

Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin I

Kommissarischer Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Götz von Wichert

Autokrine Regulation von Hepcidin in der Leber

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Sarah Fritz

aus

Tuttlingen

2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hasan Kulaksiz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Barth

Tag der Promotion: 15.6.2012

Meinen Eltern

I. Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	II
Verzeichnis über Abbildungen und Tabellen.....	III
1. Einleitung.....	1
2. Material und Methoden.....	
2.1. Material.....	
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	10
2.1.2 Kits und Materialien	11
2.1.3 Pufferlösungen & Stammlösungen.....	13
2.1.4 Geräte.....	15
2.2. Methoden.....	
2.2.1 Zellkultur.....	16
2.2.2 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese.....	18
2.2.3 Quantitative Real Time-PCR	19
2.2.4 Proteinextraktion und Proteinbestimmung.....	22
2.2.5 Western Blot.....	23
2.2.6 Immunfluoreszenz.....	25
2.3. Statistische Auswertung.....	26
3. Ergebnisse.....	
3.1. Regulation von Ferroportin durch Hepcidin in der Leber	27
3.2. Autokrine Regulation von Hepcidin in HepG2-Zellen	29
3.3. Untersuchung des intrazellulären Eisenstoffwechsels als mögliche Ursache der autokrinen Hepcidinregulation	32
3.4. Mögliche Mechanismen der autokrinen Hepcidinregulation in der Leber.....	33
3.5. Ferroportin als möglicher Signaltransduktor der autokrinen Hepcidinregulation	39

4. Diskussion.....	43
5. Zusammenfassung.....	50
6. Literaturverzeichnis.....	52

Danksagung	IV
Lebenslauf	V

II. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ß2M	ß2-Mikroglobulin
BMP-6	<i>bone morphogenetic protein 6</i>
BMP(R)	<i>bone morphogenetic protein (receptor)</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Cp	Coeruloplasmin
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMT1	divalenter Metalltransporter 1
DTT	Dithiothreitol
FCS	fetales Kälberserum
FTL	Ferritin
g	Gravitationskraft
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HAMP	<i>Hepcidin antimicrobial peptide</i>
HJV	Hämojuvelin
HRP	<i>horseradish</i> Peroxidase
ID1	<i>inhibitor of DNA binding 1</i>
IF	Immunfluoreszenz
IL-6(R)	Interleukin 6 (Rezeptor)
IREG1	<i>iron-regulated protein 1</i>

IRP1/2	<i>iron regulatory protein 1/2</i>
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
nm	Nanometer
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
kDa	Kilodalton
o.g.	oben genannt
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pmol	Pikomol
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	<i>real time</i>
s	Sekunde
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMAD4	<i>mothers against decapentaplegic homolog 4</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TBS	Tris-gepufferte Saline
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin1,2- Bis(dimethylamino)-ethan
Tf	Transferrin
TFR	Transferrin-Rezeptor
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VE-H ₂ O	vollentsalztes Wasser
z.B.	zum Beispiel

III. Verzeichnis über Abbildungen und Tabellen

- Abb. 1: Eisenhomöostase
- Abb. 2: Aminosäuresequenz von Hepcidin und seinen Vorläufermolekülen
- Abb. 3: Intrazelluläre Signalwege der Hepcidinregulation
- Abb. 4: Fluoreszenzmikroskopie von Fpn-GFP-transfizierten HEK-Zellen
- Abb. 5: In HepG2-Zellen wird Ferroportin durch exogenes Hepcidin auf Proteinebene downreguliert
- Abb. 6: Mittlere Expression von Hepcidin in HepG2-Zellen
- Abb. 7: In HepG2-Zellen wird Hepcidin durch exogenes Hepcidin auf Proteinebene downreguliert
- Abb. 8: Mittlere Expression von Hepcidin in Hep3B-Zellen
- Abb.9: Mittlere Expression von Hepcidin in AGS und HEK193-Zellen
- Abb.10: Mittlere Expression von IRP1, IRP2 und Ferritin in HepG2-Zellen
- Abb.11: Mittlere Expression von IL-6 in HepG2, Hep3B und Huh7-Zellen, sowie Mittlere Expression von STAT3 in HepG2-Zellen
- Abb.12: Mittlere Expression von BMP-6 und SMAD-4 in HepG2-Zellen
- Abb.13: Mittlere Expression von ID1 in HepG2-Zellen
- Abb.14: In HepG2-Zellen wird TFR-2 durch exogenes Hepcidin auf mRNA-Ebene und Proteinebene downreguliert
- Abb.15: Mittlere Expression von TFR-2 in HepG2-Zellen
- Abb.16: Mittlere Expression von Hepcidin in Huh7-Zellen
- Abb.17: Mittlere Expression von HFE-1 und β 2-Mikroglobulin in HepG2-Zellen
- Abb.18: Mittlere Expression von Ferroportin in HepG2-Zellen

- Abb.19: Mittlere Expression von Ferroportin in mit Hepcidin-siRNA-transfizierten HepG2-Zellen
- Abb.20: Mittlere Expression von Coeruloplasmin in HepG2-Zellen
- Abb.21: Mittlere Expression von Ferroportin in mit Fpn-siRNA-transfizierten HepG2-Zellen
- Abb.22: Mittlere Expression von Hepcidin in mit Fpn-siRNA-transfizierten HepG2-Zellen
- Abb.23: Modell der autokrinen Hepcidinregulation über Ferroportin
- Abb.24: Modell der Pathophysiologie der autokrinen Downregulation von Hepcidin

Tabelle 1: Primersequenzen

Tabelle 2-1: Pipettierschema zur Herstellung von Tricin-SDS-Polyacrylamid Gelen

Tabelle 2-2: Pipettierschema zur Herstellung von 8%-igen SDS-Gelen

Tabelle 3-1: Primäre Antikörper

Tabelle 3-2: Sekundäre Antikörper

1. Einleitung

1.1 Der Eisenstoffwechsel

Eisen ist ein essentielles Spurenelement, das in vielen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle spielt. Dazu gehören vor allem der Sauerstofftransport im Blut, die Sauerstoffspeicherung im Muskel (Hämoglobin und Myoglobin) sowie enzymatische Reaktionen der Atmungskette (Cytochrome). Peroxidasen und Katalasen, die Hämmoleküle im katalytischen Zentrum tragen, sind am Abbau von zelltoxischem Wasserstoffperoxid beteiligt. Als Bestandteil der Ribonukleotid-Reduktase ist Eisen außerdem für die DNA-Synthese essentiell (Löffler et al 2007).

Neben den wichtigen Funktionen katalysiert Eisen jedoch auch die Entstehung freier Sauerstoffradikale, die toxische Zellschäden hervorrufen. Eine konsequente Regulation des Eisenhaushaltes ist daher von großer Bedeutung, um auf der einen Seite eine ausreichende Versorgung des Organismus mit Eisen sicher zu stellen und auf der anderen Seite eine Anreicherung des freien, toxischen Eisens zu verhindern (Muñoz et al. 2010b).

Der menschliche Körper enthält ca. 3-5 g Eisen, wovon täglich bis zu 2 mg über den Darm verloren gehen. Dieser Verlust wird durch die Aufnahme von Eisen aus der Nahrung ausgeglichen, während der Eisenbedarf für die Erythropoese ausschließlich durch Recycling des Eisens aus abgebauten Erythrozyten gedeckt wird (Hentze et al. 2010, Knutson 2010) [Abb.1].

Die Eisenresorption findet vor allem im Duodenum statt. In der Nahrung liegt Eisen in zwei verschiedenen Formen vor: an Hämoglobin gebunden (Hämeisen) oder als anorganisches Ion (Nicht-Hämeisen) (Muñoz et al. 2010a). Nicht-Hämeisen wird an der apikalen Seite der Enterozyten durch duodenales Cytochrom B (DcytB) zu zweiwertigem Eisen reduziert (Muñoz et al. 2009). Dieses wird dann über den divalenten Metalltransporter DMT1, welcher neben Eisen auch andere zweiwertige Metallionen transportiert, in die Darmzelle aufgenommen (Anderson et al. 2009, Muñoz et al. 2009). Die intrazellulären Transport- und Speichermechanismen für Eisen sind bislang weitestgehend ungeklärt. An der basolateralen Membran wird Eisen über Ferroportin (*iron regulated protein1/IREG1*) in die Blutbahn abgegeben (Anderson und Vulpe 2009).

Dort wird das zweiwertige Eisen durch Hephaestin oxidiert, an das Plasmaprotein Transferrin (Tf) gebunden und zu den Zielzellen transportiert. In Eisenspeicher-Organen wie z.B. der Leber und dem Knochenmark bindet das Tf-gebundene Eisen spezifisch an den Transferrinrezeptor 1 (TFR-1). Der Komplex aus Tf und TFR-1 wird mittels Endozytose in die Zielzelle aufgenommen (Muñoz et al. 2009, Muñoz et al. 2010a). Im entstandenen Endosom löst sich Eisen nach Ansäuerung des Milieus von Tf und wird anschließend in das Zytosol abgegeben (Löffler et al. 2007). Der Tf-TFR-1-Komplex wird wieder zur Zellmembran transportiert und Transferrin wird nach erfolgter Exozytose in den Blutkreislauf freigesetzt. In der Leber ist die Expression von TFR-1 wesentlich geringer als die Expression von TFR-2. Deshalb wird Eisen in der Leber primär über TFR-2 aufgenommen (Johnson und Enns 2004, Robb und Wessling-Resnick 2004).

Im Gegensatz zum dreiwertigen Eisen wird Hämeisen über einen bisher unbekannten Mechanismus resorbiert (Anderson et al. 2009, Muñoz et al. 2009). Im Anschluss setzt eine Hämoxygenase das Eisen aus dem Porphyringerüst frei (Hentze et al. 2010).

Freies Eisen, welches nicht für die Hämoglobinsynthese und andere Prozesse benötigt wird, wird intrazellulär in Ferritin gespeichert. Dieses Speicherprotein, das etwa 20 % des Körpereisens bindet, kommt hauptsächlich in der Leber, aber auch im Knochenmark, der Milz und den Enterozyten vor.

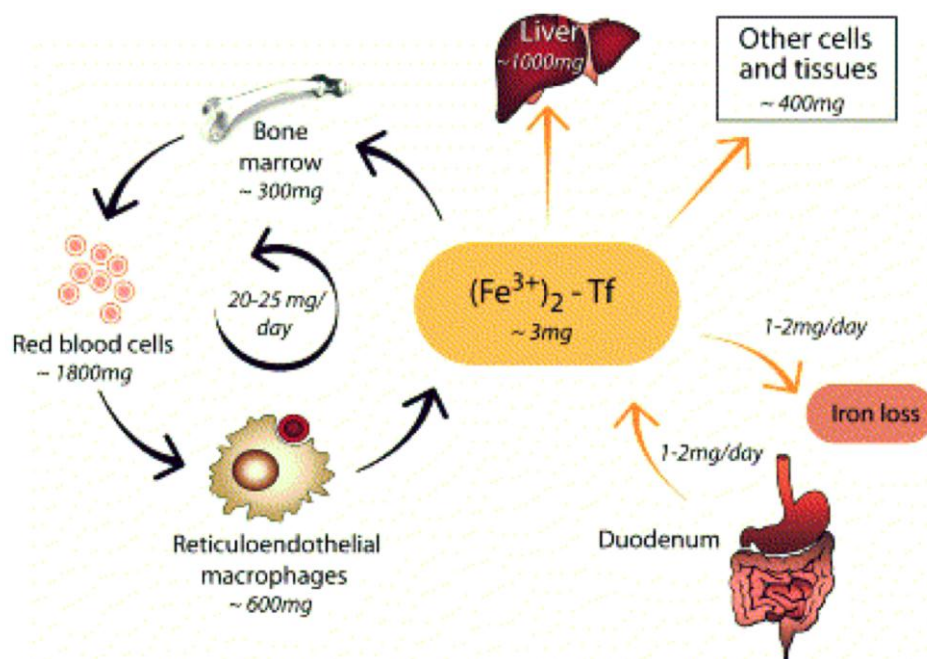


Abb. 1 : Eisenhomöostase (Hentze et al. 2004)

Benötigt der Körper vermehrt Eisen, kann schnell auf die Ferritinspeicher zugegriffen werden. Ist der Eisenbedarf des Organismus ausreichend gedeckt, geht ein geringer Teil mit den mukosalen Speichern bei Abstoßung der Darmepithelzellen über den Stuhl verloren (Anderson et al. 2009).

1.2 Struktur von Hepcidin

Hepcidin, welches erstmalig in menschlichem Plasma und Urin nachgewiesen werden konnte, ist ein Peptidhormon (Park et al. 2001). Dieses Peptidhormon nimmt als zentraler Regulator der Eisenaufnahme eine bedeutende Rolle im Eisenstoffwechsel ein. Gleichzeitig weist es aber auch antimikrobielle Eigenschaften auf (Pigeon et al. 2001).

Das Hepcidin-Gen enthält drei Exons, die ein Prä-Prohormon kodieren. Dieses besteht aus 84 Aminosäuren (AS) (Park et al. 2001): die ersten 24 AS kodieren ein Signalpeptid für den Transport in das endoplasmatische Retikulum (Collins et al. 2008). Nach Abspaltung des Signalpeptides wird das 60 AS-Prohormon, vermittelt durch die Prohormon-Konvertase Furin, zum aktiven C-terminalen Hepcidin mit 25 AS gespalten (Gagliardo et al. 2008, Valore und Ganz 2008). Im Urin wurden darüber hinaus zwei weitere Formen mit 22 bzw. 20 AS gefunden, deren biologische Funktion bislang jedoch unklar ist (Park et al. 2001) [Abb. 2].

Neben der eisenregulatorischen Funktion (siehe 1.4) wirkt Hepcidin in vitro antimikrobiell gegen grampositive und gramnegative Bakterien, sowie Pilze. Es gehört zu den Defensin-ähnlichen Proteinen (Krause et al. 2000, Park et al. 2001). In Struktur und antimikrobiellem Wirkspektrum ähnelt es dem humanen β -Defensin 1 (Zucht et al. 1998). Während jedoch β -Defensine sechs Cystein-Reste enthalten, die durch drei Disulfidbrücken verbunden sind, enthält Hepcidin acht Cystein-Reste, die über vier Disulfidbrücken verbunden sind (Bals 2000). Dadurch bildet Hepcidin in der Tertiärstruktur eine für Defensine typische Haarnadelschleife aus (Schibli et al. 2002). Das aktive Hormon besteht in der Primärstruktur überwiegend aus basischen Aminosäuren, was eine positive Gesamtladung bewirkt. Dies verleiht Hepcidin eine amphipatische Struktur, welche es antimikrobiellen Peptiden erlaubt die Membran von Mikroorganismen zu passieren und Pathogene zu lysieren (Hancock & Lehrer 1998).

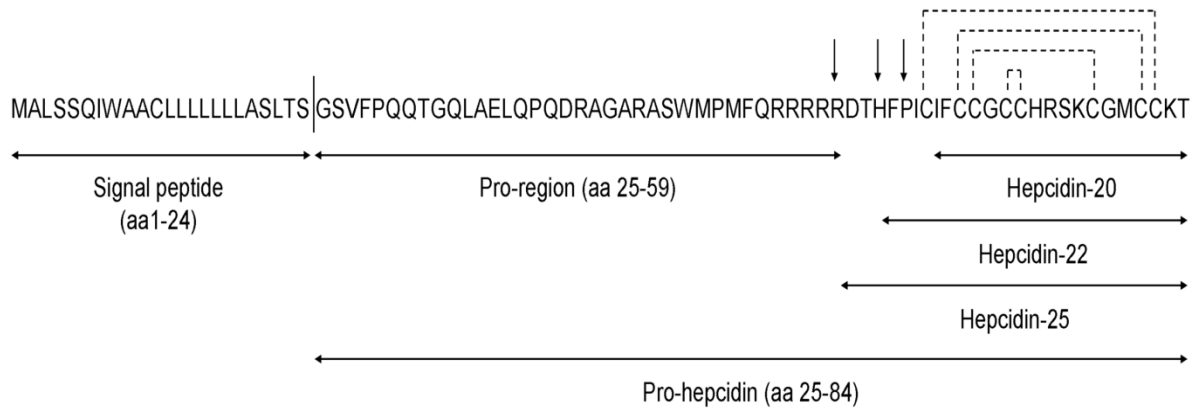


Abbildung 2: Aminosäuresequenz von Hepcidin und seinen Vorläufermolekülen
(verändert nach Kulaksiz et al. 2004)

1.3 Der Hepcidinrezeptor Ferroportin

Der bisher einzige bekannte Rezeptor für Hepcidin ist Ferroportin, das u.a. auf der Membranoberfläche von Hepatozyten, der basolateralen Seite der Enterozyten sowie auf Makrophagen exprimiert wird (Ganz 2005, Nemeth et al. 2004). Außerdem ist es der bislang einzige bekannte Eisenexporter der Zelle (Donovan et al. 2005, Montosi et al. 2001). Ferroportin ist ein Homodimer aus 12 Transmembrandomänen und insgesamt 571 Aminosäuren (De Domenico et al. 2007a, De Domenico et al. 2008). Jedes der beiden Ferroportin-Monomere verfügt jeweils über eine extrazellulär lokalisierte Hepcidin-bindestelle (De Domenico et al. 2009).

Die Bindung des aktiven Heparidins an Ferroportin vermittelt die Bindung und Aktivierung von Jak 2 (Janus Kinase 2), sowie die darauffolgende Phosphorylierung von Ferroportin und führt somit zur Internalisierung des Ferroportin/Heparidin-Komplexes. Einmal internalisiert, werden die Phosphate entfernt und Ferroportin wird ubiquitiniert (De Domenico et al. 2007b).

Im Anschluss wird das ubiquitinierte Ferroportin lysosomal abgebaut. Voraussetzung für diesen Prozess sind zwei funktionierende Ferroportin-Monomere mit jeweils intakten Hepcidinbindestellen und Phosphorylierungsstellen (De Domenico et al 2009). Durch Internalisierung verringert sich die Zahl der Ferroportin-Proteine auf der Oberfläche der Zelle, der Eisenexport wird blockiert und das Eisen reichert sich in der Zelle an. Der Eisenverlust im Rahmen des physiologischen Zelltodes mit Zellabschilferung der

Enterozyten ist die einzige Möglichkeit Eisen aktiv aus dem Körperkreislauf zu entfernen. Durch einen hohen Hepcidin-Spiegel wird also zum einen weniger Eisen aus der Nahrung aufgenommen, zum anderen kann das Eisen, welches durch Makrophagen aus alten Erythrozyten recycelt wird, nicht in die Blutbahn abgegeben werden.

Im Gegensatz dazu resultiert aus einem niedrigen Hepcidin-Spiegel eine vermehrte Eisenabgabe aus Enterozyten und Makrophagen in die Blutbahn, da mehr Ferroportin an der Zelloberfläche verbleibt.

1.4 Funktion und Regulation von Hepcidin

Hepcidin wird vorwiegend von Hepatozyten produziert (Park et al. 2001), aber auch in β -Zellen des Pankreas, im Herzen und der Niere (Kulaksiz et al. 2005, Merle et al. 2007, Kulaksiz et al. 2008) konnte die Expression von Hepcidin nachgewiesen werden.

Hepcidin erfüllt zwei wichtige Funktionen. Durch die Internalisierung von Ferroportin steuert Hepcidin die intestinale Eisenabsorption und übernimmt eine zentrale Rolle in der Eisenhomöostase (Ganz 2003, Kulaksiz et al. 2004). Diese eisenregulatorische Funktion von Hepcidin wurde in gentechnisch veränderten Mäusen entdeckt: Mäuse mit Hepcidin-Überexpression entwickelten massive Anämien (Nemeth und Ganz 2006, Nicolas et al. 2002), wohingegen ein Mangel an Hepcidin in Knockout-Mäusen zu einer Eisenüberladung in Leber, Pankreas und Herz führte (Nicolas et al. 2001). Dieses Muster der Eisenüberladung konnte auch bei Patienten mit angeborener Hämochromatose beobachtet werden (Pietrangelo 2010). Dabei zeigt sich in Folge geringer Serum-Hepcidinlevel eine Eisenüberladung der Leber (Roetto et al. 2003). Schädigungen verschiedenster Organsysteme resultieren aus diesen nicht bedarfsgerechten Eisenablagerungen (Niederau et al. 1994, Pietrangelo 2007). Ursachen sind dabei Mutationen verschiedener Eisenregulations-Gene. Am häufigsten ist davon das HFE-Gen betroffen, Mutationen des Transferrin-Rezeptors 2 (TFR-2), des Haemojuvelin-Gens (HFE2), des Ferroportin-Gens (IREG1) sowie des Hepcidin-Gens (HAMP) sind weniger häufig (Pietrangelo 2007).

