Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin I
Kommissarischer Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Götz von Wichert

Die Rolle von Hepcidin bei der Fett induzierten Eisenüberladung und Hyperferritinämie

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

vorgelegt von
Rayan Habib
aus
Dernbach
2011

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Hasan Kulaksiz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Doris Henne-Bruns
Tag der Promotion:	14.06.2012

Ich widme diese Doktorarbeit meinem Vater, der mich in meinem Leben maßgeblich geprägt hat und bis heute mein großes Vorbild ist.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1 Einleitung 1

1.1 Nichtalkoholische Fettlebererkrankung 1

1.2 Eisenstoffwechsel 4

1.3 Bedeutung von Hepcidin im Eisenstoffwechsel 7

1.4 Ziel der Arbeit 14

2 Material und Methoden 15

2.1 Chemikalien und Reagenzien 15

2.2 Reaktionsansätze und Pufferlösungen 18

2.3 Geräte 20

2.4 Antikörper 22

2.5 Molekularbiologische, biochemische und immunhistochemische Methoden 23

2.5.1 Zellkultur 23

2.5.2 Öl-Rot-Färbung 23

2.5.3 Isolierung der Gesamt-RNA und cDNA-Synthese 24

2.5.4 Real-time PCR 25

2.5.5 Protein-Extraktion und Proteinbestimmung nach Bradford 27

2.5.6 Herstellung des Tricin-SDS-Polyacrylamidgels (16,5%) 28

2.5.7 Western-Blot 29

2.5.8 Immunfluoreszenz 30

2.5.9 Eisenmessung 30

2.6 Statistische Auswertung 31

3 Ergebnisse 32

3.1 Etablierung des NAFLD-Zellmodelles 32

3.2 Effekt der Palmitinsäurestimulation auf die Hepcidin-Expression der Leberzelllinien 34
3.2.1 Analyse von Hepcidin auf RNA-Ebene mittels RT-PCR 34
3.2.2 Untersuchung von Hepcidin auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analysen 35
3.2.3 Untersuchung von Hepcidin auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenz-Analysen 36
3.3 Analyse der Postexpositionsstimulation mit Fe-NTA und IL-6 37
3.4 Effekt der Palmitinsäurestimulation auf die Proteine der Hepcidin-regulierenden-Signalkaskaden 38
3.4.1 Analyse der IL-6-Signalkaskade 38
3.4.2 Analyse des BMP6-Signalweges 39
3.4.3 Analyse des TFR2/HFE-Signalweges 41
3.5 Effekt der Palmitinsäurestimulation auf den Eisenstoffwechsel der HepG2-Zellen 42
3.5.1 Effekt der Palmitinsäure auf die Proteine des Eisenstoffwechsels 42
3.5.2 Effekt der Palmitinsäure auf die Eisenaufnahme der HepG2-Zellen 43
4 Diskussion 44
5 Zusammenfassung 57
6 Literaturverzeichnis 59
Danksagung 75
Lebenslauf 76

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BMP	Bone morphogenetic protein
BMPR	BMP-Rezeptor
ca	circa
CD	Cholin Defizient
dd.	destiliert
DNA	Deoxyribonucleic acid
DMT1	Divalent Metal Ion Transporter 1
g	Gramm
GDF15	Growth differentiation factor 15
h	Stunde
HFE	Humanes-Hämochromatose-Protein
HIF	Hypoxie-induzierte Faktor
HJV	Hämojuvelin
H_2O	Wasser
IL-6	Interleukin 6
IREG1	Ferroportin
IRE	iron responsive element
IRP	iron regulatory proteins
JAK	Januskinase
KCL	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
M	molar
mg	Milligramm
min	Minute
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease
ng	Nanogramm
nm	Nanomolar
NASH	non-alcoholic steatohepatitis

Na_2HPO_4 x 2 H_2O	Dinatriumhydrogenphosphat
RNA	Ribonucleic acid
ROS	*Reactive oxygen species*
Rpm	Rounds per minute
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction
sHJV	lösliches HJV
SMAD4	mothers against decapentaplegic homolog
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TFR	Transferrinrezeptor
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
V	Volt
VE	Vollentsalzt

1 Einleitung

1.1 Nichtalkoholische Fettlebererkrankung

Die nichtalkoholische Fettlebererkrankung (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) umfasst ein Spektrum an Lebererkrankungen, die mit keinem signifikanten Alkoholkonsum einhergehen und mit der heutzutage zunehmenden Anzahl an übergewichtigen und adipösen Mensch korrelieren (Yan et al. 2007). Definiert wird die NAFLD als Fettakkumulation in der Leber von mehr als 5 % des Lebergewichtes, bei weniger als 10 g Alkoholkonsum pro Tag (Neuschwander-Tetri und Caldwell 2003). Zum Spektrum der NAFLD gehören die Steatosis hepatis, eine benigne Ablagerung von Fett in den Hepatozyten und die Steatohepatitis (non-alcoholic steatohepatitis, NASH), aus welcher sich eine Leberzirrhose und letztendlich ein Hepatozelluläres Karzinom (HCC) entwickeln können (Neuschwander-Tetri und Caldwell 2003) (Abb.1). Der Begriff NASH wurde erstmals 1980 von Ludwig et al. für die Beschreibung von Patienten verwendet, deren Leberbiopsien dieselben Pathologien wie die einer Alkoholhepatitis aufwiesen, ohne jedoch einen signifikanten Alkoholkonsum feststellen zu können (Duvnjak et al. 2007). Die NASH unterscheidet sich von der einfachen Steatosis hepatis dadurch, dass zusätzlich zu der Fettakkumulation noch eine Entzündung und Schädigung der Hepatozyten vorliegt (Yan et al. 2007). Desweitern stellt die NASH eine der Hauptursachen der Leberzirrhose dar (Caldwell et al. 1999), die 20-25 % der Patienten mit NASH entwickeln (Blackburn und Mun 2004, Lewis und Mohanty 2010). 30-40 % der Patienten mit einer Leberzirrhose entwickeln schließlich Zirrhose-abhängige Komplikationen, inklusive dem Hepatozellulären Karzinom (Fassio et al. 2004, McCullough 2006).

Die Prävalenz der NAFLD in der Gesamtbevölkerung reicht heute von 17 % bis 33 % und steigt in der adipösen Population auf 30-100 % an (Angulo 2002, Yan et al.2007). In den USA geht man sogar davon aus, dass die NAFLD Ursache für 80-90 % der erhöhten Leberwerte in der amerikanischen Bevölkerung ist (Angulo 2002, Marchesini et al.2003, Lewis und Mohanty 2010). Desweitern stellt die NAFLD einen eigenständigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse dar und ist mit einer erhöhten Gesamtmortalität unabhängig von Alter, Geschlecht, LDL-Cholesterin und Rauchen assoziiert (Khashab et al. 2008, Byrne 2010).

Diese Daten verdeutlichen, das große medizinische Problem, das die NAFLD nicht zuletzt aufgrund der steigenden Prävalenz darstellt.

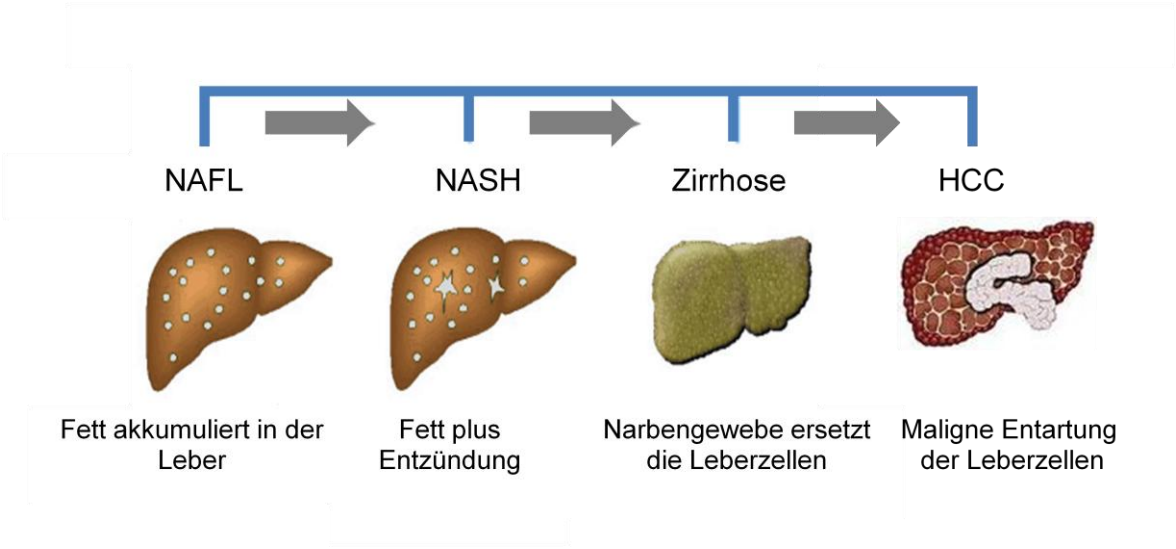


Abb. 1: Progression der NAFLD. Nicht-akoholische Fettleber (NAFL), Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH), Hepatozelluläres Karzinom (HCC). (Forsythe-Pribanic 2011)

