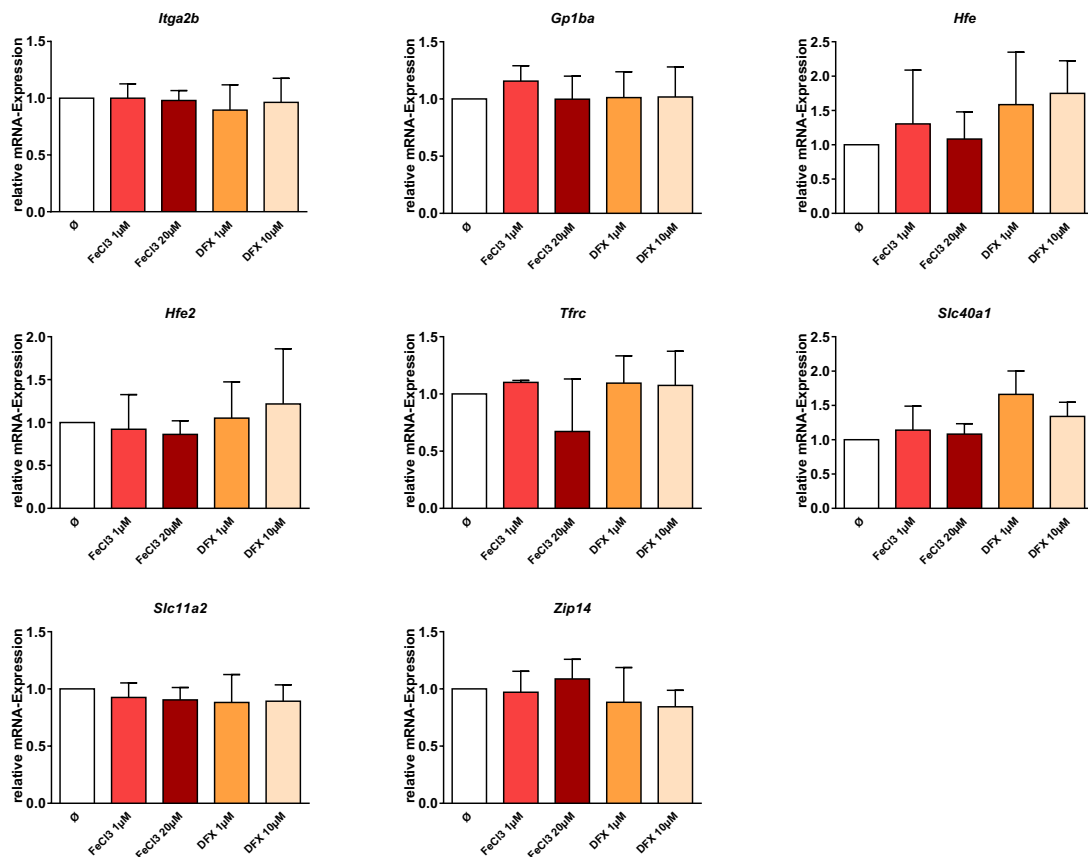


Abbildung 16: Einfluss von verschiedenen Eisenbedingungen auf den letzten Tag der megakaryopoetischen Differenzierung von primären Megakaryozyten

Die Megakaryozytenmarker und selektierte Eisengene-Expression wurde mithilfe der RT-qPCR analysiert und gegen *Rplp0* normalisiert. Mittelwerte mit Standardabweichung (SEM) für n=2, die unbehandelten Proben wurden gleich 1 gesetzt. Die Zellen wurden 5 Tage nach angegebenem Protokoll kultiviert und für den letzten Tag mit verschiedenen Konzentrationen DFX und FeCl₃ inkubiert.

In der **Abbildung 16** sind die relativen RNA-Expressionen unter je zwei verschiedenen FeCl₃- und DFX-Konzentrationen dargestellt. Auf RNA-Ebene zeigten verschiedene FeCl₃- und DFX-Behandlungen nur minimale Einflüsse auf die Expression der untersuchten Zielgene am letzten Tag der Megakaryopoese. Die Expression von *Gp1ba* und *Itga2b* blieb unter den Proben vergleichbar. Nach DFX-Behandlung wurde eine leicht erhöhte *Hfe*-Expression festgestellt, sonst gab es keine großen Unterschiede in der *Hfe*- und *Hfe2*-Expression. Die *Tfrc*-Expression zeigte sich nur bei 20µM FeCl₃ erniedrigt, erstaunlicherweise zeigte sich keine Reaktion auf DFX-Behandlung. Auch die *Slc40a1*-Expression änderte sich unter den verschiedenen Eisenüberladung- und Eisenmangel-Zuständen nur gering. Zur Überprüfung, ob der Eisenhaushalt der Megakaryozyten nach der FeCl₃-Behandlung vielleicht deutlicher über Transferrin/Transferrinrezeptor-unabhängige *Non-Transferrin-Bound-Iron* (NTBI)-Aufnahmewege wie Dmt1 oder Zip14 erfolgte, wurden letztere Gene untersucht. Dabei zeigten auch diese keine Regulation.

4.3.3. CX3CL1/CX3CR1-Achse bei Megakaryozyten

4.3.3.1. K562

Wie bei den Endothelzellen erfolgte die Untersuchung der Fractalkin-Expression zuerst in einem Vorversuch, bei dem mit verschiedenen Zytokinen auf eine Induktion der Fractalkin-Expression getestet wurde. Dabei erschien auf RNA-Ebene eine Regulation der Fractalkin-Expression durch TNFα und PMA selbst möglich, während IFNγ, IL-1β und IL-4 keine Wirkung zu haben schienen (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde in einem größeren Versuchsansatz nur TNFα untersucht. Wie in **Abbildung 17** zu erkennen ist, zeigte die TNFα-Stimulation eine stark induzierte *CX3CL1*-Expression nach 3h und 8h Stimulation wobei die nach 3h am stärksten ausfiel. Wie in **Tabelle 3** zu sehen ist, war allerdings zu beachten, dass dieser durch PMA induzierter hundertfache Anstieg sich auch aus einer Veränderung der *HPRT*-Expression nach PMA-Behandlung sowie die bei den undifferenzierten Zellen sehr geringe bis fehlende *CX3CL1*-Expression (arbiträre Wertfestsetzung auf CT=40) zusammenstellte. Die *CX3CR1*-Expression war nach Differenzierung mit PMA erhöht (auch eher auf die *HPRT*-

Veränderung zurückzuführen), die TNF α -Stimulation führte aber zu keinem solchen Unterschied wie bei *CX3CL1*. Als Positiv-Kontrolle der PMA-Behandlung wurde die *Early Growth Response 1* (*EGR1*)-Expression bestimmt, wobei *EGR1* ein in vielen Zelltypen schnell nach mitogener Behandlung aktivierter Transkriptionsfaktor ist und an der PMA-abhängigen megakaryopoetischen Differenzierung von K562-Zellen beteiligt ist (96).

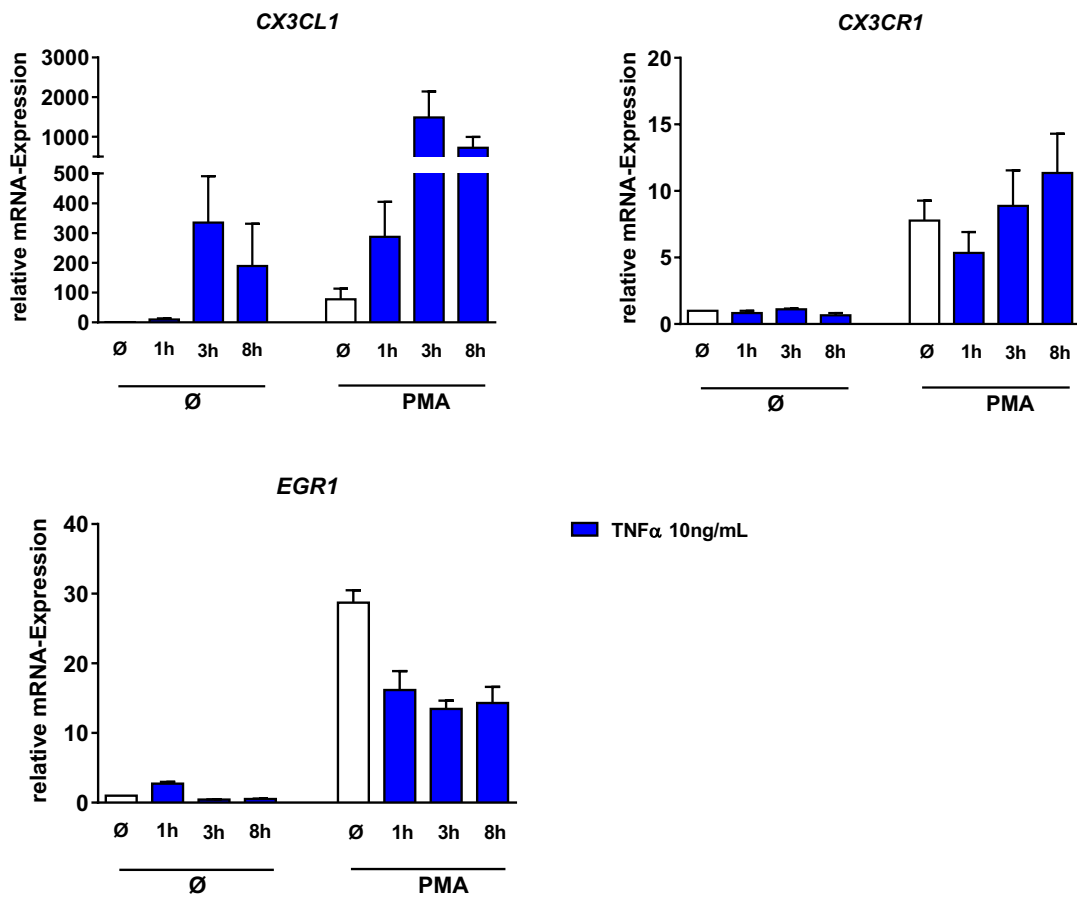


Abbildung 17: Zeitlicher Einfluss von TNF α auf die *CX3CL1*- und *CX3CR1*-Expression in differenzierten K562-Zellen

Die *CX3CL1*, *CX3CR1* und *EGR1*-Expression wurde mithilfe der RT-qPCR analysiert und gegen *HPRT* normalisiert (n=3). Die unbehandelten, unstimulierten Proben wurden gleich 1 gesetzt. Die Zellen wurden 4 Tage mit PMA differenziert und anschließend 1h, 3h oder 8h mit TNF α stimuliert.