Neben seiner Funktion im Eisenstoffwechsel ist Hepcidin als Akute-Phase-Protein ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems (Nemeth et al. 2003). Durch bakterielle Infektionen oder Entzündungsprozesse wird in den Makrophagen vermehrt Interleukin-6 (IL-6) produziert, welches die Expression von Hepcidin steigert (Nemeth et

al. 2003, Wessling-Resnick 2010). IL-6 scheint der wichtigste Induktor der Hepcidinsynthese zu sein, aber Untersuchungen am Mausmodell zeigen, dass auch andere Zytokine, wie IL-1, *transforming growth factor- β* (TGF- β) und *bone morphogenetic proteins* (BMP 2, 4 und 6), eine aktivierende Rolle bei der infekassozierten Regulation von Hepcidin spielen (Babitt et al. 2006, Lee et al. 2005, Truksa et al. 2006, Wang et al. 2005). In Patienten mit chronischen Entzündungen und Tumoren kommt es zu einem chronischen, zytokininduzierten Hepcidinanstieg (Ganz 2003, Ganz 2006). Über Ferroportin reduziert Hepcidin dabei die Eisenaufnahme bzw. die Eisenfreisetzung und die daraus resultierenden sinkenden Eisenspiegel führen zur Ausbildung einer Infektanämie (Nemeth et al. 2003, Rivera et al. 2005, Weinstein et al. 2002). Hepcidin wirkt somit in zweifacher Hinsicht gegen Mikroorganismen. Zum einen direkt durch seine bakterizide und fungizide Wirkung. Zum anderen indem es den Mikroorganismen das für ihr Wachstum notwendige Eisen entzieht (Verga Falzacappa und Muckenthaler 2005).

Obwohl bereits bekannt ist, dass Eisenmangelzustände, Hypoxie und Anämie zu einer Abnahme der Hepcidin-Konzentration im Blut führen (Ganz und Nemeth 2009, Nicolas et al. 2002) ist die Regulation von Hepcidin bis heute nicht vollständig erforscht. Eine Verringerung der Hepcidinsynthese wird auch nach Gabe von Erythropoetin beobachtet (Ashby et al. 2010, Fein et al. 2007). Im Falle von Anämie oder Hypoxie scheint die kompensatorische Erythropoese mit erhöhtem Eisenbedarf der wesentliche Trigger der abnehmenden Hepcidinkonzentration zu sein (Ganz und Nemeth 2009). Eine gesteigerte Hepcidinexpression wird wie bereits erwähnt durch Entzündungsmediatoren sowie Eisenüberladung ausgelöst.

Bisher wurden zwei Signalwege identifiziert, über welche die Regulation von hepatischem Hepcidin in Abhängigkeit von Eisen erfolgt. Der eine Signalweg ist abhängig von BMP-6. BMP's sind eine Gruppe von Signalpeptiden, welche die Zellproliferation und die Differenzierung regulieren (Collins et al. 2010). BMP-6 bindet im Falle einer Eisenüberladung an einen Komplex aus BMPR (*bone morphogenetic protein receptor*) und membranständigem Hämojuvelin (HJV). Daraufhin wird intrazellulär die Phosphorylierung von SMAD-Proteinen ausgelöst. Phosphorylierte SMAD-Proteine translozieren in den Zellkern und induzieren die Expression von Zielgenen, u.a. Hepcidin (Anderson und Darshan 2008, Deugnier 2010). Wird in Mäusen das leberspezifische SMAD4 ausgeknockt, ist die Expression von Hepcidin stark reduziert (Kautz et al. 2008).

Der zweite Signalweg ist abhängig vom Transferrinrezeptor 2 (TFR-2). Neben dem nahezu ubiquitär vorkommenden TFR-1 wurde 1999 der Transferrin-Rezeptor TFR-2 entdeckt (Kawabata et al., 1999). TFR-2 bindet wie TFR-1 an Transferrin und ist für die zelluläre Eisenaufnahme verantwortlich, jedoch ist seine Affinität zu Transferrin 25-mal geringer (Anderson und Vulpe, 2009). TFR-2 wird im Gegensatz zu TFR-1 vorwiegend in Hepatozyten exprimiert. Transferrin-assoziiertes Eisen bindet an einen Komplex aus TFR-2 und HFE-1 (*high-Fe gene*) und initialisiert die Aktivierung der Hepcidinexpression. Die intrazelluläre Signalkaskade ist dabei noch nicht vollständig verstanden. Es wird jedoch vermutet, dass es zu einer Überschneidung mit dem BMP/SMAD Signalweg kommt (Camaschella und Silvestri 2008, Knutson 2010).

Die Hepcidinregulation im Rahmen von Entzündungsprozessen erfolgt über den IL-6/STAT3-Pathway. Ligandenbindung an den IL-6-Rezeptor führt zu einer Jak-2-vermittelten Phosphorylierung von STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*). Nach Translokation von phosphoryliertem STAT3 in den Zellkern wird die Genexpression von Hepcidin induziert (Nemeth et al. 2003, Pigeon et al. 2001, Wessling-Resnick 2010) [Abb.3].

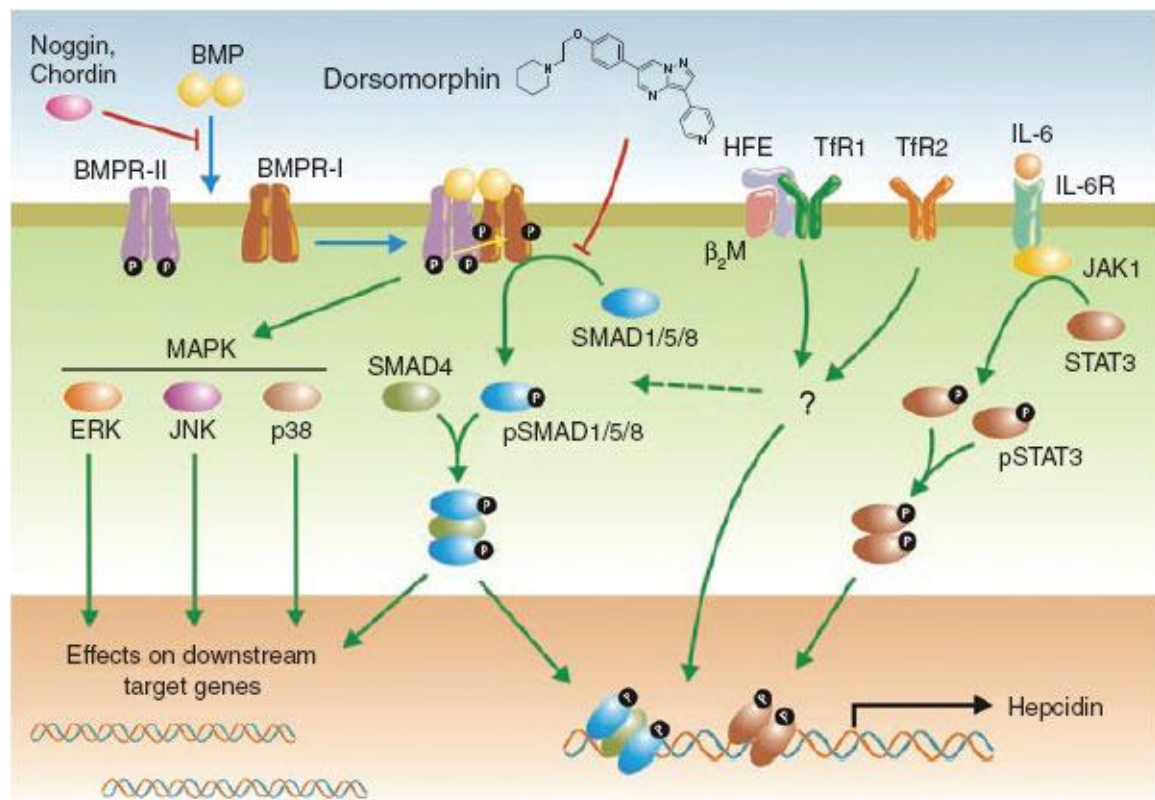


Abb. 3: Intrazelluläre Signalwege der Hepcidinregulation (Anderson und Darshan 2008)

1.5 Hormonelle Regulationsmechanismen

Hormone sind biochemische Botenstoffe, die von spezialisierten Zellen gebildet werden und über Rezeptorinteraktion spezifische Regulationsfunktionen an ihren jeweiligen Zielzellen verrichten.

Der größte Teil der Hormone ist nicht membrangängig und bindet an einen in der Zellmembran befindlichen Rezeptor. Durch Bindung des Hormons wird die zytosolische Domäne des Rezeptors aktiviert und das Signal weitergeleitet. Bei diesen Transmembranproteinen unterscheidet man wiederum drei verschiedene Grundtypen: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, ligandenaktivierte Ionenkanäle und enzymgekoppelte Rezeptoren (Deutzmann 2006).

In der hier vorliegenden Arbeit wird in diesem Zusammenhang vorwiegend Ferroportin als Rezeptor für das Peptidhormon Hepcidin betrachtet. Die Struktur von Ferroportin ist noch nicht ausreichend erforscht, um diesen Rezeptor in eine der o.g. Kategorien einzuteilen.

Wie in Kapitel 1.3 jedoch beschrieben handelt es sich bei Ferroportin am ehesten um einen Transmembranrezeptor mit assoziierter Tyrosinkinase (Jak2). Bei diesen Rezeptoren führt eine Bindung des Liganden zur Rezeptor-Dimerisierung und Autophosphorylierung der Janus-Kinasen. Diese phosphorylieren Tyrosinreste des Rezeptors und erzeugen so Bindungsstellen für Proteine mit SH2-Domänen (*src-homology 2*). Insbesondere STAT-Proteine binden an diese Domäne und werden über die Kinase an einem Tyrosinrest phosphoryliert. Phosphorylierte STAT-Dimere diffundieren in den Kern und aktivieren die Transkription JAK-STAT-regulierter Gene (Deutzmann 2006).

Von vielen Peptidhormonen ist bekannt, dass sie neben einem endokrinen zusätzlich einem autokrinen Sekretionsmechanismus unterliegen, bei dem die abgegebenen Hormone und hormonähnlichen Substanzen auf die absondernde Zelle selbst wirken. Hierbei wird vorausgesetzt, dass die betreffende Zelle Rezeptoren und nachgeschaltete Signalübertragungssysteme für dieses „eigene“ Hormon besitzt und dass dadurch wiederum eine dem Signal angemessene Antwort ausgelöst wird. Dabei kann es lokal zu einem positiven oder negativen Feedback kommen. Die Antwort kann dabei aber auch die Empfindlichkeit dieser Zelle für andere Signale modulieren (Köhrle 2006).

1.6 Ziele der Forschungsarbeit

Die Regulation von Hepcidin in Abhängigkeit von verschiedenen Stimuli wie Eisen und Entzündungsprozessen ist bereits gut aufgeklärt. Eine mögliche autokrine Regulation von Hepcidin hingegen wurde bisher nicht untersucht. Im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit sollte deshalb analysiert werden, ob die Expression von Hepcidin autokrin reguliert wird. Dazu wurden humane Hepatomazelllinien als Modellsystem verwendet und diese mit synthetischem Hepcidin behandelt. Der Einfluss von Hepcidin auf seine eigene Expression wurde sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Proteinebene untersucht.

Zusätzlich sollten, ebenfalls im Zellkulturmodell mögliche Signaltransduktionswege dieser Regulation untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
APS	Bio Rad, Laboratories GmbH, München
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Coomassie Blue	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Entwickler/Fixierer-Lösung	Tetenal AG & Co. KG, Norderstedt
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol	Honeywell Riedel-de Haen, Hanover
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
N, N' Methylen-bis-Acrylamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche, Mannheim
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
SDS ultrapure	neoLab, Heidelberg
Tricin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween20	SERVA, Feinbiochemica, Heidelberg
Xylol	VWR, Ulm

2.1.2. Kits und Materialien

a.) Zellkultur:

Allgemeines:

Grundmedien (Advanced DMEM, DMEM und RPMI)	Invitrogen, Darmstadt
Medienzusätze (FCS, Penicillin/Streptomycin, L-Glutamin)	Invitrogen, Darmstadt
Zellkulturflaschen	BD-Falcon, Heidelberg
Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Trypsin-EDTA	PAA, Cölbe

Stimulationen und Transfektionen:

Hepcidin	Bachem, Weil a. R.
HiPerfect Reagenz	Qiagen, Hilden
siRNA (Ferroportin), siRNA (Hepcidin)	AppliedBiosystems, Darmstadt

b.) Genexpressions-Bestimmungen

RNA-Isolierung:

High Pure RNA Isolatlon Kit	Roche, Mannheim
-----------------------------	-----------------

cDNA-Synthese:

SuperScript III Reverse Transkriptase Kit	Invitrogen, Darmstadt
dNTP (10mM)	PeqLab, Erlangen
Oligo(dT) ₂₀ -Primer	Invitrogen, Darmstadt

RT-PCR:

RT2-Real Time SYBR Green/Rox
 Fast Optical 96-Well Reaction Plate
 MicroAmp Optical Adhesive Film

Biomol, Hamburg
 AppliedBiosystems, Darmstadt
 AppliedBiosystems, Darmstadt

c.) ProteinanalysenProteinbestimmung:

Farbstoff-Konzentrat
 Bovines Serumalbumin
 Kulturplatte mit 96 Vertiefungen

Bio Rad, München
 SERVA, Heidelberg
 Greiner Bio-One, Frickenhausen

Western Blot:

Novex Sharp Protein Standard
 FluoroTrans PVDF-Transfermembran
 ECL Western Blotting Detection Reagent
 Cronex 5 Medical X-Ray Film

Invitrogen, Darmstadt
 Pall Cooperation, Dreieich
 GE-Healthcare, München
 AGFA, Düsseldorf

Immunfluoreszenz:

Deckgläser
 Objektträger
 Feuchtinkubations-Kammer
 FluorSave Reagent
 Triton-X-100

Marienfeld, Lauda
 VWR, Ulm
 Kobe, Marburg
 Merck, Darmstadt
 Sigma-Aldrich

2.1.3. Pufferlösungen & Stammlösungen

a.) Proteinextraktion & Proteinbestimmung

Extraktionspuffer

für Hepcidin:	10 mM 0,5 % pH 7,5	Tris Triton-X-100
für Membranproteine:	100 mM 50 mM 10 % 1 %	NaCl Tris-HCL (pH 7,4) Glycerol Triton-X-100

b.) WesternblotGießen der Gele:

Gelpuffer (Tricingel)	54,5 g 4,5 ml ad 150 ml pH 8,45	Tris 10% iges SDS H ₂ O dest.
Gelpuffer (SDS-Gel)		
Sammelgelpuffer:	60,5 g 600 ml pH 6,8 ad 1 Liter	Tris destilliertes H ₂ O VE-H ₂ O
Trenngelpuffer:	181,71 g 500 ml pH 8,8 ad 1 Liter	Tris destilliertes H ₂ O VE-H ₂ O
T40/C3	7,76 g 0,24 g ad 20 ml	Acrylamid Bisacrylamid VE-H ₂ O
T40/C6	18,8 g 1,2 g ad 50 ml	Acrylamid Bisacrylamid VE-H ₂ O

Gelelektrophorese:

Gel-Ladepuffer (5-fach)	3,125 ml 1 g 5 g 2,5 ml 375 µl 1 Spatelspitze	1M Tris-HCL pH 6,8 SDS Glycerin β-Mercaptoethanol H ₂ O Bromphonolblau
Gel-Laufpuffer (SDS-Gel)	5 g 15 g 72 g ad1 Liter bei 70°C-80°C im Wasserbad lösen	SDS Tris Glycin VE H ₂ O
Gel-Auftragspuffer		Gel-Ladepuffer mit jeweiligem Extraktionspuffer 1:5 verdünnen
Anodenpuffer (Tricin-Gel)	24,22 g ad 1 Liter	Tris VE-H ₂ O
Kathodenpuffer (Tricin-Gel)	12,11 g 17,92 g 10 ml ad 1 Liter	Tris Tricin 10% SDS VE-H ₂ O

Blotting:

Blottingpuffer	3,03 g 11,26 g 100 ml ad 1 Liter pH 8,3	Tris Glycin Methanol VE-H ₂ O dest.
----------------	---	---

Sonstiges:

Tris-Buffered-Saline (TBS)	8,7 g 1,21 ad1 Liter pH 7	NaCl Tris VE-H ₂ O
TBST	1 Liter 1 ml	TBS Tween20

c.) Immunfluoreszenz

Phosphate-buffered-saline (PBS)	Lösung A:	0,2 M Na ₂ PO ₄ (27,8g)
	Lösung B:	0,2 M Na ₂ HPO ₄ (35,6g)
	ad jeweils	1 Liter VE-H ₂ O
	50 ml	Lösung A
	200 ml	Lösung B
	43,85 g	NaCl
	ad 5 Liter	VE-H ₂ O

2.1.4. Geräte

7500 Fast Real-Time PCR System	AppliedBiosystems, Darmstadt
mit <i>Software: Sequence detection</i>	AppliedBiosystems, Darmstadt
<i>Software, Version 1.4</i>	
Analysewaage	Sartorius AG, Göttingen
Brutschrank Typ ST5050	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Criterion Blotter	Bio Rad, München
ELISA-Reader SLT Spectra II	Gemini BV, Niederlande
Heizblock DRI-Block	Biostep GmbH, Jahnsdorf
Mini-PROTEAN System	Bio Rad, München
MS1 Minishaker (Vortexer)	IKA, Staufen
Olympus Colorview Kamera	Olympus, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop IX 71	Olympus, Hamburg
mit <i>Software: Simple PCI6</i>	Photonics GmbH, Deutschland
Peltier Thermal Cycler	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf
pH-Meter DRI-Block	Biostep GmbH, Jahnsdorf
Photometer Ultrospec 1100 pro	GE Healthcare, München
PowerPac HC Power Supply	Bio Rad, München
Sterilbank Lamin Air HLB 2448	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Zählkammer nach Neubauer	Brand GmbH & Co. KG, Deutschland
Zentrifuge 5417C	Eppendorf AG, Hamburg

2.2. Methoden

2.2.1 Zellkultur

Zelllinien

Für die Versuche wurden die humanen Hepatomazelllinien HepG2, Hep3B, Huh7, die humane embryonale Nierenzellen (HEK), sowie die Magenepithelzelllinien AGS verwendet. Alle diese Zelllinien sind bereits gut etablierte Zellen und werden regelmäßig für Regulationsstudien verwendet. HepG2-Zellen sind darüber hinaus bereits mehrfach für Studien der Hepcidinregulation verwendet worden (Fein et al. 2007, Kulaksiz et al. 2004). In Huh7 Zellen lag eine mit der Hämochromatose-Mutation C282Y vergleichbare Deletion vor, welche verhindert, dass HFE auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Vecchi et al. 2009).

Kultivierung der Zellen

Die in vitro-Kultivierung der adhärenenten Zellen erfolgte je nach Versuch in unterschiedlichen Zellkulturgefäßen bei 37°C und 5% Luftfeuchtigkeit. HepG2-Zellen wurden in RPMI-Medium, Hep3B Zellen in Advanced DMEM-Medium und Huh7-Zellen sowie HEK und AGS Zellen in DMEM-Medium kultiviert. Den Grundmedien wurden jeweils 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin zugefügt. Die Medien für die Hep3B und Huh7-Zellen wurden zusätzlich mit 0,5% L-Glutamin versetzt.