Die NAFLD ist durch eine aus übermäßiger Aufnahme von Kalorien, Fetten und Kohlenhydraten resultierende Erhöhung der freien Fettsäuren in der Leber charakterisiert (Musso et al. 2003, De Gottardi et al. 2007, Byrne 2010). Durch erhöhte Abgabe der freien Fettsäuren aus dem Fettgewebe oder *De-novo*-Synthese aus Nahrungskohlenhydraten kommt es zum Ungleichgewicht der Lipid-Aufnahme und der Lipid-Abgabe in Form von Lipoproteinen, was zu einer Akkumulation der Fettsäuren in der Leber führt (Donnelly et al. 2005, Byrne 2010). Eine weitere Schlüsselrolle in der Pathogenese der NAFLD kommt der Insulinresistenz der peripheren Gewebe zu (Pagano et al. 2002). Insulin ist ein Hormon der pankreatischen ß-Zellen und wird von diesen in Abhängigkeit der mit der Nahrung aufgenommenen Menge an Zucker sezerniert. Die Wirkungen von Insulin auf den Stoffwechsel sind vielfältig. So reguliert es auf der einen Seite die Glukose-Homöostase des Körpers durch verminderte Sekretion von Glukose durch die Leber (via Hemmung der Glukoneogenese und Glykogenolyse) und vermehrte Aufnahme von Glukose in das Fett- und Muskelgewebe. Auf der anderen Seite senkt es die Freisetzung von freien Fettsäuren aus dem Fettgewebe durch Hemmung der Hormon-Sensitiven-Lipase (HSL) (Postic und

Girard 2008). Eine erniedrigte Insulinsensitivität führt zu einer erhöhten Lipolyse im Fettgewebe, was eine vermehrte Abgabe von freien Fettsäuren aus dem Fettgewebe direkt in die Portalvene bedingt und in einer chronischen Fettüberladung der Leber endet (Yan et al. 2007). Die erhöhte Menge an Lipiden überfordert das ß-Oxidation-System in den Mitochondrien der Leber, was letztendlich zu Bildung von Triglyceriden in der Leber führt (Yan et al. 2007). Da erhöhte Triglyceridwerte selbst zu einer vermehrten Insulinresistenz führen, ist bis heute nicht vollständig geklärt, ob die Insulinresistenz eine Ursache der NAFLD ist oder ob die vermehrte Bildung von Triglyceriden in der Leber während der Entwicklung einer NAFLD die Insulinresistenz erst verursacht (Postic und Girard 2008).

Die Progression der NAFLD von einer simplen Steatosis hepatis zu einer NASH ist ein weiterer Punkt, der in der Pathogenese der NAFLD bis heute nicht gänzlich verstanden ist. Vor allem die Frage, warum einige Patienten eine NASH entwickeln und andere Patienten nicht, ist noch ungeklärt (Yan et al. 2007).

Das Fettgewebe ist ein endokrin aktives Organ, dass pro- inflammatorische Zytokine wie TNF-α, IL-6 und IL-8 bildet und darüber hinaus wahrscheinlich auch die Aktivierung anderer Entzündungskaskaden und oxidativen Stress begünstigt (Byrne et al 2010).

Die Progression der NAFLD wird dementsprechend als „two hit“ Model verstanden, was bereits 1998 von Day et al. postuliert wurde (Duvnjak et al. 2007). Als „first hit“ wird die massive Akkumulation von freien Fettsäuren und Triglyceriden in den Hepatozyten gedeutet. Oxidativer Stress durch die vermehrte ß-Oxidation in den Hepatozyten, pro-inflammatorische Zytokine (vor allem TNF-α) und Hormone aus dem Fettgewebe (Adipozytokine) wirken zusammen als „second hit“ und führen schließlich zu Leberzellschaden, -entzündung und -fibrose (Angulo 2002, Duvnjak et al. 2007, Byrne et al. 2010).

Ein weiteres Problem in der Progression der NAFLD stellt die Hyperferritinämie und Eisenüberladung dar, die in ca. 30 % der Patienten mit NAFLD beobachtet wird (George et al. 1998, Mendler et al. 1999, Aigner et al. 2008, Barisani et al. 2008). Auch in *in-vivo* Versuchen mit transgenen Mäusen, die eine Steatosis hepatis entwickeln, wurde eine signifikante Überladung der Leber mit Eisen gezeigt (Yanagitani et al 2004, Tsuchiya et al. 2009). Obwohl dieses

Krankheitsbild schon länger bekannt ist, ist der zugrundeliegende Pathomechanismus dieser Eisendysregulation noch völlig ungeklärt.
Die Auswirkung der Hyperferritinämie und Eisenüberladung auf die Progression der NAFLD wurde durch Studien nahegelegt, die Leberbiopsien von NAFLD Patienten untersuchten (George et al. 1998, Malaguarnera et al. 2005). Als möglicher Pathomechanismus wurde der durch Eisen hervorgerufene oxidative Stress vermutet (George et al. 1998, Malaguarnera et al. 2005, Kohgo et al. 2007). Darüber hinaus fanden weitere Arbeitsgruppen heraus, dass Patienten, deren Eisenlast durch Aderlass oder Diät verringert wurde, eine Verbesserung der NAFLD, Senkung der Hyperferritinämie, Verminderung der Insulinresistenz und Verbesserung der Leberwerte aufwiesen (Aminotransferasen, Choleterol, Triglyceride) (Piperno et al. 2004, Valenti et al. 2007). Diese Befunde bestärken die Annahme, dass Eisen entscheidend in die Pathogenese der NAFLD eingreift.

1.2 Eisenstoffwechsel

Eisen ist ein essentielles Spurenelement für alle Lebewesen. Durch seine Fähigkeit unter physiologischen Bedingungen entweder Elektronen-Donator oder Elektronen-Akzeptor zu sein, spielt Eisen eine entscheidende Rolle in biologischen Prozessen. So ist Eisen ein Schlüsselelement bei vielen Reaktionen wie zum Beispiel der Energiegewinnung in den Mitochondrien, wo es in Form von Zytochrom einen Teil des Enzymkomplexes der Atmungskette darstellt, bei der DNA-Synthese oder als Bestandteil der Sauerstofftransporter Hämoglobin und Myoglobin. Das Gesamtkörpereisen des gesunden Menschen beträgt ca. 3-5 g und ist zu 60 % an Hämoglobin gebunden. Im Serum bindet Eisen an den zentralen Eisentransporter Transferrin, wohingegen es im Gewebe als Speichereisen gebunden an Ferritin und Hämosiderin vorkommt (Petrides 2003).
Der tägliche Eisenverlust eines gesunden Erwachsenen liegt zwischen 0,5-1 mg und geht über Desquamation der Haut- und Dünndarmepithelien, Urin, Galle und Schweiß dem Organismus verloren. Da die Resorption von Eisen aus der Nahrung bei normalem Eisenstoffwechsel bei ca. 5-10 % liegt, beträgt der tägliche Eisenbedarf der mit der Nahrung aufgenommen werden muss ungefähr 10 mg, um den Eisenverlust auszugleichen (Petrides 2003). Die Aufnahme von Nahrungseisen aus dem Darm erfolgt über die Enterozyten. Eisen kommt in der

Nahrung als Häm- oder Nicht-Häm-Eisen vor. Im Gegensatz zu Häm-Eisen ist die Aufnahme von zweiwertigen oder dreiwertigen Nicht-Häm-Eisen in die Enterozyten gut verstanden (Abb.2). Nicht reduziertes Eisen muss von einer apikal gelegenen Ferrireduktase, dem duodenal Zytochrom B (DcytB) reduziert werden, um im Anschluss via des Divalent Metal Ion Transporter 1 (DMT1) in die Enterozyten aufgenommen werden zu können (Garrick et al. 2003, Wessling-Resnick 2005, Mackenzie und Garrick 2005, Anderson et al. 2009). Sobald sich das Eisen im Enterozyten befindet, gibt es zwei mögliche Stoffwechselwege, die abhängig von der Eisenlast des Körpers sind. Bei niedrigem Eisenbedarf des Körpers wird das Eisen als Ferritin in den Enterozyten gespeichert und durch Desquamation der Zellen mit ihnen über den Darm ausgeschieden (Wessling-Resnick 2005, Anderson et al. 2009). Bei hohem Eisenbedarf des Körpers passiert das zweiwertige Eisen die basolaterale Membran der Enterozyten über den Eisenexporter IREG1 (Ferroportin) und wird so dem Körper zugeführt (Ganz und Nemeth 2005, Anderson et al. 2009). Nach Oxidation durch Hephaestin bindet das Eisen dann im Blut an seinen zentralen Transporter Transferrin und erreicht schließlich über die Portalvene die Leber und weitere Eisenspeicherorgane wie das Knochenmark.