Probe	CT-Wert <i>CX3CL1</i>			CT-Wert <i>CX3CR1</i>			CT-Wert <i>HPRT</i>		
Versuch	A	B	C	A	B	C	A	B	C
\emptyset, \emptyset	40,000	37,592	40,000	32,304	31,683	32,625	22,423	21,996	22,978
	40,000	37,625	40,000	32,768	31,774	32,965	22,265	21,605	22,853
$\emptyset, \text{TNF}\alpha$ 1h	36,574	34,636	40,000	33,187	32,047	32,924	21,932	21,966	23,089
	35,246	34,724	37,448	33,006	31,966	32,795	22,139	21,687	23,167
$\emptyset, \text{TNF}\alpha$ 3h	30,386	30,580	31,653	31,967	31,953	32,409	22,061	21,618	22,944
	30,527	30,498	32,382	31,905	31,089	32,979	21,923	21,515	23,054
$\emptyset, \text{TNF}\alpha$ 8h	30,692	32,134	33,484	32,125	32,787	34,533	21,968	21,626	23,096
	30,862	31,649	36,443	32,293	31,551	34,342	21,919	21,646	22,973
PMA, \emptyset	35,578	34,745	35,389	31,221	30,373	32,203	24,746	23,672	23,693
	34,894	34,487	35,919	31,327	30,587	31,919	24,111	23,483	25,319
PMA, $\text{TNF}\alpha$ 1h	33,543	31,979	32,315	31,603	31,977	31,764	24,410	23,156	23,846
	32,972	32,006	31,686	31,027	30,355	31,853	24,008	23,108	23,890
PMA, $\text{TNF}\alpha$ 3h	31,257	30,173	29,533	30,597	29,864	32,046	24,118	23,305	23,953
	31,463	30,581	29,702	30,666	30,074	31,473	24,245	23,156	23,903
PMA, $\text{TNF}\alpha$ 8h	31,683	31,168	32,192	31,340	29,211	31,570	24,155	23,390	24,412
	31,248	31,134	32,584	31,544	29,397	31,314	24,814	23,562	24,523

Tabelle 3: Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ auf die *CX3CL1*-Expression in differenzierten K562-Zellen, RT-qPCR Rohdaten des Versuchs von Abb. 17

4.3.3.2. Primäre Megakaryozyten

Da bei den K562 alleine der Differenzierungsprozess eine Änderung der Fractalkin- und Fractalkinrezeptor-Expression zeigte, wurden beide Gene in der Zeitreihe der Megakaryopoese untersucht (**Abb. 15**). Dabei konnte bei *Cx3cl1* während den ersten 4 Kulturtagen keine Unterschiede, an Tag 5 und 6 dann eine leicht erhöhte Expression beobachtet werden. Die *Cx3cr1*-Expression blieb nach einem Abfall nach dem ersten Tag SCF-Stimulation vergleichbar konstant.

Schließlich wurde in einem Kombinationsversuch die *Cx3cl1/Cx3cr1*-Expression in fertig differenzierten Megakaryozyten unter Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ sowie zusätzliche FeCl_3 - und DFX-Inkubation untersucht (**Abb. 18**). In der Real-Time qPCR-Analyse zeigte sich eine ca. 1,5-fache Induktion der *Cx3cl1*-Expression unter $\text{IFN}\gamma$ - und $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation. Im Gegensatz zu den Endothelzellen konnte allerdings kein verstärkender Effekt durch Kostimulation mit $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ beobachtet werden. Die *Cx3cr1*-Expression wurde durch die $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation erhöht. Ferner konnte ein inhibitorischer Effekt von $\text{IFN}\gamma$ auf die *Cx3cr1*-Expression nachgewiesen werden. Eine DFX-Behandlung führte zu einem leichten Anstieg der Expression von *Cx3cl1* und *Tfrc*,

Slc40a1 war unter dieser Kondition etwas erniedrigt. Nach Inkubation mit 20µM FeCl₃ zeigte sich eine leicht reduzierte *Cx3cl1*-Expression. Die *Tfrc*-Expression reagierte nicht auf die FeCl₃-Stimulation, der eisenregulierende Effekt war bei *Slc40a1* besser zu sehen. Des Weiteren zeigte die *Zip14*-Expression eine potentielle, leichte Eisenregulation die in ihrem Schema der *Cx3cl1*-Expression ähnelte. Diese Tendenz war zumindest bei der DFX-Inkubation auch bei *Slc11a2* zu erkennen.

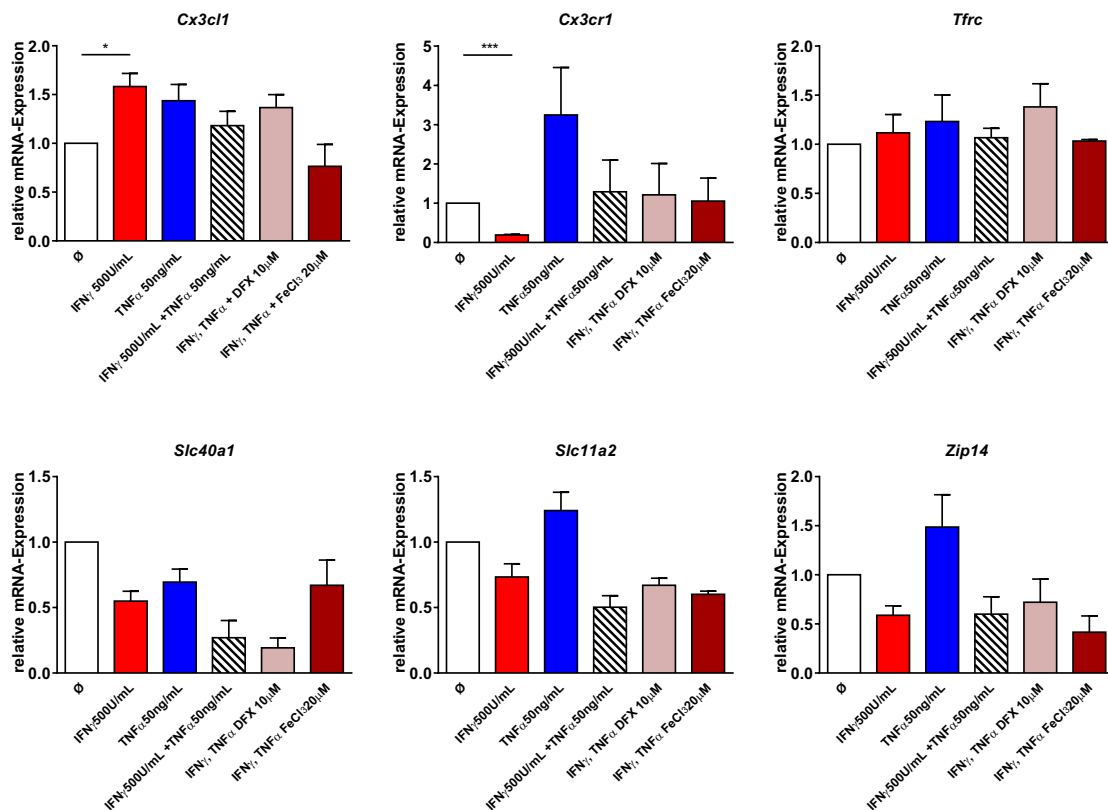


Abbildung 18: Einfluss von IFN γ , TNF α , DFX und FeCl₃ auf die *Cx3cl1*, *Cx3cr1* und Eisengene mRNA-Expression in fertig differenzierten, primären Megakaryozyten

Die *Cx3cl1*, *Cx3cr1* und Eisengene-Expression wurde mithilfe der RT-qPCR analysiert und gegen *Rplp0* normalisiert (n=3). Die unbehandelten, unstimulierten Proben wurden gleich 1 gesetzt. Die Zellen wurden 6 Tage nach angegebenem Protokoll kultiviert, 30min mit DFX und FeCl₃ vorinkubiert und anschließend für 16h mit IFN γ und TNF α stimuliert.

Wie man in **Abbildung 19** erkennen kann, wurden die Megakaryozyten-Proben ebenfalls im Western Blot gegen CX3CL1 gefärbt. Eine klare CX3CL1-Bande war neben vielen unspezifischen Banden nicht nachzuweisen.

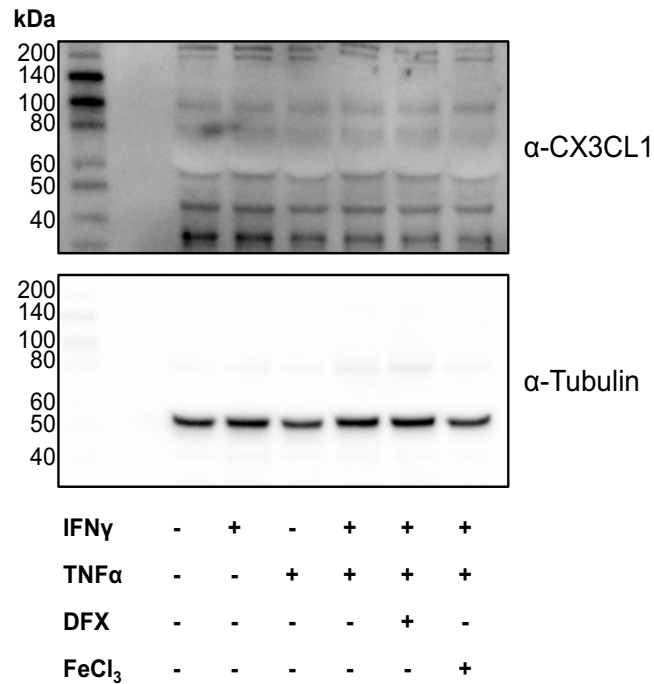


Abbildung 19: CX3CL1-Expression in differenzierten primären Megakaryozyten im Western Blot

Western Blot-Analyse aus Zelllysaten. Die Zellen wurden 6 Tage nach angegebenem Protokoll kultiviert, 30min mit DFX und FeCl₃ vorinkubiert, für 16h mit IFN γ und TNF α stimuliert (die eingesetzten Konzentrationen entsprechen dem Versuch in Abb.18) und anschließend lysiert. Die CX3CL1-Expression wurde mithilfe eines Western Blots untersucht. Der dargestellte Western Blot ist repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

5. Diskussion

5.1. Hepatische Fractalkin-Expression im Modell der Eisenüberladung in *Hfe/Hfe2*-defizienten Mäusen

Die *Hfe*- und *Hfe2*-defizienten Mauslinien stellen etablierte Modelle der Eisenüberladung dar und sind phänotypisch umfangreich beschrieben (97-100). Die Modelle wurden von uns verwendet, um *in vivo* zu untersuchen, ob sich ein Zusammenhang zwischen dem mit der *Hfe*- und *Hfe2*-Defizienz einhergehenden erhöhten Eisenspiegel und der Fractalkin-Expression zeigen lässt. Dabei wurde die Leber als zentrales, für die Akkumulation von überschüssigem plasmatischem Eisen prädisponiertes Organ, zur Untersuchung ausgewählt. Allerdings zeigt sich bei der murinen *Hfe*-Defizienz im Gegensatz zu der humanen HH keine lebenslänglich progressive Eisenladung und die hepatische Entzündung und Fibrosierung fällt milder aus. Tatsächlich steigt die hepatische Eisenladung primär in den ersten postnatalen Wochen an und erreicht nach 8-12 Wochen eine Plateau-Phase (101). Dementsprechend wurde das Alter der benutzten Tiere mit 3 und 4 Monaten bewusst jung gewählt, um einerseits einen ausgeprägten Phänotyp der Eisenüberladung zu erhalten, andererseits aber die Ausprägung einer Entzündung durch zeitlich langem oxidativen Stress, und damit eine inflammatorisch bedingte Veränderung der Fractalkin-Expression, zu reduzieren.