Lösen, Passagieren und Aussäen der Zellen

Zur Sicherstellung eines gleichmäßigen Zellwachstums in *Monolayern* wurden die Zellen bei zu großer Konfluenz in regelmäßigen Abständen gesplittet. Um dafür die adhärenenten Zellen von der Zellkulturflasche zu lösen, wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 10 ml warmem PBS gewaschen und nach Zugabe von Trypsin (2 ml je 75 cm² Wachstumsfläche) für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden 10 ml Kulturmedium zugegeben und die Zellen mithilfe einer Pipette vereinzelt und gleichmäßig in Lösung gebracht. Zum Splitten der Zellen wurde ein Teil dieses Zelllysates in eine neue Zellkulturflasche überführt. Zur Vorbereitung eines Versuchs wurde eine definierte Zellzahl (siehe „Zellzahlbestimmung“) in kleinere Zellkulturgefäße ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert.

Zellzahlbestimmung

Zur Gewährleistung der Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit der Versuche wurde immer die gleiche Anzahl an Zellen pro Zellkulturgefäß ausgesät. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer, auf die 10 µl einer Zellsuspension aufgetragen wurde. Unter Verwendung eines inversen Mikroskops wurden alle Zellen in den 4 großen Quadranten ausgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter ergab sich aus folgender Formel:

$$\text{Zellen/ml} = (\text{Anzahl der Zellen in den 4 Quadranten} \times 10^4) / 4$$

Stimulation der Zellen

Um die Regulationsmechanismen der Zelle in Anwesenheit von exogenem Hepcidin beurteilen zu können, wurde den verschiedenen Zelllinien 1,5 µg/ml synthetisches Hepcidin (Bachem) zugeführt. Diese Stimulation wurde entweder in Zellkulturflaschen (Wachstumsfläche 25 cm²) oder in Gewebekulturplatten mit sechs Vertiefungen (Wachstumsfläche 9,6 cm²) durchgeführt. Die Zellen wurden dabei jeweils bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert. Direkt vor einer Stimulation wurde immer das Kulturmedium durch frisches Medium ersetzt, um ein optimales und vergleichbares Milieu zu schaffen. Das Medium wurde unmittelbar im Anschluss mit 1,5 µg/ml synthetischem Hepcidin versetzt. Die Inkubationszeiten betrugen 6 h (für RNA-Analysen) und 24 h (für Untersuchungen auf Proteinebene).

Transfektion der Zellen

a.) Ferroportin-GFP

Um die Lokalisation von Ferroportin in An- und Abwesenheit von Hepcidin direkt untersuchen zu können, wurde ein GFP-Ferroportin-Fusionsprotein hergestellt und in einen Vektor eingebracht. HEK-Zellen wurden im Anschluss mit diesem Vektor transfiziert. Diese Fpn-GFP-transfizierten HEK-Zellen wurden uns freundlicherweise von der amerikanischen Arbeitsgruppe um Jerry Kaplan zur Verfügung gestellt (Nemeth et al. 2004). GFP (*green fluorescent protein*) ist ein Reporterprotein, dass unter UV-Licht grün fluoresziert. Co-Faktoren oder beigefügte Substrate werden nicht benötigt (Chalfie et al., 1994). GFP-Fusionsproteine werden häufig dazu verwendet, Proteinlokalisationen zu untersuchen.

In den verwendeten Zellen unterliegt die Expression des GFP-Ferroportin-Fusionsproteins der Kontrolle eines Ecdyson-Promotors, der durch Zugabe von Ponasterone (10 µg; 24 h) aktiviert wurde (Nemeth et al. 2004). Erst im Anschluss wurden die Zellen mit Hepcidin stimuliert.

b.) small interfering RNA's

Das Einbringen von synthetischer siRNA in Zellen diente dazu, über RNA-Interferenz die Expression von spezifischen Zielgenen zu verringern. Dieser Prozess ermöglichte Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung des betreffenden Gens.

Die Transfektion der Zellen mit siRNA erfolgte in Gewebekulturplatten mit sechs Vertiefungen (Wachstumsfläche 9,6 cm²). Dazu wurden pro Vertiefung $9,9 \times 10^5$ Zellen in 1,9 ml Medium ausgesät. Im Anschluss wurden die Ferroportin- oder Hepcidin-siRNA-Komplexe vorbereitet und nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur vorsichtig in das vorgelegte Medium getropft. Die Komplexe bestanden pro Ansatz aus 16,5 µl einer 2 µM siRNA-Stammlösung, 13,2 µl *HiPerfect* Reagenz und 70,3 µl FCS-freiem Medium. Als Kontrollen dienten sowohl eine Control-siRNA, die in die Zellen aufgenommen wird, aber die Genexpression nicht beeinflusst, als auch unbehandelte Zellen. In Vorversuchen wurden die Zellen mit siRNA transfiziert und mittels qRT-PCR wurde analysiert, wie lange die Down-Regulation der jeweiligen Genexpression anhielt.

Dabei zeigte sich eine stabile Down-Regulation bis zu 96 h nach Transfektion. Basierend auf diesem Befund wurden die Zellen in weiteren Versuchen etwa 68 h nach Transfektion für 6 h mit 1,5 µg/ml Hepcidin stimuliert.

2.2.2. RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Um die mRNA-Expression verschiedener Gene zu untersuchen, musste aus den Zelllysaten zunächst die Gesamt-RNA isoliert werden. Aus der isolierten Gesamt-RNA konnte daraufhin cDNA synthetisiert und diese mittels qRT-PCR untersucht werden.

Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurde der High Pure RNA Isolation Kit nach Anleitung verwendet. Dazu wurden die jeweiligen Zellen mit 400 µl *Lysis-Buffer* versetzt, mit einem Zellkulturschaber vom Boden der Kulturflasche gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 200 µl sterilem PBS aufgenommen. Anschließend wurde das Zelllysate auf einem Vortexer 15 sec gemischt und in ein *Filtertube* überführt. Nach

einer Zentrifugation (2 Minuten, 8000 g) wurde jedes *Filtertube* mit einem Mix aus 90 µl *DNase-Incubation-Buffer* und 10 µl DNase beladen. Die Inkubation erfolgte über 15 Minuten bei Raumtemperatur.

Im Anschluss wurde der Filter mit 500 µl *Wash-Buffer I* bzw. 500 µl *Wash-Buffer II* gewaschen und die Waschlösung durch Zentrifugation entfernt (jeweils 15 Sekunden, 8000 g). In einem dritten Waschschriff wurde mit 200 µl *Wash-Buffer II* gewaschen und die Membran anschließend getrocknet (4 min, 13000 g). Zum Abschluss erfolgte die Elution der RNA durch Zugabe von 25-100 µl *Elution-Buffer* und einer 1-minütigen Zentrifugation bei 8000 g.

Anschließend wurde die Konzentration der RNA durch UV-photometrische Messung bestimmt. Zur Reinheitsbestimmung wurde der Quotient der Absorptionen bei 260/280 nm ermittelt.

Für die Synthese der komplementären DNA (cDNA) wurden jeweils 2 µg RNA (ad 12 µl H₂O) mit 1 µl dNTP und 1 µl Oligo(dT)₂₀-Primer versetzt und für 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz durch 1 µl 0,1 M DTT, 4 µl 5-fach *First Strand Buffer* und 1 µl des Enzyms *Superscript III* ergänzt. Mit Hilfe eines Peltier Thermal Cycler und folgendem Programm wurde dann der komplementäre Strang synthetisiert:

- 1.) 25°C für 5 Minuten
- 2.) 50°C für 50 Minuten
- 3.) Inaktivierung des Enzyms bei 70°C für 15 Minuten

2.2.3. Quantitative Real Time-PCR

Mit Hilfe der quantitativen Real Time-PCR mittels des Fast Real Time PCR Systems lassen sich die Transkriptmengen einzelner Gene bestimmen. Die Methode basiert auf der Einlagerung von Fluorophoren – in diesem Fall *SYBR Green* - in doppelsträngige Nukleinsäuren. Das *Fast Real Time* PCR System bestimmt dabei über den gesamten Verlauf der PCR die Zunahme der Fluoreszenz. Grafisch dargestellt, ergibt sich dabei ein sigmoidaler Kurvenverlauf. Zum Rückschluss auf die Menge der enthaltenen bzw. synthetisierten Nukleinsäuren betrachtet man jeweils den Wendepunkt der Kurve. In diesem Bereich wird die PCR nicht durch eine dNTP-Limitierung oder

der Zusammenlagerung von PCR-Produkten aufgrund eines ungünstigen Primer-Template-Verhältnisses gestört, sondern verläuft unter optimalen Bedingungen. Dieser Wendepunkt wird schließlich von der *Sequence Detection Software Version 1.4* berechnet und ausgegeben. Dabei gilt, je früher der Wendepunkt erreicht wird, desto mehr Template ist im Ansatz enthalten bzw. desto stärker wird das zu untersuchende Gen exprimiert. In dieser Arbeit wurde die quantitative Real Time-PCR dazu verwendet, die Transkriptmenge verschiedener Gene (relativ zu β -Actin) zu bestimmen.

Die Reaktionen für die qRT-PCR wurden in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen angesetzt und enthielten pro Vertiefung jeweils 8 μ l RT-PCR-Mastermix, 1 μ l zu untersuchende cDNA und 1 μ l Primergemisch. Der RT-PCR-Mastermix bestand aus 5 μ l SYBR-Mix und 3 μ l sterilem H_2O dest. Das Primergemisch bestand pro Ansatz aus 0,03 μ l eines Hinprimers (100 pmol) und 0,03 μ l eines Rückprimers (100 pmol) ad 1 μ l H_2O dest.

Die Primer für HAMP (Hepcidin), IREG1 (Ferroportin), TFR-2 (Transferrin-Rezeptor 2), HFE-1, IL-6, BMP-6 (*bone morphogenetic protein*), FTL (Ferritin), Cp (Ceruloplasmin), SMAD4, β 2M (β 2-Mikroglobulin), STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), ID1 (*inhibitor of DNA binding 1*), IRP1, IRP2 (*iron regulatory proteins*) und β -Actin als housekeeping-Gen wurden über die Biomers AG Ulm bezogen [Sequenzen in Tabelle1].

Zu Beginn der qRT-PCR erfolgte eine 10-minütige Hitzeaktivierung der im SYBR-Mix enthaltenen Polymerase bei 95°C. Der anschließende Replikationszyklus enthielt eine Denaturierung (15 Sekunden bei 95°C), sowie das Annealing der Primer und die Elongation der DNA-Doppelstränge (1 Minute bei 60°C). Es wurden insgesamt 45 Zyklen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der *Sequence Detection Software* (Version 1.4). Das Programm ermittelt dabei den c_t -Wert (Wendepunkt der Kurve der Fluoreszenz) der einzelnen Proben, mit dem über die Formel $y = 2^{-[c_t(\text{Zielgen}) - c_t(\beta\text{-Actin})]}$ das Expressionslevel relativ zu β -Actin bestimmt werden kann.

Tabelle 1: Primersequenzen

Zielgen	Hinprimer	Rückprimer
HAMP	5'-gcc-tct-gga-aca-tgg-gca-t-3'	5'-gac-ggg-aca-act-tgc-aga-gc-3'
IREG1	5'-ctt-cag-cct-ggc-aag-tta-cat-g-3'	5'-ttc-tca-aag-gca-ttt-gaa-agg-g-3'
TFR-2	5'-gat-tca-ggg-tca-ggg-agg-tg-3'	5'-gaa-ggg-gct-gtg-att-gaa-gg-3'
HFE-1	5'-caa-caa-gtg-cct-cct-ttg-gt-3'	5'-gcc-act-tca-tgg-tga-tgt-tc-3'
Cp	5'-taa-cag-cac-ctg-gaa-gtg-ac-3'	5'-gcc-aag-atg-ctc-ttc-ttc-ag-3'
FTL	5'-cta-cgt-tta-cct-gtc-cat-gt-3'	5'-gct-tca-tca-gtt-tct-cag-ca-3'
BMP-6	5'-cac-aga-gac-tct-gac-ctg-tt-3'	5'-gtg-gac-tcc-atc-cct-tgt-ca-3'
SMAD4	5'-tgg-tcg-gaa-agg-att-tcc-tc-3'	5'-cct-gag-aga-tca-att-cca-gg-3'
STAT3	5'-tca-aga-ttg-ggc-ata-tgc-gg-3'	5'-tca-aga-tac-ctg-ctc-tga-ag-3'
IRP1	5'-gtt-agg-agg-aga-tcc-aga-ga-3'	5'-ctg-taa-act-gtc-tgc-cct-tc-3'
IRP2	5'-gtg-att-ctg-gag-aac-tag-gc-3'	5'-cac-tgt-ttc-agg-ttc-agg-ca-3'
β2M	5'-cta-tcc-agc-gta-ctc-caa-ag-3'	5'-gac-cag-tcc-ttg-ctg-aaa-ga-3'
ID1	5'-gac-atg-aac-ggc-tgt-tac-tc-3'	5'-ctg-atg-tag-tcg-atg-acg-tg-3'
β-Actin	5'-cag-ggc-tga-gat-gcc-gtc-gag-3'	5'-ctc-cac-aag-cgc-ctt-cgg-tcc-3'
Il-6	5'-ctc-cac-aag-cgc-ctt-cgg-tcc-3'	5'-cag-ggc-tga-gat-gcc-gtc-gag-3'

2.2.4. Proteinextraktion und Proteinbestimmung

Für die Bestimmung des Proteingehalts im Zelllysate mit Hilfe des Western Blots musste zuerst die Gesamt-Proteinmenge extrahiert werden. Zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit der Proteinbanden musste jede Geltasche die gleiche Proteinmenge enthalten. Die Proteinmenge der Zelllysate wurde im Anschluss an die Proteinextraktion mittels Photometrie bestimmt.

Die Proteinextraktion aus den Zellen erfolgte mittels verschiedener Extraktionspuffer, abhängig davon, ob das zu untersuchende Protein in der Zellmembran oder dem Zytoplasma lokalisiert war. Dazu wurden abhängig von den Wachstumsflächen der Kulturflaschen 110-300 µl des entsprechenden Puffers auf die Zellen gegeben und diese mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden des Behältnisses gelöst. Mit einer Kanüle (Durchmesser 0,45 mm) wurde durch mehrmaliges Auf- und Abziehen des Zelllysates die DNA abgeschert. Im Anschluss wurden 20 µl der Zellsuspension für die Proteinbestimmung entnommen und der restlichen Probe Ladepuffer zugegeben (1:5). Nach erneutem Auf- und Abziehen durch eine Kanüle, wurden die Proben für 10 Minuten bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert. Dadurch setzten sich Zelltrümmer in Form eines Pellets ab. Nur der Überstand wurde für die Proteinbestimmung verwendet.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach dem Prinzip von Bradford. Dieses beruht auf der Interaktion des in der Bradfordreagenz enthaltenen *Coomassie Brilliant Blue* mit Argininresten der Proteine, wobei es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 auf 595 nm kommt. Über den Abgleich mit einer Standardkurve konnte die Konzentration des Gesamtproteins in den einzelnen Proben berechnet werden. Für die Proteinbestimmung wurde die Bradford-Lösung 1:5 mit H₂O dest. verdünnt. Im Anschluss wurde mit Hilfe von BSA eine Verdünnungsreihe pipettiert, die dem ELISA-Reader zur Erstellung einer Standardkurve diente. Von den zu bestimmenden Proben wurden jeweils 2,5 µl mit 500 µl Bradford-Lösung versetzt und auf einem Vortexer für 30 Sekunden gut gemischt. Sowohl von der Verdünnungsreihe, als auch von den Probenlösungen wurden im Anschluss 200 µl auf eine Gewebekulturplatte mit 96 Vertiefungen aufgetragen.

Ein mit dem ELISA-Reader verbundener Computer berechnete aus der zuvor erstellten Standardkurve die Proteinkonzentration der Probelösungen. Eventuelle Verdünnungsfaktoren mussten im Anschluss noch mit einberechnet werden.

2.2.5. Western Blot

Beim Western Blot werden mittels Elektrophorese Proteine anhand ihrer Größe getrennt und auf eine Trägermembran übertragen. Die Proteinbanden können dann mittels Antikörperreaktionen sichtbar gemacht werden. Der primäre Antikörper bindet dabei an sein Antigen, welches auf der Membran fixiert ist. An diesen wiederum bindet der sekundäre Antikörper, der z. B. mit dem Enzym HRP (*horseradish peroxidase*) gekoppelt ist. HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, dessen Chemilumineszenz detektiert werden kann.

Zur Auftrennung der Proteine mittels Elektrophorese wurden zwei Arten von Gelen gegossen. Für die Untersuchung von Prohepcidin wurden Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gele (16,5 %) gegossen. Für die Analyse von Membranproteinen, wie Ferroportin und TFR-2 wurden SDS-Gele (6-8 %) hergestellt.

Nach den unten aufgeführten Pipettierschemata eines Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gels wurden die Mischungen für Trenn-, Sammel- und Spacergel hergestellt. Zuerst wurde das Trenngel in die Gelkammer gegossen. Direkt im Anschluss wurde das Spacergel darauf geschichtet, wobei vermieden werden musste, dass sich die Schichten mischen. Darauf folgte eine dünne Schicht Isopropanol, welches in der 30-minütigen Polymerisationszeit für eine glatte Oberfläche sorgte. Nach der Aushärtung wurde das Isopropanol abgegossen und die Oberfläche vorsichtig mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Sammelgel über das Spacergel geschichtet und ein Kamm zur Formung der Probenaschen eingesetzt. Die Herstellung des SDS-Gels erfolgte analog nur ohne Spacergel.

Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel zum Denaturieren für fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Anschließend wurde eine definierte Menge an Protein pro Tasche aufgetragen. Die eingesetzte Menge des Proteinmarkers betrug 7 µl, leere Taschen wurden mit 10 µl Ladepuffer befüllt. Zur Auftrennung der Proteine wurden die Gele in eine Laufkammer gegeben, wobei bei den Tricin-SDS-Gelen in die innere Kammer Kathodenpuffer und in die äußere Kammer Anodenpuffer gefüllt wurde.

Bei den SDS-Gelen wurde sowohl innen, als auch außen Gel-Laufpuffer eingefüllt. Dann wurde zum Einlauf des Gels für 30 Minuten eine Spannung von 60 Volt angelegt. Für den eigentlichen Gellauf wurde die Spannung auf 130 Volt erhöht und über 1,5 Stunden beibehalten.

Tabelle 2-1: Pipettierschema zur Herstellung von Tricin-SDS-Polyacrylamid Gelen (16,5 %)

Ansatz für 2 Gele	Trenngel (4cm)	Spacergel (1cm)	Sammelgel (2cm)
H ₂ O	390 µl	410 µl	1560 µl
Tricin-Gelpuffer	2300 µl	330 µl	600 µl
Glycerol	1,5 g	-	-
T40	C6 2850 µl	C3 250 µl	C3 240 µl
APS (10%)	25 µl	5 µl	12 µl
Temed	3 µl	1 µl	2,5 µl

Tabelle 2-2: Piepettierschema zur Herstellung von 6 und 8 %-igen SDS-Gelen

Ansatz für 2 Gele	Trenngel 6% (Molekulargewicht < 90kDa)	Trenngel 8% (Molekulargewicht < 90kDa)	Sammelgel (identisch für beide Gele)
H ₂ O	4,14 ml	4,12 ml	3 ml
Gelpuffer	Trenngelpuffer 2,6 ml	Trenngelpuffer 2,6 ml	Sammelgelpuffer 1,3 ml
10 % iges SDS	60µl	80 µl	50 µl
Rotiphorese Gel 30	3,3 ml	3,3 ml	750 µl
APS (10%)	50 µl	50 µl	25 µl
Temed	15 µl	15 µl	5 µl

Das Blotten auf eine PVDF-Membran erfolgte bei 75 Volt für 1 h 10 Min in einer Blotkammer mit Transferpuffer. Anschließend wurden die Membranen zweimal für 5 Minuten mit TBST gewaschen und daraufhin die Proteinbindestellen mit BSA (3% in TBST) geblockt. Direkt im Anschluss wurde der Erstantikörper (siehe Tab. 3-1) in der jeweiligen Verdünnung auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach mehrmaligem Waschen der jeweils entsprechende Zweitantikörper (Tab. 3-2) auf die Membran gegeben. Nach wiederholten Waschschritten folgte die Inkubation mit ECL für 2 Minuten. ECL diente als Substrat der HRP-

vermittelten Lumineszenzreaktion. Im Anschluss wurde die Membran zusammen mit einem Röntgenfilm für eine bestimmte Zeit in eine Röntgenkassette gelegt. Die Filme wurden daraufhin entwickelt und fixiert. Die Bestimmung der jeweiligen Bandenintensitäten erfolgte quantitativ mittels der Software ImageJ 1.36b[®] (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

2.2.6. Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz können Proteine mittels Antikörper sichtbar gemacht werden. Neben dem Nachweis eines bestimmten Proteins in einem Gewebe, ist es außerdem möglich die genaue Lokalisation dessen zu untersuchen.