Neben seinen lebenswichtigen physiologischen Funktionen stellt Eisen aber auch eine für den Organismus potenziell gefährliche Substanz dar. So führen stark erhöhte Konzentrationen an Eisen zu schweren Gewebsschäden bis hin zu Organversagen und in manchen Fällen zum Tod (Frazer et al. 2008).

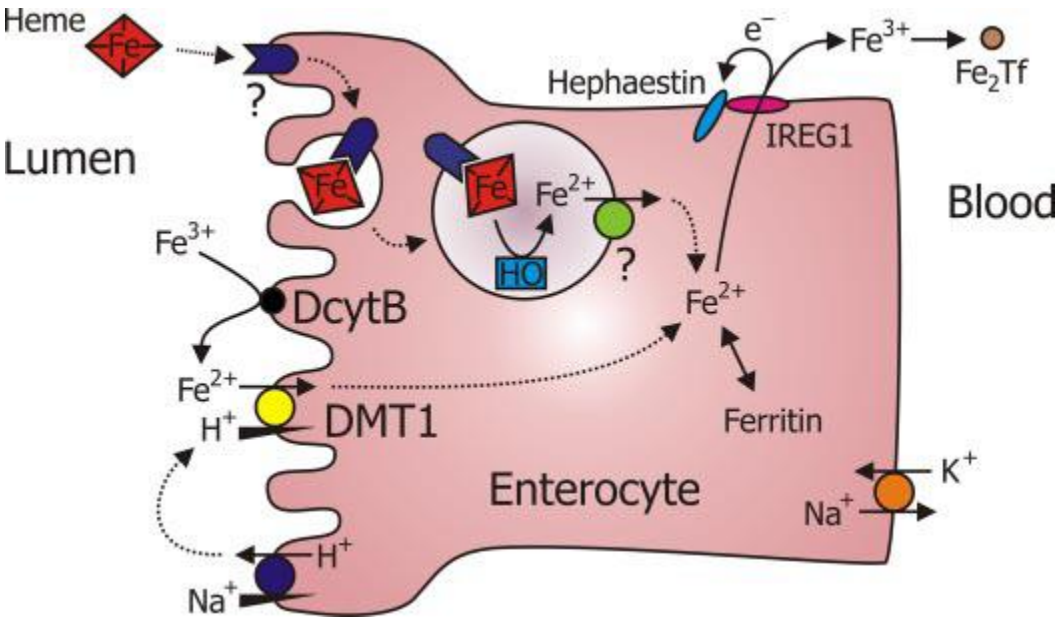


Abb.2: Eisenaufnahme über Enterozyten. Divalent Metal Transporter (DMT), Ferroportin (IREG1), duodenales Zytochrom B (DcytB). (Mackenzie und Garrick 2005, S.982)

Die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser ist ein lebensnotwendiger Teil des Zellmetabolismus und führt zu Bildung von Sauerstoffradikalen, wie zum Beispiel Superoxid-Anionen oder Wasserstoffperoxiden (Galaris und Pantopoulos 2008). Unter normalen Bedingungen sind ausreichend Enzyme vorhanden, die die Zelle vor Schädigungen durch die Radikale schützen. Wenn aber Redox-aktive Substanzen wie das Eisen in überhöhter Konzentration vorliegen, ist dieses enzymatische System überlastet, was zur Umwandlung der Radikale in extrem reaktive Hydroxyl-Radikale führt (Frazer et al. 2008). Die Hydroxyl-Radikale können mit zellulären Bestandteilen reagieren, was zur oxidativen Schädigung von Proteinen, Peroxidation von Lipid-Membranen und Modifikationen der DNA führt (Ramm und Ruddell 2005). So kommt es durch diese Peroxidation in der Leber zu Schädigungen von Zellorganellen, wie den Lysosomen und Mitochondrien, was zu einer hepatozellulären Schädigung beiträgt und letztendlich zur Entwicklung einer hepatischen Fibrose führen kann (Ramm und Ruddell 2005). Diese Befunde verdeutlichen, wie schädlich Eisenüberladungen für die Leber sind und in welcher Weise dadurch vorher bestehende Erkrankungen wie die NAFLD in ihrer Progression vorangetrieben werden können.

Aufgrund dieses ambivalenten Charakters des Eisens, einerseits physiologisch lebensnotwendig und andererseits in zu hohen Konzentrationen extrem zellschädigend zu sein, ist es von essentieller Bedeutung, die Eisenkonzentration des Körpers streng zu kontrollieren.

1.3 Bedeutung von Hepcidin im Eisenstoffwechsel

Der zentrale Eisenregulator des Körpers ist Hepcidin. Hepcidin ist ein 25 Aminosäuren langes Peptid mit antimikrobieller Aktivität. Es wurde von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander im menschlichen Plasma (Krause et al. 2000) und Urin (Park et al. 2001) entdeckt. Das antimikrobielle Spektrum scheint von Gram-positiven über Gram-negative Bakterien bis hin zu einer antimykotischen Wirkung zu reichen (Krause et al. 2000).

Hepcidin wird als 84 Aminosäuren langes Prä-Pro-Peptid hauptsächlich in der Leber synthetisiert (Park et al. 2001, Kulaksiz et al. 2004, Falzacappa und Muckenthaler 2005, Lee und Beutler 2009) (Abb.3). Neben der Leber wird Hepcidin noch in weiteren Organen wie zum Beispiel Herz, Niere, Pankreas, Galle und Magen exprimiert (Kulaksiz et al. 2005, Merle et al. 2007, Kulaksiz et al. 2008, Strnad et al. 2011, Schwarz et al. 2012). Das Prä-Pro-Peptid wird nach Abspaltung des aus 24 Aminosäuren bestehenden Signal-Peptids von der Leber als Pro-Hepcidin in die Blutbahn abgegeben und kann dort nachgewiesen werden (Kulaksiz et al. 2004). Durch weitere Modifizierungen entsteht schließlich das biologisch aktive Hepcidin, welches ebenfalls in der Blutbahn nachgewiesen werden kann und über den Urin ausgeschieden wird (Park et al. 2001). Neben der 25 Aminosäuren langen biologisch aktiven Form, lassen sich im Urin auch kleinere Peptide mit 20 und 22 Aminosäuren detektieren (Park et al. 2001).

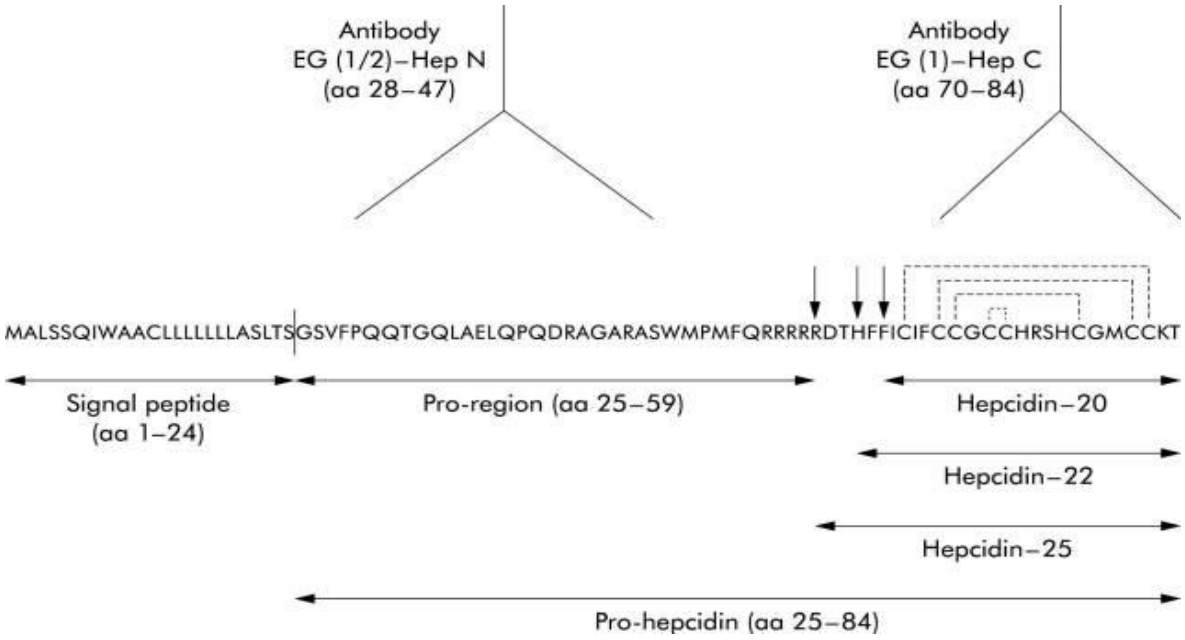


Abb. 3: Aminosäurensequenz von Hepcidin und seinen Vorläufermolekülen (Kulaksiz et al. 2004, S. 737)

Die Verbindung zwischen Hepcidin und dem Eisenstoffwechsel wurde erstmals während Untersuchungen der hepatischen Reaktion auf eine Eisenüberladung gefunden (Pigeon et al. 2001). Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die murine Hepcidin-mRNA durch Eisenüberladung hochreguliert wird. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass auch im Menschen eine Eisenüberladung zu einer erhöhten Hepcidin-Konzentration im Urin führt (Nemeth und Tuttle et al. 2004) und Hepcidin den Bluteisenspiegel reguliert (Ganz 2006).

