

## Struktur und Funktion von Ferritin<sup>[\*\*]</sup>

Von Robert R. Crichton<sup>[\*]</sup>

Ferritin ist das wichtigste Eisenspeicherprotein der Säugetiere. Es enthält einen Kern aus bis zu 4500 als Hydroxid-oxid-phosphat gebundenen Eisen(III)-Atomen, der von einer Hülle aus Protein-Untereinheiten umgeben ist. Die Proteinkomponente, Apoferritin, besteht aus 24 gleichen Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von 18 500. Ferritin speichert das Eisen in löslicher Form, aus der es schnell mobilisiert werden kann. In diesem Aufsatz werden neuere Erkenntnisse über die Ferritinstruktur besprochen; außerdem wird über Fortschritte bei der Aufklärung der Vorgänge berichtet, die sich beim Einbau von Eisen in Apoferritin und bei der Freisetzung von Eisen aus Ferritin abspielen.

### 1. Einführung

„Im Jahr 1894 beschrieb der bekannte deutsche Pharmakologe *Schmiedeberg* eine Proteinsubstanz, von ihm Ferratin genannt, welche 6% Eisen und eine variable Menge Phosphor enthielt. Unsere Bemühungen, den eisenreichen Bestandteil in reiner Form aus Pferdeleber zu isolieren, verliefen ergebnislos. Erst als unsere Wahl auf die Pferdemilz fiel, konnten wir die reine Substanz isolieren. Im Gedenken an das Ferratin von *Schmiedeberg* gaben wir diesem neuen Protein den Namen Ferritin. Die Analyse ergab 20% Fe, 9,9% N und 9% P. Nach Ansicht des Autors muß es sich bei Ferritin um eine Substanz handeln, die im Organismus als Depot für Eisen dient“.

Die 1937 von *Laufberger*<sup>[1]</sup> beschriebene Isolierung und Kristallisation von Ferritin aus der Pferdemilz war der Katalysator, der dazu führte, die weite Verbreitung dieses Proteins zu erkennen und seine fundamentale Rolle bei der Speicherung von Eisen in den Geweben und bei der Eisenresorption aus dem Darm zu beweisen. Im vorliegenden Fortschrittsbericht werden die Ergebnisse neuerer Unter-

suchungen einiger besonderer Aspekte der Struktur und Funktion von Ferritin besprochen.

### 2. Struktur des Ferritins aus der Pferdemilz

Obwohl Ferritine aus einer Vielzahl von Geweben und Organismen untersucht worden sind, ist doch noch immer das aus Pferdemilz gewonnene Protein am eingehendsten charakterisiert. Der vorliegende Bericht behandelt ausschließlich Ferritin aus der Pferdemilz. „Ferritin“ im folgenden Text bezieht sich also immer auf dieses Protein. Als Apoferritin wird das eisenfreie Protein bezeichnet, unabhängig von seiner Darstellung aus nativem Ferritin durch Zentrifugiertechniken oder durch Abspaltung des Eisens vom Ferritin mit chemischen Mitteln. Daß Ferritine verschiedener Struktur in verschiedenen Geweben der gleichen Spezies auftreten, daß bestimmte Tumore atypische Ferritine enthalten und daß die Verabreichung von Eisen in vivo oder in vitro die Ferritinsynthese stimuliert, wurde bereits an anderer Stelle beschrieben<sup>[2]</sup>.

#### 2.1. Isolierung und Grobstruktur des Ferritins

Wegen seiner Beständigkeit bei hohen Temperaturen, der schnellen Ausfällung mit 35-proz.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - und der

[\*] Dr. R. R. Crichton  
Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik  
Berlin-Dahlem, Ihnestraße 63/73

[\*\*] Der größte Teil der vom Autor zitierten unveröffentlichten Arbeiten wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Kristallisation aus 5-proz.  $\text{CdSO}_4$ -Lösung läßt sich Ferritin leicht aus Pferdemilz isolieren. Die Isolierung des Proteins aus anderen Geweben und Arten bereitet Schwierigkeiten<sup>[3]</sup>. Ferritin besteht aus einer Hülle von Proteinuntereinheiten, die eine Micelle aus Eisen(III)-hydroxid-oxidphosphat umgeben. Das Eisen kann durch Reduktion mit jedem geeigneten Reduktionsmittel abgespalten werden, vorzugsweise in Gegenwart eines Chelatbildners zur Erleichterung der  $\text{Fe}^{2+}$ -Entfernung. Beim ursprünglichen Verfahren von Granick<sup>[4]</sup> wurde  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  mit  $\alpha, \alpha'$ -Bipyridyl bei  $\text{pH}=4.5$  verwendet. Der Nachteil hierbei ist, daß vorhandener molekularer Sauerstoff zur Bildung von kolloidalem Schwefel führt, den das Protein stark bindet und der die folgenden Untersuchungen erheblich erschwert<sup>[5]</sup>. Daher spalten wir das Eisen routinemäßig durch Behandlung des Ferritins mit Thioglykolsäure ab<sup>[6]</sup>. Maßnahmen zum Sauerstoff-Ausschluß sind nicht erforderlich; das Thioglykolat wirkt zugleich als Reduktionsmittel und als Chelatbildner. Auch durch Ascorbinsäure in Konzentrationen von 0.5–1.5 mol/l bei pH-Werten zwischen 3 und 5 wird das Eisen vom Ferritin wirksam abgespalten<sup>[6]</sup>.

Apo ferritin läßt sich aus Lösungen nativen Ferritins durch Zentrifugieren in einem isopyknischen Dichtegradienten herstellen<sup>[7]</sup>; der Eisengehalt des nativen Ferritins schwankt zwischen Null und einem geschätzten Maximum von 4300 Atomen/Molekül<sup>[7]</sup> (Abb. 1). Wegen dieses schwankenden Eisengehalts ist Ferritin inhomogen, Apoferritin dagegen homogen und farblos; es läßt sich ebenfalls aus 5-proz.  $\text{CdSO}_4$ -Lösung kristallisieren<sup>[4]</sup>. Es besitzt die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit wie Ferritin und kann mit Pferdeferritin-Antiserum ebenso leicht präzipitiert werden<sup>[8]</sup>. Diese Angaben sowie elektronenmikroskopische Untersuchungen<sup>[9]</sup> machen deutlich, daß das Eisen im Ferritin in einer Proteinhülle eingeschlossen ist.

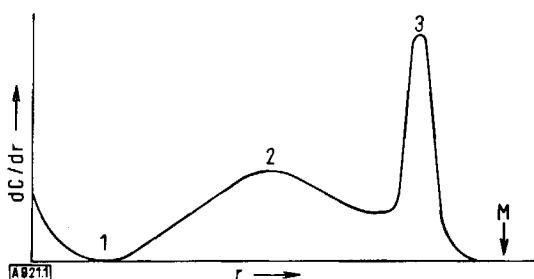


Abb. 1. Bei der Sedimentation von nativem Ferritin beobachteter Konzentrationsgradient, schematisch. Die Änderung der Konzentration  $dC/dr$  ist über dem Abstand vom Rotationszentrum  $r$  aufgetragen. Komplettes Ferritin (1) befindet sich am Boden der Zelle, während das eisenfreie Apoferritin (3) dem Meniskus (M) am nächsten ist. Dazwischen befinden sich Ferritine verschiedenen Eisengehalts (2) („eisenarme“ Ferritine).

## 2.2. Struktur der Micelle

Wegen seines hohen Eisen(III)-Gehalts hat Ferritin eine rotbraune Farbe (typisch für nicht fraktioniertes Ferritin von ca. 20% Trockengewicht). Die genaue chemische Beschaffenheit der eisenhaltigen Micelle ist nicht sicher bekannt. Es scheint jedoch, daß sie den gesamten Phosphor

des Ferritins enthält; als mögliche Zusammensetzung wurde  $8\text{FeO}(\text{OH}) \cdot \text{FeO}(\text{PO}_3\text{H}_2)$  vorgeschlagen<sup>[10, 11]</sup>. Durch Ausfällung mit 1 N NaOH läßt sich die Micelle vom Protein abspalten<sup>[12]</sup>; sie enthält nur 23% des gesamten Phosphors. Im Überstand finden sich das Protein und der Rest des Phosphors, unbekannt ist jedoch, ob dieser an das Protein gebunden oder als freies Orthophosphat vorliegt. Auf diese Weise erhaltene Micellen zeigen das gleiche Röntgen-Beugungsbild wie intaktes Ferritin<sup>[13]</sup>. Daraus wurde geschlossen, daß Phosphat kein notwendiger Bestandteil der Micellstruktur ist; auch scheint es sich nicht wesentlich auf das Röntgen-Beugungsbild auszuwirken. Bestätigt wird diese Ansicht durch die Beobachtung, daß aus Apoferritin nach drei Verfahren rekonstituierte Ferritine in Abwesenheit von Phosphat ähnliche Beugungsbilder wie natives Ferritin ergaben. Auch die durch Alkali freigesetzten Micellen behalten im Elektronenmikroskop viel von ihrer ursprünglichen Form<sup>[13]</sup>.