HepG2-Zellen wurden, wie oben bereits erwähnt, gezählt und im Anschluss auf in einer Petrischale liegende Objektträgern ausgesät. Nach zwei Tagen wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 50 % stimuliert. Dafür wurde in kleine Plastiktüten 5 ml Medium vorgelegt und die einzelnen Objektträger hineingeschoben. Nach Zugabe von 1,5 µg/ml Hepcidin, wurden die Tüten verschweißt und die Objektträger für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Objektträger mit den Zellen wurden zur Fixierung der Zellen für 4 Minuten in Methanol geschwenkt. Im Anschluss erfolgten drei 5-minütige Waschgänge in PBS und die Inkubation für 10 Minuten in 0,5 % Triton-X-100 zur Permeabilisierung der Zellmembran. Nach wiederholtem Waschen wurden unspezifische Proteinbindestellen über 30 Minuten mit FCS (10 % in PBS) geblockt und 200 µl des Erstantikörpers in entsprechender Verdünnung auf den Objektträger pipettiert. Die Inkubation des Erstantikörpers (Tab. 3-1) erfolgte über Nacht in einer Feuchtkammer bei 4°C.

Am darauffolgenden Tag erfolgten erneut drei 5-minütige Waschgänge in PBS sowie die Inkubation des fluoreszierenden Zweitantikörpers (Tab. 3-2) bei Dunkelheit und Raumtemperatur. Nach Ende der einstündigen Inkubationszeit wurden die Schnitte erneut gewaschen und anschließend mit Fluorsafe und Deckgläsern versehen. Nach zweistündiger Trocknung erfolgte die Auswertung der Immunfluoreszenz unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Tab. 3-1: Primäre Antikörper

Antikörper	Reaktivität	Spezies	Antikörperproduktion
Anti-Hepcidin: EG(5)-HepN/2	Mensch	Kaninchen	Fein et al. 2007
Anti-Ferroportin	Mensch	Kaninchen	Harrison-Findik et al. 2007
EG(1)-TFR2	Mensch	Kaninchen	Merle et al. 2007

Tab. 3-2: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Reaktivität	Spezies	Firma
Anti-rabbit IgG-HRP	Kaninchen	Ziege	Dianova GmbH, Deutschland
Cy3-anti-rabbit IgG	Kaninchen	Ziege	Jackson Immuno-Research, USA

2.3. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels Student T-Test (zweiseitig) für paarige Ergebnisse, wobei $p < 0,05$ als signifikant angesehen wurde. Signifikante Ergebnisse sind in den Abbildungen dieser Forschungsarbeit mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3.1 Regulation von Ferroportin durch Hepcidin in HepG2-Zellen

Wie bereits in vorangegangenen Studien an Fpn-GFP transfizierten HEK-Zellen gezeigt, verringert sich die Anzahl der membranständigen Ferroportin-Moleküle in Anwesenheit von aktivem Hepcidin (Hepcidin 25) durch Internalisierung und Degradierung des Ferroportin/Hepcidin-Komplexes (De Domenico et al. 2009, Nemeth et al. 2004). Um die biologische Aktivität des verwendeten, synthetischen Hepcidins zu untersuchen, wurden ebenfalls Fpn-GFP transfizierte HEK293-Zellen verwendet. Während sich Ferroportin in Abwesenheit von Hepcidin mittels Immunfluoreszenz entlang der Zellmembran nachweisen ließ, zeigten sich dessen Abbauprodukte nach Stimulation intrazellulär [Abb. 4]. Damit wurde, als Basis für weitere Stimulationsversuche, die biologische Aktivität des synthetischen Hepcidins sichergestellt.

Um zu untersuchen, ob sich diese Interaktion von Hepcidin mit Ferroportin auf humane Leberzelllinien übertragen lässt, wurden HepG2-Zellen über 24 h mit synthetischem Hepcidin (1,5 µg/ml) stimuliert und im Anschluss mittels Immunfluoreszenz und Western Blot analysiert. Im Western Blot detektierten Ferroportin-spezifische Antikörper eine Bande bei 100 kDa [Abb. 5A], was dem Molekulargewicht von Ferroportin entspricht.

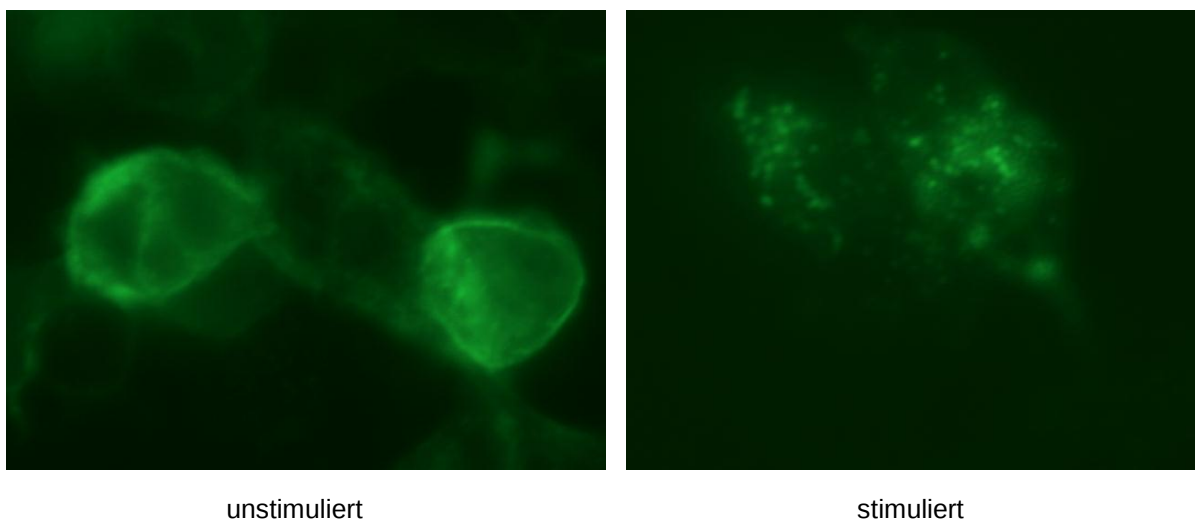


Abbildung 4: Fluoreszenzmikroskopie von HEK293-Fpn-GFP-Zellen (vorbehandelt mit 10µM Ponasteron über 24 h) mit und ohne Hepcidinstimulation (1,5µg/ml, 24 h). Universität Ulm, Juli 2009

Die quantitative Bestimmung der Bandenintensitäten mittels der Software ImageJ® 1.36b zeigte, dass diese in Zellextrakten nach Hepcidinstimulation signifikant schwächer waren als die Intensitäten in Extrakten unstimulierter Zellen ($p=0,02$) [Abb. 5B]. Dieser Befund konnte in Immunfluoreszenz-Untersuchungen bestätigt werden. Das Fluoreszenzsignal in stimulierten Zellen war deutlich schwächer als in unbehandelten Kontrollzellen [Abb. 5C].

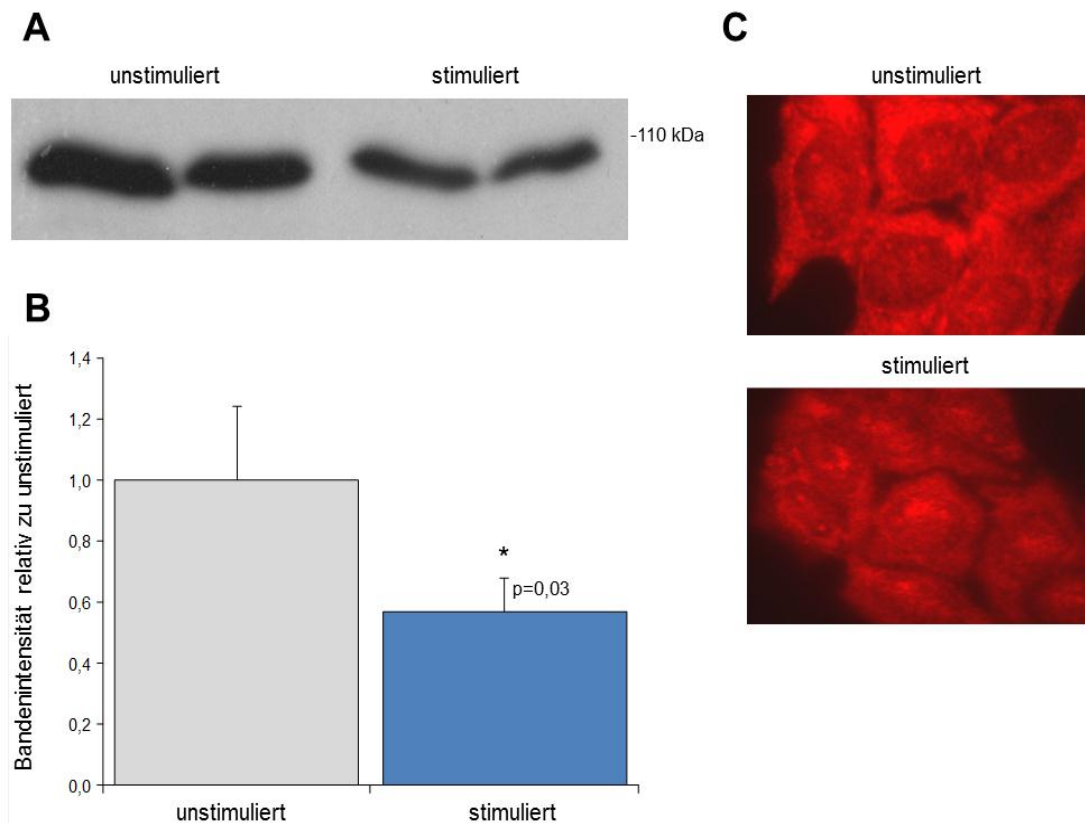


Abbildung 5: In HepG2-Zellen wird Ferroportin durch exogenes Hepcidin auf Proteinebene downreguliert. (A) Western Blot von HepG2-Zellen mit und ohne Hepcidinstimulation (1,5µg/ml über 24h); 1.Antikörper: anti-Ferroportin 1:10000, 2.Antikörper: anti-rabbit IgG-HRP 1:25000 (B) Auswertung der quantitativen Bandenintensität der Banden aus A mittels ImageJ® mit und ohne Hepcidinstimulation. (C) Darstellung von Ferroportin mit und ohne Hepcidinstimulation mittels Immunfluoreszenz in HepG2-Zellen (1,5µg/ml über 24 h); 1.Antikörper: anti-Ferroportin 1:1000, 2.Antikörper: Cy3-anti-rabbit IgG 1:200. Universität Ulm, Mai 2010

3.2 Autokrine Regulation von Hepcidin in HepG2-Zellen

Viele Regulationsmechanismen von Hepcidin wie z.B. durch Eisen oder Entzündungsprozesse sind bereits bekannt. Da bislang aber ungeklärt war, ob Hepcidin auch einem autokrinen Sekretionsmechanismus unterliegt, wurde untersucht, ob die hepatische Hepcidinexpression durch exogenes Hepcidin beeinflusst wird. Dazu wurden HepG2-Zellen mit 1,5 µg/ml Hepcidin stimuliert. Die Zelllysate wurden im Anschluss sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Proteinebene untersucht. Mittels qRT-PCR zeigte sich ein signifikanter Abfall der endogenen Hepcidinexpression nach Hepcidinstimulation ($p=0,029$) [Abb. 6]. Verglichen mit unbehandelten HepG2-Zellen, war die Hepcidinexpression dabei auf 60% reduziert. Auch auf Proteinebene war ein Abfall des Hepcidinlevels nach Stimulation zu erkennen. Im Western Blot detektierte der polyklonale Prohepcidin-Antikörper EG(5)-HepN/2 eine Bande bei etwa 8 kDa [Abb. 7A]. Diese Größe entspricht in etwa der berechneten Molekülmasse von Prohepcidin (Kulaksiz et al. 2004). Messungen der Bandenintensität ergaben einen Abfall des Proteinlevels nach Stimulation von etwa 20% [Abb. 7B]. Mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Analysen wurden die Western Blot Ergebnisse bestätigt. Auch hier zeigte sich eine Abnahme der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von Hepcidin zum Kulturmedium [Abb. 7C].

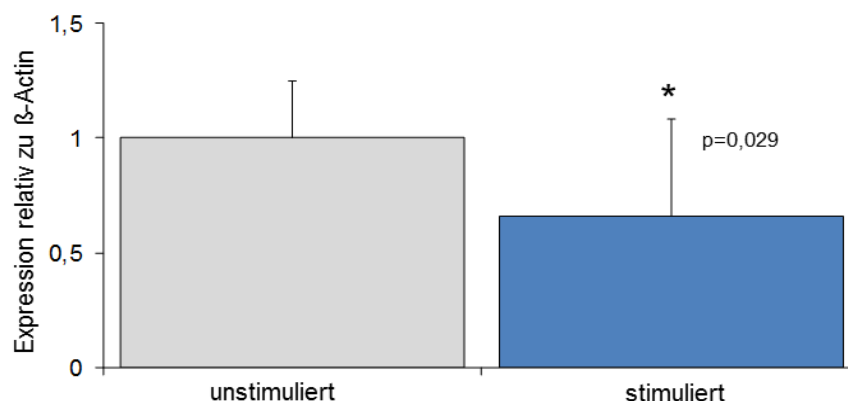


Abbildung 6: Mittlere Expression von Hepcidin (relativ zu β-Actin) in HepG2-Zellen mit und ohne Hepcidinstimulation (1,5µg/ml über 6 h). n=4. Universität Ulm, August 2009

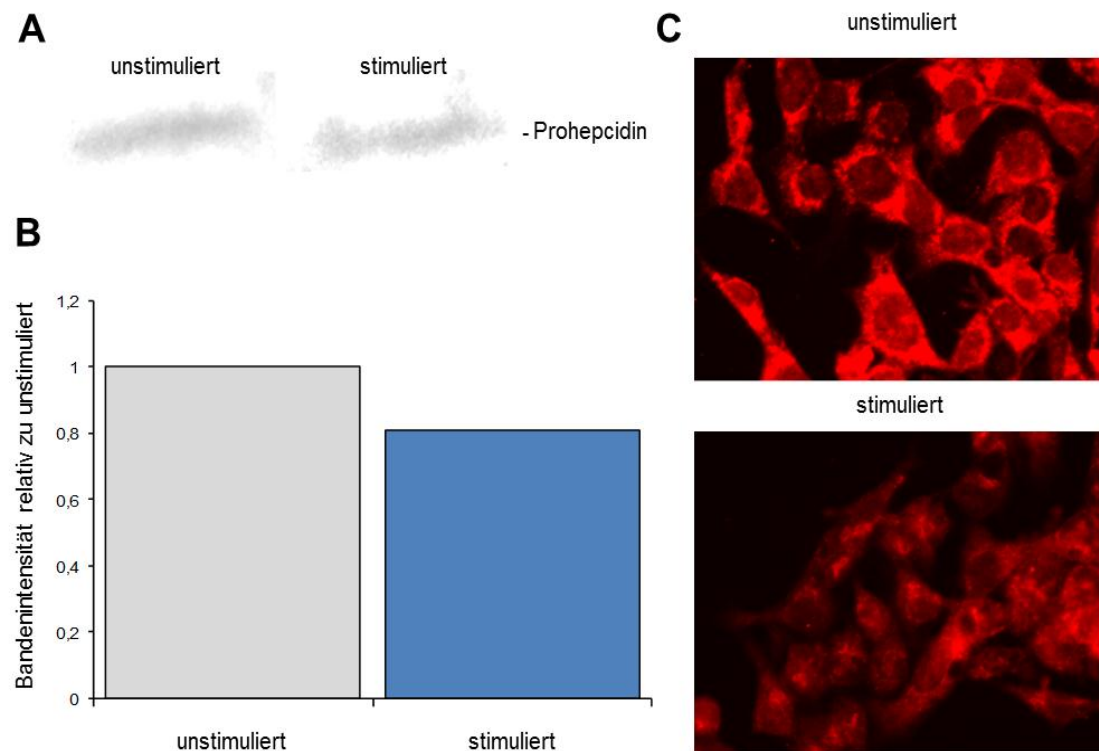


Abbildung 7: In HepG2-Zellen wird das hepatische Hepcidin durch exogenes Hepcidin auf Proteinebene downreguliert. (A) Hepcidin Western Blot von HepG2-Zellen mit und ohne Hepcidinstimulation (1,5µg/ml über 24h); 1.Antikörper: anti-Hepcidin EG(5)HepN/2 1:3000, 2.Antikörper: anti-rabbit IgG-HRP 1:10000 (B) Auswertung der quantitativen Bandenintensität der Banden aus A mittels ImageJ® mit und ohne Hepcidinstimulation. (C) Immunfluoreszenz von HepG2-Zellen mit und ohne Hepcidinstimulation (1,5µg/ml über 24 h); 1.Antikörper: anti-Hepcidin EG(5)-HepN/2 1:1000, 2.Antikörper: Cy3-anti-rabbit IgG 1:200. Universität Ulm, September 2009

Um auszuschließen, dass es sich bei diesen Ergebnissen um einen HepG2-Zell-spezifischen Effekt handelt, wurden zusätzlich Hep3B-Zellen mit synthetischem Hepcidin stimuliert. Auch in dieser Hepatomazelllinie zeigte sich nach Hepcidinstimulation ein signifikanter Abfall der endogenen Hepcidinexpression ($p=0,0002$). Das mRNA-Level fiel verglichen mit unbehandelten Hep3B-Zellen nach der Stimulation mit Hepcidin auf 20% ab [Abb. 8].

Nachdem die autokrine Downregulation von Hepcidin in mehreren Leberzelllinien gezeigt wurde, sollte untersucht werden, ob sich dieser Effekt auch in anderen Organsystemen nachweisen lässt. Dazu wurden zusätzlich humane embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen) und Magenepithelzellen (AGS-Zellen) mit Hepcidin stimuliert.

Sowohl in AGS-Zellen, als auch in HEK293-Zellen war kein Unterschied in der Hepcidin-expression mit und ohne Hepcidinstimulation zu erkennen (A $p=0,5$ B $p=0,7$) [Abb. 9].