Der Rezeptor für Hepcidin ist Ferroportin. Zirkulierendes Hepcidin bindet an Ferroportin und führt zu Internalisierung und lysosomalen Degradation des Komplexes (Nemeth und Tuttle et al. 2004, De Domenico et al. 2007). Ferroportin wird neben der Leber vor allem in Makrophagen und Enterozyten exprimiert und ist der einzige bis jetzt bekannte Eisen-Exporter der Zelle (Ganz 2005). Die Makrophagen geben das durch den Abbau der Erythrozyten anfallende Eisen, die Enterozyten das aus dem Darm aufgenommene Eisen mit Hilfe von Ferroportin in die Blutbahn ab. So führt eine Erhöhung der Hepcidin-Konzentration zu einer Verringerung und eine Verminderung der Hepcidin-Konzentration zu einer Steigerung der Eisenabgabe aus den Zellen und somit des Bluteisenspiegels.

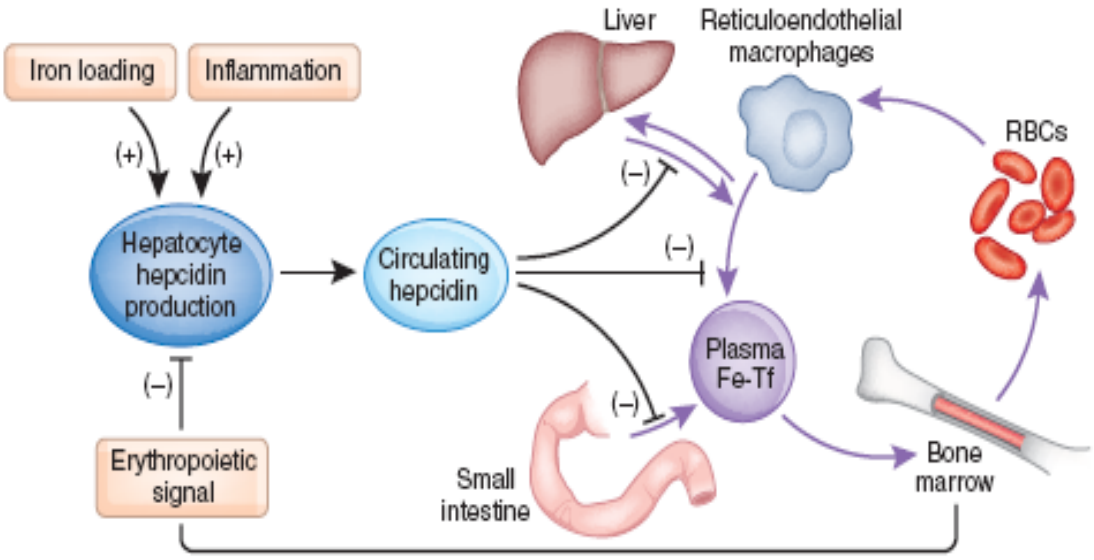


Abb. 4: Grafik der Regulation und Funktion von Hepcidin. Transferrin (Tf), Erythrozyten (RBC). (Young und Zaritsky 2009, S.1385)

Der Hepcidin-Gehalt seinerseits wird über mindestens drei unabhängige Mechanismen reguliert. Während Entzündungen und Eisenüberladungen die Hepcidin Expression induzieren, hemmen erythropoetische Aktivitäten seine Expression (Abb.4).

Im Rahmen der Entzündung ist ein erhöhtes Level von Interleukin-6 (IL-6) der primäre Stimulus für eine erhöhte Hepcidin-Expression (Nemeth und Rivera et al. 2004). So konnte sowohl bei *in-vitro*- als auch bei *in-vivo*-Experimenten gezeigt werden, dass die Hepcidin-Konzentration durch den Entzündungsmediator IL-6 gesteigert wird (Nemeth et al. 2003, Nemeth und Rivera et al. 2004, Fein et al. 2007). Die Bindung von IL-6 an den IL-6-Rezeptor führt über eine Janus-Kinase (JAK) zur Phosphorylierung von STAT3, welches an den Hepcidin-Promotor bindet und dessen Aktivität erhöht (Papanikolaou et al. 2005, Nemeth und Rivera et al. 2004). Auch Patienten mit chronischen entzündlichen Erkrankungen zeigten deutlich erhöhte Hepcidin-Werte gegenüber gesunden Probanden (Nemeth und Rivera et al. 2004). Dies weist darauf hin, dass erhöhte Hepcidin-Werte eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Anämie bei Entzündung (Infektanämie) spielen könnten (Nemeth und Rivera et al. 2004).

Die Hepcidin-Regulation durch Eisenlast wird über eine Interaktion von TFR1, TFR2, HFE und dem BMP-Rezeptorkomplex auf der Oberfläche der Hepatozyten gesteuert (Babitt et al. 2006, Lin et al 2007, Babitt et al. 2007, Schmidt et al. 2008, Goswami et al. 2006) (Abb. 5).

BMPs sind eine Gruppe von mindestens 20 löslichen Molekülen und gehören zur Superfamilie der transformierenden Wachstumsfaktoren-β (TGFβ). BMPs binden an den membranständigen BMP-Rezeptor-Komplex, der jeweils aus zwei Typ I (BMPR1) und Typ II (BMPR2) Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren besteht (Knutson 2010). Durch Bindung eines Liganden, z.B. BMP6 phosphoryliert BMPR2 BMPR1, welcher daraufhin das Signal weiterleitet, indem er die Phosphorylierung nachgeschalteter Transkriptionsfaktoren SMAD1/5/8 katalysiert. SMAD1/5/8-phosphoryliert assoziiert mit SMAD4 zu einem Komplex, der nach Translokation in den Nukleus die Transkription von Hepcidin steigert (Wang et al. 2005). Die Wichtigkeit von SMAD4 für die Hepcidin-Regulation über den BMP-Signalweg konnten *in-vitro* Versuche mit Hepatozyten zeigen. So kam es bei *smad4-null* Hepatozyten zu keinem Anstieg von Hepcidin nach Stimulation mit BMP4, einem starken Hepcidin-Induktor bei Wild-Typ Hepatozyten (Xia et al. 2008).
Darüber hinaus konnte in mehreren *in-vitro* und *in-vivo* Experimenten gezeigt werden, dass eine Reihe von BMP-Liganden, unter anderem BMP2, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7 und BMP9 durch Bindung an den BMP-Rezeptor-Komplex die Hepcidin-Expression hochregulieren (Babitt et al. 2006, Babitt et al. 2007, Truksa et al. 2006, Wang et al. 2005). BMP6 ist dabei der stärkste stimulierende Ligand für die Regulation von Hepcidin über den BMP-Signalweg (Andriopoulos et al. 2009, Meynard et al. 2009). So konnte gezeigt werden, dass BMP6-defiziente Mäuse einen dramatischen Abfall von Hepcidin und eine massive Eisenüberladung entwickelten. Des Weiteren wurde durch Injektion von BMP6 in Mäuse eine erhöhte Hepcidin-Expression beobachtet, während ein BMP6-Antikörper Hepcidin drastisch supprimierte (Andriopoulos et al. 2009).