Was die *Hfe*^{-/-}-Mäuse betrifft, so stimmen die hier gefundenen Ergebnisse (**Abb. 5**) einer reduzierten *Hamp*- und *Tfrc*- sowie einer erhöhten *Slc40a1*-Expression mit Genexpressionsanalysen (100, 102) überein. Ferner konnten wir die von Fleming *et al.* (103) beschriebene, nicht signifikant reduzierte Expression von *Tfr2* in *Hfe*^{-/-}-Mäusen reproduzieren. Im Gegensatz zu *Hfe* stehen für *Hfe2*^{-/-}-Mäuse noch keine ausführlichen Genexpressionsanalysen zur Verfügung. Wir konnten neben der bekannten reduzierten *Hamp*-Expression und erhöhten *Slc40a1*-Expression (99), eine gehemmte *Tfrc*-Expression sowie eine leicht erhöhte *Tfr2*-Expression in *Hfe2*^{-/-}-Mäusen beobachten. Interessanterweise war *Slc11a2* in *Hfe2*^{-/-} Tieren erhöht, was die

Hypothese einer wichtigen pathophysiologischen Rolle von NTBI-Aufnahmewegen in der hepatischen Eisenüberladung unterstützt. Die Fractalkin-Expression war in beiden KO-Mäusen ca. 1,3x erhöht und könnte auf eine durch die Eisenüberladung bedingte Regulation von Fractalkin durch freies molekulare Eisen deuten. Allerdings ist bei Leberschäden eine erhöhte Fractalkin-Expression in der Literatur beschrieben und könnte hier durch oxidativ bedingte Entzündung induziert worden sein (78). Passend dazu waren in den *Hfe2^{-/-}* Tieren die Expression von C-reaktives-Protein (*Crp*) und Serum Amyloid A2 (*Saa2*), beides akute-Phase-Proteine und Marker für diverse Inflammationsreaktionen, erhöht. Jedoch konnten in den *Hfe^{-/-}* Tieren keine *Crp* und *Saa2*-Erhöhung und ferner in keinen der beiden KO-Tier-Gruppen eine erhöhte *Ccl2*-Expression nachgewiesen werden. Bei CCL2 handelt es sich um ein Monozyten-rekrutierendes Chemokin. Diese Resultate deuten auf keine Entzündung in den *Hfe^{-/-}* Mäusen und einen beginnenden entzündlichen Prozess in den *Hfe2^{-/-}* Mäusen hin und passt zu dem schneller progressiv und schlimmer verlaufenden Bild der HH Typ 2A. Warum sich die Fractalkin-Expressionen in beiden KO-Mäusen nicht deutlicher unterscheiden, ob die beobachtete *Cx3cl1*-Expression entzündungsbedingt ist und welchen Einfluss der erhöhte Eisenspiegel auf die Fractalkin-Expression hat, bleibt somit unklar.

5.2. Fractalkin-Expression und -Regulation in Endothelzellen

Endothelzellen sind starke Fractalkin-produzierende Zellen. Ferner zeigt diese Expression, neben einem konstitutiven, einen induzierbaren Charakter, welchen wir uns als verstärkenden Faktor zur Untersuchung einer potentiellen Eisenregulation von Fractalkin zunutze gemacht haben. Die murine MS1-Endothelzelllinie (sinusoidale Endothelzellen aus den Langerhans-Inseln des Pankreas) zeigte nach IFN γ -Stimulation die stärkste Induktion der *Cx3cl1*-mRNA-Expression (**Abb. 6**). Diese Expression stieg in Beziehung zu der Dauer der IFN γ -Stimulation auf über das 10-fache an. Die Eisenchelatierung mit DFX führte zu einem deutlichen Anstieg der Fractalkin-Expression, die Inkubation mit FeCl₃ zeigte dagegen keine Unterschiede, auch nicht bei hoher Konzentration von 20 μ M. Erstaunlicherweise konnte diese Regulation nicht auf

Proteinebene bestätigt werden, da weder die Durchflusszytometrie (**Abb. 8a**) noch die Western Blot-Analyse (**Abb. 9a**) zu einem deutlichen Proteinnachweis führte. Schulz *et al.* (83) zeigten in humanen, umbilikalen Venen-Endothelzellen (HUVECs), dass die Stimulation alleine mit IFN γ oder TNF α zu einer nur sehr geringen Induktion der Fractalkin-Proteinexpression führte. Die IFN γ +TNF α -Kostimulation äußerte sich dagegen in einer starken Fractalkin-Induktion. Dieser Synergismus wird in der Literatur einerseits durch transkriptionale Regulation durch synergistische Stimulation der Fractalkin-Promotoraktivität, aber auch durch posttranskriptionale Mechanismen erklärt (104). In einem angepassten Versuch (**Abb. 8b**) zeigten die MS1-Zellen jedoch auch nach IFN γ +TNF α -Kostimulation keine veränderte Fractalkin-Expression. Die zum Ausschluss von technischen Fehlern durchgeführte Untersuchung der verschiedenen Zytokinsignalwege (**Abb. 9b**) zeigte eine regelrechte Phosphorylierung von STAT1 durch IFN γ , p38-Phosphorylierungen durch TNF α /IL-1 β sowie I κ B α -Degradation, und erklärt somit die fehlende Proteinantwort nicht. Da MS1 immortalisierte Zellen sind, könnte der Immortalisierungsprozess anhand SV40-Transformation neben gewollten zellulären Veränderungen auch zu einer Beeinträchtigung der Proteinsynthese von Fractalkin geführt haben, der genaue Grund der fehlenden Proteinantwort ist aber unklar.

Um beobachtete Effekte auch auf Proteinebene untersuchen zu können, wurden analoge Versuche mit HUVECs durchgeführt. In den HUVECs führte die IFN γ -Stimulation zu einer ca. 250-fachen, also im Vergleich zu den MS1 deutlich stärkeren, CX3CL1-mRNA-Induktion (**Abb. 10**). Ferner konnte der schon beschriebene Synergismus von IFN γ und TNF α auf die Fractalkin-Expression gezeigt werden, was in einer potenten, ca. 12000-fach erhöhten Fractalkin-mRNA-Expression resultierte. Im Gegensatz zu den MS1-Zellen, führte die DFX-Behandlung in HUVECs zu einer reduzierten Fractalkin-Expression, was den Resultaten von Yamashita *et al.* (88) entspricht. Zusätzlich standen die im Western Blot gefundenen Ergebnisse der Proteinexpression (**Abb. 11a**) im Verhältnis zu den in der RT-qPCR gemessenen Effekten auf RNA-Ebene. Untersuchungen der molekularen transkriptionalen Regulationsmechanismen von Fractalkin konnten u.a. NF κ B, STAT1/STAT3 und

Aktivator-Protein 1 (AP1) als Transkriptionsfaktoren bedeutender Rolle für die Fractalkin-Induktion identifizieren (105). In unserer Western Blot-Analyse der Zytokinsignalwege (**Abb. 11b**) konnte der Effekt von DFX v.a. mit einer reduzierten Phosphorylierung von STAT1, sowohl an Tyrosin 701 als an Serin 727, verbunden werden. Allgemein ist der Effekt von DFX auf den STAT1-Signalweg wenig untersucht: teilweise wird der von uns gefundene inhibitorische Effekt von DFX auf die STAT1-Phosphorylierung in der Literatur bestätigt (106), andere Studien berichten jedoch genau umgekehrt von einem stimulierenden Effekt von DFX (107, 108).

Die zwei verschiedenen Endothelzellen zeigten also beide eine deutliche Reaktion auf DFX, obwohl sich die Richtung der Regulation unterschied. Allerdings konnte in keinen der beiden Endothelzellen eine deutliche Veränderung der Fractalkin-Expression auf erhöhte Eisenspiegel durch FeCl₃ festgestellt werden, was sich von dem Expressionsmuster der Positivkontrolle *TFRC*, welche ein bestätigtes 3'-UTR-IRE besitzt, drastisch unterscheidet (**Abb. 7 und Abb. 10**). Zusammengefasst lassen unsere Ergebnisse nicht klar auf eine Eisen-Regulation von Fractalkin schließen, was das Vorhandensein eines regulierenden IRE in der *CX3CL1*-mRNA in Endothelzellen unwahrscheinlich macht. Ferner zeigten neuere verfeinerte Algorithmen zur Untersuchung der im Genom verschiedener Spezies vorkommender IREs, dass es sich bei dem IRE des Fractalkin-Gens um ein auf dem anti-sense Strang lokalisiertes IRE handelt, was erklärt, warum die klassische Eisenregulation hier nicht zu beobachten war. Leider standen diese bioinformatischen Ergebnisse erst nach Abschluss der Experimente zur Verfügung. Da DFX zusätzlich hypoxie-mimetische Eigenschaften in der Stabilisierung von HIF-1 besitzt (109), könnten die beobachteten Resultate jedoch auf HIF-Regulation von Fractalkin in Endothelzellen deuten. Weitere Untersuchungen, u.a. ein genetisches Screening des Fractalkin Gens auf ein HRE, sind nötig.