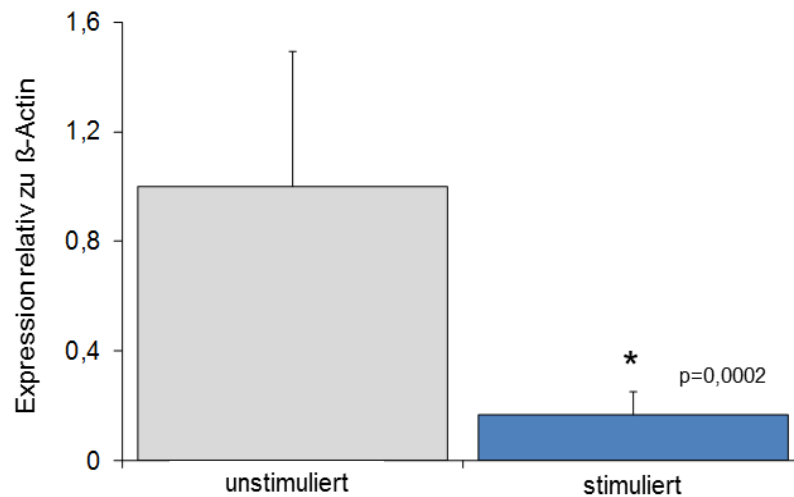


Abbildung 8: Mittlere Expression von Hepcidin (relativ zu β -Actin) in Hep3B-Zellen mit und ohne Hepcidin-stimulation (1,5 μ g/ml über 6 h). n=2. Universität Ulm, September 2009

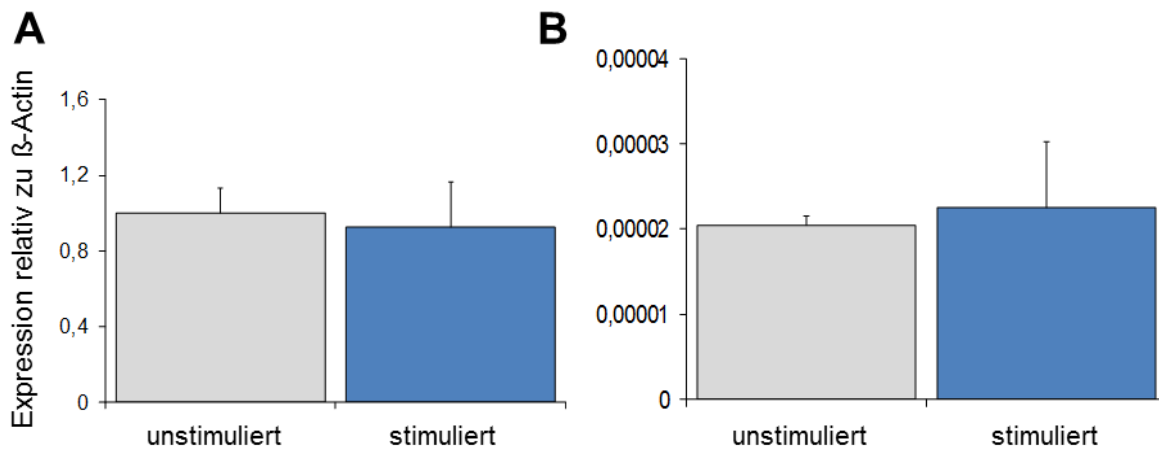


Abbildung 9: Mittlere Expression von Hepcidin (relativ zu β -Actin) in (A) AGS-Zellen und (B) HEK193-Zellen mit und ohne Hepcidinstimulation (1,5 μ g/ml über 6 h). Universität Ulm, Dezember 2009

3.3 Untersuchung des intrazellulären Eisenstoffwechsels als mögliche Ursache für die autokrine Hepcidin-Regulation

Da Hepcidin der zentrale Regulator des Eisenstoffwechsels ist und seine Expression direkt von Eisen abhängig ist, sollte sichergestellt werden, dass die beobachteten Effekte nicht auf Änderungen des Eisenstoffwechsels zurückzuführen sind.

Dafür wurden die Expressionen des Eisenspeicherproteins Ferritin sowie der *Iron Response Proteins* (IRP1 und IRP2) in HepG2-Zellen in An- und Abwesenheit von Hepcidin untersucht [Abb. 10A-C]. Die untersuchten Gene wiesen keine Änderung der Expression in Abhängigkeit von Hepcidin auf (A $p=0,8$ B $p=0,7$ C $p=0,8$).

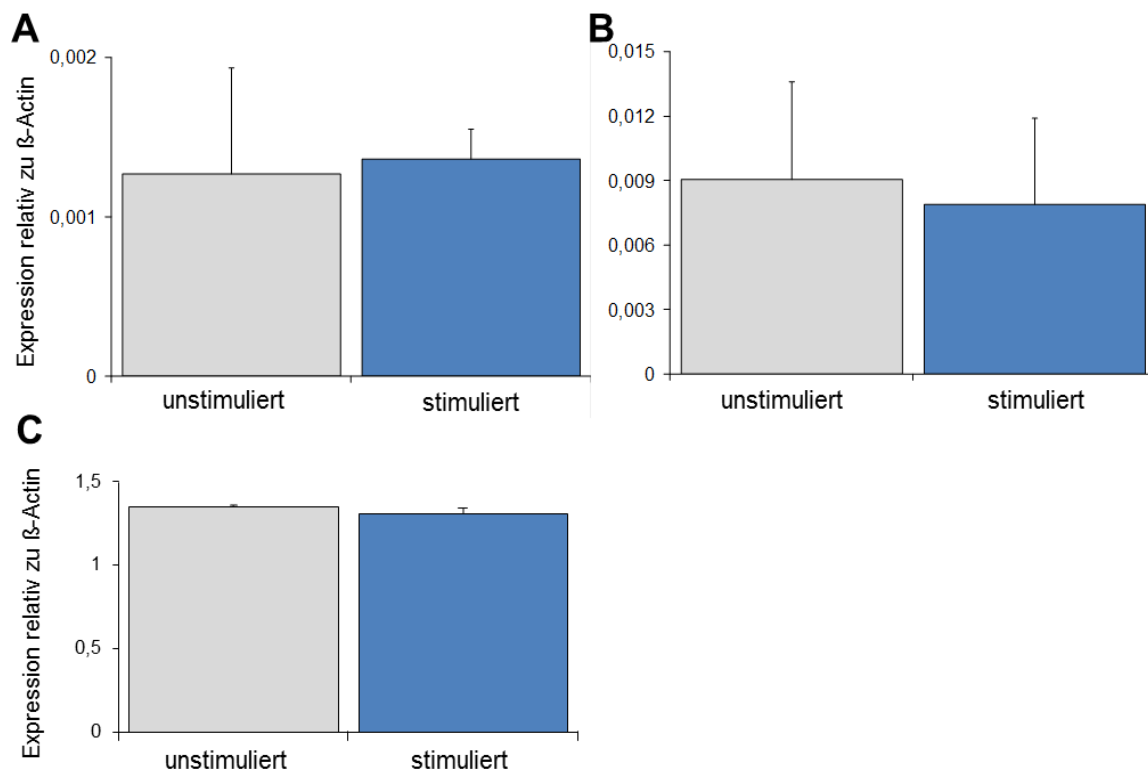


Abbildung 10: Mittlere Expression von (A) IRP1, (B) IRP2, (C) Ferritin (alle relativ zu β -Actin) in HepG2-Zellen **mit** und **ohne** Hepcidinstimulation (1,5 μ g/ml über 6 h). Universität Ulm, August 2010

3.4 Mögliche Mechanismen der autokrinen Hepcidinregulation in der Leber

Bisher sind drei Signalwege bekannt, die die Expression von Hepcidin regulieren:

- 1.) Signalweg über IL-6 und STAT3
- 2.) Signalweg über BMP-6 und SMAD4
- 3.) Signalweg über TFR-2 und HFE-1

Um zu untersuchen, ob diese Signalwege auch eine Rolle bei der autokrinen Regulation von Hepcidin spielen, wurden erneut HepG2-Zellen mit und ohne Hepcidinstimulation verwendet. Dabei wurden die Genexpressionen von an der Signalübertragung beteiligter Proteine mittels qRT-PCR untersucht.

1.) Signalweg über IL-6

IL-6 gilt als einer der Hauptinduktoren der Hochregulation von Hepcidin im Rahmen entzündlicher Prozesse (Ganz und Nemeth 2009). Verglichen mit unstimulierten Kontrollzellen war die IL-6-Expression in mit Hepcidin stimulierten HepG2-Zellen zwar erhöht, aber die Unterschiede waren nicht signifikant ($p=0,3$) [Abb. 11A]. In Hep3B und Huh7-Zellen konnte keine Änderung der Expression in Abhängigkeit von Hepcidin im Kulturmedium beobachtet werden (B: $p=0,8$ C: $p=0,4$) [Abb. 11B, C]. Die Genexpression von STAT3, welches als Transkriptionsfaktor des IL-6-Signalweges wirkt, war nach Hepcidinstimulation ebenfalls unverändert ($p=0,1$) [Abb. 11D].

2.) Signalweg über BMP-6 und SMAD-Proteine

Auch dieser Signalweg zählt zu den etablierten Signalwegen der Hepcidin-Geninduktion (Anderson und Darshan 2008). Die Expressionen von BMP-6 und SMAD4 in Hepcidin-stimulierten HepG2-Zellen waren zwar tendenziell leicht vermindert, aber nicht signifikant [Abb. 12]. ID1 ist ein Transkriptionsfaktor, der als direktes Target für den BMP6-Signalweg gilt und Auskunft über dessen Signalaktivität gibt (Corradini et al. 2009). Auch ID1 zeigte in HepG2-Zellen keine Veränderung nach Hepcidinstimulation [Abb.13].

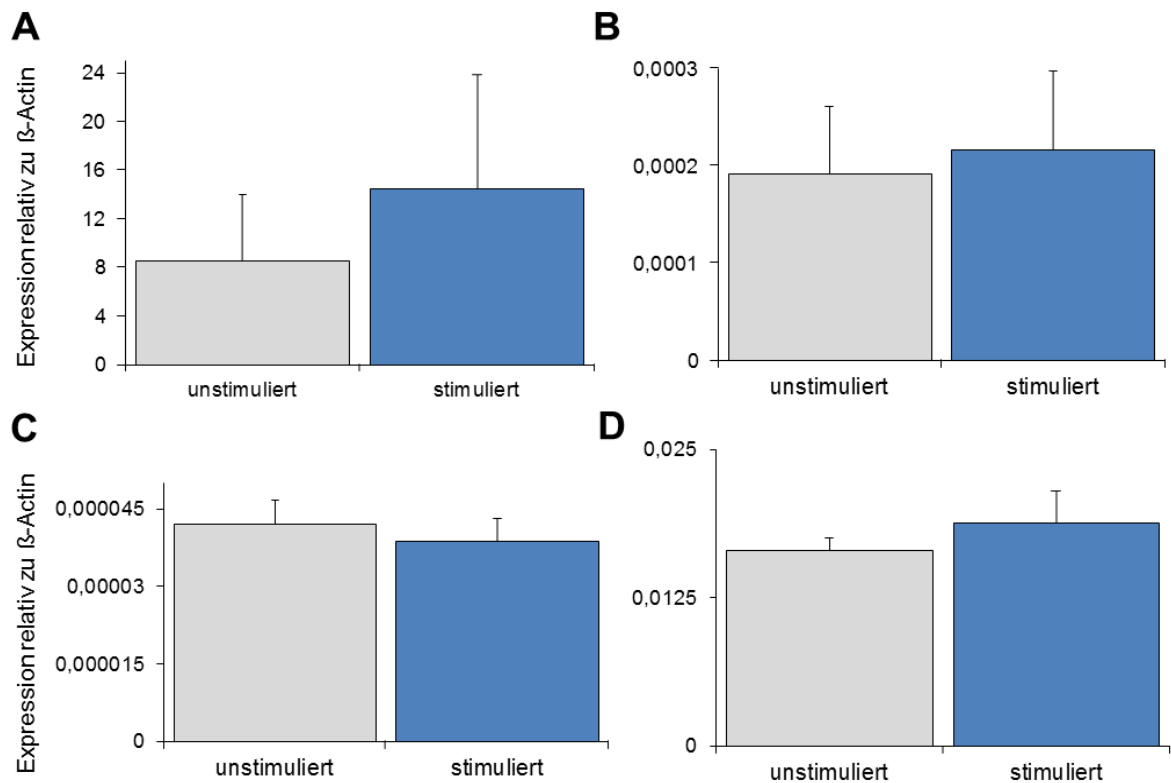


Abbildung 11: Mittlere Expression von IL-6 in (A) HepG2, (B) Hep3B und (C) Huh7 **mit** und **ohne** Hepcidinstimulation relativ zu β -Actin (1,5 μ g/ml über 6 h). (D) STAT3 in HepG2-Zellen **mit** und **ohne** Hepcidinstimulation (1,5 μ g/ml über 6 h) relativ zu β -Actin. Universität Ulm, Juni 2010

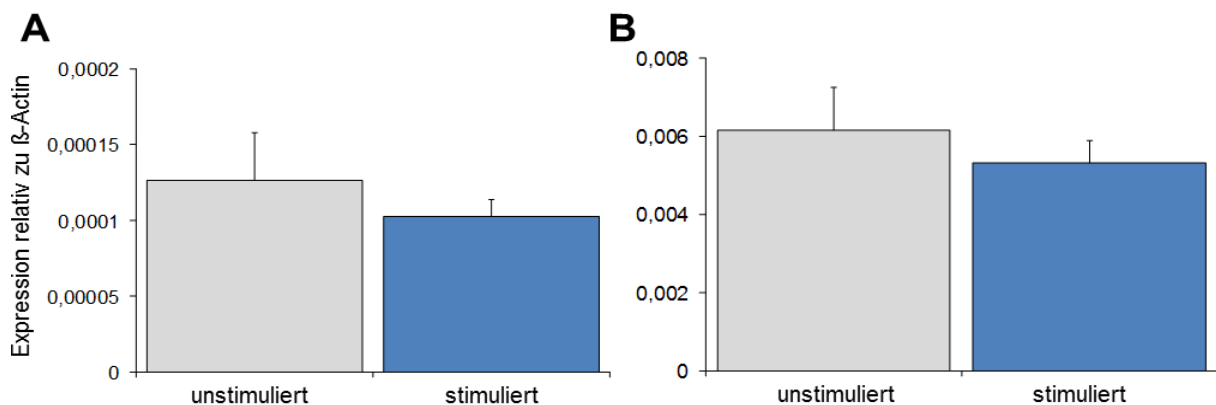


Abbildung 12 : Mittlere Expression von (A) BMP-6 und (B) SMAD4 in HepG2-Zellen **mit** und **ohne** Hepcidinstimulation relativ zu β -Actin (1,5 μ g/ml über 6 h). Universität Ulm, Mai 2010

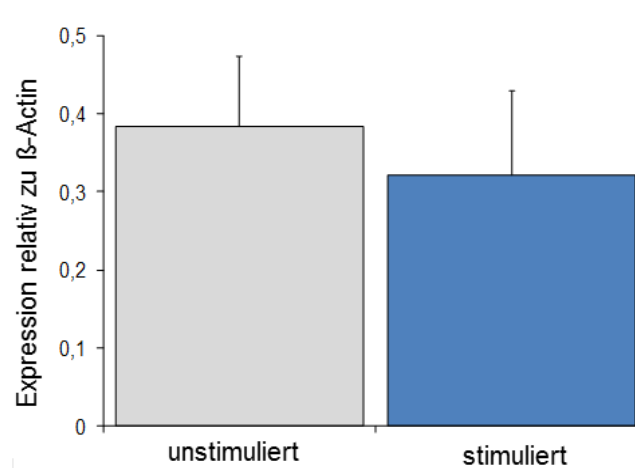


Abbildung 13 : Mittlere Expression von ID1 in HepG2-Zellen **mit** und **ohne** Hepcidinstimulation relativ zu β -Actin (1,5 μ g/ml über 6 h). Universität Ulm, Oktober 2010

3.) Signalweg über TFR-2 und HFE-1

TFR-2

TFR-2 nimmt als Haupteisentransporter der Leber eine wichtige Rolle im Eisenstoffwechsel ein. Nach Stimulation von HepG2-Zellen mit exogenem Hepcidin zeigte sich eine nicht ganz signifikant verringerte Expression von TFR-2 im Vergleich zur Expression in den Kontrollzellen ($p=0,07$) [Abb.14A]. Auch auf Proteinebene konnte der Abfall des TFR-2-Levels in Anwesenheit von Hepcidin nachgewiesen werden [Abb.14B]. Analysen der Bandenintensitäten zeigten einen Abfall von 20%, verglichen mit unbehandelten Zellen ($p=0,5$) [Abb.14C].

Unklar war aber, ob dieser Effekt direkt durch das exogene Hepcidin hervorgerufen wird oder auf die damit verbundene Downregulation des endogenen Hepcidins zurückzuführen ist. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen wurde die Expression von Hepcidin in HepG2-Zellen durch spezifische Hepcidin-siRNA inhibiert und im Anschluss die Genexpression von TFR-2 bestimmt. Die qRT-PCR-Ergebnisse zeigten einen signifikanten Abfall von TFR-2 nach Hepcidin-siRNA-Transfektion ($p=0,03$) [Abb.15].

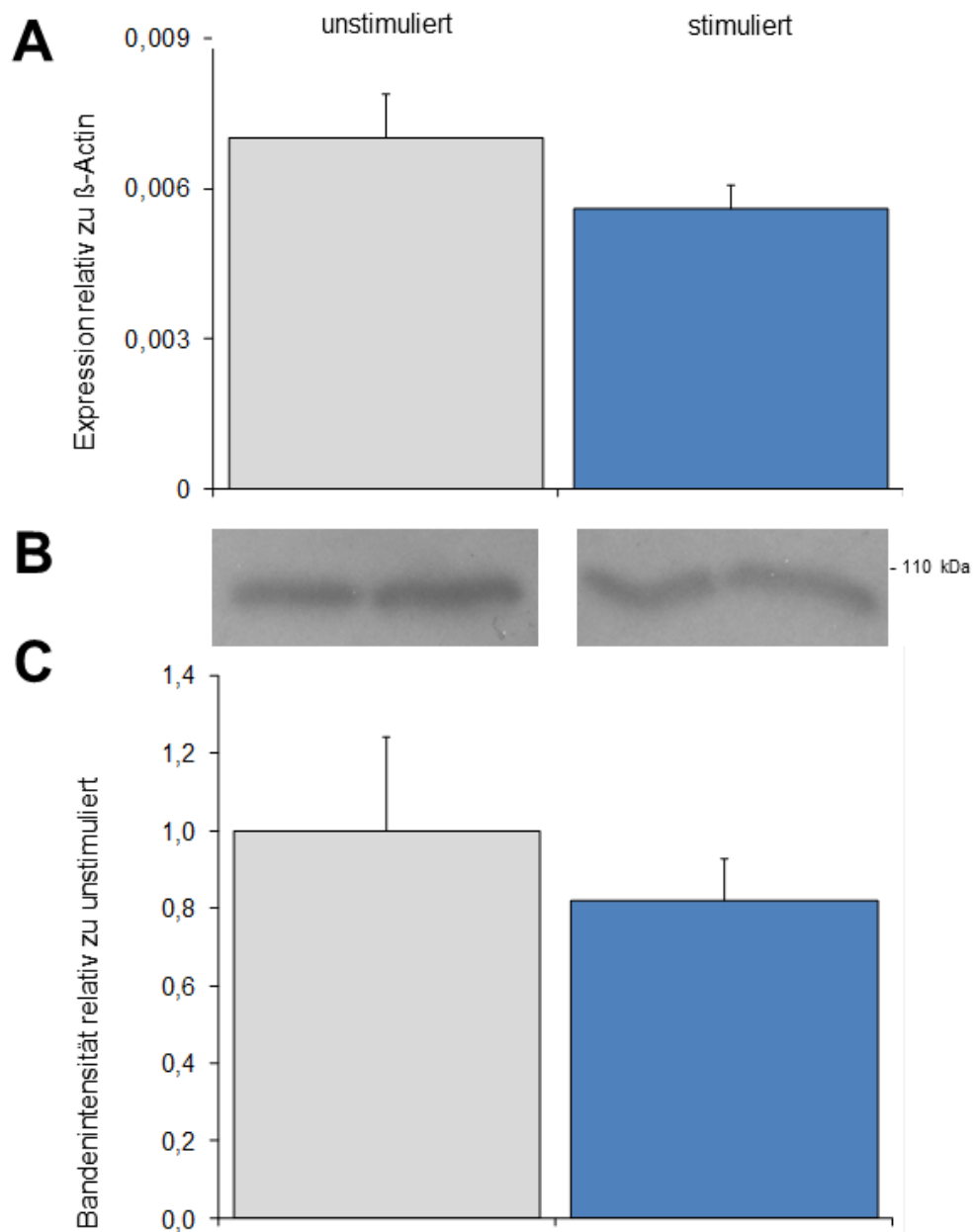


Abbildung 14: In HepG2-Zellen wird TFR-2 durch exogenes Hepcidin auf mRNA-Ebene und Proteinebene downreguliert. (A) Mittlere Expression von TFR-2 (relativ zu β -Actin) in HepG2-Zellen **mit** und **ohne** Hepcidinstimulation (1,5 μ g/ml über 6 h) (B) TFR2 Western Blot von HepG2-Zellen mit und ohne Hepcidinstimulation (1,5 μ g/ml über 24h); 1.Antikörper: EG(1)-TFR2 1:6000, 2.Antikörper: anti-rabbit IgG-HRP 1:13000 (C) Auswertung der quantitativen Bandenintensität der Banden aus A mittels ImageJ® **mit** und **ohne** Hepcidinstimulation. Universität Ulm, Januar 2010