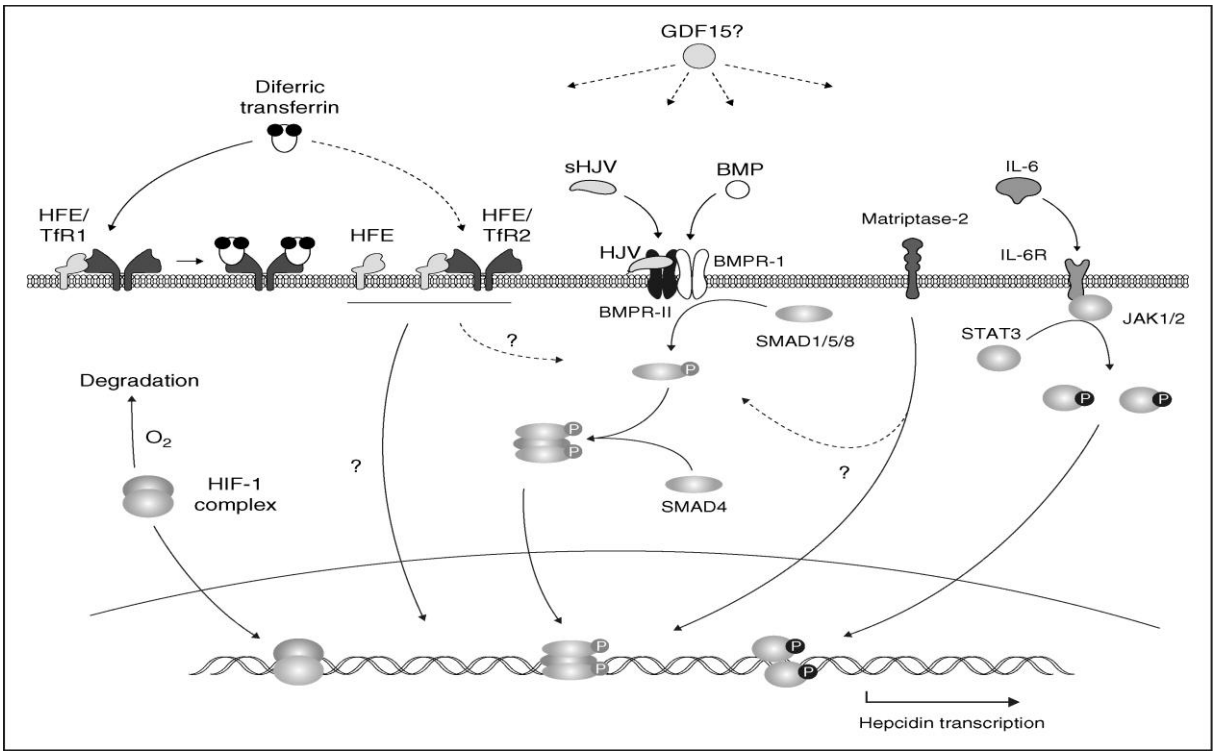


Abb. 5: Signalkaskaden der Hepcidin-Regulation. Interleukin (IL), Bone morphgenic protein (BMP), Ferroportin (IREG1), Transferrinrezeptor (TFR), Hämojuvelin (HJV), mothers against decapentaplegic homolog (SMAD), Januskinase (JAK), Humanes-Hämochromatose-Protein (HFE), Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), Hypoxie-induzierte Faktor (HIF), BMP-Rezeptor (BMPR), lösliches HJV (sHJV), Growth differentiation factor 15 (GDF15). (Anderson et al. 2009, S. 133)

Die Regulation von Hepcidin über den BMP6-Signalweg wird durch Eisenlast gesteuert. Dies wurde durch *in-vivo* Experimente verdeutlicht, bei denen Mäuse mit eisendefizienter, normaler und eisenreicher Diät gefüttert wurden (Kautz et al. 2008). Erstaunlicherweise waren BMP6 und aufgrund funktioneller Konsequenzen auch phosphoryliertes SMAD-1/5/8 die einzigen Mediatoren, die durch Eisenlast hochreguliert und durch Eisenmangel runter reguliert wurden. Darüber hinaus konnte noch gezeigt werden, dass in *smad4-null* und *hamp1-null* Mäusen, die aufgrund ihrer Mutation eine schwere Eisenüberladung entwickelten, ebenfalls BMP6 hochreguliert war (Kautz et al. 2008). Diese Experimente zeigen wie wichtig der BMP6-Signalweg in der Regulation von Hepcidin durch Eisen ist.

Die Hepcidin-stimulierende Wirkung von BMP6 über die BMP-Rezeptoren benötigt als Co-Rezeptor das membranständige Protein HJV. Mutationen im HJV-Gen stellen neben Defekten in den Genen für HFE, Hepcidin (HAMP) und TFR2-Gen

eine Ursache für die hereditäre Eisenspeicherkrankheit Hämochromatose dar. In Folge der inadäquaten Hepcidin-Synthese, die die zentrale Ursache der Hämochromatose darstellt, kommt es bei den Patienten zu übermäßigen Eisenablagerungen in der Leber, Pankreas, Herz, Haut, Gelenke und endokrinen Drüsen und im weiteren Verlauf zu Schädigung der Organe (Ganz 2006, Pietrangelo 2006, Pietrangelo 2007). Das klinische Bild der Hämochromatose reicht von einfachen biochemischen Anomalitäten bis hin zum schweren Multiorganversagen (Pietrangelo 2007).
Typisch für die durch HJV-Mutationen hervorgerufene juvenile Hämochromatose sind stark erniedrigte Hepcidin-Level (Papanikolaou et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass Veränderungen im HJV-Gen zu einer Beeinträchtigung der BMP vermittelten Hepcidin-Stimulation führen und dadurch das basale Hepcidin-Level erniedrigen (Babitt et al 2006).
Neben der membrangebundenen Form von HJV gibt es noch eine lösliche Form (sHJV), die BMP-Liganden bindet und deren Interaktion mit dem HJV-BMPR-Komplex verhindert und somit zu einer Suppression der Hepcidin-Synthese führt (Babitt et al. 2007). Einen ähnlichen Effekt zeigt die membrangebundene Protease Matriptase-2. Wenn sie aktiviert wird, spaltet sie HJV in kleine Fragmente und verhindert somit die Bindung der BMP-Liganden an ihre Rezeptoren (Silvestri et al. 2008).
Der genaue Mechanismus, wie der BMP-Rezeptor-Komplex die Eisenlast des Körpers ermittelt, ist bis jetzt noch nicht vollständig verstanden. Es gibt aber Hinweise, dass eine Interaktion zwischen TFR2 und dem BMP-Signalweg einen Sensor für die Eisenlast darstellen könnte (Ramey et al 2009).

TFR1 und TFR2 sind Typ-II-Transmembran-Glykoproteine die Transferrin-gebundenes Eisen (Holotransferrin) binden, den Transferrin-Eisen-Komplex internalisieren und somit einen zentralen Weg der zellulären Eisenaufnahme darstellen (Kawabata et al. 1999). TFR2, das hauptsächlich in der Leber exprimiert wird (Kawabata et al. 1999), kann genau wie TFR1 Eisen aus Holotransferrin in die Leber transportieren. Wenn Holotransferrin an einen der Transferrinrezeptoren bindet, kommt es zur Rezeptor-vermittelten Endozytose in spezielle Endosomen. Die Ansäuerung des Endosoms führt zu dem Freisetzen des Eisens aus Transferrin. Das dreiwertige Eisen wird reduziert und durch DMT1 in das

Zytoplasma abgegeben. Transferrin sowie Transferrinrezeptor kehren zur Wiederverwendung an die Zelloberfläche zurück (Levy et al. 1999).

Neben seiner Funktion als Eisenimporter der Zelle ist TFR2 auch ein zentraler Regulator des Eisenstoffwechsels. Die Funktion von TFR2 als Eisenregulator wurde das erste Mal entdeckt, als sechs Hämochromatose Patienten identifiziert wurden, die als einzige genetische Veränderung eine *nonsense-Mutation* im TFR2-Gen aufwiesen (Camaschella et al. 2000). Des Weiteren konnte in Experimenten gezeigt werden, dass in Mäusen und Menschen eine inaktivierende Mutation im TFR2-Gen zu einer stark verminderten Hepcidin-Expression führt (Kawabata et al. 2005, Nemeth et al. 2005).

Die Hepcidin-regulierende Funktion von TFR2 wird über eine Interaktion mit HFE vermittelt. HFE, dessen Mutation selbst auch zu Hämochromatose führt (Pietrangelo 2007), bindet an TFR1 und TFR2. Die Bindung von HFE an TFR2 führt zu Stimulation der Hepcidin-Expression (Gao et al. 2009).

Interessanterweise überlappt bei TFR1, im Gegensatz zu TFR2, die Bindungsstelle von HFE mit der von Holotransferrin (West et al. 2001, Chen et al. 2007). Außerdem wurde in Mäusen herausgefunden, dass eine Mutation, die die Bindung von HFE an TFR1 verhindert, die Hepcidin-Expression erhöht und eine Mutation, die die Bindung von HFE an TFR1 begünstigt, im Gegensatz dazu die Hepcidin-Expression erniedrigt (Schmidt et al. 2008). Weitere Befunde zeigten, dass erhöhte Holotransferrin-Konzentrationen nicht nur das TFR2-Protein stabilisieren (Johnson und Enns 2004, Robb und Wessling-Resnick 2004), sondern auch zusätzlich zu einer vermehrten Degradation von TFR1-mRNA führen (Einstein 2000).

Aus diesen Beobachtungen entwickelte sich die These, dass TFR1 HFE bindet und somit die für den Hepcidin-stimulierenden Effekt notwendige Interaktion von HFE und TFR2 verhindert. In Situationen mit hoher Eisenlast und dadurch hoher Holotransferrin-Konzentration, verdrängt Holotransferrin HFE aus seiner Bindung. Das freie HFE bindet nun an TFR2 und der Komplex stimuliert die Hepcidin-Synthese.

Im Gegensatz zu dem BMP6 Signalweg, sind die dem TFR2/HFE-Signalweg zugrundeliegenden intrazellulären Kaskaden nur ansatzweise verstanden.

Die intrazelluläre Signalkaskade scheint über den *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalweg sowie den *extracellular signal regulated kinases* 1/2 (ERK-1/2) Signalweg zu laufen (Calzolari et al. 2006).