Was die Abweichungen der DFX-bedingten Fractalkin-Expression in MS1 verglichen mit HUVECs betrifft, so handelt es sich bei beiden um verschiedene Spezies und verschiedene Anteile des blutleitenden Systems: die einen murin sinusoidal, die anderen human venös. Es ist denkbar, dass unter inflammatorischen Zuständen mit

Hypoxie/Eisenmangel eine erhöhte Fractalkin-Expression im sinusoidalen System zu einer verstärkten Rekrutierung und Einwanderung von Leukozyten in das Zielgewebe führt, das „Aufhalten“ von Leukozyten im venösen System jedoch durch niedrige Fractalkin-Expression verhindert wird.

5.3. Eisenhaushalt in der Megakaryopoese

Thrombozyten besitzen keinen Zellkern und ihre Fähigkeit zur begrenzten Neusynthese von Proteinen basiert auf, von Megakaryozyten (MKs) zur Verfügung gestellter, mRNA. Zur in vitro Untersuchung von Regulationsmechanismen in Thrombozyten ist daher die Kultivierung von MKs am besten geeignet. Die Gewinnung und Kultivierung von primären MKs erweist sich jedoch als zeitaufwendig und teuer, weshalb mehrere Zelllinien, hauptsächlich etabliert aus Blut von Leukämiepatienten, zur Verfügung stehen (110). In dieser Arbeit wurden K562-Zellen, undifferenzierte menschliche Knochenmarkzellen mit chronisch-myeloisch-leukämischen Hintergrund, durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), ein Proteinkinase C-Aktivator, zum Einschlagen des megakaryopoetischen Differenzierungswegs gebracht und mit primären murinen MKs verglichen. Beim Betrachten der Resultate ist zu beachten, dass die differenzierten K562-Zellen eher als megakaryoblastäre Zwischenstufen anzusehen sind und deshalb nur eine Annäherung der megakaryopoetischen Differenzierung darstellen. Die primären murinen MKs konnten dagegen bis zum Stadium der Proplättchen-Absonderung kultiviert werden (**Abb. 14**) (95), und sind daher als reife MKs anzusehen. Die erfolgreiche PMA-Stimulation der K562 wurde, wie in der Literatur beschrieben (110, 111), durch veränderte Morphologie (**Abb. 12a**), Hemmung der Proliferation (**Tab. 2**), Protein-Expression des Megakaryozytenmarkers Integrin alpha IIb (CD41a, *ITGA2B*) (**Abb. 12b**) und mRNA-Expression von *ITGA2B* sowie Glykoprotein Ib alpha- und beta-Untereinheit (*GP1BA*, *GP1BB*) bestätigt (**Abb. 13**). Auch in den primären MKs spiegelten die *Itga2b*- und *Gp1ba*-mRNA-Expressionen das Fortschreiten des morphologisch beobachteten Differenzierungsprozesses wider (**Abb. 14+15**). Der Eisenhaushalt während der Megakaryopoese ist in der Literatur nur schlecht untersucht und wurde zum Zeitpunkt dieser Arbeit nur in einer Studie beschrieben

(91). Den Resultaten von Wandzik *et al.* (91) entsprechend, konnten wir eine starke Herunterregulation der Ferroportin-Expression während der megakaryopoetischen Differenzierung, sowohl in den differenzierten K562-Zellen (**Abb. 13**) als in den primären MKs (**Abb. 15**), beobachten. Dagegen konnte bei unseren Versuchen, weder bei den differenzierten K562 noch bei den primären MKs, eine deutliche Veränderung der *TFRC*-Expression gefunden werden. Ferner zeigte sich bei unseren K562-Versuchen, wie bei Wandzik *et al.* (91), eine erhöhte *HFE*-Expression während der Differenzierung. Dagegen blieb die *Hfe*-Expression in den primären MKs nach initialem Abfall relativ konstant. Diese Resultate lassen also entweder auf keine deutliche Rolle von HFE in der megakaryopoetischen Differenzierung oder auf einen Unterschied zwischen Mensch und Maus schließen. Zusätzlich zeigte die Untersuchung von, vor dieser Arbeit noch nicht in der Megakaryopoese analysiertem, *HFE2*, eine Augmentation der Expression in sowohl differenzierten K562 als auch primären MKs, bei Letzteren spezifisch in den letzten zwei Tagen des Differenzierungsprozesses.

Diese Resultate deuten auf einen erhöhten, hauptsächlich durch Hemmung des Eisenexports durch Ferroportin verursachten, Eisenspiegel in sich differenzierenden Megakaryozyten hin. Dies wird von neuen durchgeführten Untersuchungen dieser AG unterstützt, welche normale Thrombozytenzahlen in Mäusen mit Plättchen-spezifischer Ferroportin-Defizienz, jedoch einen thrombozytopenischen Phänotyp bei Plättchen-spezifischen Transferrinrezeptor-defizienten Mäusen feststellen konnten (unpublizierte Daten). Wandzik *et al.* (91) schlagen vor, dass diese durch Ferroportin-Hemmung vermittelte Eisenakkumulation einer Reduktion der zellulären Eisenkonzentration durch Vergrößerung des zytoplasmatischen Kompartiments im Rahmen der Differenzierung entgegensteuert. Was die Funktion von HFE2 betrifft, so berichten Lin *et al.* (112), dass HFE2 in einer Zell-assoziierten aber auch löslichen Form vorkommt. Dabei fungiert die zelluläre HFE2-Form wie beschrieben als positiver Regulator der Heparin-Expression (27), die lösliche Form scheint dagegen ein Gegenspieler von Heparin zu sein (112). In unserem Kontext der Megakaryopoese bleibt die Funktion vom zellulären HFE2 also unklar, da Megakaryozyten selbst kein Heparin produzieren. Die erhöhte *HFE2*-Expression in reifen MKs könnte jedoch zu

einer Verschiebung des Gleichgewichts von zellulärem/löslichem HFE2 zugunsten des löslichen HFE2 führen und dementsprechend, über Reduzierung von hepatischer Hepcidin-Produktion, der Ferroportin-Hemmung auf Proteinebene entgegenwirken. Dieser *feedback*-Mechanismus zwischen megakaryopoetischen Kompartiment und hepatischer Hepcidin-Produktion könnte eine fein regulierte Alternative zur direkten transkriptionalen Regulation von megakaryopoetischem Ferroportin sein, da reife MKs noch immer einen erhöhten Eisenbedarf im Rahmen der Plättchen-Produktion durch die sich ständig abspielende Absonderung von Zytoplasmaanteilen und damit einhergehenden Eisenverlusten haben, dieser Eisenzufuhrbedarf jedoch im Vergleich zu sich differenzierenden MKs weniger stark ausgeprägt sein könnte. Weitere Untersuchungen der Rolle von HFE2 in Megakaryozyten sind nötig.

Was den Einfluss von Eisenmangel/Eisenüberschuss während der megakaryopoetischen Differenzierung betrifft, so konnten wir während des letzten Tags der Megakaryopoese keine Veränderungen in Morphologie und *Itga2b/Gp1ba*-Expression der primären MKs (**Abb. 16**) nach verschiedenen FeCl_3 /DFX-Behandlungen feststellen. Interessanterweise konnten unter diesen Konditionen ebenfalls keine charakteristischen IRE/IRP-bedingten Veränderungen der *Slc40a1*-Expression in differenzierten MKs beobachtet werden. Dies unterstützt die Hypothese, dass die durch die Differenzierung bedingte transkriptionale Regulation von Eisengenen den IRE/IRP-Regulationsmechanismus ausschalten (91).

5.4. CX3CL1/CX3CR1-Expression in Megakaryozyten und pathophysiologische Rolle der Fractalkin-Achse

Seit dem ersten Bericht über Fractalkin 1997 durch Bazan *et al.* (53), wurden der CX3CL1/CX3CR1-Achse, bedingt durch die außergewöhnlichen Funktionen von Fractalkin in sowohl Chemotaxis als auch Adhäsion, zahlreiche wichtige (patho-)physiologischen Rollen zugewiesen. Im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen wurde die Rolle von CX3CR1 in Plättchen, aber nicht Megakaryozyten, bereits teilweise untersucht, die Rolle von Plättchen-produziertem CX3CL1 im inflammatorischen Kontext ist jedoch schlecht erforscht. Um festzustellen, ob Plättchen eine induzierbare

Fractalkin-Expression aufweisen, wurden PMA-differenzierte K562-Zellen sowie reife primäre MKs mit Zytokinen stimuliert. Dabei wurde beobachtet, dass TNF α -Stimulation von undifferenzierten und differenzierten K562 Zellen zu einer erhöhten *CX3CL1*-Expression führte. Interessanterweise rief die PMA-Differenzierung alleine eine verstärkte Fractalkin-Expression hervor (**Abb. 17**). Die TNF α -abhängigen *CX3CL1*-Expressionen waren in den differenzierten im Vergleich zu den undifferenzierten Zellen stärker ausgeprägt, wobei die relative Fractalkin-Induktion von undifferenzierten Zellen durch TNF α höher war. Dementsprechend könnte Fractalkin in Megakaryozyten basal höher exprimiert sein und in der Folge weniger stark durch TNF α induzierbar sein. Da es sich bei den benutzten differenzierten K562-Zellen um megakaryoblastäre Zwischenstufen handelt und zusätzlich bei der Kultivierung der primären MKs eine Aufreinigung mittels BSA-Gradienten durchgeführt wurde, stellte sich letztere als überlegenes Modell für die Untersuchung der Fractalkin-Expression heraus. Allerdings führte die Stimulation von primären MKs mit IFN γ , TNF α und Kostimulation mit beiden (**Abb. 18**) zu keiner starken, mit der in Endothelzellen vergleichbaren, Erhöhung der *Cx3cl1*-Expression, was gegen die Arbeitshypothese einer stark induzierbaren Fractalkin-Expression auf Megakaryozyten spricht. Ob diese nur geringe Fractalkin-Induktion auf murinen primären MKs einen Unterschied zwischen Mensch und Maus darstellt und ob die in differenzierten K562-Zellen beobachtete hohe Fractalkin-Induktionen möglicherweise durch Kontamination durch restliche undifferenzierten Knochenmarkszellen hervorgerufen wurde, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Des Weiteren spielen Plättchen eine wichtige Rolle in der Immunantwort inflammatorischer Prozesse, indem sie u.a. mit Monozyten, Neutrophilen, dendritischen Zellen, Lymphozyten und Endothelzellen, alles CX3CL1⁺-Zellen, interagieren und an diese adhären (113). Was die *CX3CR1*-Expression betrifft, so wird in der Literatur beschrieben, dass Plättchenaktivierung einerseits durch CX3CL1/CX3CR1-Interaktion ausgelöst werden kann und ferner eine erhöhte Expression von CX3CR1 hervorruft (114). Interessanterweise führte in unseren Versuchen die TNF α -Stimulation zu einer ca. 3-fach erhöhten *Cx3cr1*-Expression in