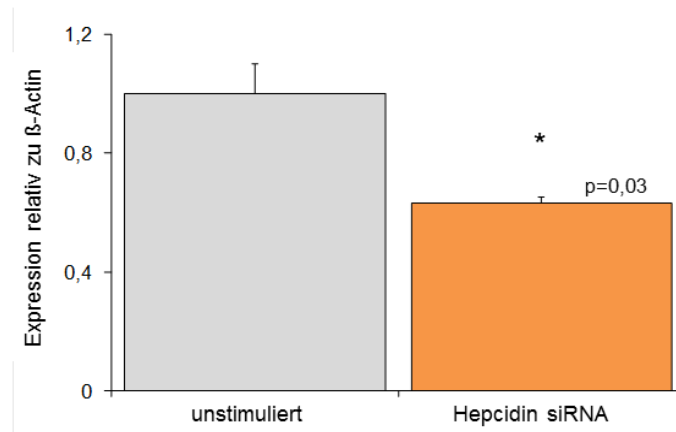


Abbildung 15: Mittlere Expression von TFR-2 (relativ zu β -Actin) in HepG2-Zellen **mit** und **ohne** Hepcidin-siRNA-Transfektion. Universität Ulm, Juni 2010

HFE-1

Der Effekt von exogenem Hepcidin auf die Expression des Peptidhormones wurde initial auch in der Leberzelllinie Huh7 untersucht. Diese Zelllinie zeichnet sich durch eine mit der Hämochromatose-Mutation C282Y vergleichbare Deletion aus. Bei dieser Mutation wird die Bindung des HFE1-Proteins an β 2-Mikroglobulin blockiert, wodurch die Expression von HFE-1 auf die Zelloberfläche verhindert wird (Feder et al. 1997, Vecchi 2010). Genexpressions-Analysen bestätigten die Ergebnisse aus den HepG2- und Hep3B-Zellen. Auch in Huh7-Zellen war die Expression von Hepcidin nach exogener Hepcidingabe verringert. Dieses Ergebnis deutete bereits an, dass HFE-1 wahrscheinlich nicht an der autokrinen Regulation von Hepcidin beteiligt ist. Die Untersuchung des HFE-1-spezifischen Expressionslevels verdeutlichte dies. Die Zugabe von Hepcidin zum Kulturmedium hatte keinen Einfluss auf die mRNA-Synthese von HFE-1. β 2-Mikroglobulin wirkt als Chaperon und ist somit wichtig für die Zelloberflächenexpression von HFE-1 (Bhatt et al. 2007, Bhatt et al. 2009). In mit Hepcidin stimulierten HepG2-Zellen zeigte sich zur Bestätigung keine Änderung der HFE-1-Expression. Auch die Expression von β 2-Mikroglobulin war in Anwesenheit von Hepcidin im Kulturmedium unverändert ($p=0,2$) [Abb. 17A, B].

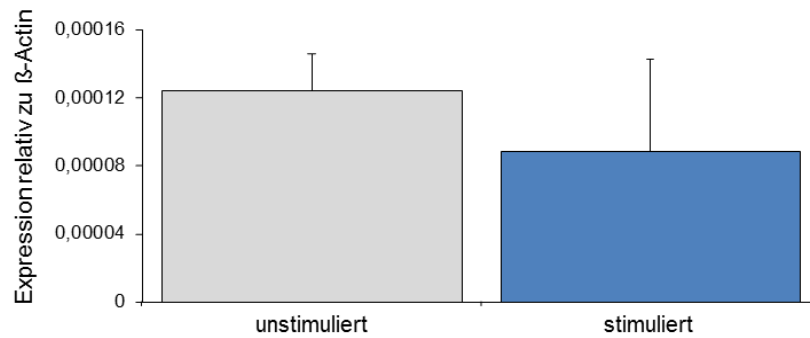


Abbildung 16: Mittlere Expression von Hepcidin (relativ zu β -Actin) in Huh7-Zellen **mit** und **ohne** Hepcidin-stimulation (1,5 μ g/ml über 6 h) n=2. Universität Ulm, Mai 2010

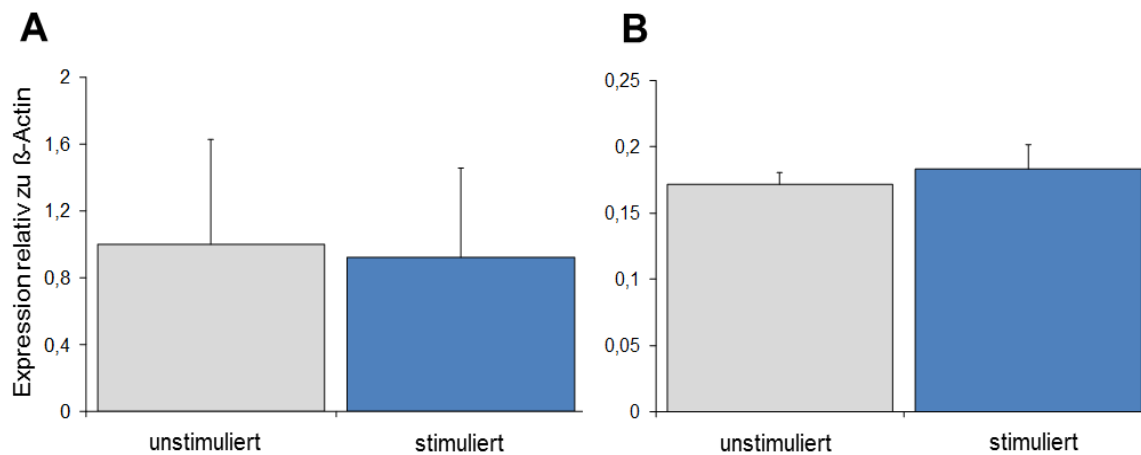


Abbildung 17 : Mittlere Expression von (A) HFE-1 und (B) β 2M (relativ zu β -Actin) in HepG2-Zellen **mit** und **ohne** Hepcidinstimulation (1,5 μ g/ml über 6 h). Universität Ulm, Juni 2010

3.5 Ferroportin als möglicher Signaltransduktor der autokrinen Hepcidin-regulation

Da die Untersuchung der 3 etablierten Regulationswege keinen sicheren Anhaltspunkt für eine Beteiligung dieser an der autokrinen Downregulation von Hepcidin lieferte, wurde ein möglicher vierter Signalweg in Betracht gezogen.

Ferroportin ist der einzige bislang bekannte Rezeptor für Hepcidin. Darüber hinaus gab es aus der Literatur Hinweise darauf, dass Hepcidin Ferroportin nicht nur auf der Proteinebene (siehe Ergebnisse Abb. 5), sondern auch auf der mRNA-Ebene reguliert (Ramey et al. 2010).

Um dies in unserem Modellsystem genauer zu untersuchen, wurde mittels qRT-PCR die Expression von Ferroportin in HepG2-Zellen mit und ohne Hepcidinstimulation gemessen. Dabei zeigte sich auch in der Leberzelllinie ein signifikanter Abfall der Ferroportin-mRNA um etwa 50% verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen ($p=0,012$) [Abb. 18].

Unklar war, ob dieses Ergebnis direkt durch exogenes Hepcidin hervorgerufen wird, oder ob die damit verbundene Downregulation des endogenen Hepcidins die Ferroportin-Expression beeinflusst. Um diese Frage zu klären, wurden mit Hepcidin-siRNA-transfizierte HepG2-Zellen auf eine Veränderung in der Genexpression von Ferroportin untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Ferroportin-Expression nicht durch eine Änderung der Hepcidinexpression reguliert wird ($p=0,7$) [Abb. 19].

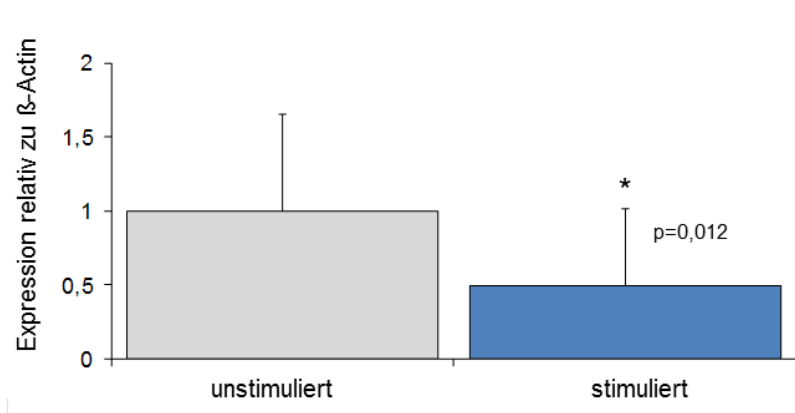


Abbildung 18: Mittlere Expression von Ferroportin (relativ zu β -Actin) in HepG2-Zellen mit und ohne Hepcidin-stimulation (1,5 μ g/ml über 6 h). Universität Ulm, Oktober 2009

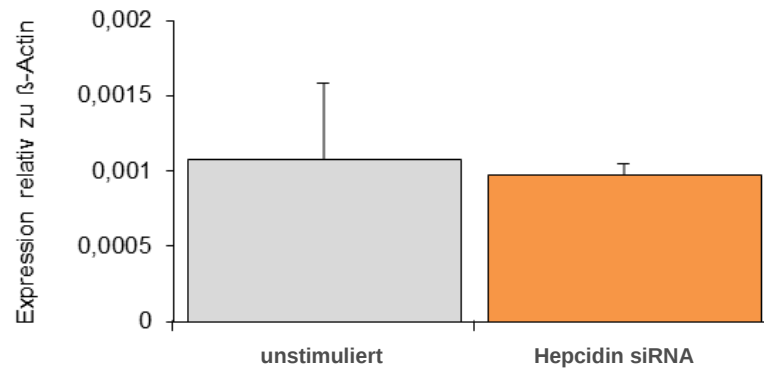


Abbildung 19: Mittlere Expression von Ferroportin (relativ zu β -Actin) in HepG2-Zellen **mit** und **ohne** Hepcidin-siRNA-Transfektion. Universität Ulm, Oktober 2010

Von großer Bedeutung für die Stabilität des transmembranären Ferroportin ist die Ferroxidase Coeruloplasmin (De Domenico et al. 2007b), deren Aktivität die treibende Kraft für den Eisenexport über Ferroporin darstellt. Ein Fehlen von Coeruloplasmin führt zur sofortigen Internalisierung und Degradierung von Ferroportin (De Domenico et al. 2009). Um zu untersuchen, ob eine Veränderung der Coeruloplasmin-Expression und damit verbunden auch Ferroportin die Ursache für die Downregulation von Hepcidin durch exogene Hepcidingabe sein könnte, wurde mittels qRT-PCR das Expressionslevel von Coeruloplasmin bestimmt. Verglichen mit Kontrollzellen, zeigten sich in Anwesenheit von Hepcidin im Kulturmedium keine Unterschiede ($p=0,6$) [Abb. 20].

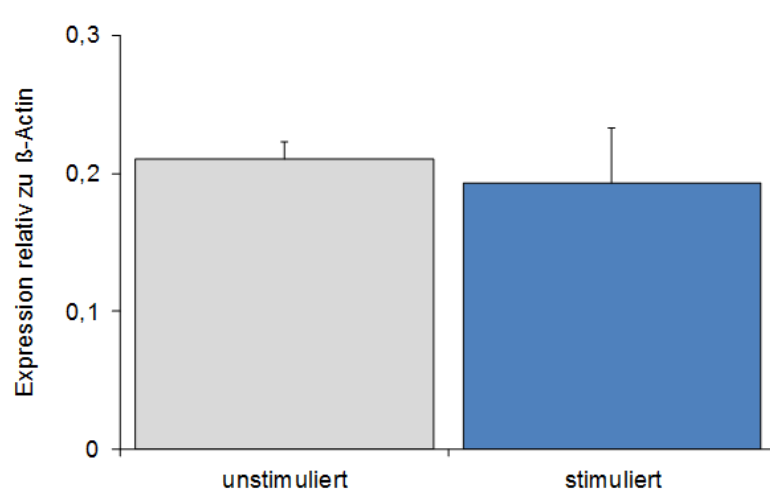


Abbildung 20: Mittlere Expression von Coeruloplasmin (relativ zu β -Actin) in HepG2-Zellen **mit** und **ohne** Hepcidinstimulation (1,5 μ g/ml über 6 h). Universität Ulm, Januar 2010

Der Befund der reduzierten Ferroportin-Expression nach Stimulation der Leberzelllinie mit Hepcidin unterstützte die Theorie, dass die Downregulation von Hepcidin über eine Änderung seines Rezeptors vermittelt wird. Um dies eingehender zu überprüfen, sollte die Hepcidinexpression nach Hepcidinstimulation in HepG2-Zellen untersucht werden, in denen die Ferroportin-Expression durch spezifische siRNA geblockt wurde. In Vorversuchen wurden zunächst verschiedene Fpn-siRNA's und deren Konzentrationen ausgetestet, sowie geeignete Transfektionszeiten bestimmt [Abb. 21 A-C].

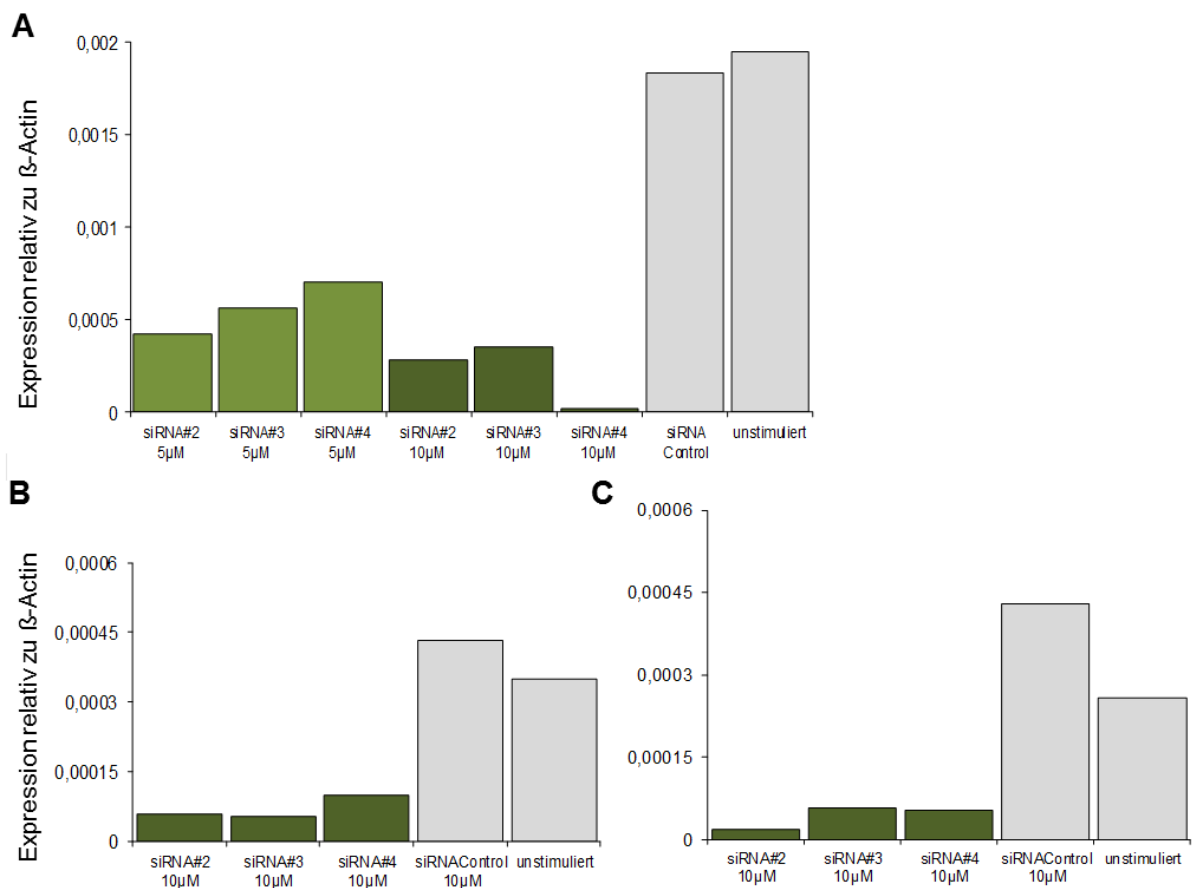


Abbildung 21: Mittlere Expression von Ferroportin in HepG2-Zellen nach Transfektion mit spezifischen Fpn-siRNA's nach (A) 48h mit 5 μ M und 10 μ M Fpn-siRNA (B) 72h, 10 μ M und (C) 96 h, 10 μ M . Universität Ulm, September 2010

Verglichen mit einer Transfektionskontrolle und unbehandelten Zellen erzielten alle getesteten Fpn-siRNA's einen Knock-Down der Ferroportin-Expression. Dieser war bei einer Konzentration von 10 μ M deutlicher als bei 5 μ M. Bei der Fpn-siRNA#2 (in einer Konzentration von 10 μ M) konnte über die verschiedenen Transfektionszeiten der konstanteste Knock-Down beobachtet werden.

Für die weiterführenden Versuche wurden die mit Fpn-siRNA # 2 transfizierten HepG2-Zellen zusätzlich mit 1,5 μ g/ml Hepcidin stimuliert und 6 h später geerntet. Die Stimulation wurde dabei ca. 68 Stunden nach Transfektion durchgeführt, da nach dieser Zeit die Ferroportin-Expression in den transfizierten Zellen auf 20 % des Levels untransfizierter Zellen reduziert war. Die Genexpression von Hepcidin wurde im Anschluss mittels qRT-PCR bestimmt [Abb. 22].

Dabei zeigte sich erneut eine Downregulation von Hepcidin um etwa 15% nach Addition von Hepcidin in das Kulturmedium. Des Weiteren konnte man beobachten, dass in mit Fpn-siRNA transfizierten Zellen auch ohne Hepcidinstimulation die Expression des endogenen Hepcidins ebenfalls um 15% reduziert war. Eine zusätzliche Stimulation der Ferroportin-siRNA transfizierten Zellen mit Hepcidin führte zu keiner weiteren Reduktion des Hepcidin-Expressionslevels und verdeutlicht, dass der Knockdown der Ferroportin-Produktion Hepcidin schon maximal supprimiert.