Die Verbindung zwischen dem TFR-Signalweg und BMP6-Signalweg wurde durch Versuche mit isolierten Maus-Hepatozyten untersucht (Ramey et al. 2009).
Diese Experimente zeigten, dass die Gabe von Holotransferrin nicht nur den TFR-Signalweg über ERK1/2 beeinflusst sondern auch zu einer Phosphorylierung von SMAD1/5/8, ein Teil der intrazellulären BMP-Signalkaskade, führt (Ramey et al. 2009). Ferner verursachte die Hemmung des TFR-Signalweges durch Gabe von ERK Inhibitoren eine verminderte Phosphorylierung von SMAD1/5/8 durch Holotransferrin (Ramey et al. 2009). In Versuchen mit *hfe-null* und *tfr2-null* Mäusen fand man darüber hinaus, dass eine Deletion in beiden Genen zu einer stark verminderten intrazellulären SMAD1/5/8 Konzentration führt (Wallace et al. 2009). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der TFR2/HFE Signalweg und der BMP-Signalweg miteinander verknüpft sind und TFR2 den Sensor der Eisenlast für den BMP-Signalweg darstellen könnte.

1.4 Ziel der Arbeit

Die NAFLD-assoziierte Hyperferritinämie und Eisenüberladung ist ein häufiges Krankheitsbild in der westlichen Welt und stellt wegen ihres ungeklärten Pathomechanismuses und der fehlenden Therapiemöglichkeit ein großes medizinisches Problem dar. Insbesondere besteht die Gefahr, das durch die Eisenüberladung der Leber die Progredienz der Erkrankung von einer benignen Steatosis hepatis zu einer NASH, Leberfibrose/Leberzirrhose oder sogar zu einem hepatozellulären Karzinom beschleunigt wird.
Daher soll in dieser Arbeit in einem NAFLD *in-vitro* Modell die Auswirkung von Fett auf den zentralen Eisenregulator Hepcidin, die Proteine seiner Signalkaskade, sowie den Eisenstoffwechsel der Zellen untersucht und somit eine mögliche Beteiligung des Hepcidin-Stoffwechsels an der NAFDL-assoziierte Eisenüberladung aufgeklärt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Agarose	Appligene, Großbritannien
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bathophenanthrolindisulfonsäure-Dinatriumsalz (BPS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
ß-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Coomassie blue	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Dinatrium-Nitrilotriessigsäure (NTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DL-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
ECL (Westernblot Detektionsreagenz)	Amersham Biosciences, Großbritannien
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Eisenammoniumcitrat (FAC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Münche
Eisen(III)-Nitrat-Nonahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Entwickler-Lösung	Tetenal AG & Co KG, Norderstedt
Ethanol (≥99,5%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ferric Nitrate Nonhydrate (Fe^{3+})	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Fetal Calf Serum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Fluorsafe	Calbiochem, USA
Formalin (37%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Hämalaun nach Mayer	Merck, Darmstadt
High Pure RNA Isolation Kit®	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumchlorid (NaCl)	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH,Heidelberg

N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
N,N'-Methylenbisacrylamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
NOVEX Sharp Protein Standard (Marker Westernblot)	Invitrogen GMBH, Darmstadt
Öl-Rot-O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Palmitinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Proteinaseinhibitor „Complete“	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Protein X-Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
RPMI Medium 1640-L-Glutamin	Invitrogen GMBH, Darmstadt
RT^2 SYBR® Green/ROX™ qPCR Master Mix	SABiosciences™, USA
SuperScript III Reverse Transcriptase	Invitrogen GMBH, Darmstadt
Tricin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Triton X-100	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH, Österreich

Tween20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt

2.2 Reaktionsansätze und Pufferlösungen

Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (T40/C3)	Acrylamid N,N'-Methylenbisacrylamid in VE-Wasser	5,46 M 78 mM
Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (T40/C6)	Acrylamid N,N'-Methylenbisacrylamid in VE-Wasser	5, 29 M 156 mM
Anodenpuffer	Tris auffüllen auf 1l dd. H_2O pH auf 8,9 einstellen	24,22 g
Coomassie blue	Methanol Essigsäure Coomassie blue 250G auffüllen auf 1 l dd. H_2O	400 ml 100 ml 0, 4 g
Entfärbungslösung	Methanol Essigsäure H_2O	400 ml 100 ml 500 ml
Fe^{3+}-Lösung (13mM)	Ferric Nitrate Nonahydrate Auffüllen auf 10 ml mit dd. H_2O	52,5 g
Fe-NTA-Lösung (6,5 mM)	Fe^{3+}-Lösung (13mM) NTA-Lösung (13mM) pH auf 7,4 einstellen	1 ml 0,01 ml

Gelpuffer	Tris	54,5 g
	10% SDS	4,5 ml
	auf 150 ml dd. H_20 auffüllen	
	pH auf 8,45 einstellen	
Kathodenpuffer	Tris	12,11 g
	Tricin	17,92 g
	10% SDS	10 ml
	auffüllen auf 1 l dd. H_20	
5 x Ladepuffer	312,5 mM Tris, pH 6,8	
	10% SDS	
	50% Glycerin	
	25% s-Mercaptoethanol	
	Bromphenolblau	
	in dd. Wasser	
Lysepuffer	10 mM Tris	
	0, 5% Triton X-100	
	in dd. H_20 pH 7,5	
	¼ Complete® Protease Inhibitor-Tablette	
	auf 5 ml Puffer	
Master-Mix für cDNA-Synthese I	dNTP	1 µl
	Oligo $(dT)_{20}$ (0,2 µg/µl)	1 µl
	RNA (2µg)	
Master-Mix für cDNA-Synthese II	First-Strand-Buffer	4 µl
	0,1 M DTT	1 µl
	SuperScript III RT (200 U/µl)	1 µl

NTA-Lösung (13mM)	Dinatrium-Nitrilotriessigsäure Auffüllen auf 10 ml mit dd. H_2O	30,6 mg
Phosphate-buffered-saline (PBS) (Zellkultur/ Ölrotfärbung)	KCL NaCl Na_2HPO_4 x 2 H_2O KH_2PO_4 in dd. H_20, pH 7,4	27 mM 1,37 M 100 mM 18 mM
Phosphate-buffered-saline (PBS) (Immunfluoreszenz)	Na_2HPO_4 x H_2O Na_2HPO_4 x 2 H_2O NaCl In VE-Wasser	2 mM 8 mM 150 mM
Transferpuffer (Blotting-Puffer)	Tris Glycin Methanol auf 1 l mit dd. H_20 auffüllen pH 8,3 einstellen	3,03 g 11,26 g 100 ml
Tris-Buffered-Saline (TBS)	NaCl Tris auf 1 l mit dd. H_20 auffüllen pH 7,5 einstellen	8,76 g 1,21 g
TBST	1 l TBS + 1 ml Tween20	

2.3 Geräte

7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, USA
Analysewaage	Sartorius AG, Göttingen

Aufrechtes Lichtmikroskop mit Software: Leica application suite	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Bakterienschüttler Certomat ®H	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
ELISA-*Reader* SLT Spectra II	Gemini BV, Niederlande
Fluoreszenzmikroskop IX 71 mit *Software*: Simple PCI6	Olympus Europa GmbH, Hamburg Photonics GmbH, Deutschland
Gelelektrophorese-Apparatur und Zubehör	Bio-Rad Laboratories, USA
Heizblock DRI-Block®	Biostep GmbH, Jahnsdorf
Inkubationsschrank	WTB Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen
Inverses Lichtmikroskop	Carl Zeiss, Deutschland
Laborwaage PM 4000	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
pH-Meter InoLab ®	WTW GmbH, Weilheim
Schüttler	Edmund Buhler GmbH, Hechingen
Sterilbank Lamin Air HLB 2448	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Stromversorgungsgerät (*Power Supply)*	Bio-Rad Laboratories, USA

Vortexer Genie® 2	Scientific Industries, USA
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

2.4 Antikörper

Tabelle 1: Primär Antikörper

Antikörper	Zielspezies	Ursprungsspezies	Immunisierung und Gewinnung
polyklonaler α-Hepcidin EG(5)-HepN/2	Mensch	Kaninchen	Kulaksiz et al. 2004

Tabelle 2: Sekundär Antikörper

Antikörper	Zielspezies	Ursprungsspezies	Immunisierung und Gewinnung
α -rabbit IgG-HRP	Kaninchen	Ziege	Dianova GmbH, Hamburg
Cy™3-α-rabbit IgG	Kaninchen	Ziege	Jackson Immuno-Research, USA

2.5 Molekularbiologische, biochemische und immunhistochemische Methoden

2.5.1 Zellkultur

Für die Zellstimulationsversuche wurden die humanen Leberkarzinomzelllinien HepG2 und Hep3B verwendet. Die Zelllinien wurden in RPMI 1640 Medium bei 37° C und 5 % CO_2 kultiviert. Dem Medium wurden 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS), Penicillin (Endkonzentration: 100 Units/ml, PAA) und Streptomycin (Endkonzentration: 100 µg/ml, PAA) zugesetzt.