reifen MKs (**Abb. 18**). Dementsprechend könnten erhöhte TNF α -Spiegel, welche in zahlreichen Zuständen akuter und chronischer Inflammation beschrieben sind (115), in MKs eine verstärkte CX3CR1-Expression bewirken und damit möglicherweise eine verstärkte Thrombozyten-Interaktion mit CX3CL1⁺-Zellen hervorrufen. In der Folge könnte dies in einer verstärkten Plättchenaktivierung resultieren. Dabei scheint der Fractalkinrezeptor eine wichtige Rolle als besonders schneller Adhäsionsmediator zu spielen, da die CX3CL1/CX3CR1 vermittelte Adhäsion nur 60ms dauert und damit viel schneller als der klassische Weg des Integrin-Systems (durchschnittlich 190ms) abläuft (116). Zusammengefasst stellen unsere Ergebnisse eine zusätzliche Seite der facettenreichen Rolle von Plättchen in der Immunantwort unter inflammatorischen Bedingungen dar.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das einzige bis jetzt bekannte Mitglied der CX3C-Chemokinfamilie und in seiner löslichen Form als Chemokin, in seiner membranständigen Form jedoch als Adhäsionsmolekül wirkende, Fractalkin (*CX3CL1*) auf eine putative Regulation durch molekulares Eisen im Sinne des klassischen IRE/IRP-Weges untersucht. Zuerst wurden *Hfe*- und *Hfe2*-defiziente Mauslinien benutzt, um in vivo zu untersuchen, ob sich ein Zusammenhang zwischen dem mit der *Hfe*- und *Hfe2*-Defizienz einhergehenden erhöhten Eisenspiegel und der Fractalkin-Expression zeigen lässt. Die Fractalkin-mRNA-Expression war in den für die Akkumulation von überschüssigem Eisen prädisponierten Lebern beider KO-Mäuse ca. 1,3x erhöht, es bleibt aber unklar ob dies entzündungsbedingt war oder auf eine Regulation durch erhöhte Eisenspiegel hindeuten lässt. Da Endothelzellen unter Stimulation mit Zytokinen im Rahmen von Entzündung vermehrt entzündliche Chemokine exprimieren und Fractalkin initial von Bazan *et al.* (53) als induzierbares Chemokin auf Endothelzellen nachgewiesen wurde, wurden anschließend die MS1-Zelllinie (sinusoidale Endothelzellen aus den Langerhans-Inseln des Pankreas) und HUVECs (humane, umbilikalen Venen-Endothelzellen) in Zellkulturversuchen untersucht. Beide zeigten eine starke Induktion der Fractalkin-mRNA-Expression, die MS1-Zellen nach $IFN\gamma$ -Stimulation, die HUVECs am stärksten nach synergistischer Stimulation mit $IFN\gamma+TNF\alpha$. In keiner der beiden Endothelzellen konnte eine deutliche Veränderung der Fractalkin-Expression auf erhöhte Eisenspiegel durch $FeCl_3$ festgestellt werden. Allerdings zeigten beide Zelllinien eine deutliche Reaktion auf Eisenchelatierung durch DFX, obwohl sich die Richtung der Regulation unterschied: in MS1-Zellen führte DFX zu einer Erhöhung, in HUVECs dagegen zu einer Reduzierung der Fractalkin-Expression. Zusammengefasst lassen unsere Ergebnisse nicht klar auf eine Eisen-Regulation von Fractalkin schließen, was das Vorhandensein eines regulierenden IRE in der *CX3CL1*-mRNA in Endothelzellen unwahrscheinlich macht. Da DFX zusätzlich Hypoxiemimetische Eigenschaften in der Stabilisierung von HIF-1 besitzt (109), könnten die beobachteten Resultate jedoch auf HIF-Regulation von Fractalkin in Endothelzellen

deuten. Weitere Untersuchungen, u.a. eine genetische Sequenzanalyse des Fractalkin Gens auf ein HRE, sind nötig.

Zusätzlich wurde die Expression von Eisenhaushaltgenen in der Megakaryopoese sowie der Einfluss von Eisen auf die megakaryopoetische Differenzierung untersucht. Dazu wurden PMA-differenzierte K562-Zellen und aus Mäusen gewonnene primäre Megakaryozyten verwendet. In beiden konnten wir, den Resultaten von Wandzik *et al.* (91), die jedoch nur K562 Zellen untersuchten, entsprechend, eine starke Herunterregulation der Ferroportin-Expression während der megakaryopoetischen Differenzierung feststellen. Zusätzlich zeigte sich eine Augmentation der *HFE2*-Expression aber keine deutliche Veränderung der *TFRC*-Expression. Diese Resultate deuten auf einen erhöhten, hauptsächlich durch Hemmung des Eisenexports durch Ferroportin verursachten, Eisenspiegel in sich differenzierenden Megakaryozyten hin. Dies wird von neuen durchgeführten Untersuchungen dieser AG unterstützt, welche normale Thrombozytenzahlen in Mäusen mit Plättchen-spezifischer Ferroportin-Defizienz, jedoch einen thrombozytopenischen Phänotyp bei Plättchen-spezifischen Transferrinrezeptor-defizienten Mäusen feststellen konnten (unpublizierte Daten). Ferner berichten wir zum ersten Mal von einer potentiell wichtigen Rolle von *HFE2* in Megakaryozyten, welche jedoch molekular unklar bleibt. Weitere Untersuchungen der Rolle von *HFE2* in Megakaryozyten sind nötig. Was den Einfluss von Eisenmangel/Eisenüberschuss während der megakaryopoetischen Differenzierung betrifft, so zeigte die Inkubation mit FeCl_3 und DFX am letzten Tag der Differenzierung der primären Megakaryozyten keinen Einfluss auf Morphologie und Expression der megakaryozytären Marker *Itga2b* und *Gp1ba*.

Schließlich wurde in den benutzten Megakaryozyten-Modellen untersucht, ob Plättchen neben einer schon beschriebenen geringen konstitutiven *CX3CL1*-Expression, welcher keine große pathophysiologische Funktion zugeordnet wird, auch eine, mit Endothelzellen vergleichbare, induzierbare Expression aufweisen und diese eine verstärkende parakrine/autokrine Wirkung auf den inflammatorischen Prozess in Zuständen akuter und/oder chronischer Entzündung haben könnte. Dabei wurde

beobachtet, dass $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation von undifferenzierten und differenzierten K562-Zellen zu einer erhöhten *CX3CL1*-Expression führte. Allerdings führte die Stimulation von primären MKs mit $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ und Kostimulation mit beiden zu keiner deutlichen, mit der in Endothelzellen vergleichbaren, Erhöhung der *Cx3c1*-Expression. Ob diese nur geringe Fractalkin-Induktion auf murinen primären MKs einen Unterschied zwischen Mensch und Maus darstellt und ob die in differenzierten K562-Zellen beobachtete hohe Fractalkin-Induktionen möglicherweise durch Kontamination durch restliche undifferenzierten Knochenmarkszellen hervorgerufen wurde, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Interessanterweise führte in unseren Versuchen die $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation zu einer ca. 3-fach erhöhten *Cx3cr1*-Expression in reifen MKs. Dementsprechend könnten erhöhte $\text{TNF}\alpha$ -Spiegel, welche in zahlreichen Zuständen akuter und chronischer Inflammation beschrieben sind (115) in MKs eine verstärkte *CX3CR1*-Expression bewirken und damit möglicherweise eine verstärkte Thrombozyten-Interaktion mit *CX3CL1*⁺-Zellen hervorrufen. In der Folge könnte dies in einer verstärkten Plättchenaktivierung resultieren. Zusammengefasst stellen unsere Ergebnisse eine zusätzliche Seite der facettenreichen Rolle von Plättchen in der Immunantwort unter inflammatorischen Bedingungen dar.

7. Literaturverzeichnis

1. Silva B, Faustino P. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852:1347-1359.
2. Siah CW, Ombiga J, Adams LA, Trinder D, Olynyk JK. Normal iron metabolism and the pathophysiology of iron overload disorders. *Clin Biochem Rev* 2006;27:5-16.
3. MacKenzie EL, Iwasaki K, Tsuji Y. Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:997-1030.
4. Jacobs A. Iron deficiency and iron overload. *Crit Rev Oncol Hematol* 1985;3:143-186.
5. Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1996;1275:161-203.
6. Morikawa K, Oseko F, Morikawa S. A role for ferritin in hematopoiesis and the immune system. *Leuk Lymphoma* 1995;18:429-433.
7. Fleming RE, Ponka P. Iron overload in human disease. *N Engl J Med* 2012;366:348-359.
8. Gozzelino R, Arosio P. Iron Homeostasis in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 2016;17.
9. Beaumont C. [Molecular mechanisms of iron homeostasis]. *Med Sci (Paris)* 2004;20:68-72.
10. Canonne-Hergaux F, Zhang AS, Ponka P, Gros P. Characterization of the iron transporter DMT1 (NRAMP2/DCT1) in red blood cells of normal and anemic mk/mk mice. *Blood* 2001;98:3823-3830.
11. Ponka P. Cellular iron metabolism. *Kidney Int Suppl* 1999;69:S2-11.
12. Camaschella C, Pagani A, Nai A, Silvestri L. The mutual control of iron and erythropoiesis. *Int J Lab Hematol* 2016;38 Suppl 1:20-26.
13. Camaschella C, Roetto A, De Gobbi M. Genetic haemochromatosis: genes and mutations associated with iron loading. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002;15:261-276.
14. Trinder D, Baker E. Transferrin receptor 2: a new molecule in iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:292-296.
15. Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H, Knutson MD, Cousins RJ. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:13612-13617.
16. Jeong J, Eide DJ. The SLC39 family of zinc transporters. *Mol Aspects Med* 2013;34:612-619.
17. Daher R, Karim Z. Iron metabolism: State of the art. *Transfus Clin Biol* 2017;24:115-119.
18. Jenkitkasemwong S, Wang CY, Mackenzie B, Knutson MD. Physiologic implications of metal-ion transport by ZIP14 and ZIP8. *Biometals* 2012;25:643-655.

19. Feder JN. The hereditary hemochromatosis gene (HFE): a MHC class I-like gene that functions in the regulation of iron homeostasis. *Immunol Res* 1999;20:175-185.
20. Zhang AS, Xiong S, Tsukamoto H, Enns CA. Localization of iron metabolism-related mRNAs in rat liver indicate that HFE is expressed predominantly in hepatocytes. *Blood* 2004;103:1509-1514.
21. Bastin JM, Jones M, O'Callaghan CA, Schimanski L, Mason DY, Townsend AR. Kupffer cell staining by an HFE-specific monoclonal antibody: implications for hereditary haemochromatosis. *Br J Haematol* 1998;103:931-941.
22. Lebron JA, Bennett MJ, Vaughn DE, Chirino AJ, Snow PM, Mintier GA, Feder JN, et al. Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell* 1998;93:111-123.
23. Bridle KR, Frazer DM, Wilkins SJ, Dixon JL, Purdie DM, Crawford DH, Subramaniam VN, et al. Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet* 2003;361:669-673.
24. Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, Campagna JA, et al. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet* 2006;38:531-539.
25. Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald ML, Franchini PL, Dube MP, Andres L, et al. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 2004;36:77-82.
26. Anderson ER, Shah YM. Iron homeostasis in the liver. *Compr Physiol* 2013;3:315-330.
27. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 2010;142:24-38.
28. Hasebe T, Tanaka H, Sawada K, Nakajima S, Ohtake T, Fujiya M, Kohgo Y. Bone morphogenetic protein-binding endothelial regulator of liver sinusoidal endothelial cells induces iron overload in a fatty liver mouse model. *J Gastroenterol* 2017;52:341-351.
29. Steinbicker AU, Bartnikas TB, Lohmeyer LK, Leyton P, Mayeur C, Kao SM, Pappas AE, et al. Perturbation of hepcidin expression by BMP type I receptor deletion induces iron overload in mice. *Blood* 2011;118:4224-4230.
30. Fleming RE. Hepcidin activation during inflammation: make it STAT. *Gastroenterology* 2007;132:447-449.
31. Wilkinson N, Pantopoulos K. The IRP/IRE system in vivo: insights from mouse models. *Front Pharmacol* 2014;5:176.
32. Zhang DL, Ghosh MC, Rouault TA. The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis - an update. *Front Pharmacol* 2014;5:124.

33. Elks PM, Renshaw SA, Meijer AH, Walmsley SR, van Eeden FJ. Exploring the HIFs, buts and maybes of hypoxia signalling in disease: lessons from zebrafish models. *Dis Model Mech* 2015;8:1349-1360.
34. Shah YM, Xie L. Hypoxia-inducible factors link iron homeostasis and erythropoiesis. *Gastroenterology* 2014;146:630-642.
35. Lok CN, Ponka P. Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem* 1999;274:24147-24152.
36. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vaulont S, Haase VH, Nizet V, et al. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest* 2007;117:1926-1932.
37. Stoltzfus RJ. Iron deficiency: global prevalence and consequences. *Food Nutr Bull* 2003;24:S99-103.
38. Miller JL. Iron deficiency anemia: a common and curable disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3.
39. Gross S, Keefer V, Newman AJ. The Platelets in Iron-Deficiency Anemia. I. The Response to Oral and Parenteral Iron. *Pediatrics* 1964;34:315-323.
40. Akan H, Guven N, Aydogdu I, Arat M, Beksac M, Dalva K. Thrombopoietic cytokines in patients with iron deficiency anemia with or without thrombocytosis. *Acta Haematol* 2000;103:152-156.
41. Lopas H, Rabiner SF. Thrombocytopenia associated with iron deficiency anemia. A report of five cases. *Clin Pediatr (Phila)* 1966;5:609-616.
42. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology* 2010;139:393-408, 408 e391-392.
43. Erhardt A, Donner MG, Haussinger D. [Metabolic disorders of the liver. Part 1: Hemochromatosis, Wilson's disease, alpha(1)-antitrypsin-deficiency, Gaucher's disease]. *Dtsch Med Wochenschr* 2010;135:2481-2488.
44. van Bokhoven MA, van Deursen CT, Swinkels DW. Diagnosis and management of hereditary haemochromatosis. *BMJ* 2011;342:c7251.
45. Feder JN, Penny DM, Irrinki A, Lee VK, Lebron JA, Watson N, Tsuchihashi Z, et al. The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:1472-1477.
46. Pantopoulos K. Function of the hemochromatosis protein HFE: Lessons from animal models. *World J Gastroenterol* 2008;14:6893-6901.
47. De Gobbi M, Roetto A, Piperno A, Mariani R, Alberti F, Papanikolaou G, Politou M, et al. Natural history of juvenile haemochromatosis. *Br J Haematol* 2002;117:973-979.

48. Bardou-Jacquet E, Ben Ali Z, Beaumont-Epinette MP, Loreal O, Jouanolle AM, Brissot P. Non-HFE hemochromatosis: pathophysiological and diagnostic aspects. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2014;38:143-154.
49. Darshan D, Frazer DM, Anderson GJ. Molecular basis of iron-loading disorders. *Expert Rev Mol Med* 2010;12:e36.
50. Camaschella C, Poggiali E. Towards explaining "unexplained hyperferritinemia". *Haematologica* 2009;94:307-309.
51. Palomino DC, Marti LC. Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo)* 2015;13:469-473.
52. Roy I, Evans DB, Dwinell MB. Chemokines and chemokine receptors: update on utility and challenges for the clinician. *Surgery* 2014;155:961-973.
53. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997;385:640-644.
54. Bourd-Boittin K, Basset L, Bonnier D, L'Helgoualc'h A, Samson M, Theret N. CX3CL1/fractalkine shedding by human hepatic stellate cells: contribution to chronic inflammation in the liver. *J Cell Mol Med* 2009;13:1526-1535.
55. Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, Tedder TF, Yoshie O, Imai T, Patel DD. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med* 1998;188:1413-1419.
56. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 2015;347:1260419.
57. Ollivier V, Faure S, Tarantino N, Chollet-Martin S, Deterre P, Combadiere C, de Prost D. Fractalkine/CX3CL1 production by human aortic smooth muscle cells impairs monocyte procoagulant and inflammatory responses. *Cytokine* 2003;21:303-311.
58. Imaizumi T, Yoshida H, Satoh K. Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* 2004;11:15-21.
59. Hundhausen C, Schulte A, Schulz B, Andrzejewski MG, Schwarz N, von Hundelshausen P, Winter U, et al. Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes. *J Immunol* 2007;178:8064-8072.
60. Huang YW, Su P, Liu GY, Crow MR, Chaukos D, Yan H, Robinson LA. Constitutive endocytosis of the chemokine CX3CL1 prevents its degradation by cell surface metalloproteases. *J Biol Chem* 2009;284:29644-29653.
61. Combadiere C, Salzwedel K, Smith ED, Tiffany HL, Berger EA, Murphy PM. Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *J Biol Chem* 1998;273:23799-23804.

62. McDermott DH, Fong AM, Yang Q, Sechler JM, Cupples LA, Merrell MN, Wilson PW, et al. Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans. *J Clin Invest* 2003;111:1241-1250.
63. Perros F, Dorfmüller P, Souza R, Durand-Gasselin I, Godot V, Capel F, Adnot S, et al. Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2007;29:937-943.
64. Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, Vyas JM, et al. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 2005;307:254-258.
65. Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 1997;91:521-530.
66. Goda S, Imai T, Yoshie O, Yoneda O, Inoue H, Nagano Y, Okazaki T, et al. CX3C-chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 2000;164:4313-4320.
67. White GE, Greaves DR. Fractalkine: a survivor's guide: chemokines as antiapoptotic mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:589-594.
68. Koizumi K, Saitoh Y, Minami T, Takeno N, Tsuneyama K, Miyahara T, Nakayama T, et al. Role of CX3CL1/fractalkine in osteoclast differentiation and bone resorption. *J Immunol* 2009;183:7825-7831.
69. Mizuno T, Kawanokuchi J, Numata K, Suzumura A. Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system. *Brain Res* 2003;979:65-70.
70. Fuhrmann M, Bittner T, Jung CK, Burgold S, Page RM, Mitteregger G, Haass C, et al. Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 2010;13:411-413.
71. Garin A, Tarantino N, Faure S, Daoudi M, Lecureuil C, Bourdais A, Debre P, et al. Two novel fully functional isoforms of CX3CR1 are potent HIV coreceptors. *J Immunol* 2003;171:5305-5312.
72. Becker Y. The spreading of HIV-1 infection in the human organism is caused by fractalkine trafficking of the infected lymphocytes--a review, hypothesis and implications for treatment. *Virus Genes* 2007;34:93-109.
73. Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Luscinskas FW, Gabuzda D. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med* 2003;197:1701-1707.
74. Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O, Imai T. Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:34-40.
75. Brand S, Hofbauer K, Dambacher J, Schnitzler F, Staudinger T, Pfennig S, Seiderer J, et al. Increased expression of the chemokine fractalkine in Crohn's disease and association of the

- fractalkine receptor T280M polymorphism with a fibrostenosing disease Phenotype. *Am J Gastroenterol* 2006;101:99-106.
76. Blaschke S, Koziol M, Schwarz A, Benohr P, Middel P, Schwarz G, Hummel KM, et al. Proinflammatory role of fractalkine (CX3CL1) in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003;30:1918-1927.
77. Julia V, Staumont-Salle D, Dombrowicz D. [Role of fractalkine/CX3CL1 and its receptor CX3CR1 in allergic diseases]. *Med Sci (Paris)* 2016;32:260-266.
78. Efsen E, Grappone C, DeFranco RM, Milani S, Romanelli RG, Bonacchi A, Caligiuri A, et al. Up-regulated expression of fractalkine and its receptor CX3CR1 during liver injury in humans. *J Hepatol* 2002;37:39-47.
79. Ferretti E, Pistoia V, Corcione A. Role of fractalkine/CX3CL1 and its receptor in the pathogenesis of inflammatory and malignant diseases with emphasis on B cell malignancies. *Mediators Inflamm* 2014;2014:480941.
80. Jones BA, Beamer M, Ahmed S. Fractalkine/CX3CL1: a potential new target for inflammatory diseases. *Mol Interv* 2010;10:263-270.
81. Babendreyer A, Molls L, Dreytmueller D, Uhlig S, Ludwig A. Shear Stress Counteracts Endothelial CX3CL1 Induction and Monocytic Cell Adhesion. *Mediators Inflamm* 2017;2017:1515389.
82. Kerfoot SM, Lord SE, Bell RB, Gill V, Robbins SM, Kubes P. Human fractalkine mediates leukocyte adhesion but not capture under physiological shear conditions; a mechanism for selective monocyte recruitment. *Eur J Immunol* 2003;33:729-739.
83. Schulz C, Schafer A, Stolla M, Kerstan S, Lorenz M, von Bruhl ML, Schiemann M, et al. Chemokine fractalkine mediates leukocyte recruitment to inflammatory endothelial cells in flowing whole blood: a critical role for P-selectin expressed on activated platelets. *Circulation* 2007;116:764-773.
84. Lucas AD, Bursill C, Guzik TJ, Sadowski J, Channon KM, Greaves DR. Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques express the fractalkine receptor CX3CR1 and undergo chemotaxis to the CX3C chemokine fractalkine (CX3CL1). *Circulation* 2003;108:2498-2504.
85. Liu H, Jiang D. Fractalkine/CX3CR1 and atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2011;412:1180-1186.
86. Combadiere C, Potteaux S, Gao JL, Esposito B, Casanova S, Lee EJ, Debre P, et al. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation* 2003;107:1009-1016.
87. Apostolakis S, Spandidos D. Chemokines and atherosclerosis: focus on the CX3CL1/CX3CR1 pathway. *Acta Pharmacol Sin* 2013;34:1251-1256.
88. Yamashita K, Imaizumi T, Hatakeyama M, Tamo W, Kimura D, Kumagai M, Yoshida H, et al. Effect of hypoxia on the expression of fractalkine in human endothelial cells. *Tohoku J Exp Med* 2003;200:187-194.

89. Tang J, Chen Y, Cui R, Li D, Xiao L, Lin P, Du Y, et al. Upregulation of fractalkine contributes to the proliferative response of prostate cancer cells to hypoxia via promoting the G1/S phase transition. *Mol Med Rep* 2015;12:7907-7914.
90. Amsellem V, Abid S, Poupel L, Parpaleix A, Rodero M, Gary-Bobo G, Latiri M, et al. Roles for the CX3CL1/CX3CR1 and CCL2/CCR2 Chemokine Systems in Hypoxic Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2017;56:597-608.
91. Wandzik K, Zahn C, Dassler K, Fuchs H. Substantial changes of cellular iron homeostasis during megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Dev Growth Differ* 2009;51:555-565.
92. Cunha V, Ferreira M, Barosa R, Fonseca AG, Delerue F, Carvalho C. Iron-induced thrombocytopenia in severe iron-deficiency anemia. *Expert Rev Hematol* 2015;8:247-251.
93. Marshall OJ. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 2004;20:2471-2472.
94. Huo XF, Yu J, Peng H, Du ZW, Liu XL, Ma YN, Zhang X, et al. Differential expression changes in K562 cells during the hemin-induced erythroid differentiation and the phorbol myristate acetate (PMA)-induced megakaryocytic differentiation. *Mol Cell Biochem* 2006;292:155-167.
95. Schulze H. Culture, Expansion, and Differentiation of Murine Megakaryocytes from Fetal Liver, Bone Marrow, and Spleen. *Curr Protoc Immunol* 2016;112:22F 26 21-22F 26 15.
96. Cheng T, Wang Y, Dai W. Transcription factor *egr-1* is involved in phorbol 12-myristate 13-acetate-induced megakaryocytic differentiation of K562 cells. *J Biol Chem* 1994;269:30848-30853.
97. Bahram S, Gilfillan S, Kuhn LC, Moret R, Schulze JB, Lebeau A, Schumann K. Experimental hemochromatosis due to MHC class I HFE deficiency: immune status and iron metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:13312-13317.
98. Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE, Parkkila S, Waheed A, Jiang J, Fei Y, et al. HFE gene knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:2492-2497.
99. Vulont S, Lou DQ, Viatte L, Kahn A. Of mice and men: the iron age. *J Clin Invest* 2005;115:2079-2082.
100. Coppin H, Darnaud V, Kautz L, Meynard D, Aubry M, Mosser J, Martinez M, et al. Gene expression profiling of *Hfe*^{-/-} liver and duodenum in mouse strains with differing susceptibilities to iron loading: identification of transcriptional regulatory targets of *Hfe* and potential hemochromatosis modifiers. *Genome Biol* 2007;8:R221.
101. Lee SM, Loguinov A, Fleming RE, Vulpe CD. Effects of strain and age on hepatic gene expression profiles in murine models of HFE-associated hereditary hemochromatosis. *Genes Nutr* 2015;10:443.
102. Rodriguez A, Luukkaala T, Fleming RE, Britton RS, Bacon BR, Parkkila S. Global transcriptional response to *Hfe* deficiency and dietary iron overload in mouse liver and duodenum. *PLoS One* 2009;4:e7212.

103. Fleming RE, Migas MC, Holden CC, Waheed A, Britton RS, Tomatsu S, Bacon BR, et al. Transferrin receptor 2: continued expression in mouse liver in the face of iron overload and in hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:2214-2219.
104. Matsumiya T, Ota K, Imaizumi T, Yoshida H, Kimura H, Satoh K. Characterization of synergistic induction of CX3CL1/fractalkine by TNF-alpha and IFN-gamma in vascular endothelial cells: an essential role for TNF-alpha in post-transcriptional regulation of CX3CL1. *J Immunol* 2010;184:4205-4214.
105. Gan AM, Butoi E, Manea A, Pirvulescu MM, Stan D, Simion V, Calin M, et al. Functional analysis of the fractalkine gene promoter in human aortic smooth muscle cells exposed to proinflammatory conditions. *FEBS J* 2014;281:3869-3881.
106. Imaizumi T, Sakashita N, Mushiga Y, Yoshida H, Hayakari R, Xing F, Wang L, et al. Desferrioxamine, an iron chelator, inhibits CXCL10 expression induced by polyinosinic-polycytidylic acid in U373MG human astrocytoma cells. *Neurosci Res* 2015;94:10-16.
107. Lee MY, Joung YH, Lim EJ, Park JH, Ye SK, Park T, Zhang Z, et al. Phosphorylation and activation of STAT proteins by hypoxia in breast cancer cells. *Breast* 2006;15:187-195.
108. Regis G, Bosticardo M, Conti L, De Angelis S, Boselli D, Tomaino B, Bernabei P, et al. Iron regulates T-lymphocyte sensitivity to the IFN-gamma/STAT1 signaling pathway in vitro and in vivo. *Blood* 2005;105:3214-3221.
109. Hou Z, Nie C, Si Z, Ma Y. Deferoxamine enhances neovascularization and accelerates wound healing in diabetic rats via the accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Diabetes Res Clin Pract* 2013;101:62-71.
110. Saito H. Megakaryocytic cell lines. *Baillieres Clin Haematol* 1997;10:47-63.
111. Huang R, Zhao L, Chen H, Yin RH, Li CY, Zhan YQ, Zhang JH, et al. Megakaryocytic differentiation of K562 cells induced by PMA reduced the activity of respiratory chain complex IV. *PLoS One* 2014;9:e96246.
112. Lin L, Goldberg YP, Ganz T. Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin. *Blood* 2005;106:2884-2889.
113. Rondina MT, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets as cellular effectors of inflammation in vascular diseases. *Circ Res* 2013;112:1506-1519.
114. Postea O, Vasina EM, Cauwenberghs S, Projahn D, Liehn EA, Lievens D, Theelen W, et al. Contribution of platelet CX(3)CR1 to platelet-monocyte complex formation and vascular recruitment during hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:1186-1193.
115. Popa C, Netea MG, van Riel PL, van der Meer JW, Stalenhoef AF. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res* 2007;48:751-762.
116. Haskell CA, Cleary MD, Charo IF. Molecular uncoupling of fractalkine-mediated cell adhesion and signal transduction. Rapid flow arrest of CX3CR1-expressing cells is independent of G-protein activation. *J Biol Chem* 1999;274:10053-10058

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Hpcidin-Regulation im Hepatozyten.....	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung der IRP/IRE-Regulation	9
Abbildung 3: CX3CL1/CX3CR1-Achse in den an der Atherogenese beteiligten Zellen	20
Abbildung 4: Aufbau der verschiedenen Megakaryozytenversuche	34
Abbildung 5: Gen-Expression in Lebergewebe von <i>Hfe</i> - und <i>Hfe2-knockout</i> Mäusen im Vergleich zu Wildtypen	41
Abbildung 6: Einfluss von IL-1 β und IFN γ auf die <i>Cx3cl1</i> -Expression in MS1-Endothelzellen	43
Abbildung 7: Einfluss von DFX/FeCl ₃ auf die Zytokin-induzierte <i>Cx3cl1</i> -Expression in MS1-Endothelzellen	44
Abbildung 8: CX3CL1-Expression in der Durchflusszytometrie von MS1-Endothelzellen nach IFN γ , TNF α , DFX und FeCl ₃ Behandlung	45
Abbildung 9: CX3CL1-Expression und Signalkaskade in MS1-Endothelzellen im Western Blot .	46
Abbildung 10: Einfluss von DFX/FeCl ₃ auf die <i>CX3CL1</i> -Expression in HUVECs	48
Abbildung 11: CX3CL1-Expression und Signalkaskade in HUVECs im Western Blot	49
Abbildung 12: unstimulierte und PMA-differenzierte K562-Zellen	52
Abbildung 13: Gen-Expression in unstimulierten und PMA-differenzierten K562-Zellen	52
Abbildung 14: primäre Megakaryozyten an Tag 6 der Kultivierung	53
Abbildung 15: Zeitreihe des Differenzierungsprozesses von primären Megakaryozyten	54
Abbildung 16: Einfluss von verschiedenen Eisenkonditionen auf den letzten Tag der megakaryopoetischen Differenzierung von primären Megakaryozyten	55
Abbildung 17: Zeitlicher Einfluss von TNF α auf die <i>CX3CL1</i> - und <i>CX3CR1</i> -Expression in differenzierten K562-Zellen	57
Abbildung 18: Einfluss von IFN γ , TNF α , DFX und FeCl ₃ auf die <i>Cx3cl1</i> , <i>Cx3cr1</i> und Eisengene mRNA-Expression in fertig differenzierten, primären Megakaryozyten	59
Abbildung 19: CX3CL1-Expression in differenzierten primären Megakaryozyten im Western Blot	60
Tabelle 1: Verschiedene Typen der HH	12
Tabelle 2: Durchschnittliche Zellzählung von unstimulierten und PMA-differenzierten K562-Zellen	51
Tabelle 3: Einfluss von TNF α auf die <i>CX3CL1</i> -Expression in differenzierten K562-Zellen, RT-qPCR Rohdaten des Versuchs von Abb. 16	58