Eine Untersuchung durch Röntgen-Kleinwinkelstreuung<sup>[7]</sup> zeigte, daß jede Micelle bei einer Auflösung von 20 Å einem einzigen Objekt einheitlicher Dichte mit einem mittleren Durchmesser von 75 Å entspricht. Die Dichte reicht zur Erkennung im Elektronenmikroskop ohne Anfärbung aus; ursprünglich wurde angenommen, daß das Eisen auf vier Stellen hoher Elektronendichte verteilt sei<sup>[9]</sup>. Eine neuere Untersuchung mit einem Elektronenmikroskop von über 4 Å Auflösung<sup>[14]</sup> ergab aber, daß keine bestimmte Anzahl von Gruppen mit hoher Elektronendichte vorliegt. Sowohl durch direkte Ansicht als auch durch Elektronenbeugung erwies sich, daß das Eisenoxid zumindest im Vakuum des Elektronenmikroskops in Form kleiner Kristallite vorhanden ist, deren Zahl je nach Molekül schwankt, und die innerhalb der Proteinhülle mehr oder weniger statistisch verteilt sind.

Stationäre, feuchte Ferritin-Einkristalle ergeben die für Ferritin-Micell-Präparationen typischen Pulverdiagramme<sup>[13]</sup>. Gleichzeitig zu sehen sind die durch das Proteingitter hervorgerufenen scharfen, punktförmigen Reflexe und sehr schwache, unscharfe Ringe, entstanden durch die eisenhaltigen Micellen. Die Ringe geben keinen Hinweis auf eine bevorzugte Orientierung der Eisenatome in bezug auf das Proteingitter. Hierdurch und durch obige elektronenmikroskopische Untersuchung erhärtet sich der ursprünglich aus Röntgen-Beugungsbildern von Ferritin- und Apoferritin-Einkristallen<sup>[15]</sup> gewonnene Schluß, daß die Anordnung der Eisenatome in den Micellen nicht spezifisch auf die Struktur des Proteins bezogen ist. Dies bedeutet, daß das Protein entweder keine spezifischen Bindungsstellen für die Micellen besitzt, oder, sollte dies doch der Fall sein, daß das Micellenmaterial in zufälliger Verteilung an diese Stellen gebunden ist.

Das Röntgen-Beugungsbild der Ferritinmicellen mit seinen breiten, im Vergleich zum Untergrund verhältnismäßig schwachen Linien ist typisch für schlecht kristallisiertes Material. Das Bild entspricht keinem bekannten Mineral, doch besteht eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Röntgen-Beugungsbild von  $\delta$ -Eisen(III)-hydroxid-oxid, und man kann es unter Annahme einer hexagonalen Zelle indizieren. Von Harrison et al.<sup>[13]</sup> sowie Towe und Bradley<sup>[16]</sup> stammen Vorschläge für die Struktur des Eisen(III)-oxid-hydro-

xids aus der Ferritinmicelle. Beide Strukturen haben nahe verwandte Elementarzellen.

Das Mößbauer-Spektrum des Ferritins besteht bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs und darüber aus einer quadrupol-aufgespaltenen Linie mit einer Isomeriever-schiebung von 0.47–0.50 mm/s, bezogen auf rostfreien Stahl<sup>[17, 18]</sup>. Bei niedrigen Temperaturen (5°K) erhält man ein Spektrum mit magnetischer Hyperfeinaufspaltung (sechs Linien), was auf eine magnetische Ordnung hinweist. Mit steigender Temperatur wird das Hyperfeinspektrum allmählich durch das paramagnetische Dublettspektrum (Quadrupolaufspaltung, s. oben) ersetzt. Dieser Superparamagnetismus wird als charakteristisch für sehr feine magnetische Partikeln angesehen<sup>[19]</sup>.

Als effektives magnetisches Moment von Ferritin wurden 3.81–3.85 BM<sup>[10, 20, 21]</sup> ermittelt. Als Grund für den niedrigen Wert wurde der Übergang von zwei Elektronen von Sauerstoff zu Eisen(III) vorgeschlagen, der bei einem Kation-Anion-Kation-Superaustausch stattfinden sollte<sup>[20]</sup>. Bei genauer Untersuchung der Feldstärke-Abhängigkeit der Magnetisierung ergab sich jedoch ein Moment von 5.08 BM<sup>[17]</sup>. Der niedrigere Wert des apparenten Moments zeigt, daß die Ferritinpartikeln beim Verhalten als Superparamagnete antiferromagnetisch sind.

### 2.3. Dissoziation, Untereinheiten und Molekulargewicht des Polymeren

Die erste Bestimmung des Molekulargewichts von Apoferritin ergab einen Wert von 465 000<sup>[22]</sup>. Es ist sicherlich unwahrscheinlich, daß solch ein Molekül aus einer einzigen Polypeptidkette besteht. Hinweise auf eine Zusammensetzung aus Untereinheiten wurden aus Röntgen-Beugungsuntersuchungen und den im folgenden besprochenen chemischen Untersuchungen gewonnen. Das Apoferritinmolekül hat einen Sedimentationskoeffizienten von 17.6 S<sup>[22]</sup> und läßt sich durch eine Reihe von Techniken in Untereinheiten zerlegen, die bei 2–3 S sedimentieren. Die Inkubation von Apoferritin bei pH=12.6 ergibt eine allerdings nur 50-proz. Dissoziation in eine Komponente von 2.1 S<sup>[23]</sup>. Allerdings führt die Behandlung mit 67-proz. Essigsäure bei 0°C zur vollständigen Dissoziation; das Molekül bleibt bei der Dialyse in 0.01 M Glycin-HCl-Puffer, pH=3.0, dissoziiert und sedimentiert bei 2.7 S<sup>[24]</sup>.

Die Dissoziation von Apoferritin und von Ferritin läßt sich durch Behandlung mit Natriumdodecylsulfat<sup>[23, 25, 26]</sup> und durch Verwendung von Guanidiniumchlorid in Konzentrationen von 5–6 mol/l erreichen<sup>[27, 28]</sup>, obwohl der zuletzt genannte Prozeß stark pH-abhängig ist, wie kürzlich berichtet wurde<sup>[29]</sup>. Harnstoff, selbst in Konzentrationen von 8 mol/l, bringt das Protein nicht zur Dissoziation<sup>[23]</sup>, wenngleich auch dieser Prozeß vom pH-Wert abzuhängen scheint<sup>[29]</sup>. Wir haben festgestellt, daß eine Maleinierung der Lysinreste von Apoferritin<sup>[6]</sup> oder ihre Umwandlung in Homoargininreste<sup>[30]</sup> keine Dissoziation des Proteins in Untereinheiten bewirkt. Zuvor wurde berichtet, daß eine Succinylierung der Lysinreste zur Dissoziation führe<sup>[31]</sup>. Von den neun Lysinresten pro Untereinheit können nur sieben mit Maleinsäureanhydrid oder O-Methylisoharnstoff modifiziert werden; acht der neun

Argininreste pro Untereinheit lassen sich mit Cyclohexadienon umsetzen. Nur einer der fünf Tyrosinreste pro Untereinheit wird von Tetranitromethan nitriert<sup>[30]</sup>.

Apoferritin kann in Lösungen mit extremen pH-Werten in Untereinheiten dissoziieren. Wir haben diesen Prozeß durch Sedimentationsgeschwindigkeits- und Gelfiltrationsuntersuchungen analysiert. Das Oligomere ist zwischen pH=2.8 und 10.6 beständig, dissoziiert zwischen pH=2.8–1.6 und 10.6–13.0 jedoch nach und nach in die Untereinheiten. Bei pH=2.16 bzw. 11.62 liegen jeweils gleiche Anteile der 17 S- und der 2–3 S-Komponenten vor. Wenn Apoferritin bei pH=1.6 vollständig dissoziiert ist und die resultierenden Untereinheiten gegen Pufferlösungen von pH=1.8–5.0 dialysiert werden, kommt es im pH-Bereich von 3.1–4.3 zur Reassoziierung zum Oligomeren; der oben beschriebene Mittelpunkt liegt bei pH=3.76<sup>[30]</sup>. Die Untersuchung der Dissoziation und Reassoziierung durch Gelfiltration deutet nicht nur auf monomere Untereinheiten, sondern auch auf Dimere und Tetramere als Zwischenstufen: Diese Zwischenstufen ließen sich bei Messungen der Sedimentationsgeschwindigkeit nicht nachweisen<sup>[30a]</sup>. Wie die UV-differenzspektroskopische Untersuchung der Dissoziation bei niedrigem pH-Wert ergab, sind die fünf Tyrosinreste in der Apoferritin-Untereinheit, die sich beim monomeren Oligomeren im Innern des Moleküls verbergen, in der monomeren Untereinheit dem Lösungsmittel ausgesetzt. Während der Reassoziierung kehren sie in den ursprünglichen „verborgenen“ Zustand zurück<sup>[30]</sup>.

Die Bedeutung der Salzbrücken für die Quartärstruktur läßt sich aus der pH-Abhängigkeit der Reagentien zur Proteindenaturierung, wie Guanidiniumchlorid und Harnstoff, ableiten. Es ist bekannt, daß bei der Stabilisierung der Quartärstruktur oligomerer Proteine hydrophobe Wechselwirkungen eine Hauptrolle spielen, und die Wirkungen von Reagentien wie Guanidiniumchlorid und Natriumdodecylsulfat auf die Dissoziation von Apoferritin stehen in Einklang mit dieser Rolle. Apoferritin besitzt einen relativ hohen Gehalt an hydrophoben Aminosäuren, insbesondere Leucin (Tabelle 1).

Zunächst wurde das Molekulargewicht von Apoferritin durch Sedimentationsgleichgewichtsuntersuchungen an durch Natriumdodecylsulfat dissoziiertem Protein be-

Tabelle 1. Aminosäurezusammensetzung von Apoferritin.

Aminosäurereste	Anzahl Reste/ 18 500 Dalton	Anzahl Reste/ 23 000 Dalton
Cysteinsäure	2.9	3.6
Asparaginsäure	17.3	21.6
Threonin	5.5	6.9
Serin	9.0	11.3
Glutaminsäure	23.9	29.9
Prolin	2.8	3.5
Glycin	9.9	12.4
Alanin	14.0	17.5
Valin	7.0	8.8
Methionin	2.8	3.5
Isoleucin	3.5	4.3
Leucin	25.0	31.0
Tyrosin	5.0	6.2
Phenylalanin	7.3	9.0
Histidin	5.8	7.2
Lysin	8.7	10.8
Arginin	9.5	11.8
Tryptophan	2.1	2.6

stimmt<sup>[23]</sup>. Aus der durch Gleichgewichtsdialyse ermittelten Menge des gebundenen Detergens ergab sich ein Wert von 25 000–27 000. Wir haben das Molekulargewicht der Apoferritinuntereinheit neu bestimmt, und zwar durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Natriumdodecylsulfat<sup>[25]</sup>, Gelfiltration an kalibrierten Sepharose-6B-Säulen in 6 M Guanidiniumchlorid und durch Sedimentationsgleichgewichtsuntersuchungen des durch Essigsäure dissoziierten Proteins nach Dialyse in einen Glycinpuffer zur Entfernung gebundener Essigsäure sowie an durch Guanidin dissoziiertem Protein<sup>[27]</sup>. In allen Fällen finden wir einen Wert von 18 500. Rechnet man die früheren Angaben unter Annahme von 1.4 g gebundenem Detergens pro Gramm Protein<sup>[32]</sup> nach, so ergibt sich ein Molekulargewicht von 18 000–19 000<sup>[27]</sup>. Der Wert von 18 500 für das Molekulargewicht der Untereinheit wurde von einem amerikanischen Arbeitskreis bestätigt<sup>[28]</sup>.

Da das Apoferritinmolekül zur Aggregatbildung neigt, führen Molekulargewichtsbestimmungen leicht zu überhöhten Werten. Optische Konzentrationsmessungen im UV-Gebiet gestatten jedoch Molekulargewichtsbestimmungen im Sedimentationsgleichgewicht in der analytischen Ultrazentrifuge bei Konzentrationen unterhalb 1 mg/ml, bei denen keinerlei Hinweise auf Aggregatbildung oder sonstiges nicht ideales Verhalten vorliegen. Nimmt man für das partielle spezifische Volumen ( $\bar{v}$ ) des Polymeren einen Wert von 0.731, so erhält man ein Molekulargewicht von 443 000<sup>[33]</sup>. Ergebnisse aus einer früheren Sedimentationsdiffusionsstudie<sup>[22]</sup> und aus Röntgen-Beugungsuntersuchungen<sup>[15]</sup> basierten auf einem Wert von 0.747 für  $\bar{v}$ . Mit dem neuen  $\bar{v}$ -Wert verringern sich diese früheren Schätzwerte auf 446 000 bzw. 443 000. Durch Lichtstreuungsmessungen ergab sich ein Wert von 431 000<sup>[34]</sup>; eine kürzlich veröffentlichte Sedimentationsgleichgewichtsstudie ergab 440 000–465 000 unter Verwendung des Wertes 0.732 für  $\bar{v}$ <sup>[28]</sup>. Wir können folgern, daß das Molekulargewicht des Apoferritins um 445 000 liegt und daß es höchstwahrscheinlich aus 24 Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 18 500 besteht.

#### 2.4. Primärstruktur des Apoferritins

Es gibt kaum etwas Langweiligeres als einen Fortschrittsbericht über die Bestimmung der Primärstruktur eines Proteins, dessen Sequenz noch nicht vollständig bekannt ist. Der Autor ist sich darüber völlig im klaren und wird auch nur kurz auf den gegenwärtigen Stand der in Berlin fortgeführten Sequenzstudien eingehen, da diese Angaben nun einmal zu den in Abschnitt 2.6 dargelegten Argumenten gehören.

Anfang der sechziger Jahre stellte man fest, daß das Apoferritinmolekül aus Untereinheiten besteht; aufgrund chemischer<sup>[23, 35, 36]</sup> und späterer kristallographischer Befunde wurde gefolgert, daß es sich höchstwahrscheinlich um 20 Untereinheiten handelt<sup>[27, 37]</sup>. Aus den neuen physikalisch-chemischen Befunden ergibt sich jedoch eindeutig, daß das Molekulargewicht der Untereinheiten des Apoferritins 18 500 und nicht 23 000–24 000 beträgt (siehe Abschnitt 2.3). Ein Vergleich der beiden Datengruppen für die Aminosäureanalyse des Proteins (Tabelle 1) zeigt, daß drei und nicht vier Methioninreste pro Untereinheit vorhan-

den sein sollten und wir nach Spaltung mit CNBr drei neue *N*-terminale Reste finden müßten. Tatsächlich stellten wir nach dieser Spaltung mit CNBr äquimolare Mengen von drei neuen Endgruppen fest, nämlich Glutaminsäure (oder Glutamin), Isoleucin und Glycin<sup>[38]</sup>. Eine chromatographische Trennung der Spaltprodukte führte zur Isolierung von vier Peptiden<sup>[39–42]</sup> mit Aminosäurezusammensetzungen<sup>[38, 42]</sup>, deren Summe recht genau der Aminosäurezusammensetzung der Apoferritinuntereinheit entspricht. Die Molekulargewichte dieser Peptide lassen sich leicht durch Chromatographie an der gleichen Sepharose-6B-Säule in 6 M Guanidiniumchlorid feststellen, wie sie zur Bestimmung des Molekulargewichts der Untereinheiten des Proteins benutzt wurde. Die Summe der Molekulargewichte der Peptide stimmt mit dem Molekulargewicht der Untereinheiten gut überein<sup>[43]</sup>.

Nach der Fingerprintmethode findet man in tryptischen Hydrolysaten des Apoferritins 25 Peptide<sup>[5, 35]</sup>, also erheblich mehr als man anhand der Aminosäureanalyse erwarten würde (Tabelle 1). Allerdings haben wir schon im Laufe unserer Sequenzstudien mehrere Peptide als Produkte unvollständiger tryptischer Spaltung, und in einem Fall nicht-tryptischer Spaltung<sup>[44]</sup> erkannt, womit erklärt wird, warum wir mehr tryptische Peptide erhalten haben als erwartet wurden. Die Sequenzen des *N*-terminalen Pentapeptids und des *C*-terminalen Octapeptids von Apoferritin wurden aufgeklärt<sup>[45, 46]</sup>. Die Bestimmung der Sequenz der tryptischen Peptide und der CNBr-Peptide macht ständig Fortschritte.

Bei isoelektrischer Fokussierung von Ferritin und Apoferritin in Polyacrylamidgel und in Saccharosedichtegradienten<sup>[47, 48]</sup> wurde ein uneinheitliches Bandenmuster beobachtet. Aus diesem Grunde wurde angenommen, daß Apoferritin inhomogen ist. Es gibt jedoch genügend Grund zu zweifeln, daß sich aus der Erscheinung multipler Banden notwendigerweise eine Heterogenität ableiten läßt<sup>[49]</sup>, und es scheint, daß es sich bei der augenscheinlichen Mikroheterogenität des Ferritins aus der Pferdemiiz um Artefakte handelt<sup>[50, 51]</sup>. Es wurde auch berichtet, daß in Lösungsmitteln, welche eine Dissoziation bewirken, zwei Bestandteile niedrigen Molekulargewichts auftreten<sup>[28]</sup>, die zusammen ca. 10% des gesamten Proteins ausmachen. Wir haben keinen Anhaltspunkt für derartige Bestandteile unter den genannten Bedingungen gefunden<sup>[27]</sup>.

#### 2.5. Sekundär- und Tertiärstruktur von Ferritin und Apoferritin

Die Analyse des Ferritins durch optische Rotationsdispersion (ORD) und Circular dichroismus (CD) ergibt einen  $\alpha$ -Helix-Gehalt von ca. 50%<sup>[52, 53]</sup>. Die gewonnenen Spektren sind vom Eisengehalt des Ferritins unabhängig. Die chemische Reduktion des Ferritins zu Apoferritin bewirkt eine merkliche Vergrößerung des Sekundärstruktur-Anteils<sup>[52, 53]</sup>, wie aus den in Abbildung 2 gezeigten Spektren ersichtlich wird. Diese Feststellung steht in deutlichem Gegensatz zu den Beobachtungen bei Röntgen-Kristallstrukturuntersuchungen. Chemisch entstandenes Apoferritin kristallisiert nicht nur in einer Form, die isomorph ist mit einer Form des Ferritins<sup>[15]</sup>, sondern es sind

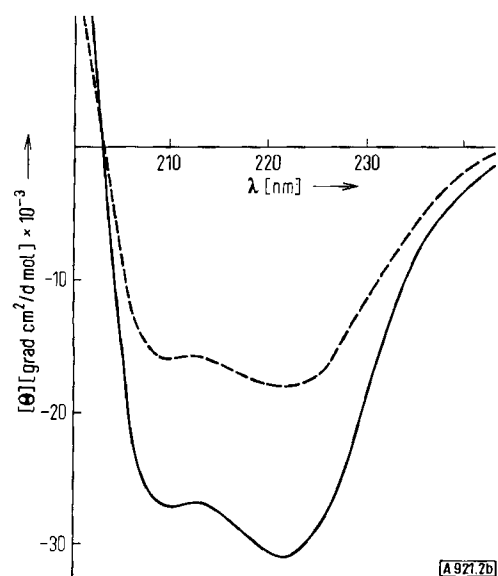
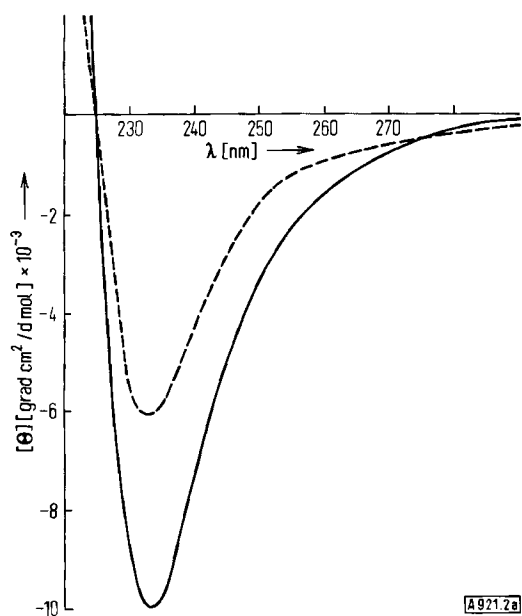


Abb. 2. ORD-Spektrum (a) und CD-Spektrum (b) von Ferritin (---) und durch Reduktion mit Thioglykolsäure gewonnenem Apoferritin (—). Die Tiefen der Mulden bei 233 nm in Abb. 2a sowie 222 und 208 nm in Abb. 2b sind ein Maß für den Anteil an Sekundärstruktur (nach [52]).

bei niedriger Auflösung auch keine Unterschiede in den Intensitäten der Reflexe des Proteinanteils von Ferritinen variierenden Eisengehalts und von Apoferritin<sup>[54]</sup> feststellbar, was auf eine im wesentlichen unveränderte Konformation des Proteins schließen läßt. Kürzlich wurde berichtet, daß durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnenes natives Apoferritin das gleiche CD-Spektrum aufweist wie Ferritin<sup>[29]</sup>.

Apoferritin wird durch Trypsin, Chymotrypsin und Subtilisin schneller und vollständiger verdaut als Ferritin<sup>[5, 55, 56]</sup>. Pepsin und Cathepsin D spalten jedoch beide Proteine bei pH=3.0 gleich gut, eine Tatsache, die sich aus der verhältnismäßig unspezifischen Natur dieser beiden Enzyme erklären läßt. Mit Pepsin bei pH=2.5 wird Apoferritin sehr viel wirksamer verdaut als Ferritin, wofür man als Erklärung eine teilweise Auffaltung der Apoferritinstruktur bei niedrigem pH-Wert angenommen hat.

Bei ORD- und CD-Untersuchungen über die pH-Abhängigkeit der Konformation ergaben sich im pH-Bereich von 3.1–2.2 wesentliche Änderungen in den Spektren beider Proteine, die einem Verlust von ca. 10% ihrer geordneten Struktur entsprechen<sup>[53]</sup>. Beim Apoferritin (Abb. 3) zeigten sich merkbare Änderungen im CD-Spektrum im nahen UV-Bereich, die darauf hinweisen, daß sich die Umgebung der

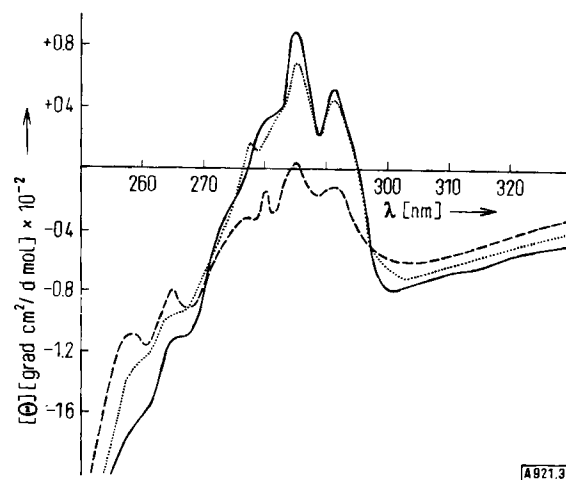


Abb. 3. CD-Spektren von Apoferritin in Citratpuffern: (—) bei pH = 3.11, (---) bei pH = 2.80, (---) bei pH = 2.50 (nach [52]).

Tyrosin- und Tryptophanreste des Proteins beträchtlich ändert. Protein-denaturierende Agentien wie 7 M Guanidiniumchlorid, pH=7.5, führen zu völliger Zerstörung der helicalen Segmente im Ferritin und bewirken den Zerfall in Untereinheiten<sup>[29]</sup>. Dagegen zeigte sich im CD-Spektrum von Apoferritin unter diesen Bedingungen kaum eine Änderung. Bei pH=4.5 wurde jedoch auch Apoferritin durch 7 M Guanidiniumchlorid in Untereinheiten zerlegt. In 10 M Harnstoff waren die Auswirkungen analog. Hier wurde die native dreidimensionale Struktur des Ferritins und Apoferritins zwischen pH=5.0–8.0 nicht beeinflusst, außer bei niedrigeren pH-Werten. Die ORD-Eigenschaften von Ferritin bei 233 nm in mehreren organischen Lösungsmitteln entsprachen denen in wässrigen Lösungen<sup>[53]</sup>. Demnach scheint die Aufhebung hydrophober Wechselwirkungen keine zusätzliche  $\alpha$ -Helixbildung zu bewirken.

## 2.6. Quartärstruktur von Apoferritin

Die ersten Röntgen-Pulveraufnahmen<sup>[57]</sup> deuteten darauf hin, daß Ferritin und Apoferritin kubisch und isomorph sind. Später fanden Hodgkin<sup>[58]</sup> und Cowan<sup>[59]</sup>, daß Ferritin-Einkristalle orthorhombisch, nicht kubisch sind. Die Dimensionen der Elementarzelle in feuchtem Zustand betragen  $a = 130 \text{ \AA}$ ,  $b = 130 \text{ \AA}$ ,  $c = 184 \text{ \AA}$ <sup>[6]</sup>. Damals wurde die Raumgruppe  $P 2_1 2_1 2_1$  abgeleitet, später folgerte man je-

[\*] Eine Elementarzelle mit  $a = b \neq c$  ( $\beta = 90^\circ$ ) ist tetragonal. Offensichtlich reichte die Meßgenauigkeit nicht für eine Entscheidung zugunsten dieser höheren Symmetrieklasse aus.

doch, daß dies nicht die wahre Raumgruppe sei. Eine Nachuntersuchung beim Apoferritin und bei zwei kristallinen Formen des Ferritins, A und B<sup>[15]</sup>, zeigte für alle drei Kristalle eine regelmäßige Abfolge der Elementarzellen. Feuchtes Apoferritin und Ferritin B kristallisieren kubisch-flächenzentriert mit  $a = 184 \text{ \AA}$ , wohingegen Ferritin-A-Kristalle pseudokubisch und nur an einer Stelle wirklich flächenzentriert sind. Das Gitter von Ferritin A besteht aus orthorhombischen Elementarzellen, deren Dimensionen mit den zuvor festgestellten übereinstimmen. Keine der Raumgruppen konnte anhand der Röntgen-Daten eindeutig bestimmt werden, man schloß jedoch, daß Apoferritin wahrscheinlich die Raumgruppe F 432 aufweist und vier Moleküle in der Elementarzelle enthält. In diesem Fall besäße jedes Molekül die Punktgruppensymmetrie 432 und bestünde aus 24  $n$  Untereinheiten, wobei  $n$  eine ganze Zahl ist. Es wurde eine Struktur vorgeschlagen, bei der die 24 Untereinheiten sich an den Ecken eines abgestumpften Würfels befinden (Abb. 4).

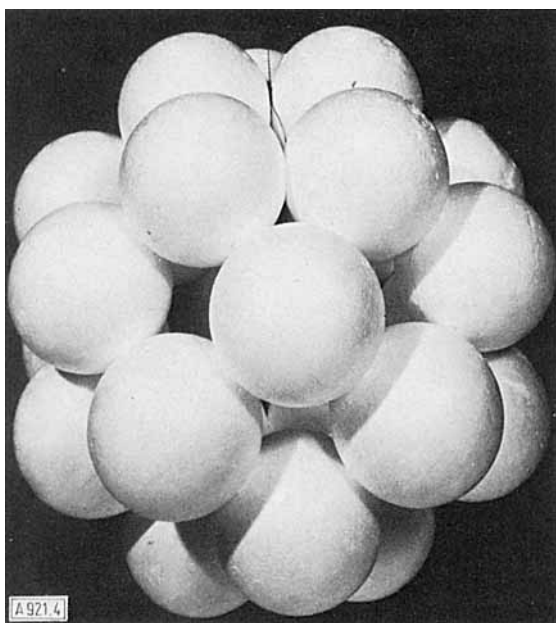


Abb. 4. Photographie eines Modells einer möglichen räumlichen Anordnung der 24 Untereinheiten des Apoferritins. Die Untereinheiten befinden sich an den Ecken eines abgestumpften Würfels ( $\{100\}$  mit  $\{111\}$  und  $\{110\}$ ). Im Modell ist oben eine Rhombendodekaederfläche, vorn eine auf der Spitze stehende Würfelfläche zu sehen.

Bei weiterer Untersuchung dieser kubischen Form<sup>[60]</sup> fand sich auf den Röntgenbildern eine Mischung von sowohl scharfen Reflexen, die auf Abständen von 1–1.4 Å beruhten, als auch diffusen Streifen, die charakteristisch für eine Struktur „geordneter Unordnung“ sind. Diesen uneinheitlichen, diffusen Untergrund deutete man als Hinweis dafür, daß die innere Anordnung nicht bei jeder Elementarzelle gleich ist, obwohl diese sich mit geometrischer Regelmäßigkeit wiederholen. Dieser Situation ließ sich auf einfache Weise mit fast kugelförmigen Molekülen gerecht werden, die äquivalente Gitterpositionen besetzen, aber an den entsprechenden Positionen benachbarter Elementarzellen nicht durchweg gleich orientiert sind. In diesem besonderen Fall nahm man an, daß die apparente Symme-

trie 432 und der diffuse Untergrund dadurch erklärt werden können, daß die an den Gitterpunkten liegenden Moleküle eine niedrigere Punktgruppensymmetrie als 432 und verschiedenartige Orientierungen aufweisen, so daß sich die Kristallsymmetrie statistisch zusammensetzt.

Die Möglichkeit, daß Apoferritinmoleküle eine Symmetrie der Gruppe 532 aufweisen, oder eine Pseudo-532-Symmetrie, wurde durch die relativ starken Intensitäten in der Nähe der nicht-kristallographischen fünfzähligen Achsen nahegelegt. Offensichtlich überzeugende Röntgen-Beugungsbefunde zugunsten dieser ikosaedrischen Symmetrie und die bereits dargelegten chemischen und physikochemischen Daten führten zum Vorschlag, daß Apoferritin aus 20 Untereinheiten besteht, die an den Ecken eines Pentagondodekaeders angeordnet sind und einen zentralen Hohlraum in jedem Fünfeck freilassen. Es ist darauf hingewiesen worden, daß bestimmte Besonderheiten der diffusen Teile des Röntgen-Beugungsbildes mit diesem Modell in Einklang sind.

Aus den oben wiedergegebenen Daten für das Molekulargewicht der Untereinheit und des Oligomeren geht allerdings eindeutig hervor, daß das 20-Untereinheiten-Modell für Apoferritin nicht länger wahrscheinlich ist. So ist tatsächlich kürzlich darauf hingewiesen worden, daß die chemischen und physikalischen Befunde für eine ikosaedrische Struktur ganz allgemein sehr schwach sind<sup>[37]</sup>. Die Problematik einer eikosameren Struktur liegt darin, daß nicht alle Untereinheiten äquivalente Positionen bezogen auf ein normales kristallographisches Gitter besetzen können. Es müssen daher entweder wenigstens zwei Arten von Untereinheiten vorhanden sein, oder ein und dieselbe Untereinheit muß in zwei ausgeprägten Konformationen innerhalb der einen Quartärstruktur vorkommen<sup>[37, 61]</sup>. Wie oben dargelegt wurde, gibt es bisher keine Befunde für die Existenz von mehr als einem Typ der Untereinheit.

Eine Struktur aus 24 Untereinheiten für Apoferritin scheint heute höchst wahrscheinlich, wenn auch für die exakte Anordnung der Untereinheiten eine detailliertere Röntgen-Strukturanalyse abgewartet werden muß. Die von Harrison ursprünglich vorgeschlagene Struktur aus 24 Untereinheiten, verteilt auf die Ecken eines abgestumpften Würfels<sup>[15]</sup> (Abb. 4), besitzt ebenfalls einige der Merkmale, welche man von einer ikosaedrischen Struktur erwarten würde. So gibt sie z. B. starke Intensitäten in der Nähe der nicht-kristallographischen fünfzähligen Achse von Molekülen mit 532-Symmetrie.

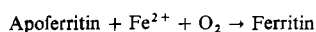
### 3. Funktion von Ferritin

Die Hauptfunktion des Ferritins besteht in seiner Wirkung als intrazelluläres Eisendepot, vor allem in Milz, Leber und Knochenmark, wo überschüssiges Eisen deponiert und bei Bedarf mobilisiert werden kann. Das Ferritin im Gewebe steht in dynamischem Gleichgewicht mit im Plasma befindlichen Eisen. Das Eisen wird an Transferrin gebunden, ein  $\beta_1$ -Globulin mit zwei Bindungsstellen, von denen jede ein  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Atom tragen kann, und von diesem transportiert<sup>[62]</sup>. Transferrin bindet sich an spezifische Rezeptorstellen an den Zellmembranen reifender Reticulocy-

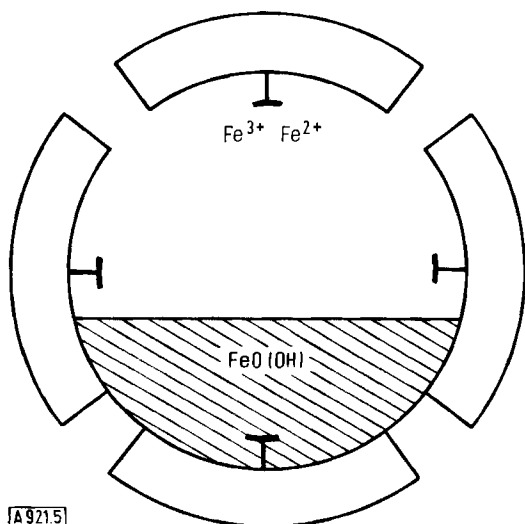
ten<sup>[63, 64]</sup>, und es besteht größte Wahrscheinlichkeit, daß das Ferritineisen in Reticulocyten für die Hämoglobinsynthese verwendet wird<sup>[65, 66]</sup>. Auch in den Mucosazellen des Dünndarms findet sich Ferritin; seit einiger Zeit wird angenommen, daß es bei der Regulierung der Eisenabsorption aus dem Darm eine Rolle spielt. Wahrscheinlich wirkt es als „Eisenfalle“, indem es überschüssiges Eisen innerhalb der Mucosazelle auffängt und dafür sorgt, daß es nicht im Körper absorbiert wird, sondern verloren geht, wenn die Mucosazelle am Ende ihrer Lebenszeit abgestoßen wird.

### 3.1. Untersuchungen der Ferritinbildung in vitro

Erste Untersuchungen zeigten, daß bei der Inkubation von Apoferritin mit  $\text{Fe}^{II}$  in  $\text{HCO}_3^-$ -Puffer bei  $\text{pH}=7.0$  und  $4-6^\circ\text{C}$  in Gegenwart von Luftsauerstoff ein Produkt entstand, das mit  $\text{CdSO}_4$  kristallisiert werden konnte und bei dem das Verhältnis  $\text{N}:\text{Fe}$  2.4:1 betrug<sup>[67]</sup>. Die Wichtigkeit dieses Beitrags bestand darin, daß sich nun ein einfaches Redox-Modell für die Ferritinbildung aufstellen ließ:



Später wurde berichtet, daß bei der Oxidation von Eisen(II)-ammoniumsulfat in Anwesenheit von Apoferritin entweder mit  $\text{O}_2$  in Hydrogencarbonatpuffer,  $\text{pH}=6.8-8.0$ , oder mit Kaliumjodid in Natriumthiosulfat bei  $\text{pH}=5.4-7.4$ , oder mit Sauerstoff in Imidazolpuffer,  $\text{pH}=6.7-7.0$ , ein Produkt mit der üblichen rotbraunen Farbe von Ferritin entstand, dessen Sedimentationskoeffizient beträchtlich über dem von Apoferritin lag, dessen dichten Kern man im Elektronenmikroskop erkennen konnte und dessen Röntgen-Beugungsbild dem von nativem Ferritin glich. Ohne Apoferritin führte die Oxidation zur Bildung von  $\alpha$ -Eisen(III)-hydroxid,  $\gamma$ -Eisen(III)-hydroxid-oxid bzw. einem dritten, nicht identifizierten Produkt<sup>[13]</sup>. Auch wurde festgestellt, daß Apoferritin anscheinend die Oxidationsgeschwindigkeit von  $\text{Fe}^{2+}$  beeinflusst.



[A 9215]

Abb. 5. Modell für die Bildung von Ferritin. Durch einen geeigneten Elektronenacceptor wird  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  in einer Reaktion oxidiert, die durch die aktiven Zentren der Apoferritinuntereinheiten katalysiert wird. Das Eisenhydroxid-oxid bildet eine Micelle, die schließlich zu groß wird, um aus der Proteinhülle entkommen zu können.

Als Erweiterung dieses Modells schlug *Niederer*<sup>[68]</sup> vor, daß kleine Moleküle und Ionen durch Löcher in der Proteinhülle in das Innere des Apoferritinmoleküls eindringen könnten. An der Innenfläche des Apoferritins nahm er aktive Stellen an, welche die Oxidation von  $\text{Fe}^{2+}$  katalysieren könnten. Die sich bildenden  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen würden rasch einen intramolekularen Niederschlag ergeben, der möglicherweise zu groß wäre, um den Hohlraum verlassen zu können (Abb. 5).

Als Stütze dieser Hypothese wurde gezeigt, daß Apoferritin die Oxidation von  $\text{Fe}^{2+}$  stimuliert. Unterbunden wird die Eisenaufnahme durch Behandlung des Apoferritins mit Formaldehyd und  $\beta$ -Propiolacton, die mit Aminogruppen und Histidinresten reagieren, sowie durch Behandlung mit Bromacetat, einem schwachen, histidin-alkylierenden Mittel. Jodacetamid und Tetrazoldiazoniumchlorid wurden als wirkungslos beschrieben;  $\text{Zn}^{2+}$ , von dem bekannt ist, daß es in vivo die Bildung von Ferritin hemmt<sup>[69]</sup>, inhibiert die Reaktion stark.

Dieser Prozeß wurde in unserem Laboratorium in Berlin und von *Harrison* und ihren Kollegen in Sheffield genauestens untersucht. Die Kinetik der Eisenaufnahme von Apoferritin ist kompliziert<sup>[70]</sup>, wenn Kaliumjodid als Oxidationsmittel zusammen mit Thiosulfat in Imidazolpuffer,  $\text{pH}=7.4$ , verwendet wird. Apoferritin wirkt katalytisch, ebenso Rinderserum-Albumin, obwohl das Produkt nicht dem mit Apoferritin entstandenen entspricht. Bei niedrigeren  $\text{pH}$ -Werten mit molekularem Sauerstoff als Oxidationsmittel beobachten wir eine normale Michaelis-Menten-Kinetik; der katalytische Effekt anderer Proteine, wie Lysozym und Rinderserum-Albumin, ist praktisch gleich Null<sup>[71]</sup>. Die Carboxymethylierung von zwei Cysteinresten und einem Histidinrest in jeder Untereinheit führt zum vollständigen Verlust der katalytischen Aktivität<sup>[71]</sup>.

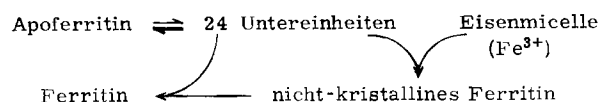


Abb. 6. Bildung von Ferritin aus Eisenmicellen und Apoferritinuntereinheiten. Es wird ein Gleichgewicht zwischen Apoferritin und seinen Untereinheiten angenommen. Eisen(III)-Chelate hydrolysieren und polymerisieren zu Eisenmicellen, die dieses Gleichgewicht durch Assoziation mit Proteinuntereinheiten zu nicht-kristallinem Ferritin verschieben. Diese Zwischenstufe, der die vollständige Proteinhülle fehlt, wird rasch in kristallisierbares Ferritin umgewandelt.

*Saltman et al.*<sup>[72]</sup> schlugen für die Ferritinbildung ein Alternativmodell vor, welches davon ausgeht, daß Apoferritinuntereinheiten um eine vorgeformte Eisenmicelle (Abb. 6) angeordnet werden. Es wird argumentiert<sup>[73]</sup>, daß die Chemie von Eisen(III)-Chelaten wie Eisen(III)-fructose, -citrat und -hydroxid-nitrat in wässrigen Lösungen von der Tendenz zur Hydrolyse und Polymerisation beherrscht wird, wobei lösliche Micellen ungefähr der gleichen Größe wie im Ferritin entstehen (70 Å). Polymeres Eisen(III)-hydroxid-nitrat<sup>[74]</sup> mit der ungefähren Zusammensetzung  $\text{Fe}_4\text{O}_3(\text{OH})_4(\text{NO}_3)_2$  hat magnetische und Mößbauer-Eigenschaften, die ziemlich genau denjenigen des Ferritins entsprechen.

Bei einem Experiment, bei dem überschüssiges Apoferritin verschieden lange Zeit mit der nicht-kristallisierbaren Ferritinfraktion und dem aus Cadmiumsulfat-Lösungen kristallisierten Produkt inkubiert wurde, konnten innerhalb von 45 min 100% des ursprünglich im nicht-kristallinen Ferritin enthaltenen Eisens als kristallines Ferritin zurückgewonnen werden. Mit dieser Beweisführung und elektronenmikroskopischen Ergebnissen wird die Ansicht gestützt, daß nicht-kristallines Ferritin aus Molekülen besteht, denen der vollständige Satz Proteinuntereinheiten fehlt; daraus ergibt sich weiterhin, daß die Anwesenheit der Eisenmicelle die Dissoziation des Apoferritins in Untereinheiten bewirkt, die sich daraufhin um die Micelle anordnen und Ferritin bilden<sup>[72]</sup>.

In einem kürzlich erschienenen, vorläufigen Bericht wird angedeutet, daß bei Zugabe einer sauren Lösung von Apoferritinuntereinheiten zu natürlichen, aus Ferritin isolierten Eisenmicellen oder zu synthetischen Polymeren aus Eisen(III)-nitrat, Eisen(III)-citrat, Eisen(III)-fructose und Eisen(III)-ATP und rascher Neutralisation ein Produkt entsteht, das in seiner Grundzusammensetzung, seinem elektrophoretischen und seinem Sedimentationsverhalten sowie nach seinem Aussehen im Elektronenmikroskop Ferritin ähnelt<sup>[75]</sup>.

Gegen das Chelatmodell wurde eine Reihe von Einwendungen vorgebracht<sup>[76]</sup>. Zunächst einmal steht die Beobachtung, daß im nicht-kristallinen Ferritin Proteinuntereinheiten fehlen, im Gegensatz zu Beobachtungen von *Farrant*<sup>[9]</sup>, der in elektronenmikroskopischen Aufnahmen die Identität von Ferritin und nicht-kristallinem Ferritin feststellte. Das Verhältnis Fe: N des nicht-kristallinen Ferritins entspricht dem des kristallinen Ferritins, aus dem es präpariert wurde<sup>[72]</sup>, d. h. bei Vorhandensein unvollständiger Proteinhüllen müssen auch freie Untereinheiten existieren. Tatsächlich setzt das Modell voraus, daß Apoferritinmoleküle mit den Untereinheiten im Gleichgewicht stehen.

Für die Dissoziation von Apoferritin in Untereinheiten unter physiologischen Bedingungen gibt es derzeit keinen Beweis. Nach der in Abbildung 6 gezeigten Hypothese sollten bei der Bildung von Ferritin nur zwei Zwischenstufen auftreten: das eisenfreie Apoferritin und Ferritin mit einigen fehlenden Untereinheiten, aber vollständiger Eisenmicelle. Bei Experimenten über die durch Eisengaben induzierte Biosynthese von Ferritin fand man jedoch unter Verwendung von [<sup>14</sup>C]-Leucin, daß die Radioaktivität zuerst im eisenarmen Ferritin (siehe Abb. 1) und erst nach verhältnismäßig langer Zeit im eisenreichen Ferritin erschien<sup>[77, 78]</sup>. Hieraus könnte man schließen, daß das neu synthetisierte Apoferritin allmählich mit Eisen angefüllt wird. Nach *Niederer*<sup>[68]</sup> müßte neu synthetisiertes Apoferritin im bereits vorhandenen Ferritinpool der Leber eher in eisenarmes als in eisenreiches Ferritin inkorporiert werden, falls Ferritin durch Eisen stabilisiert wird. Eisenreiches Ferritin sollte unter dieser Annahme sehr viel langsamer als eisenarmes Ferritin oder Apoferritin in Untereinheiten dissoziieren. *Niederer* berichtet kurz über Ergebnisse, die zeigen, daß das Eisen allmählich von Apoferritin aufgenommen wird, wenn man die Reaktion während einer isopyknischen Zentrifugation in einem Uro-

grafin-Gradienten durchführt<sup>[68]</sup>. Dies bringt ihn zur Ablehnung des Chelatmodells; er übersieht allerdings, daß sich unter den beschriebenen Bedingungen der Eisenaufnahme (siehe oben) die von *Pape et al.*<sup>[72]</sup> gefundenen micellaren Aggregate nicht bilden werden. – Das Chelatmodell ist zwar oft kritisiert worden, doch kann es aufgrund der vorliegenden Hinweise nicht ausgeschlossen werden.

### 3.2. Mobilisierung von Eisen aus Ferritin

Wie bereits früher erwähnt<sup>[4]</sup>, kann durch Reduktion von Fe<sup>III</sup> im Ferritin zu Fe<sup>II</sup> Eisen aus dem Protein freigesetzt werden. *Bielig* und *Bayer*<sup>[79]</sup> zeigten die Möglichkeit, Eisen aus Ferritin unter Verwendung biologischer Reduktionsmittel wie Ascorbat, Glutathion und NADH zu mobilisieren. Allerdings verläuft die Mobilisierung selbst bei hohen Konzentrationen dieser Reduktionsmittel sehr langsam.

Auf der Suche nach einem physiologischen Redoxsystem nahm *Mazur et al.*<sup>[80]</sup> an, daß Xanthin-Oxidase für die Reduktion von Eisen aus Ferritin und die Mobilisierung in der Leber verantwortlich sei. Eine solche Rolle der Xanthin-Oxidase wurde schon früher von *Tanaka*<sup>[81]</sup> vorgeschlagen, der festgestellt hatte, daß sich die magnetische Suszeptibilität einer Ferritinlösung bei Behandlung mit Xanthin-Oxidase und Methylenblau und mit reduzierter Diaphorase langsam erhöhte. Die Beobachtung von Xanthin im Urin eines Patienten mit Haemochromatosis – einer erblichen Anlage zu übermäßiger Eisenspeicherung – sowie einem merklich verringerten Xanthinoxidase-Spiegel der Leber brachte *Ayzvasian*<sup>[82]</sup> zu der Annahme, daß die

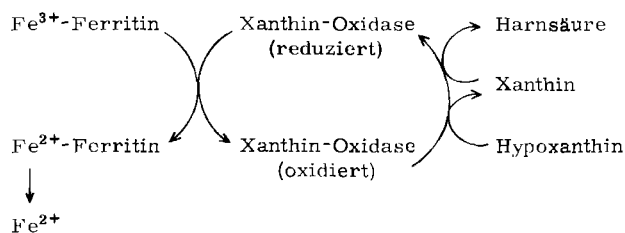


Abb. 7. Mögliche Rolle der Xanthin-Oxidase bei der Mobilisierung von Eisen aus Ferritin.

Reduktion von Ferritineisen mit der Oxidation von Xanthin und Hypoxanthin gemäß Abbildung 7 in Verbindung steht. Als Reduktionsstelle des Ferritineisens wurde das Nicht-Hämeisen der Xanthin-Oxidase angenommen<sup>[80]</sup>. Allerdings haben mehrere Verbindungen wie Allopurinol (4-Hydroxypyrazolo[3,4-d]pyrimidin), welches Xanthin-Oxidase stark inhibiert, wenig oder keinen Einfluß auf den Eisenstoffwechsel<sup>[83]</sup>.

Mit spezifischen Chelatbildnern niedrigen Molekulargewichts kann Eisen ohne Reduktionsmittel<sup>[84]</sup> aus Ferritin mit Geschwindigkeiten von physiologischer Bedeutung mobilisiert werden. Nitrilotriacetat, der überzeugendste bei dieser Untersuchung verwendete Chelatbildner, hat sicherlich keinerlei physiologische Funktion. Ob ein geeigneter zellulärer Metabolit bei der nicht-reduktiven

Mobilisation ebenso wirksam sein würde, muß noch untersucht werden.

Wir haben kürzlich überprüft, ob physiologische Reduktionsmittel oder Chelatbildner das Ferritineisen mobilisieren können. Mit Ausnahme von Ascorbinsäure in Konzentrationen oberhalb 200 mmol/l und pH-Werten unterhalb 5, sowie Cystein in Konzentrationen oberhalb 100 mmol/l, konnte keine der untersuchten Verbindungen – allein oder in Kombination mit anderen Reduktionsmitteln oder Chelatbildnern – das Eisen aus dem Ferritin mit Geschwindigkeiten freisetzen, die in der Säugetierzelle physiologisch bedeutungsvoll sind. Das gleiche gilt für Xanthin-Oxidase, die bei unseren Versuchen das Ferritin in vitro überhaupt nicht mobilisieren<sup>[6]</sup>.

In Leberhomogenaten von Säugetieren wurde kürzlich eine spezifische Enzymaktivität gefunden; das Enzym, welches teilweise durch Chromatographie an CM-Sephadex und durch Ultrazentrifugation gereinigt wurde, kann Ferritineisen reduktiv mobilisieren. Das Enzym benötigt NADH und FMN, um das an Ferritin gebundene  $\text{Fe}^{3+}$  zu freiem  $\text{Fe}^{2+}$  zu reduzieren, wahrscheinlich durch Elektronentransfer von NADH zum Ferritin. Die Reaktion wird durch Sauerstoff, jedoch nicht durch Allopurinol inhibiert, was darauf hindeutet, daß es sich bei dem Enzym nicht um Xanthin-Oxidase aus der Leber handelt. Das Enzym ist sehr hitzelabil, das pH-Optimum liegt bei 7.2–7.4. Hypoxanthin, Succinat, Äthanol und Glucose eignen sich nicht als Elektronendonoren. Vorläufige Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge deuten darauf hin, daß das Enzym, für das der Name Ferriductase vorgeschlagen wurde, hauptsächlich in der löslichen Fraktion der Zelle vorkommt<sup>[85]</sup>.

### 3.3. Eisentransfer zwischen Ferritin und Transferrin

Bielig und Bayer haben nachgewiesen, daß beim Transfer von Eisen aus dem Ferritin zum Transferrin durch eine semipermeable Membran Ascorbinsäure erforderlich ist<sup>[79]</sup>. Im gleichen Jahr wurde gezeigt<sup>[86]</sup>, daß Ferritin, welches kleine Mengen  $\text{Fe}^{\text{II}}$  und freie SH-Gruppen aufweist, in Leberschnitten Eisen zu Transferrin transportieren konnte. Danach wurde festgestellt, daß für den Transfer von Eisen aus dem Transferrin zum Ferritin in Leberschnitten und Homogenaten unbedingt ATP erforderlich ist<sup>[87]</sup>. Bei einer detaillierten Untersuchung anhand eines Modellsystems, bei dem der Transfer von  $^{59}\text{Fe}$  vom Transferrin zum Ferritin über eine semipermeable Membran gemessen wurde, ergab sich, daß Reduktionsmittel und Chelatbildner für den Eisentransfer erforderlich sind<sup>[88]</sup>. ATP wirkt als Chelatbildner und nicht als Energiequelle.

Der Prozeß des Eisentransfers vom Transferrin zum Ferritin wurde nun so formuliert, daß, wie in Abbildung 8 gezeigt, Reduktion, Chelatbildung und Oxidation beteiligt sein müssen. Er erfolgte auch ohne spezifischen Chelatbildner mit einer Reihe biologisch wirksamer komplexbildender Reagentien, wie Zucker, ATP, ADP und AMP.

Von den geprüften Reduktionsmitteln waren Ascorbate weitaus am wirksamsten. Der Eisengehalt des verwendeten Ferritins und Transferrins regulierte das Ausmaß des be-

obachteten Transfers. Transferrin, das zu 50% oder weniger gesättigt war, konnte Eisen nicht transferieren. Bei ca. 50-proz. Sättigung mit Eisen nahm Ferritin das meiste Eisen auf. Vorläufige Experimente ergaben, daß bei Dialyse von Apotransferrin gegen Ferritin in Anwesenheit von Reduktionsmitteln und Chelatbildnern der umgekehrte Transfer so lange andauert, bis das Transferrin zu 40% mit Eisen gesättigt ist<sup>[89]</sup>. Somit lassen sich sowohl die Hin- als auch die Rückreaktion anhand der in Abbildung 8 beschriebenen Vorgänge erklären.

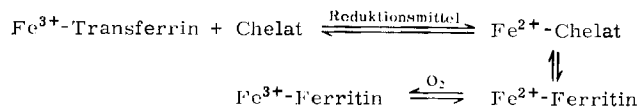


Abb. 8. Modell für den Eisentransfer von Transferrin zu Ferritin. Transferrin-gebundenes  $\text{Fe}^{3+}$  wird reduziert und komplex gebunden, worauf das eisenhaltige Chelat sein Eisen zum Ferritin transferiert.  $\text{Fe}^{2+}$  wird durch molekularen Sauerstoff zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert.

## 4. Ausblick

Aufgrund der hier kurz besprochenen Ergebnisse läßt sich voraussehen, daß Struktur- und Funktionsuntersuchungen am Ferritin schnell zu einer Phase höchsten Interesses und enormer Aktivität gelangen werden. Die Identifizierung der Primärstruktur des Proteins aus der Pferdemilz sowie der Teile der Primärstruktur, die bei der Katalyse der  $\text{Fe}^{2+}$ -Oxidation eine Rolle spielen, werden zur Neuerforschung der dreidimensionalen Struktur des Proteins anspornen.

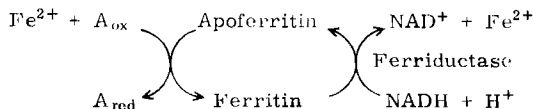


Abb. 9. Bei der Einlagerung von Eisen in Apoferritin als  $\text{Fe}^{2+}$  in Gegenwart eines geeigneten Oxidationsmittels A wirkt das Protein selbst als Katalysator. Die Mobilisierung von Eisen als  $\text{Fe}^{2+}$  aus Ferritin wird durch ein als Ferriductase bezeichnetes Enzym verursacht, welches NADH-abhängig ist.

Durch die in Abbildung 9 gezeigte Möglichkeit der Mitwirkung eines vollständigen Redoxsystems bei der Aufnahme von Eisen in Ferritin und umgekehrt dessen Mobilisierung aus Ferritin wird der Weg zur detaillierten Analyse der Regulation beider Stoffwechselwege eröffnet; mit wachsendem Verständnis dieser Prozesse sollte eine verständnisvollere Therapie bei Störungen der Eisenspeicherung möglich werden. Dies ist besonders wichtig, da derzeit die Anämie vermehrt durch Transfusionen bekämpft wird, die zu einer stetig wachsenden Zahl von Fällen sekundärer Eisenüberbelastung führen (Transfusions-Siderose). Wenn, und dies wird immer wahrscheinlicher, das Ferritineisen in den Reticulocyten zur Hämoglobinsynthese dient<sup>[65, 66]</sup>, wird das Verständnis der Regulationsfaktoren des dynamischen Gleichgewichts zwischen der Aufnahme des Eisens in das Ferritin und umgekehrt dessen Mobilisierung

aus der Speicherform sogar noch wichtiger. Falls dieser Vorgang der Eisenaufnahme und -abgabe aus dem Ferritin von Oxidation und Reduktion begleitet ist, so besteht kaum Zweifel, daß es irgendwo in der Zelle ein System geben muß, das  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert, entweder vor oder gleichzeitig mit der Eisenaufnahme durch Transferrin an der Oberfläche der Zelle. Dieses System muß außerdem in der Lage sein,  $\text{Fe}^{3+}$  aus Transferrin zu reduzieren und innerhalb der Zelle als  $\text{Fe}^{2+}$  abzugeben. Man wird zu der Spekulation verleitet, daß das Trägersystem – es kann enzymatisch sein oder auch nicht – in der Zellmembran lokalisiert ist und zwischen der Außen- und Innenfläche wie ein Pendelsystem arbeitet, ähnlich wie es Margoliash et al.<sup>[90]</sup> für Cytochrom C in der inneren Mitochondrienmembran vorgeschlagen haben. Die Aufklärung dieses Stoffwechselweges wird uns immer größere Einsicht in die Regulierung all der vielen Prozesse geben, die unter dem Namen Eisenstoffwechsel laufen und von denen wir hier einen kleinen Ausschnitt behandelt haben.

Eingegangen am 11. Januar 1972

Übersetzt von Doz. Dr. H. Tschesche und Frau, München [A 921]

- [1] V. Laufberger, Bull. Soc. Chim. Biol. 19, 1575 (1937).
- [2] R. R. Crichton, New Engl. J. Med. 284, 1413 (1971).
- [3] R. R. Crichton, J. A. Millar, R. L. C. Cumming u. C. F. A. Bryce, Biochem. J., im Druck.
- [4] S. Granick u. L. Michaelis, J. Biol. Chem. 147, 91 (1943).
- [5] R. R. Crichton, Biochim. Biophys. Acta, 194, 34 (1969).
- [6] R. R. Crichton, unveröffentlichte Beobachtungen.
- [7] F. A. Fischbach u. J. W. Anderegg, J. Mol. Biol. 14, 458 (1965).
- [8] A. Mazur u. E. Shorr, J. Biol. Chem. 182, 607 (1950).
- [9] J. F. Farrant, Biochim. Biophys. Acta 13, 569 (1954).
- [10] L. Michaelis, C. D. Coryell u. S. Granick, J. Biol. Chem. 148, 463 (1943).
- [11] S. Granick u. P. F. Hahn, J. Biol. Chem. 155, 661 (1944).
- [12] S. Granick, J. Biol. Chem. 146, 451 (1942).
- [13] P. M. Harrison, F. A. Fischbach, T. G. Hoy u. G. H. Haggis, Nature 216, 1188 (1967).
- [14] G. H. Haggis, J. Mol. Biol. 14, 598 (1965).
- [15] P. M. Harrison, J. Mol. Biol. 1, 69 (1959).
- [16] K. M. Towle u. W. F. Bradley, J. Colloid Interface Sci. 24, 384 (1967).
- [17] A. Blaise, J. Chappert u. J. Giradet, C. R. Acad. Sci. 261, 2310 (1965).
- [18] J. F. Boas u. B. Window, Aust. J. Phys. 19, 573 (1966).
- [19] I. S. Jacobs u. C. P. Bean in G. T. Rado u. H. Suhl: Magnetism. Academic Press, New York 1967, Band 3, S. 271.
- [20] C. Schoffa, Z. Naturforsch. 20b, 167 (1965).
- [21] E. Bayer u. K. H. Hauser, Experientia 11, 254 (1955).
- [22] A. Rothen, J. Biol. Chem. 152, 679 (1944).
- [23] T. Hofmann u. P. M. Harrison, J. Mol. Biol. 6, 256 (1963).
- [24] P. M. Harrison u. D. W. Gregory, Nature 220, 578 (1968).
- [25] R. R. Crichton u. C. F. A. Bryce, FEBS Lett. 6, 121 (1970).
- [26] H. Smith-Johannsen u. J. W. Drysdale, Biochim. Biophys. Acta 194, 43 (1969).
- [27] C. F. A. Bryce u. R. R. Crichton, J. Biol. Chem. 246, 4198 (1971).
- [28] I. Björk u. W. W. Fish, Biochemistry 10, 2844 (1971).
- [29] I. Listowsky, G. Blauer u. J. J. Betheil, Fed. Proc. 30, Abstr. 1058 (1971).
- [30] R. R. Crichton u. C. F. A. Bryce, unveröffentlichte Beobachtungen.
- [30a] R. R. Crichton, Biochem. J., im Druck.
- [31] W. I. P. Mainwaring, unveröffentlichte Ergebnisse, zitiert von P. M. Harrison in F. Gross: Iron Metabolism. CIBA Symposium. Springer, Berlin 1964.
- [32] J. A. Reynolds u. C. Tanford, J. Biol. Chem. 245, 5161 (1970).
- [33] R. R. Crichton, R. Eason, A. Barclay u. C. F. A. Bryce, Biochem. J., im Druck.
- [34] G. W. Richter u. G. F. Walker, Biochemistry 6, 2871 (1967).
- [35] P. M. Harrison u. T. Hofmann, J. Mol. Biol. 4, 239 (1962).
- [36] P. M. Harrison, T. Hofmann u. W. I. P. Mainwaring, J. Mol. Biol. 4, 251 (1962).
- [37] R. R. Crichton, Biochem. J. 126, 761 (1972).
- [38] R. R. Crichton, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 9 (1971).
- [39] R. R. Crichton u. V. Barbiroli, FEBS Lett. 6, 134 (1970).
- [40] R. R. Crichton, Automat. Anal. Chem., Technicon Symp. 1969, im Druck.
- [41] R. R. Crichton, Biochem. J. 117, 34 P (1970).
- [42] R. R. Crichton u. P. G. Hughes, unveröffentlichte Beobachtungen.
- [43] C. F. A. Bryce u. R. R. Crichton, J. Chromatogr. 63, 267 (1971).
- [44] R. R. Crichton u. M. D. P. Boyle, unveröffentlichte Beobachtungen.
- [45] W. I. P. Mainwaring u. T. Hofmann, Arch. Biochem. Biophys. 125, 975 (1968).
- [46] A. A. Suran, Arch. Biochem. Biophys. 113, 1 (1966).
- [47] J. W. Drysdale, Biochem. Biophys. Acta 207, 256 (1970).
- [48] I. Uroshizaki, Y. Niitsu, K. Ishitani, M. Matsuda u. M. Fukuda, Biochim. Biophys. Acta 243, 187 (1971).
- [49] M. B. Hayes u. D. Wellner, J. Biol. Chem. 244, 6636 (1969).
- [50] J. C. K. Lee u. G. W. Richter, Comp. Biochem. Physiol. 39 B, 325 (1971).
- [51] C. F. A. Bryce u. R. R. Crichton, unveröffentlichte Beobachtungen.
- [52] G. C. Wood u. R. R. Crichton, Biochim. Biophys. Acta 229, 83 (1971).
- [53] I. Listowsky, J. J. Betheil u. S. Englard, Biochemistry 6, 1341 (1967).
- [54] F. A. Fischbach, P. M. Harrison u. T. G. Hoy, J. Mol. Biol. 39, 235 (1969).
- [55] R. R. Crichton, Biochim. Biophys. Acta, 229, 75 (1971).
- [56] R. R. Crichton, Biochem. J. 119, 40 P (1970).
- [57] I. Fankuchen, J. Biol. Chem. 150, 57 (1943).
- [58] D. C. Hodgkin, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 14, 65 (1949).
- [59] P. M. Cowan, Dissertation, Oxford 1953.
- [60] P. M. Harrison, J. Mol. Biol. 6, 404 (1963).
- [61] K. R. Hanson, J. Mol. Biol. 38, 133 (1968).
- [62] J. Fletcher u. E. R. Huehns, Nature 218, 1211 (1968).
- [63] J. H. Jandl u. J. H. Katz, J. Clin. Invest. 42, 314 (1963).
- [64] E. H. Morgan, Brit. J. Haematol. 10, 442 (1964).
- [65] M. C. Bessis u. J. Breton-Gorius, Blood 19, 635 (1962).
- [66] A. Mazur u. A. Carleton, J. Biol. Chem. 238, 1817 (1963).
- [67] H. J. Biegel u. E. Bayer, Naturwissenschaften 42, 125 (1955).
- [68] W. Niederer, Experientia 26, 218 (1970).
- [69] C. T. Settlemyre u. G. Matrone, J. Nutr. 92, 153 (1967).
- [70] I. G. Macara, T. G. Hoy u. P. M. Harrison, Biochem. J. 126, 151 (1972).
- [71] R. R. Crichton u. C. F. A. Bryce, noch unveröffentlicht.
- [72] L. Pape, J. S. Multani, C. Stitt u. P. Saltman, Biochemistry 7, 606 (1968).
- [73] T. G. Spiro u. P. Saltman, Struct. Bond. 6, 166 (1969).
- [74] G. W. Brady, C. R. Kurjian, E. F. X. Lyden, M. B. Robin, P. Saltman, T. Spiro u. A. Terzis, Biochemistry 7, 2185 (1968).
- [75] C. P. Cephurnee, J. C. Hagenmaier, M. L. Meltzer, J. W. Winslow, T. G. Spiro u. P. Saltman, Fed. Proc. 30, Abstr. 1469 (1971).
- [76] J. W. Drysdale, G. H. Haggis u. P. M. Harrison, Nature 219, 1045 (1968).
- [77] R. A. Fineberg u. D. M. Greenberg, J. Biol. Chem. 214, 97, 107 (1955).
- [78] J. W. Drysdale u. H. N. Munro, J. Biol. Chem. 241, 3630 (1966).
- [79] H. J. Biegel u. E. Bayer, Naturwissenschaften 42, 466 (1955).
- [80] A. Mazur, S. Green, A. Saha u. A. Carleton, J. Clin. Invest. 37, 1809 (1958).
- [81] S. Tanaka, J. Biochem. (Tokyo) 37, 129 (1950).
- [82] J. H. Ayzvasian, New Engl. J. Med. 18, 270 (1964).
- [83] P. S. Davis u. D. J. Deller, Lancet 2, 470 (1966).
- [84] L. Pape, J. S. Multani, C. Stitt u. P. Saltman, Biochemistry 7, 613 (1968).
- [85] S. Osaki u. S. Sirivech, Fed. Proc. 30, Abstr. 1394 (1971).
- [86] A. Mazur, S. Baez u. E. Shorr, J. Biol. Chem. 213, 147 (1955).
- [87] A. Mazur, S. Green u. A. Carleton, J. Biol. Chem. 235 (1960).
- [88] J. P. G. Miller u. D. J. Perkins, Eur. J. Biochem. 10, 146 (1969).
- [89] J. P. G. Miller, Dissertation, University of London 1968.
- [90] E. Margoliash, G. H. Barlow u. V. Byers, Nature 228, 723 (1970).