Für die Fettsäurestimulation wurde Palmitinsäure an Bovines Serumalbumin (BSA) komplexiert. Hierfür wurde Palmitinsäurepulver zu 10 %iger BSA Lösung gegeben und bei 37°C und leichtem Schütteln gelöst, um eine 8 mM Lösung von komplexierter Palmitinsäure an BSA zu erreichen. Das endgültige Molare Verhältnis von Fettsäure zu BSA war 5:1.

Die Zellstimulation mit Palmitinsäure wurde für die Öl-Rot-Färbung und die RNA-Analysen in 6-Lochplatten und für die Westernblot-Analysen und Eisenmessungen in T25 Kulturflaschen (25 cm² Wachstumsfläche) durchgeführt. Pro Loch wurden 6,5 x 10*5 Zellen und pro T25 Kulturflasche 1,7 x 10*6 Zellen ausgesät. Die Zellen wurden drei Tage lang bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert. Danach folgte die 24 stündige Stimulation mit Palmitinsäure in Konzentrationen von 0,1 – 1 mM in 2 ml Komplett-Medium.

Für die Postexpositionsstimulation wurden die Zellen nach Kultivierung in 6-Lochplatten und Stimulation für 24 h mit 1 mM Palmitinsäure entweder 4 h mit 40 ng/ml IL-6 oder 72 h mit 1 µM Nicht-Transferrin-Gebundenen Eisen (Fe-NTA) stimuliert. Die Konzentrationen und Stimulationszeiten für IL-6 und Fe-NTA wurden entsprechend vorrangegangener Versuche mit HepG2-Zellen gewählt (Fein et al. 2007).

2.5.2 Öl-Rot-Färbung

Oil-Red-O (Sudanrot 5B, C26H24N4O) ist ein fettlöslicher Farbstoff, mit dem sich neutrale Fette (Triacylglyceride) anfärben lassen. Für die Stammlösung wurden 0,35 g Oil-Red-O in 100 ml Isopropanol (≥99,9%) über Nacht mittels Magnetrührer gelöst. Anschließend wurde die Lösung gefiltert. Für die Arbeitslösung wurden

4 Teile dd. Wasser mit 6 Teilen der Stammlösung gemischt und bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Danach wurde die Lösung durch ein WhatmanR-Papier gefiltert.

HepG2-Zellen wurden auf Objektträger ausgesät und für 2 Tage bis zu einer Konfluenz von ca. 80% kultiviert. Danach wurden die Objektträger in einzelne Petrischalen überführt und mit 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM, 1mM Palmitinsäure für 24 h stimuliert. Als Kontrolle wurde ein Objektträger mit der höchsten verwendeten Konzentration an BSA (entsprechen der BSA-Konzentration bei Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure) stimuliert, auf einem Objektträger wurden die Zellen unstimuliert wachsen gelassen.

Für die Färbung der Zellen nach 24 h Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen Palmitinsäure wurde in einem ersten Schritt das Medium abgesaugt und die Objektträger in den Petrischalen mit jeweils 25 ml PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen auf den Objektträgern für 10 Minuten mit 25 ml einer 10%igen Formalinlösung fixiert und anschließend für 60 Minuten in einer frischen Formalinlösung derselben Konzentration inkubiert. Darauffolgend wurden die Objektträger zweimal mit 25 ml dd. Wasser gewaschen und für 5 Minuten mit 25 ml 60 %igem Isopropanol inkubiert. Als Nächstes wurden die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich für 10 Minuten mit 25 ml der Arbeitslösung gefärbt. Nach der Färbung wurden die Zellen viermal mit 25 ml dd. Wasser gewaschen.

Zur Anfärbung der Zellkerne wurden die Zellen in einem letzten Schritt für 2 Minuten mit Hämalaun nach Mayer inkubiert. Anschließend folgte das Bläuen der Färbung für 5 Minuten unter fließendem Wasser und die Trocknung der Objektträger.

Die Auswertung der Färbung erfolgte bei 400facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop (Zeiss) mit angeschlossenem Dokumentationssystem.

2.5.3 Isolierung der Gesamt-RNA und cDNA-Synthese

Zur Gewinnung der Gesamt-RNA wurden die Zellen nach 24 h Inkubation mit Palmitinsäure gemäß dem Protokoll des High Pure RNA Isolation Kit® (Roche) geerntet.

Nach Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen mit 2 ml kalten PBS wurde den Zellen 400 µl Lysis-Puffer hinzugefügt. Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Oberfläche entfernt und in ein steriles Eppendorf Reaktionsgefäß, welches 200 µl PBS enthielt, überführt und für 15 Sekunden gevortext.
Anschließend wurde die gesamte Probe in ein High Pure Filter Tube überführt und für 15 Sekunden bei 8,000 x g zentrifugiert. Die Inkubation der Probe mit der aufgebrachten DNase (10 µl DNase in 90 µl DNase-Inkubations-Lösung) erfolgte für 15 Minuten bei Raumtemperatur.
Im Anschluss daran wurde der Filter mit 500 µl Waschpuffer I und 500 µl Waschpuffer II gewaschen und jeweils für 15 Sekunden bei 8 000 x g zentrifugiert. Ein letzter Waschschritt mit 200 µl Waschpuffer II erfolgte bei 13 000 x g für 2 Minuten. Schließlich wurde die RNA mittels 50 µl Elutions-Puffer in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 8 000 x g für 1 Minute eluiert.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte durch Messung bei 260 nm im UV-Photometer. Dazu wurden 4 µl Probe in 300 µl H_2O verdünnt. Zur Reinheitsbestimmung wurde der Quotient der Absorptionen bei 260/280 nm ermittelt.

Dem cDNA-Master-Mix I wurde 2 µg RNA hinzugefügt und das Volumen mit sterilen dd. H_2O auf 14 µl aufgefüllt. Danach wurde die gesamte Probe für 5 min bei 65 °C inkubiert und darauf für 1 Minute auf Eis gekühlt. Anschließend wurde der Probe der cDNA-Master-Mix II hinzugefügt.
Die cDNA-Synthese erfolgte für 5 Minuten bei 25 °C, gefolgt von 50 Minuten bei 50 °C und abschließend für 15 Minuten bei 70 °C.

2.5.4 Real-time PCR

Zur Quantifizierung der mRNA Expression der gewählten Gene wurde eine Real-time PCR durchgeführt.
Ein Reaktionsansatz enthielt pro Vertiefung 5 µl SYBR-Mix, 3 µl H_2O, 1 µl cDNA (1:10 verdünnt mit dd. H_2O) und 1 µl Primer-Mix (für 10 µl Primer-Mix wurden jeweils 3 µl Forward-primer (10 pmol) und 3 µl Reverse-primer (10 pmol) gemischt

und mit dd. H_2O auf 10 µl aufgefüllt). Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Primer für Hepcidin, IL-6, STAT3, BMP6, SMAD4, HFE, HJV, TFR1, TFR2, IREG1 und das house-keeping-Gen ß-Actin wurden über Biomers Ulm bezogen. Die Primersequenzen sind in Tabelle 3 enthalten.

Tabelle 3: Primersequenzen (human)

Gen	Forward primer	Reverse primer
Hepcidin	5'-gac ggg aca act tgc aga gc-3'	5'-gcc tct gga aca tgg gca t-3'
IL-6	5'-ctc cac aag cgc ctt cgg tcc-3'	5'-cag ggc tga gat gcc gtc gag-3'
STAT3	5'-tca aga ttg ggc ata tgc gg-3'	5'-tca aga tac ctg ctc tga ag-3'
BMP6	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´
HFE	5'-caa caa gtg cct ttg gt-3'	5'-gcc act tca tgg tga tgt tc-3'
HJV	5'-tct tag ctc cac tcc ttt ctg g-'3	5'-gat aat ttc aac cct gga cta ctg c-'3
TFR2	5'-gat tca ggg tca ggg agg tg-3'	5'-gaa ggg gct gtg att gaa gg-3'
IREG1	5'-ctt cag cct ggc aag tta cat g-3'	5'-ttc tca aag gca ttt gaa agg g-3'
TFR1	5'-tat aga agg ttt ggg ggc tgt g_3'	5'-gag acc cta tga act ttt ccc tag-'3
ß-Aktin	5'-agg atg cag aag gag atc act g-3'	5'-ggg tgt aac gca act aag tca tag-3'

Ein Replikationszyklus enthielt folgende Schritte:

15 Sekunden Denaturierung bei 95°C

60 Sekunden Annealing und Elongation bei 60°C

Vor dem Replikationszyklus wurde die in dem SYBR-Mix enthaltene Hot-Start-Taq-DNA-Polymerase für 10 Minuten bei 95°C aktiviert.

Die quantitative RT-PCR erfolgte durch das 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) und wurde mittels der 7500 Fast System SDS Software ausgewertet.
Es wurden 45 Zyklen durchgeführt. Der jeweils für die spezifische mRNA detektierte Wert wurde auf das ß-Actin-Gen als interne Kontrolle genormt.