9. Abkürzungsverzeichnis

ADAM 10/17 – A Disintegrin And Metalloproteinase domain-containing protein 10/17

AP1 – Aktivator-Protein 1

BMP – Bone Morphogenetic Protein

BMPR – Bone Morphogenetic Protein Rezeptor

BSA – bovines Serum-Albumin

CA – Karzinom

cDNA – complementary DNA

d – Tag

dCytB – duodenales Cytochrom B

DFX – Deferoxamine Mesylate

DM – Diabetes Mellitus

DMT1 –Divalent Metal Transporter 1

DNA – Desoxyribonukleinsäure

EGR1 – *Early Growth Response 1*

EMA – Eisenmangelanämie

FACS – Fluorescence-Activated Cell Sorting

FCS – Fötale Kälberserum

GIT – Gastrointestinal-Trakt

h – Stunde

HCP1 – Heme Carrier Protein 1

HH – Hereditäre Hämochromatose

HIF – Hypoxie-induzierter Faktor

HIV – Humanes Immundefizienz-Virus

HPRT – Hxypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1

HRE – Hypoxie responsives Element

HRP – Horseradish Peroxidase

HUVEC – humane umbilikale Ven-Endothelzelle

IFN γ – Interferon γ

IL-1 β – Interleukin 1 β

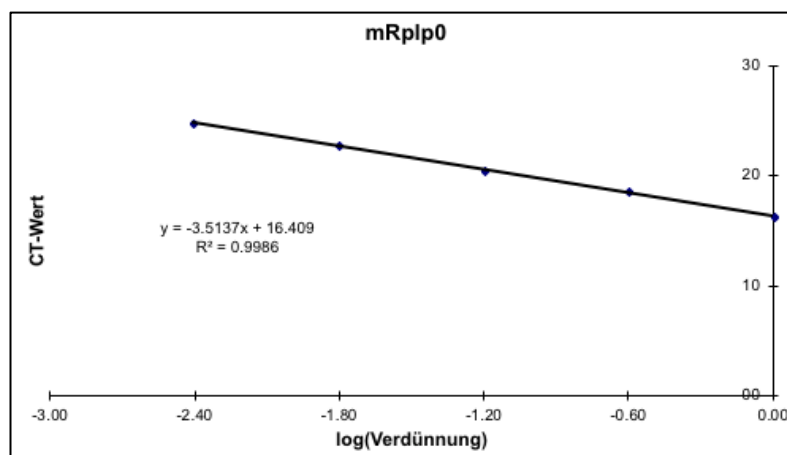
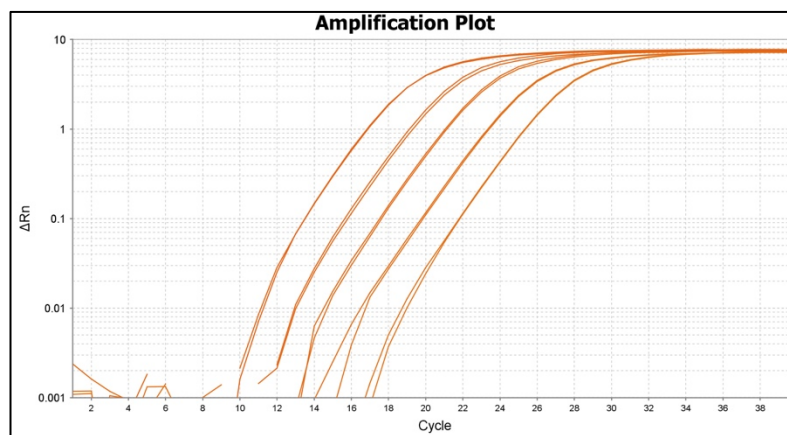
IRE – Iron Responsive Element
IRP – Iron Regulatory Protein
I κ B α – nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor α
kDA – Kilodalton
KO – Knockout
LPS – Lipopolysaccharid
MHC – Major Histocompatibility Complex
min – Minute
MK – Megakaryozyt
mRNA – Messenger RNA
NK-Zellen – Natürliche-Killer-Zellen
NTBI – Non Transferrin Bound Iron
PMA – Phorbol-12-myristate-13-acetate
RES – Retikuloendotheliales System
RNA – Ribonukleinsäure
ROS – Reactive Oxygen Species
RPLP0 – ribosomal protein lateral stalk subunit P0
RT-qPCR – Realtime Quantitative Polymerase Chain Reaction
SCF – Stem Cell Factor
STAT – Signal Transducers and Activators of Transcription
TBI – Transferrin Bound Iron
TFR2 – Transferrin-Rezeptor 2
TFRC – Transferrin-Rezeptor 1
TNF α – Tumornekrosefaktor α
TPO – Thrombopoietin
UTR – untranslatierte Region
WB – Western Blot
WT – Wildtyp

10. Primer-Effizienzen

Zur Bestimmung der Primereffizienzen wurden Verdünnungsreihen angelegt und anhand der gemessenen CT-Werte ein logarithmisches Kurvendiagramm in Bezug zur Verdünnung erstellt. Die Effizienz E jedes Primers ließ sich anhand der Steigung dieser Kurve mit folgender Formel errechnen:

$$E = 10^{1/\text{Steigung}}$$

Hierunter sind exemplarisch die für mRplp0 in der RT-qPCR ermittelten CT-Kurven der Verdünnungsreihe sowie die daraus erstellte logarithmische Kurve dargestellt. In der Tabelle sind die für jeden Primer gefundene Steigung sowie die daraus berechnete Effizienz zusammengefasst.



Murine Primer	Steigung	Effizienz E	Humane Primer	Steigung	Effizienz E
mCcl2	-3,3498	1,9885	hCX3CL1	-4,9306	1,5952
mCx3cl1	-3,4778	1,9388	hCX3CR1	-3,3643	1,9826
mCx3cr1	-3,6061	1,8937	hEGR1	-3,7490	1,8482
mSele	-3,2962	2,0108	hGP1BA	-4,1541	1,7407
mGp1ba	-3,8398	1,8215	hGP1BB	-3,6697	1,8728
mHamp	-3,5074	1,9280	hHFE	-4,1142	1,7501
mHfe	-3,4753	1,9397	hHFE2	-3,1774	2,0641
mHfe2	-3,3787	1,9768	hHPRT	-3,4585	1,9460
mlcam1	-3,5344	1,9184	hITGA2B	-3,4407	1,9527
mltga2b	-3,8075	1,8308	hSLC40A1	-3,8446	1,8201
mRplp0	-3,5137	1,9258	hTFRC	-3,6153	1,8906
mSlc11a2	-3,6080	1,8930			
mSaa2	-3,4863	1,9357			
mSlc40a1	-3,2714	2,0215			
mTfr2	-3,3782	1,9770			
mZip14	-3,6540	1,8779			

SPRINGER NATURE LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Dec 10, 2020

This Agreement between Charles Breyer ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	4965351502828
License date	Dec 10, 2020
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Acta Pharmacologica Sinica
Licensed Content Title	Chemokines and atherosclerosis: focus on the CX3CL1/CX3CR1 pathway
Licensed Content Author	Stavros Apostolakis et al
Licensed Content Date	Aug 26, 2013
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1

High-res required	no
Will you be translating?	yes, without original language
Number of languages	1
Circulation/distribution	50000 or greater
Author of this Springer Nature content	no
Title	Putative Eisenregulation von Fractalkin (CX3CL1), pathophysiologische Rolle von CX3CL1 in Plättchenmodellen und Eisenhaushalt in der Megakaryopoese
Institution name	JMU Würzburg
Expected presentation date	Jan 2021
Portions	Figure 1
Specific Languages	German

Total 206.72 EUR

Terms and Conditions

From: Ballen, Karen KBallen@liebertpub.com
Subject: RE: Permission for modified figure in doctoral thesis
Date: 30 November 2020 at 20:40
To: Charel Breyer



Dear Charles:

Copyright permission is granted for this request for the modification and inclusion of Fig. 2 from ANTIOXIDANTS AND REDOX SIGNALING 2008, by MacKenzie et al, in your doctoral thesis.

Please give proper citation.

Kind regards,

Karen Ballen
Manager, Reprints, Permissions, and Open Access
Mary Ann Liebert, Inc., publisher
New Rochelle, NY

From: Charel Breyer
Sent: Monday, November 30, 2020 12:45 PM
To: Ballen, Karen <KBallen@liebertpub.com>
Subject: Permission for modified figure in doctoral thesis

Ladies and Gentlemen,

my name is Charles Breyer, I am a MD student at the Julius-Maximilians-Universität Würzburg in Germany. I would like to ask if it would be possible to have written permission for one figure which I have reproduced in a modified fashion in my M.D. doctoral thesis. My university newly requests written permissions even for modified figures with adequate citation. The figure in question is Fig.2 of the following paper:

MacKenzie EL, Iwasaki K, Tsuji Y. Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:997-1030.

Thank you in advance, yours sincerely,

Charles Breyer

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Andreas Geier danken, der es mir durch freundliche Überlassung des Themas ermöglichte, Teil seines wissenschaftlichen Teams zu werden. Die dort gesammelten Erfahrungen waren eine echte Bereicherung meiner akademischen Ausbildung.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Frau PD Dr. rer. nat. Heike Hermanns, die mich in allen Fragestellungen und in der Gestaltung dieser Arbeit von Beginn an betreut und gefördert hat.

Weiterhin möchte ich Dr. Attila Braun für die gute Zusammenarbeit und allen Mitarbeitern des Labors für molekulare Hepatologie danken, ohne deren Hilfe diese Dissertation nur schwerlich zustande gekommen wäre.

Schließlich möchte ich meinen Eltern und meiner lieben Freundin Raimunde danken. Für die ständige Unterstützung in allen Stadien dieser Arbeit bin ich euch zu sehr großem Dank verpflichtet.