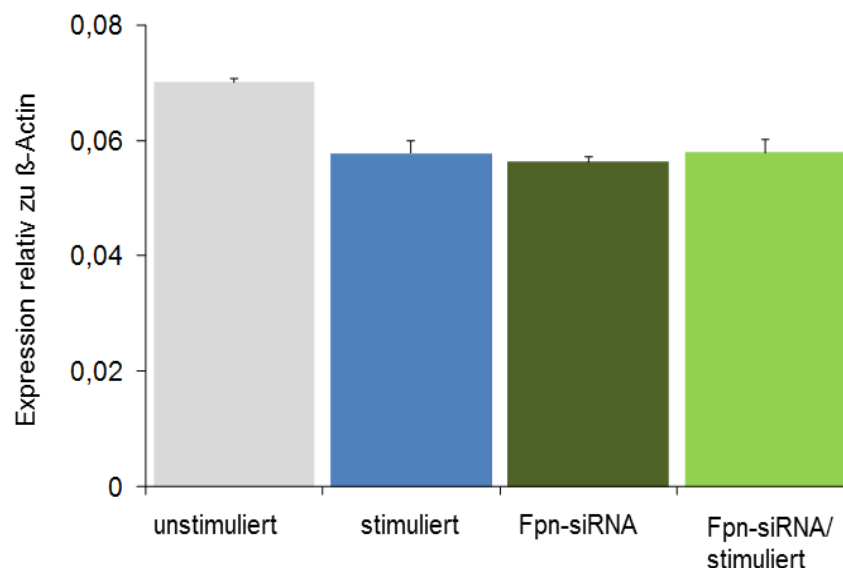


Abbildung 22: Mittlere Expression von Hepcidin in mit Fpn-siRNA (10 μ M, 68 h) transfizierten HepG2-Zellen **mit** und **ohne** zusätzliche Hepcidinstimulation (1,5 μ g, 6 h), n=2. Zum Vergleich HepG2-Zellen ohne siRNA-Transfektion **mit** und **ohne** Hepcidinstimulation. Universität Ulm, November 2010

4. Diskussion

Das Peptidhormon Hepcidin spielt im Eisenstoffwechsel eine zentrale Rolle (Ganz 2003, Kulaksiz et al. 2004, Pigeon et al. 2001). Die Hepcidin-vermittelte Internalisierung von Ferroportin führt zu einem reduzierten, zellulären Eisenexport und ermöglicht es dem Organismus, die Eisenaufnahme über Hepcidin zu steuern (Nemeth et al. 2004).

Die Rolle von Hepcidin wurde in den letzten Jahren bezüglich des Eisenstoffwechsels, Entzündungen und Infektionen sowie Faktoren der Blutbildung eingehend untersucht. Dennoch ist die hepatische Hepcidinexpression noch nicht vollständig bekannt. Obwohl andere Peptidhormone häufig zusätzlich autokrinen Regulationsmechanismen unterliegen, wurde bislang nicht untersucht, ob auch Hepcidin Teil eines autokrinen Biofeedbacks sein könnte. Eine Vorarbeit von 2004 ließ vermuten, dass in Mäusen solch eine autokrine Autoregulation von Hepcidin stattfindet. Dabei wurde Mäusen für drei Tage synthetisches Hepcidin injiziert (100 µg) und im Anschluss die endogene Hepcidinexpression bestimmt. Es zeigte sich ein Abfall der endogenen Hepcidinexpression nach Hepcidininjektion (Laftah et al. 2004).

Gegenstand dieser Arbeit war es herauszufinden, ob die hepatische Hepcidinexpression auch in humanen Leberzellen durch exogenes Hepcidin beeinflusst werden kann.

In Anwesenheit von exogen zugeführtem Hepcidin konnte ein signifikanter Abfall der endogenen Hepcidinexpression beobachtet werden. Dieser Effekt konnte in mehreren Leberzelllinien nachgewiesen werden. In HepG2-Zellen zeigten sich nach Stimulation mit Hepcidin zudem verringerte Hepcidin-Proteinlevel, was die Ergebnisse der RNA-Analysen bestätigte. Die autokrine Downregulation von Hepcidin in der Leber würde bedeuten, dass das in einem Hepatozyten synthetisierte Hepcidin direkt auf dieselbe Zelle wieder eine Wirkung ausübt. Ein Beispiel für autokrine Mediatoren stellen die Eicosanoide (Prostaglandine, Leukotriene, Thromboxane) dar, die aufgrund ihrer kurzen Lebensdauer direkt am Ort ihrer Entstehung wirken (Boyce 2007).

Neben der Leber als Hauptsyntheseort für Hepcidin wird das Peptidhormon u.a. auch in der Gallenblase, der Niere und dem Magen exprimiert. In humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-Zellen) sowie Magenepithelzellen (AGS) konnte jedoch keine Änderung des Expressionslevels in Anwesenheit von exogenem Hepcidin im Kulturmedium festgestellt werden.

Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse schlussfolgern, dass die autokrine Regulation organspezifisch ist und vorwiegend in der Leber stattfindet. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass Hepcidin in den übrigen Organsystemen in geringeren Mengen vorliegt als in der Leber und wahrscheinlich eine lokale Funktion ausübt (Schwarz et al 2011). Weitere Befunde lassen außerdem vermuten, dass das in peripheren Organen gebildete Hepcidin wahrscheinlich nicht ins Blut abgegeben wird und somit keine systemische Wirkung erfüllen kann (Schwarz et al. 2011, Kulaksiz et al. 2008, Merle et al. 2007, Strnad et al. 2010).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Hepcidin einem autokrinen Sekretionsmechanismus unterliegt, stellte sich die Frage, welcher Signaltransduktionsweg dafür verantwortlich ist. Bisher waren drei Signaltransduktionswege bekannt, welche die Hepcidinexpression regulieren: Der Signalweg über IL-6/STAT3, der Signalweg über BMP-6/SMAD, sowie der Signalweg über HFE-1/TFR-2. Bezüglich des IL-6/STAT3-Signalweges, sowie des BMP-6/SMAD-Signalweges zeigten die Ergebnisse keinen möglichen Zusammenhang zur autokrinen Downregulation von Hepcidin.

Bei Untersuchungen zur Hepcidinexpression in Huh7-Zellen konnte festgestellt werden, dass auch in dieser Zelllinie in Anwesenheit von exogenem Hepcidin die endogene Hepcidinexpression downreguliert war. Die Mutation des HFE-Gens in diesen Zellen (die verhindert, dass HFE auf der Zelloberfläche exprimiert) hat keinen Einfluss auf die Hepcidin-Downregulation. Dieser Befund legt nahe, dass HFE an der Hepcidin-Downregulation nicht beteiligt ist. Darüber hinaus konnten auch in der Expression von β 2-Mikroglobulin, das an HFE-1 bindet und dieses auf der Zelloberfläche stabilisiert, keine Veränderungen nach der Hepcidin-Behandlung festgestellt werden.

Lediglich TFR-2 war in Anwesenheit von Hepcidin sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Proteinebene im Vergleich zu unstimulierten Zellen verändert. Auch in mit spezifischer Hepcidin-siRNA transfizierten HepG2-Zellen war die Expression von TFR-2 signifikant reduziert. Dies zeigt, dass es sich beim Abfall von TFR-2 in Anwesenheit von Hepcidin wahrscheinlich um einen indirekten Effekt der Downregulation des endogenen Hepcidins handelt. Da TFR-2 für die Regulation von Hepcidin essentiell ist und eine Mutation von TFR-2 in Hämochromatose-Patienten und in Mausmodellen zu einer Störung der Hepcidin-Produktion führt (Niederau et al. 1994, Pietrangelo 2007) sollte in weiterführenden Versuchen die Rolle von TFR-2 bei der autokrinen Regulation von Hepcidin näher untersucht werden.

Aufgrund der Beobachtung, dass die autokrine Downregulation von Hepcidin durch die bereits etablierten Regulationswege nicht zu erklären war, musste es weitere Regulationswege für Hepcidin geben. Da es sich bei Ferroportin um den bislang einzigen bekannten Hepcidinrezeptor handelt und ein signifikanter Effekt von Hepcidin auf dessen Expression beobachtet werden konnte, wurde Ferroportin als Ausgangspunkt eines weiteren Signalweges untersucht.

Durch die Entdeckung von Ferroportin als Rezeptor für Hepcidin, wurde die Wirkungsweise von Hepcidin auf zellulärer Ebene neu verstanden. Die Interaktion von Hepcidin und Ferroportin war in Fpn-GFP-transfizierten HEK-Zellen bereits gut untersucht. Eine Arbeitsgruppe aus Österreich konnte kürzlich zeigen, dass Hepcidin in THP-1 Zellen, einer humanen Monozytenzelllinie, ebenfalls die Internalisierung von Ferroportin bedingt (Theurl et al. 2008).

Unklar blieb, ob dieser Mechanismus auch in humanen Hepatozyten von Bedeutung ist. In dieser Arbeit zeigten Western Blot Untersuchungen, dass es auch in humanen Hepatomazelllinien durch Anwesenheit von Hepcidin im Kulturmedium zu einem Abfall des Ferroportinlevels kommt. Die Verwendung Ferroportin-spezifischer Antikörper ermöglichte darüber hinaus in Immunfluoreszenz Untersuchungen den Nachweis, dass Ferroportin durch die Hepcidinwirkung von der Zelloberfläche entfernt und intrazellulär abgebaut wird, wie es bereits in Fpn-GFP transfizierten HEK-Zellen beobachtet worden war (De Domenico et al. 2009, Nemeth et al. 2004).

Die Ergebnisse einer Pariser Arbeitsgruppe aus dem Jahr 2009 ließen darüber hinaus vermuten, dass Hepcidin in isolierten Maushepatozyten Ferroportin nicht nur auf Proteinebene, sondern auch auf RNA-Ebene beeinflusst (Ramey et al. 2009). In der vorliegenden Forschungsarbeit konnte dies für humane Hepatomazellen bestätigt werden. Auswertungen quantitativer Real Time-PCR zeigten einen signifikanten Abfall der Ferroportin-mRNA in Anwesenheit von Hepcidin.

Eine Rolle von Ferroportin bei der autokrinen Downregulation von Hepcidin zeigte sich in mit spezifischer Fpn-siRNA transfizierten HepG2-Zellen. Allein die Stimulation mit Fpn-siRNA führte in HepG2-Zellen zu einer Abnahme der endogenen Hepcidinexpression. Diese Supprimierung ließ sich auch durch zusätzliche Hepcidinstimulation nicht verstärken. Die Schlussfolgerung daraus war, dass die alleinige Downregulation von Ferroportin durch exogenes Hepcidin in einer Abnahme der endogenen Hepcidinexpression resultiert [Abb. 23].

In den Versuchen mit Ferroportin-siRNA war der beobachtete Abfall der Hepcidinexpression deutlich geringer als in den Hepcidin-Stimulationsversuchen ohne siRNA-Transfektion. Ein Grund dafür ist wahrscheinlich der modifizierte Versuchsaufbau. Zum einen verlängerte sich durch die Transfektion die Kulturzeit von 54 h auf 90 h. Zum anderen musste aus diesem Grund auch die Zellzahl reduziert werden, um zu verhindern, dass die Konfluenz 100 % übersteigt. Bereits in vorherigen Versuchen konnte beobachtet werden, dass die Zelldichte für die Effektivität der Stimulation mit Hepcidin eine wichtige Rolle spielt. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass nach Transfektion mit siRNA eine optimale Zelldichte nicht mehr gegeben war und der Effekt auf die Hepcidinexpression aus dem Grunde nicht so deutlich ausfällt.

Zwei weitere mögliche Mechanismen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurden, aber in weiterführenden Versuchen analysiert werden sollten, sind die Signalwege über JAK2 und/oder über Abbauprodukte der Ferroportin-Internalisierung und Degradation. Es wurde bereits gezeigt, dass die Bindung von Hepcidin an Ferroportin die Tyrosinkinase JAK2 aktiviert (De Domenico et al. 2009). Andere Vorarbeiten zeigten außerdem, dass JAK2 die Phosphorylierung von STAT3 initiiert, welches daraufhin als intrazellulärer Signaltransmitter wirkt (Maliken et al. 2011). Im Rahmen der entzündungsbedingten Hepcidinregulation taucht STAT3 im IL-6-Regulationsweg bereits als Signaltransmitter für Hepcidin auf (Wessling-Resnick 2010). Somit sollte STAT3 im Rahmen der autokrinen Hepcidinregulation auf RNA- und Proteinebene zukünftig genauer untersucht werden.

Darüber hinaus kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass beim Abbau des Hepcidin-Ferroportin-Komplexes Signalkaskaden aktiviert werden. Allerdings ist dieser Prozess bisher noch nicht ausreichend aufgeklärt, um mögliche Kandidaten gezielt zu untersuchen.

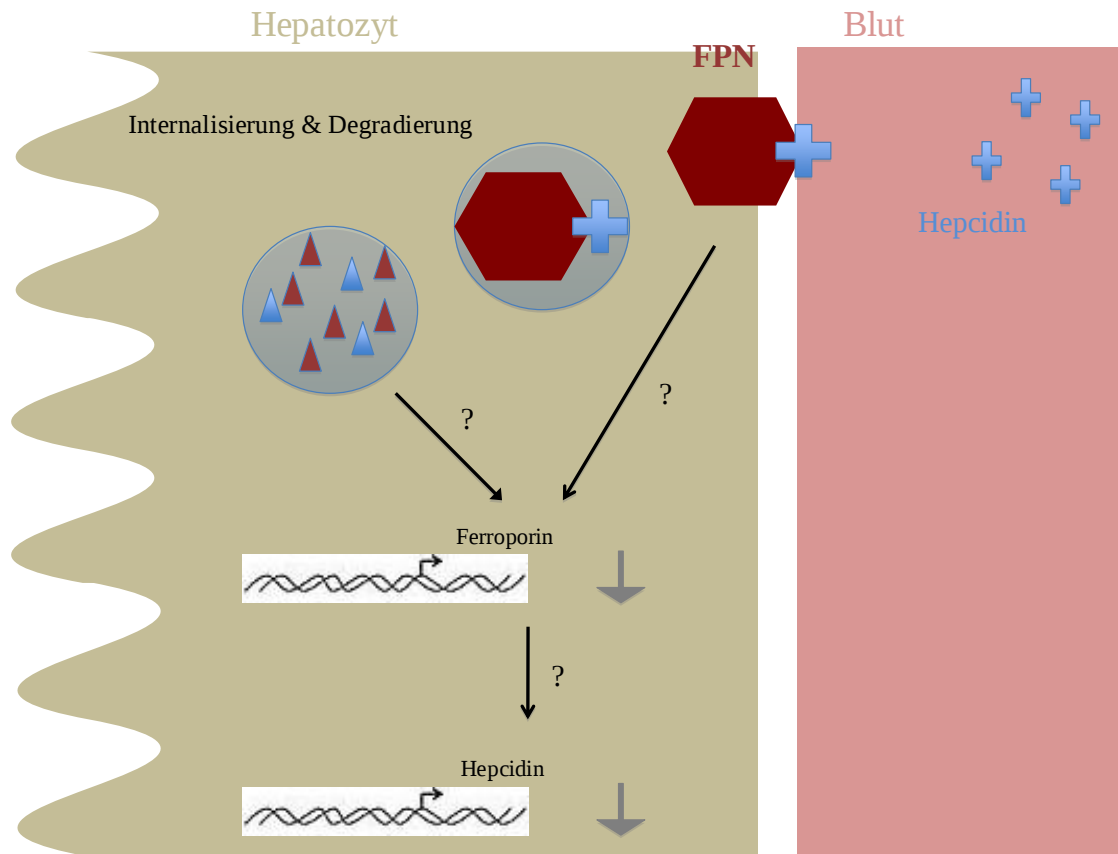


Abbildung 23: Modell der autokrinen Hepcidinregulation über Ferroportin. Universität Ulm, Dezember 2010

Da Hepcidin unmittelbar mit dem Eisenstoffwechsel verbunden ist, wurde durch ergänzende Experimente sichergestellt, dass die durch Hepcidin hervorgerufenen Effekte nicht indirekt durch einen veränderten Eisenstoffwechsel der Hepatozyten zu erklären sind. Die Messungen des Eisenspeicherproteins Ferritin, sowie der eisenregulatorischen Proteine IRP1 und IRP2 lieferten mit und ohne Hepcidinstimulation die gleichen Ergebnisse, so dass angenommen werden konnte, dass der hepatozytäre Eisenhaushalt die Ergebnisse dieser Arbeit nicht beeinflusst hat.

Die Zusammenschau aller Ergebnisse dieser Forschungsarbeit vor einem pathophysiologischen Hintergrund führt zu der Aussage, dass die autokrine Downregulation von Hepcidin in der Leber höchstwahrscheinlich dazu dient, hohe zirkulierende Hepcidinspiegel schnellstmöglich auf ein bedarfsgerechtes Level zu reduzieren. Wie im Folgenden genauer beschrieben schützt dieser autokrine Feedback-Mechanismus den Organismus vor langanhaltenden hohen Hepcidinspiegeln und damit verbunden vor extremen Eisenmangelzuständen im Rahmen von Entzündungsprozessen.

Im Falle von Entzündungsprozessen steigern hohe Konzentrationen an IL-6 über die Bindung an den hepatischen IL-6-Rezeptor und die nachfolgende Phosphorylierung von STAT3 die Hepcidinproduktion der Leber sowie anderer Hepcidin-produzierender Organe. In Folge dessen kommt es zu einer massiven Erhöhung des zirkulierenden Hepcidins. Resultierend daraus sind die Eisenaufnahme im Duodenum und die Eisenabgabe aus Makrophagen stark reduziert. Bei permanent hohen Hepcidinspiegeln und der daraus resultierenden Abnahme der Eisenresorption sowie der Blockierung der Eisenreserven in Makrophagen nehmen im Laufe der Zeit auch die Eisendepots des Organismus ab. Als Folge daraus können Eisenmangelanämien entstehen (Muñoz et al. 2010, Sasu et al. 2010). Die Bindung des zirkulierenden Hepcidins an Ferroportin führt möglicherweise parallel zu der beschriebenen IL-6 bedingten Upregulation von Hepcidin zu einer autokrinen Gegenregulation. In Folge kann der Hepcidinspiegel nach Abklingen der induzierenden Stimuli schneller wieder auf ein bedarfsgerechtes Level reduziert werden [Abb. 23].

Es ist bekannt, dass ein Zusammenhang zwischen hohen Hepcidinspiegeln bei chronischen Entzündungen und Eisenmangelanämien (Infektanämie) besteht (Nemeth et al. 2003, Rivera et al. 2005, Weinstein et al. 2002). Im Rahmen chronischer Entzündungsprozesse liegen Hepcidin induzierende Faktoren und in Folge dessen auch Hepcidin dauerhaft erhöht vor (Nemeth et al. 2003, Rivera et al. 2005, Weinstein et al. 2002). Im Gegensatz dazu waren die Leberzelllinien in unseren Versuchen einmalig für kurze Zeit hohen exogenen Hepcidinkonzentrationen ausgesetzt. Die Versuche simulieren daher eher eine akute Entzündungsreaktion. Um zu überprüfen, ob die autokrine Hepcidinregulation auch bei chronischer Stimulation eine Rolle spielt, wären weitere Versuche mit längerfristiger Hepcidingabe wichtig. Daraus könnte sich auch ein besseres Verständnis dafür entwickeln, warum in vivo nicht jeder akute Entzündungsprozess zu einer Infektanämie führen muss, chronische Entzündungen jedoch häufig mit Eisenmangelanämien assoziiert sind.

Im Falle einer Eisenüberladung des Organismus könnte die autokrine Hepcidinregulation einem ähnlichen Zweck dienen. Durch die anhaltenden hohen Hepcidinspiegel käme es in diesem Fall zu einer inadäquaten Regulation mit verminderter Eisenresorption, Anreicherung des Eisens in Makrophagen und daraus resultierenden Eisenmangelzuständen. Das Ziel der autokrinen Downregulation wäre auch hier wieder die schnelle Normalisierung des Hepcidin-Blutspiegels und die damit verbundene Balancierung des Eisenhaushaltes [Abb. 23].

Hinsichtlich einer Eisenüberladung lassen sich die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit noch unter einem weiteren Gesichtspunkt betrachten. Die durch Hepcidin verursachte Reduktion der Ferroportinexpression wurde bislang nur als Zwischenschritt für die autokrine Downregulation von Hepcidin diskutiert. Bei erhöhten Hepcidinspiegeln durch Eisenüberladung könnte diese Downregulation außerdem dazu dienen den Eisenexport aus der Leber, dem Haupteisenspeicherorgan, zu stoppen. Somit würde vermieden werden, dass periphere Organe im Rahmen einer bereits bestehenden Eisenüberladung zusätzlichen Mengen an Eisen ausgesetzt werden. Möglicherweise ist dies der Grund, warum es bei der Hämochromatose primär zu einer Eisenüberladung der Leber kommt.

Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit beschreiben eine neue Form der Hepcidinregulation. Erkrankungen, die auf Störungen der Hepcidinregulation beruhen (z.B. Hämochromatose, bestimmte Formen der Eisenmangelanämien) können bislang kaum adäquat therapiert werden. Die Kenntnisse über die exakten Regulationsmechanismen von Hepcidin erlangen daher eine große Bedeutung und können in Zukunft neue Therapieansätze bei fehlregulierter Hepcidinexpression definieren.

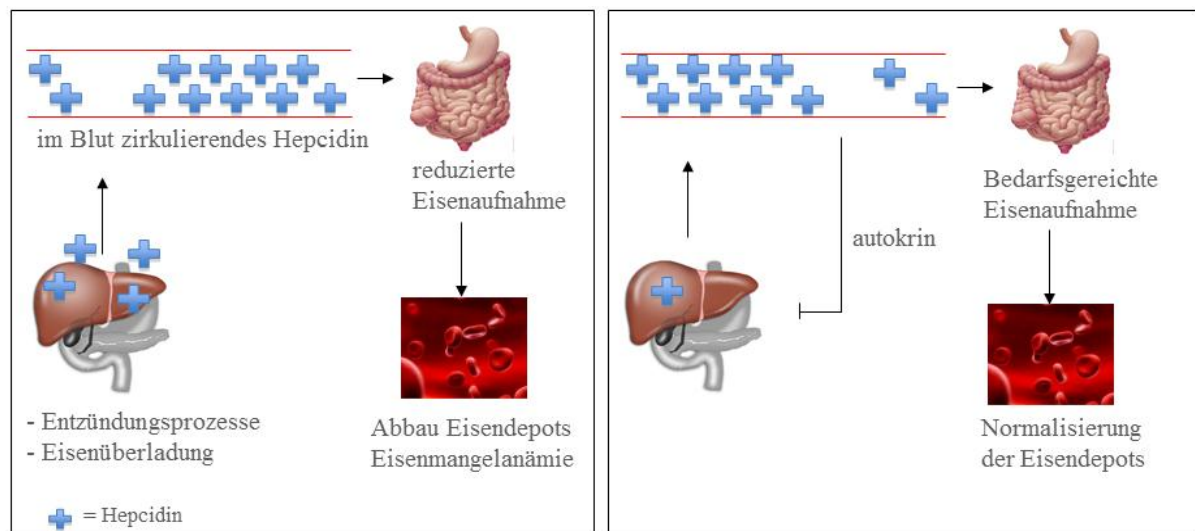


Abbildung 24: Modell der humanen Pathophysiologie der autokrinen Downregulation von Hepcidin in der Leber.
Universität Ulm, Dezember 2010

5. Zusammenfassung

Das antimikrobielle Peptid Hepcidin stellt einerseits eine Komponente der angeborenen Immunabwehr dar, andererseits übernimmt es die zentrale Rolle in der Regulation des Eisenstoffwechsels. Die Interaktion von Hepcidin mit Ferroportin, dem bisher einzigen bekannten Hepcidinrezeptor und Eisenexporter, führt zu einer Hemmung der Eisenaufnahme aus dem Darm, zu einer Hemmung der Eisenabgabe aus Makrophagen, sowie zu einer Hemmung der Eisenbereitstellung aus der Leber. Die Leber ist das Organ der systemischen Hepcidinsynthese, der Eisenspeicherung sowie der Regulation des Zusammenspiels zwischen Eisenhaushalt und Hepcidinproduktion. Somit ist eine strenge Regulation der hepatischen Hepcidinexpression von großer pathophysiologischer Bedeutung.

Die Interaktion von Hepcidin und Ferroportin in humanen Leberzelllinien konnte in dieser Arbeit durch molekularbiologische und immunhistochemische Methoden gezeigt werden. Hepcidin beeinflusst durch diese Interaktion nicht nur die Eisenaufnahme im Darm, sondern auch seine eigene Expression. In Zellstimulationsversuchen mit humanen Hepatomazelllinien zeigte sich eine autokrine Downregulation des endogenen Hepcidins als Antwort auf eine Stimulation mit exogenem Hepcidin. Diesen Effekt zeigten weder humane embryonale Nierenzellen noch Magenepithelzellen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich dabei um einen leberzellspezifischen Regulationsmechanismus handelt.

Untersuchungen der bisher bekannten Signaltransduktionswege der Hepcidinregulation ergaben auf RNA-Ebene keine Hinweise darauf, dass diese eine Rolle in der autokrinen hepatischen Downregulation von Hepcidin spielen. Schlussfolgernd müssen weitere, bisher nicht identifizierte Faktoren existieren, die Hepcidin autokrin regulieren. Ferroportin bzw. die Interaktion von Hepcidin mit Ferroportin könnte ein solcher Faktor sein.

Neben dem erniedrigten Proteinlevel von Ferroportin, zeigten Expressionsmessungen außerdem einen Abfall der Ferroportinexpression in Anwesenheit von Hepcidin. Ein Zusammenhang dieser Downregulation und der autokrinen Downregulation von Hepcidin ergab sich anhand von Versuchen mit spezifischer Ferroportin-siRNA. In Hepatomazelllinien, in denen die Expression von Ferroportin inhibiert war, zeigte sich unabhängig von exogenem Hepcidin ein Expressionsabfall des endogenen Hepcidins.

Die vorliegenden Ergebnisse beschreiben also einen autokrinen Regulationsmechanismus von Hepcidin, dessen Signaltransduktionsweg wahrscheinlich abhängig von Ferroportin ist. Die genauen Mechanismen, die diesem Transduktionsweg zu Grunde liegen, sind zum jetzigen Zeitpunkt noch ungeklärt.

6. Literaturverzeichnis

1. **Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, Murphy KG, Duncan ND, Cairns TD, Taube DH, Bloom SR, Tam FW, Chapman R, Maxwell PH, Choi P:** Erythropoietin administration in humans causes a marked and prolonged reduction in circulating hepcidin. *Haematologica*. 2010; 95: 505-8
2. **Anderson GJ and Darshan D:** Small-molecule dissection of BMP signaling. *Nat Chem Biol*. 2008; 4: 15-6
3. **Anderson GJ, Frazer DM, McLare GD:** Iron absorption and metabolism. *Curr Opin Gastroenterol*. 2009; 25: 129-35
4. **Anderson GJ and Vulpe CD:** Mammalian iron transport. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66: 3241-61
5. **Bals R:** Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res*. 2000; 1: 141-50
6. **Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia J, Sidis Y, Samad TA, Campagna JA, Chung RT, Schneyer AL, Woolf CJ, Andrews NC, Lin HY:** Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet*. 2006; 38: 531-9
7. **Bhatt L, Horgan CP, Walsh M, McCaffrey MW:** The hereditary hemochromatosis protein HFE and its chaperone beta2-microglobulin localise predominantly to the endosomal-recycling compartment: *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 359: 277-84
8. **Bhatt L, Horgan CP, McCaffrey MW:** Knockdown of beta2-microglobulin perturbs the subcellular distribution of HFE and hepcidin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 378: 727-31
9. **Boyce JA:** Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. *Immunol Rev*. 2007; 217: 168-85
10. **Camaschella C and Silvestri L:** New and old players in the hepcidin pathway. *Haematologica*. 2008; 93: 1441-4

11. **Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC:** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994; 263: 802
12. **Collins JF, Wessling-Resnick M, Knutson MD:** Hepcidin Regulation of Iron Transport. *J Nutr.* 2008; 138: 2284-8
13. **Corradini E, Garuti C, Montosi G, Ventura P, Andriopoulos B Jr, Lin HY, Pietrangelo A, Babitt JL:** Bone morphogenetic protein signaling is impaired in an HFE knockout mouse model of hemochromatosis. *Gastroenterology.* 2009; 137: 1489-97.
14. **De Domenico I, McVey Ward DM, Musci G, Kaplan J:** Evidence for the multimeric structure of ferroportin. *Blood.* 2007a; 109: 2205-9
15. **De Domenico I, Ward DM, di Patti MC, Jeong SY, David S, Musci G, Kaplan J:** Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *EMBO J.* 2007b; 26: 2823-31
16. **De Domenico I, Nemeth E, Nelson JM, Phillips JD, Ajioka RS, Kay MS, Kushner JP, Ganz T, Ward DM, Kaplan J:** The hepcidin-binding site on ferroportin is evolutionarily conserved. *Cell Metab.* 2008; 8: 146-56.
17. **De Domenico I, Lo E, Ward DM, Kaplan J:** Hepcidin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106: 3800-5
18. **Deugnier Y:** The iron driven pathway of hepcidin synthesis. *Gastroenterol Clin Biol.* 2010; 34: 351-4
19. **Deutzmann R:** Mechanismen der Signaltransduktion , In Joachim Rassow, Karin Hauser, Roland Netzker, Rainer Deutzmann: *Duale Reihe Biochemie*, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, Auflage 1; 2006: 544-565
20. **Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinks GS, Zon LI, Robine S, Andrews NC:** The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab.* 2005; 1: 191-200

21. **Feder JN, Tsuchihashi Z, Irrinki A, Lee VK, Mapa FA, Morikang E, Prass CE, Starnes SM, Wolff RK, Parkkila S, Sly WS, Schatzman RC:** The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2 microglobulin interaction and cell surface expression. *J Biol Chem.* 1997; 272: 14025-8
22. **Fein E, Merle U, Eehalt R, Herrmann T, Kulaksiz H:** Regulation of hepcidin in HepG2 and RINm5F cells. *Peptides.* 2007; 28: 951-7
23. **Gagliardo B, Faye A, Jaouen M, Deschemin JC, Canonne-Hergaux F, Vaulont S, Sari MA:** Production of biologically active forms of recombinant hepcidin, the iron-regulatory hormone. *FEBS J.* 2008; 275: 3793-803
24. **Ganz T:** Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood.* 2003; 102: 783-8
25. **Ganz T:** Cellular iron: Ferroportin is the only way out. *Cell Metab.* 2005; 1: 155-7
26. **Ganz T:** Hepcidin-a peptide hormone at the interface of innate immunity and iron metabolism. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006; 306: 183-98
27. **Ganz T and Nemeth E:** Iron sequestration and anemia of inflammation. *Semin Hematol.* 2009; 46: 387-93
28. **Hancock RE, Lehrer R:** Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechno.* 1998; 16: 82-8
29. **Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC:** Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell.* 2004; 117: 285-97
30. **Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C:** Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. *Cell.* 2010; 142: 24-38.
31. **Johnson MB, Enns CA:** Diferric transferrin regulates transferrin receptor 2 protein stability. *Blood.* 2004; 104: 4287-93
32. **Kautz L, Meynard D, Monnier A, Darnaud V, Bouvet R, Wang RH, Deng C, Vaulont S, Mosser J, Coppin H, Roth MP:** Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in themouse liver. *Blood.* 2008; 112: 1503-9

33. **Kawabata, H.; Yang, R.; Hirama, T.; Vuong, P. T.; Kawano, S.; Gombart, A. F.; Koeffler, H.P.** Molecular Cloning of Transferrin Receptor2. A new member of the transferrin receptorlike family. The Journal of biological chemistry 1999; 274: 20826–20832
34. **Knutson MD:** Iron-sensing proteins that regulate hepcidin and enteric iron absorption. Annu Rev Nutr. 2010; 30: 149-71
35. **Köhrle Josef:** Grundlagen der parakrinen, autokrinen und intrakrinen Regulation endokriner Organe, In: Detlev Ganten und Klaus Ruckpaul (Hrsg.) Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen, Springer-Verlag Berlin, Auflage: 1; 2006: 3-24
36. **Kulaksiz H, Gehrke SG, Janetzko A, Rost D, Bruckner T, Kallinowski B, Stremmel W:** Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. Gut. 2004; 53: 735-43
37. **Kulaksiz H, Theilig F, Bachmann S, Gehrke SG, Rost D, Janetzko A, Cetin Y, Stremmel W:** The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. J Endocrinol. 2005; 184: 361-70
38. **Kulaksiz H, Fein E, Redecker P, Stremmel W, Adler G, Cetic Y:** Pancreatic β -cells express hepcidin, an iron-uptake regulatory peptide. J Endocrinol. 2008; 197: 241-9
39. **Krause A, Neitz S, Mägert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz Knappe P, Adermann K:** LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. FEBS Lett. 2000; 480: 147-50
40. **Laftah AH, Ramesh B, Simpson RJ, Solanky N, Bahram S, Schümann K, Debnam ES, Srai SK:** Effect of hepcidin on intestinal iron absorption in mice. Blood. 2004; 103: 3940-4
41. **Lee P, Peng H, Gelbart T, Wang L, Beuter E:** Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102: 1906-10

42. **Löffler, G.; Petrides, P. E.; Heinrich, P.C.** in Biochemie & Pathobiochemie“, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 8. Auflage; 2007: 658-666
43. **Merle U, Fein E, Gehrke SG, Stremmel W, Kulaksiz H:** The Iron Regulatory Peptide Hepcidin Is Expressed in the Heart and Regulated by Hypoxia and Inflammation. *Endocrinology* . 2007; 148: 2663-8
44. **Montosi G, Donovan A, Totaro A, Garuti C, Pignatti E, Cassanelli S, Trenor CC, Gsparini P, Andrews NC, Pietrangelo A:** Autosomal dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J Clin Invest*. 2001; 108: 619-23
45. **Muñoz M, Villar I, García-Erce JA:** An update on iron physiology. *World J Gastroenterol*. 2009; 15: 4617-26
46. **Muñoz M, García-Erce JA, Remacha AF:** Disorders of iron metabolism. Part I: molecular basis of iron homoeostasis. *J Clin Pathol*. 2011a; 64: 281-6
47. **Muñoz M, García-Erce JA, Remacha AF:** Disorders of iron metabolism. Part II: iron deficiency and iron overload. *J Clin Pathol*. 2011b; 64: 287-96.
48. **Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T:** Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute protein. *Blood*. 2003; 101: 2461-3
49. **Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J:** Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004; 306: 2090-3
50. **Nemeth E, Ganz T:** Heparin and iron-loading anemias. *Haematologica*. 2006; 91: 727-32
51. **Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, Vaulont S:** Lack of hepcidin gene expression and severe iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Sci USA*. 2001; 98: 8780-5

52. **Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, Sirito M, Sawadogo M, Kahn A, Vaulont S:** Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 4596-601
53. **Niederau C, Strohmeyer G, Stremmel W:** Epidemiology, clinical spectrum and prognosis of hemochromatosis. *Adv Exp Med Biol*. 1994; 356: 293-302
54. **Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T:** Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*. 2001; 276: 7806 -10
55. **Pietrangelo A:** Hemochromatosis: An Endocrine Liver Disease. *Hepatology*. 2007; 46: 1291-301
56. **Pietrangelo A:** Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology*. 2010; 139: 393-408
57. **Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loréal O:** A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem*. 2001; 276: 7811-9
58. **Ramey G, Deschemin JC, Durel B, Canonne-Hergaux F, Nicolas G, Vaulont S:** Hepcidin targets ferroportin for degradation in hepatocytes. *Haematologica*. 2010; 95: 501-4
59. **Rivera S, Liu L, Nemeth E, Gabayan V, Sorensen OE, Ganz T:** Hepcidin excess induces the sequestration of iron and exacerbates tumor-associated anemia. *Blood*. 2005; 105: 1797-802
60. **Robb A, Wessling-Resnick M:** Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin. *Blood*. 2004; 104: 4294-9
61. **Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Girelli D, Christakis J, Loukopoulos D, Camaschella C:** Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*. 2003; 33: 21-2
62. **Sasu BJ, Li H, Rose MJ, Arvedson TL, Doellgast G, Molineux G:** Serum hepcidin but not prohepcidin may be an effective marker for anemia of inflammation (AI). *Blood Cells Mol Dis*. 2010; 45: 238-45

63. **Schibli DJ, Hnter HN, Aseyev V, Starner TD, Wiencek JM, McCray PB Jr, Track BF, Vogel HJ:** The solution structures of the hman beta defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*. 2002; 277: 8279-89
64. **Schwarz P, Kübler JA, Strnad P, Müller K, Barth TF, Gerloff A, Feick P, Peyssonnaud C, Vaulont S, Adler G, Kulaksiz H:** Hepcidin is localised in gastric parietal cells, regulates acid secretion and is induced by *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. 2011: [Epub ahead of print]
65. **Strnad P, Schwarz P, Rasenack MCD, Kucukoglu O, Habib RI, Heuberger D, Eehalt R, Müller MW, Stiehl A, Adler G, Kulaksiz H:** Hepcidin is an antibacterial, stress-inducible peptide of the biliary system. *PLoS One*. 2011; 6: e16454.
66. **Theurl I, Theurl M, Seifert M, Mair S, Nairz M, Rumpold H, Zoller H, Bellmann-Weiler R, Niederegger H, Talasz H, Weiss G:** Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes. *Blood*. 2008; 111: 2392-9.
67. **Truksa J, Peng H, Lee P, Beutler E:** Bone morphogenetic proteins 2,4, and 9 stimulate murine hepcidin 1 expression independently of Hfe, transferrin receptor 2 (Tfr2), and IL-6. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 10289-93
68. **Valore EV, Ganz T:** Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells Mol Dis*. 2008; 40: 132-8
69. **Vecchi C, Montosi G, Pietrangelo A:** Huh-7: a human "hemochromatotic" cell line. *Hepatology*. 2010; 51: 654-9
70. **Verga Falcacappa MV, Muckenthaler MU:** Hepcidin: iron-hormone an antimicrobial peptide. *Gene*. 2005; 364: 37-44

71. **Wang RH, Li C, Xu X, Zheng Y, Xiao C, Zerfas P, Cooperman S, Eckhaus M, Rouault T, Mishra L, Deng CX:** A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab.* 2005; 2: 399-409
72. **Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, Loda MF, Wolfsdorf JI, Andrews NC:** Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood.* 2002; 100: 3776-81
73. **Wessling-Resnick M:** Iron homeostasis and the inflammatory response. *Annu Rev Nutr.* 2010; 30: 105-22
74. **Zucht HD, Grabowsky J, Schrader M, Liepke C, Jürgens M, Schulz Knappe P, Forssmann WG:** Human beta-defensin-1: A urinary peptide present in variant molecular forms and its putative functional implication. *Eur J MedRes.* 1998; 3: 315-23

IV. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Kulaksiz bedanken, der es mir ermöglicht hat in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Danke für die wertvolle Erfahrung und die sehr gute Betreuung.

Besonders und von Herzen bedanke ich mich bei Peggy, die mich trotz vieler dummer Fragen (es gibt sehr wohl dumme Fragen) geduldig in alle Methoden eingewiesen hat und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Danke für deine Hilfe und die schöne Zeit mit dir!

Danke auch an Rayan, Katrin, Nadine, Stefanie, Melanie und Dilek für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Atmosphäre im Labor.

Mein Dank gilt ebenfalls der AG Strnad und der AG Wagner, sowie vielen weiteren, die bei Fragen und Materialengpässen stets geholfen haben.

Danke an Frau Stein und Herrn Prof. Adler für Ihre Unterstützung

Danke auch an die Verantwortlichen des Promotionsprogramms „Experimentelle Medizin“ für den wertvollen Erfahrungsaustausch, sowie die Chance mich in einem Freisemester ohne finanzielle Sorgen voll und ganz auf diese Arbeit konzentrieren zu können.

Danke natürlich auch an alle, die bisher nicht erwähnt wurden, mich aber fachlich oder durch ihre Freundschaft unterstützt haben.

Ein großes Dankeschön geht an meinen Freund Daniel, der mir immer beigestanden, meine Launen geduldig ertragen hat und mich so oft wegen meines Studiums entbehren musste.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder sowie Oma und Opa! Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt. Danke für eure Geduld und Unterstützung in stressigen Momenten und danke, dass ich dank euch mein Studium ohne finanzielle Sorgen ausüben konnte.

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt