

Proxyferrin: Supplement für den transferrinunabhängigen Eisentransport

Information der Biochrom AG

Proxyferrin ist ein chemisch definiertes, niedermolekulares Ersatzsupplement für Holotransferrin. Es unterstützt die transferrin-unabhängige Eisenaufnahme bei *in vitro*-kultivierten Säugerzellen. Proxyferrin (Zusammensetzung geschützt) ist sowohl frei von Komponenten tierischen Ursprungs, als auch frei von Pyrogenen und Proteinen. Die Vorteile des konzentrierten Ersatzsupplements: Proxyferrin hat ein vernachlässigbares biologisches Risiko, verursacht niedrige Kosten im Vergleich zu rekombinantem Transferrin, ist anwendbar für viele Zelltypen (insbesondere für niedrig-Eisen-tolerante Zellen) und hat eine hohe Lagerstabilität. Der Endotoxingehalt von Proxyferrin ist unter der Nachweisgrenze.

Proxyferrin bietet hohe Einsatzflexibilität und Sicherheit für das Design von hormonell definierten, serumfreien Zellkulturmedien. Zusätzlich stimuliert es das Zellwachstum in Medien mit niedrigem Serumgehalt und die Aktivität von Serum mit niedrigem Eisengehalt.

1 Transferrin ist Eisendonator in serumfreien Medien

Ionisiertes Eisen ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) ist für den Metabolismus von Säugerzellen essenziell, da es leicht seinen oxidativen Status wechseln kann. Es ist eine brauchbare Komponente für Hämoglobin, Myoglobin, Zytochrome und verschiedene nicht-häm Enzyme. Eisen ist für alle Eukaryonten essenziell, kann aber auch toxisch sein: Dieselbe Eigenschaft, die es Eisen erlaubt, Elektronen aufzunehmen oder abzugeben, kann Elektronen auch auf Sauerstoff übertragen. Dies könnte über die Fenton- und Haber-Weiss Reaktionen zur Bildung von Superoxidradikalen und Hydroxylradikalen führen. Durch den Überschuss solcher sehr reaktiven Sauerstoffspezies werden biologische Moleküle wie Proteine, Lipide und DNS besonders leicht umgebaut und deren biochemische Funktion zerstört.

Konsequenterweise wird deshalb bei allen Arten von Säugern die Eisenkonzentration in biologischen Flüssigkeiten straff reguliert. Aus diesem Grund sind Eisensupplemente auch essenzielle Bestandteile in den Formulierungen von Kulturmedien für Säugerzellen. Am häufigsten wird Transferrin als Eisendonator in serumfreien Medien angewendet. Dieses Plasmaprotein bindet Fe^{3+} mit hoher Affinität.

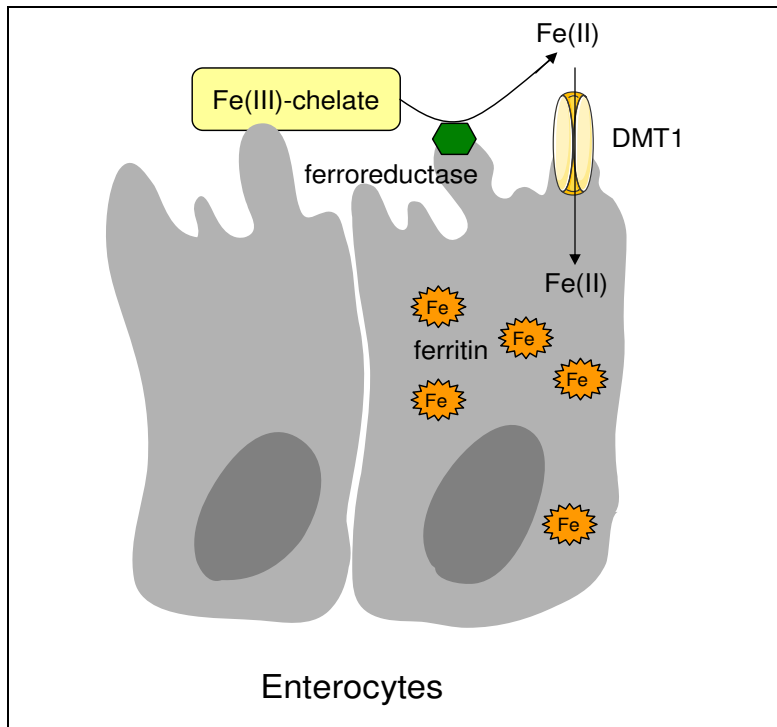
Bei neutralem pH-Wert im Plasma bindet Transferrin- Fe^{3+} an den Transferrinrezeptor auf der Zelloberfläche, von wo es durch rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert wird.

Alternativ wurde die *in vitro*- und *in vivo*- Aufnahme von nicht-transferringebundenem Eisen extensiv bei Enterozyten [1] sowie bei einer großen Anzahl von anderen Säugerzellen studiert (Tabelle 1). Obwohl der Mechanismus des transferrinunabhängigen Eisentransports weniger gut analysiert ist, können einige gemeinsame Eigenschaften in allen Zelltypen gefunden werden (Abbildung 1).

Tab. 1: Säugerzellen, deren transferrinunabhängige Eisenaufnahme untersucht wurde.

Säugerzelltypus	Gewebeursprung	Spezies
Enterozyten	Dünndarmepithel	Human
HeLa	Cervixkarzinom	Human
Hepatozyten	Leber	Ratte
K562	Myelogene Erythroleukemie	Human
Fibroblasten	Haut	Human
Vero	Nierenepithel	Meerkatze
SK-Hep1	Leberkarzinom	Human
Wish	Amnionzellen	Human
BHK21	Nierenzellen	Hamster
HepG2	Leberkarzinom	Human
CHO-K1	Ovarienzellen	Hamster

Abb. 1: Schematische Aufnahme von nicht Transferrin-gebundenen Fe³⁺ Ionen bei Enterozyten.



Fe³⁺ Ionen werden durch niedermolekulare Chelatverbindungen, so genannte Siderophore, komplexiert. Dabei verhindert die Chelatisierung einerseits die Hydrolyse und die darauf

folgende Präzipitation des Metalls und ermöglicht andererseits die spezifische Erkennung und Aufnahme des Metalls an der Zelloberfläche.

Eine weitere wichtige Funktion der Siderophore ist die Kontrolle der Redoxeigenschaften ihres Eisenzentrums. Harington et al. [2] postulierten, dass das Metallzentrum *in vivo* durch niedermolekulare Agenzien und/oder durch eine Ferroreduktase reduziert wird, wodurch die Freisetzung von Fe^{2+} Ion vom Eisen-Siderophor-Komplex gefördert wird. Das Fe^{2+} Ion wird danach durch den divalenten Metalltransporter 1 (DMT1) in die Zelle hineintransportiert.

Neben natürlichen Fe^{3+} Chelatoren wie Zitronensäure wurde eine Reihe von synthetischen Siderophortypen in serum-freien Zellkulturen getestet. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Iminodiessigsäure (IDA), Aurintricarboxylsäure und Tropolone wurden am häufigsten untersucht.

2 Proxyferrin als Transferrinersatz-Konzentrat

Dieses tierkomponentenfreie, geschützte Produkt der Biochrom AG wurde entwickelt, um die Funktion von Holotransferrin zu ersetzen. Weiterhin sollte eine alternative transferrinunabhängige Eisenaufnahme in einem weiten Bereich von Säugerzellkultursystemen ermöglicht werden.

Proxyferrin besteht aus zwei Typen von Eisenchelatkomplexen. Der Haupt- Fe^{3+} -Komplex wird durch den natürlichen zweizähligen Zitronensäurekomplex gebildet. Er verhindert das Ausfallen von Fe^{3+} Ionen als unlösliches $\text{FeO} \cdot \text{OH} \cdot n\text{H}_2\text{O}$. Der Nebenkomples ist eine vierzählige synthetische Chelatverbindung. Zusätzlich verstärkt Proxyferrin die nichttransferringebundene Eisenaufnahme in die Zelle durch chelatisierte Zn^{2+} Ionen, eine Eigenschaft, die kürzlich spezifischen Zinktransportern [3] in der Plasmamembran von Säugerzellen zugeschrieben wurde.

Immer wenn die Entwicklung eines Zellkulturmediums den Sicherheitserfordernissen für therapeutische Anwendungen folgen muss, ist der Ersatz von nativem Transferrin unumgänglich.

Zusätzlich zum geringeren biologischen Risiko eines proteinfreien Substituts hat Proxyferrin einen weiteren Vorteil: Kontaminierende bakterielle Endotoxine sind in Proxyferrin nicht enthalten. Endotoxin könnte unbeabsichtigt in das Kulturmedium gelangen, wenn es an zugefügtem Transferrin [4] gebunden ist. Daher erleichtert der Gebrauch eines nichtproteinhaltigen Transferrinersatzes wie Proxyferrin die Entwicklung einer Rezeptur für definierte Kulturmedien, weil das biologische Risiko von tierischen Komponenten vermieden wird. Zusätzlich sind die Kosten für die Medienkomponenten geringer als beim Transferrinersatz durch rekombinantes Transferrin.

Die Supplementkonzentration für transferrinunabhängige Eisenaufnahme sollte für jeden Zelltyp angepasst werden. Für die Mehrheit der Zelltypen ist 1 ml Proxyferrin-Konzentrat (Kat. Nr. K 3702 und K 3703) pro Liter Medium ausreichend, was ungefähr 5 μM Fe^{3+} Chelat entspricht (niedrig-eisen-tolerante Zellen). Eisenkonsumierende Zellen, z.B. die erythroide K562 Zelllinie, bei der eine hohe Eisenaufnahme für eine optimale Hämsynthese gebraucht wird, benötigen beträchtlich größere (mindestens 20fache) Supplementmengen (hoch-eisen-abhängige Zellen) [5].

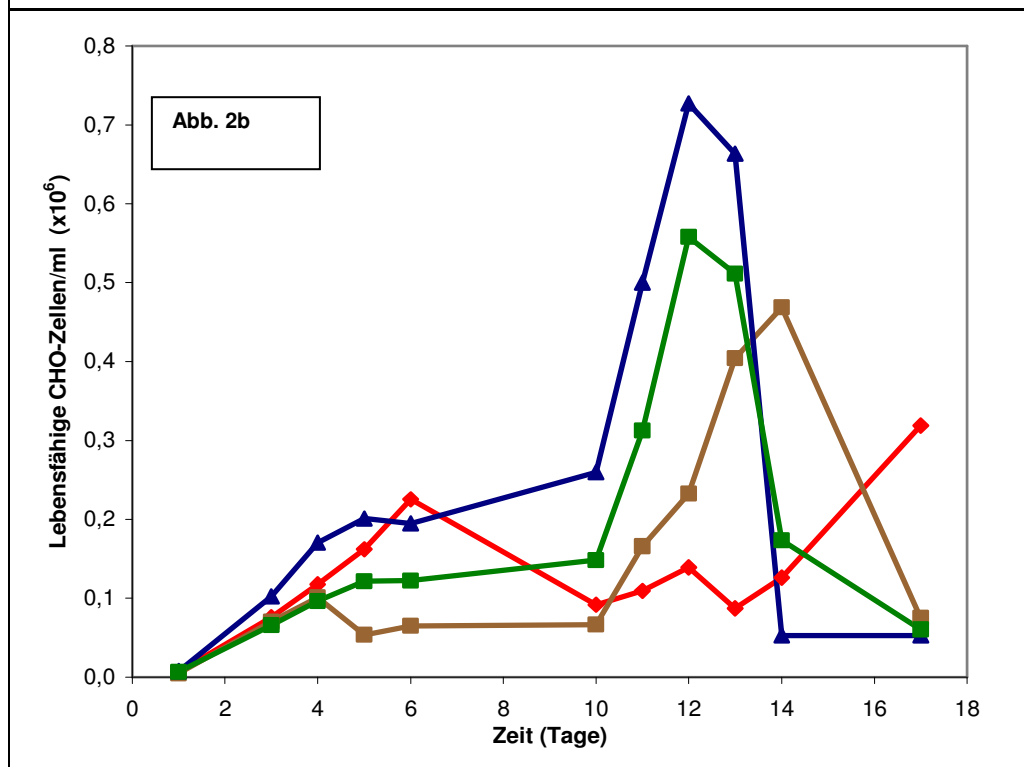
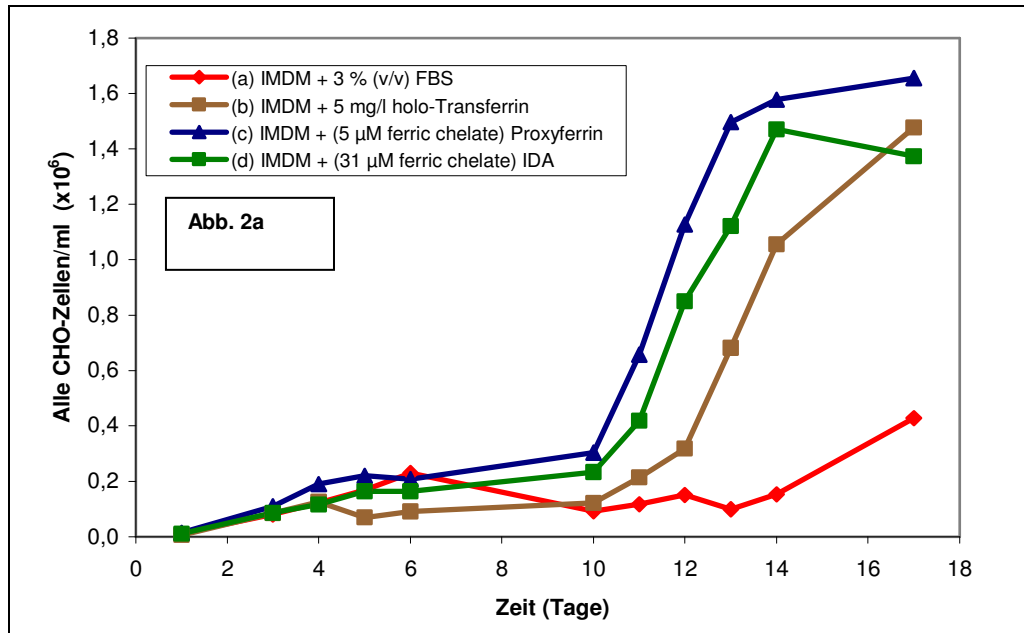
3 Testung von Proxyferrin in serumfreien definierten Medien

Proxyferrin wurde für einige Zellkulturen in serumfreien definierten Medien getestet, die mit verschiedenen Kombinationen von Wachstumsfaktoren supplementiert waren. Die Abbildungen 2a und 2b zeigen die 17-tägige Wachstumsentwicklung der Ovarienzelllinie des chinesischen Hamsters (CHO), adaptiert für die Suspension, kultiviert in definierten Medien, die mit verschiedenen Fe^{3+} Donorsystemen supplementiert waren.

Nach einer Adaptationsperiode von 10 Tagen ist die Viabilität der Zellen, deren Eisenaufnahme durch transferrinunabhängige Siderophore erfolgte, während des exponentiellen Zellwachstums am größten. Die Abbildung 2 zeigt, dass unter diesen Kulturbedingungen die CHO Proliferation in Proxyferrin-supplementierten Medien bei weitem besser ist als in Kontrollkulturmedien, die mit fötalem Rinderserum (FBS) oder Transferrin supplementiert wurden.

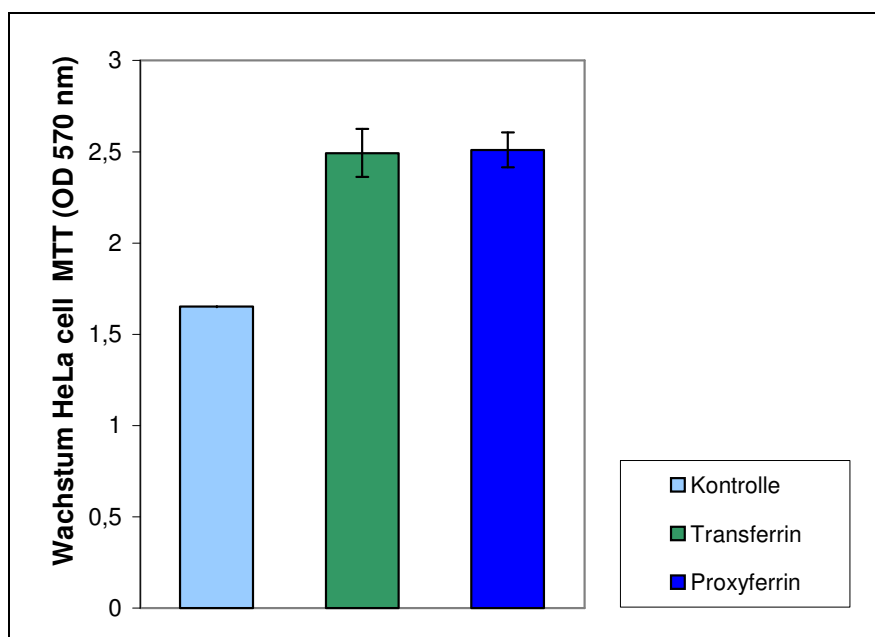


Abb.2a. CHO-Batchkulturen in modifiziertem Iscove's Modified Dulbecco Medium (IMDM) supplementiert mit entweder a) 3 % (v/v) FBS oder einer serumfreien definierten Wachstumsfaktorkombination (b, c, d) die mit b) 5 mg/l humanem Holo-Transferrin, c) mit 5 μM Fe^{3+} Chelatkomplex (Proxyferrin), oder d) 31 μM Fe^{3+} Chelatkomplex (IDA) supplementiert wurden. Die Zellproliferation während 17 Tagen einer kontinuierlichen Suspensionskultur wurde durch Bestimmung der Gesamtzellzahl bestimmt. Diese Gesamtzellzahl kann mit der Zahl an lebenden Zellen verglichen werden (Abb. 2b)



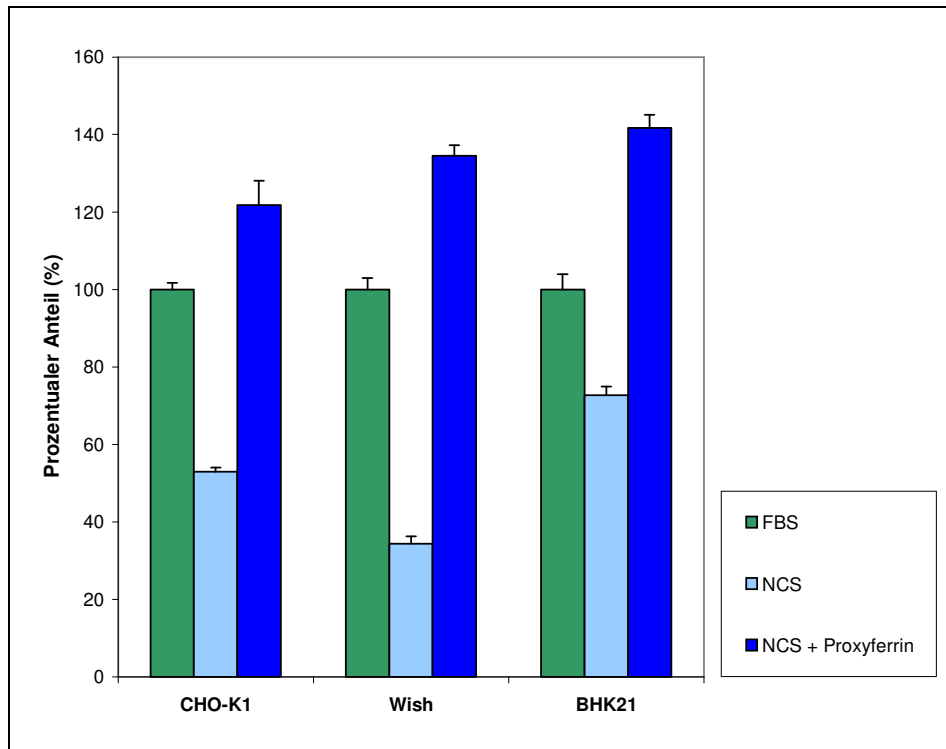
Ein Beispiel für den Einfluss der Eisenversorgung auf adhären wachsende Kulturen zeigt Abbildung 3. HeLa-Zellen wurden in unbeschichteten 96 well Platten für 4 Tage in serumfreiem definiertem Medium (IMDM + Kombination von Wachstumsfaktoren) ohne Holotransferrin (Kontrolle), mit 5 µg/ml Holotransferrin und mit Proxyferrin (5 µM Fe³⁺ Chelatkomplex; 1ml/Liter Medium) supplementiert. Der Einfluss von Holotransferrin auf die Proliferation von HeLa-Zellen kann vollständig durch ein serumfreies definiertes Medium ersetzt werden, das mit der Standardkonzentration an Proxyferrin (1:1000 Verdünnung des Konzentrats) supplementiert wird. In Bezug auf die nicht-transferrin-abhängige Eisenaufnahme sind HeLa- und CHO typische Vertreter von niedrig-eisen-toleranten Zellen.

Abb. 3: Einfluss von Transferrin und Proxyferrin auf das Wachstum von HeLa Zellen. In einem MTT-Assay wurde die Extinktion bei 570 nm gemessen.



Der Eisenmangel von *Newborn* Kälberserum (NCS) kann durch Zugabe von Proxyferrin kompensiert werden [6]. (Abbildung 4).

Abb. 4: Proliferationsantwort von 3 adhärennten Säugerzelllinien, kultiviert 4 Tage in IMDM Basalmedium supplementiert mit 5 % (v/v) FBS, 5 % (v/v) NCS, und 5 % (v/v) NCS mit Proxyferrin. Die Extinktion von MTT Messungen für das Zellwachstum in FBS-supplementierten Medien wurde auf 100 % gesetzt. Alle Kulturen wurden in 96 well Platten durchgeführt.



4 Literatur

- [1] M. Shindo et al. Functional role of DMT1 in transferrin-independent iron uptake by human hepatocyte and hepatocellular carcinoma cell, HLF. *Hepatology Research*, Volume 35, Issue 3, Pages 152-162 [2006]
- [2] J.M.Harrington & A.L.Crumbliss. The redox hypothesis in siderophore mediated iron uptake. *Biomaterials* 22: 679-689 [2009]
- [3] J.P. Liuzzi et al. Zip 14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *PNAS*. 103: 37, 13612 -13617 [2006]
- [4] D. Berger et al. Demonstration of an interaction between transferrin and lipopolysaccharide. An *in vitro* study. *European Surgical Research*. 23: 309-316 [1999].
- [5] J. Kovar et al. The inability of cells to grow in low iron correlates with increasing activity of their iron regulatory protein (IRP). *In Vitro Cell. Dev. Biol Animal* 33: 633-639 [1997]
- [6] S-I.Kume & S.Tanabe Effect of Supplemental Lactoferrin with Ferrous Iron on Iron Status of Newborn Calves. *J. Dairy Sci*, 79: 459-464 [1995].