2.5.5 Protein-Extraktion und Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Protein-Extraktion für die Western-Blot-Analysen wurden die Zellen nach Kultivierung und Stimulation in T25 Kulturflaschen in einem ersten Schritt mit 3 ml kalten PBS gewaschen. Anschließend wurde 300 µl Lysepuffer hinzugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturflasche gelöst und in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.
In einem nächsten Schritt wurde die DNA mittels einer 1 ml Spritze (Kanüle: Größe 18) auf Eis durch zehnmaliges auf- und abziehen abgeschert. Für die folgende Proteinbestimmung wurde 25 µl der Zellsuspension in ein separates Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Für die Western-Blot-Analyse wurden der restlichen Zellsuspension 75 µl des 5 x Ladepuffers hinzugefügt und durch mehrmaliges auf- und abziehen durch eine 1-ml Spritze gemischt. Danach wurde das Zelllysat für 10 Minuten bei 4° C und 10000 rpm zentrifugiert. Schließlich wurde der die extrahierten Proteine enthaltende Überstand in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

Die Proteinkonzentrationsbestimmung im Zelllysat erfolgte mittels der kolorimetrischen Methode nach Bradford. Hierfür wurde zuerst das *Protein assay* Farbstoff-Konzentrat im Verhältnis 1:5 mit dd. Wasser verdünnt und die BSA Standardlösung mit 0, 2, 4, 8, 16 und 32 µg/ml vorbereitet. Darauf folgend wurden jeweils 2,5 µl einer Probe mit 500 µl der verdünnten Bradford-Lösung gemischt. Für die Konzentrationsbestimmung wurde für jede Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt und jeweils 200 µl einer Probe bzw. der Standardlösung in zwei Vertiefungen einer Mikrotestplatte aufgetragen. Mittels eines *ELISA-Readers* wurden die Extinktionen der Proben gemessen und anhand der durch die Standardlösung erstellten Kurve die Proteinkonzentration der einzelnen Proben

errechnet. Der endgültige Proteinwert ergab sich durch Multiplizieren der errechneten Werte mit dem Verdünnungsfaktor der Proben.

2.5.6 Herstellung des Tricin-SDS-Polyacrylamidgels (16,5%)

Zur Herstellung der Tricin-Gele für die Western-Blot-Analyse wurden die benötigten Substanzen für die einzelnen Gele in den unten beschriebenen Konzentrationen jeweils in einem Reaktionsgefäß gemischt (Tabelle 4). Da die Zugabe von TEMED und APS die Polymerisation des Geles bewirkt, wurden diese Substanzen jeweils erst kurz vor dem Gießen des entsprechenden Geles hinzugefügt.

Die verwendeten Gele bestanden aus drei Schichten (Trenn-, Spacer-, und Sammelgel). Zuerst wurde das Trenngel in die Gelkammer gegossen. Darüber folgte das Spacergel, welches mit Isopropanol zum Schutz vor Austrocknung überschichtet wurde. Nach 30 Minuten Polymerisationszeit wurde das Isopropanol abgegossen, das Sammelgel in die Kammer gegossen und ein Kamm zur Formung der Probentaschen eingebracht. Die Gele wurden in befeuchtetem Zellulosepapier bei 4° C über 24 Stunden auspolymerisiert.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Tricin-SDS-Polyacrylamidgels

	Trenngel	Spacergel	Sammelgel
H_20	390 µl	410 µl	1560 µl
Gelpuffer	2300 µl	330 µl	600 µl
Glycerol	1,5 g	-	-
T40	2850 µl (C6)	250 µl (C3)	240 µl (C3)
APS	25 µl	5 µl	12 µl
TEMED	3 µl	1 µl	2,5 µl

2.5.7 Western-Blot

Zur Bestimmung von Hepcidin auf Proteinebene wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt.

Beim Western-Blot werden die zu untersuchenden Proben mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran (FluoroTrans® PVDF-Membran, Pall Corporation USA) übertragen und durch Immundetektion untersucht.

Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte im PhoreseTank, der innen mit Kathodenpuffer und außen mit Anodenpuffer gefüllt wurde. Nach dem Spülen der Gel-Taschen mit Kathodenpuffer und Denaturierung der Proben bei 95 °C für 5 Minuten, wurden die Taschen entweder mit 7 µl Marker oder 20 µg Probe (mit Lysepuffer auf ein Volumen von 12 µl gebracht) pro Spur geladen. Die Gelelektrophorese fand bei Raumtemperatur für 1 Stunde bei 70 V, gefolgt von 1,5 Stunden bei 100 V statt.

Das Blotten erfolgte im Tank-Blot-Verfahren. Nach dem die Membran für 3-5 Sekunden in Methanol aktiviert und für 10 min in Transferpuffer äquilibriert wurde, wurde der Blot luftblasenfrei zusammengesetzt, wobei die PVDF-Membran zur Kathode und das Gel zur Anode gerichtet war. Der Transfer fand bei 4°C für 70 Minuten bei einer konstanten Spannung von 75 V statt.

Nach dem Proteintransfer aus den Elektrophoresegelen auf die Membran wurde diese mit TBST gewaschen. Darauf folgte das Blocken unspezifischer Proteinbindungsstellen für 1 Stunde mit 3 % BSA bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran wieder mit TBST gewaschen und dann bei 4 °C mit dem ersten Antikörper EG(5)-HepN/2 in einer 1:5000 Verdünnung bei leichtem Schütteln über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Membranen gewaschen und mit dem Peroxidase-gekoppelten Anti-rabbit IgG-HRP Antikörper (Dianova), der zuvor 1:10000 in TBST verdünnt wurde, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach erneutem sorgfältigen Waschen mit TBST wurde, zwecks Aktivierung des Peroxidase-gekoppelten-Enzyms, die Membran für 2 min mit ECL-Luminolreagenz (je Enhancer und Developer im Verhältnis 1:1) überschichtet.

Anschließend wurde auf die Membran ein Röntgenfilm Cronex 5 (Agfa-Gevaert Gruppe, Belgien) gelegt. Um das bestmögliche Verhältnis von Sensitivität und Auflösung / Hintergrund zu erreichen, wurden Filme mit unterschiedlichen Zeiten

(30 sec; 1 min; 1,5 min und 2 min) belichtet. Diese wurden anschließend mit üblichen phototechnischen Methoden entwickelt.

2.5.8 Immunfluoreszenz

Zur Untersuchung der Lokalisation des Hepcidins in-situ wurden Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt.
HepG2 Zellen wurden auf Objektträgern ausgesät und darauf zwei Tage kultiviert. Anschließend wurden die einzelnen Objektträger in jeweils eine Petrischale gelegt und mit verschieden Konzentrationen Palmitinsäure oder ohne Palmitinsäure in 30 ml Komplett-Medium für 24h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Objektträger 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-X100. Nach wiederholtem Waschen wurden unspezifische Proteinbindungsstellen über 30 Minuten mit 10% FCS geblockt und 200 µl des Erstantikörpers EG(5)-HepN/2, der in PBS 1:1000 verdünnt wurde, auf den Objektträger pipettiert. Die Inkubation des Erstantikörpers wurde über Nacht in einer Feuchtkammer durchgeführt. Am darauffolgenden Tag erfolgten erneut drei 5-minütige Waschgänge in PBS sowie die Inkubation des dem Erstantikörper entsprechenden fluoreszierenden Zweitantikörpers Cy^{TM}3-α-rabbit IgG (Jackson Immuno-Research) bei Dunkelheit und Raumtemperatur. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Schnitte, zur Konservierung mit Fluorsafe und Deckgläsern versehen. Nach zweistündiger Trocknung erfolgte die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop.

2.5.9 Eisenmessung

Um die Eisenaufnahme der Zellen nach Stimulation mit oder ohne Palmitinsäure zu bestimmen, wurden Absorptionsmessungen bei 535 nm durchgeführt. Für die Messungen wurden die Zellen in T25 Kulturflaschen kultiviert und entweder mit 1 mM Palmitinsäure und 20 µg/ml Eisenammoniumcitrat (FAC) oder mit BSA (in der Konzentration entsprechend der Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure) und 20 µg/ml FAC für 24 h stimuliert.

Die Zellen wurden wie oben beschrieben geerntet und pro Probe wurde 2,5 µl Zellsuspension zwecks Proteinbestimmung nach Bradford in ein separates Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Für die Eisenmessung wurde der restlichen Zellsuspension 1 ml H_2O hinzugefügt und das Gemisch über Nacht bei 110°C getrocknet. Am nächsten Tag wurde je Probe 1 ml Zitronensäure (100 mM, pH=2.0) hinzugefügt und erneut für 4 h bei 60° C im Wasserbad inkubiert.

Anschließend wurden 0,5 ml der Probe mit 0,5 ml frischer Zitronensäure gemischt. 200 µl des Gemisches wurden nun 10 µl Ascorbinsäure (100 mM) und 20µl BPS (5 mM) hinzugefügt und im Dunkeln für weitere 45 Minuten inkubiert.

Schließlich wurde bei 535 nm die Absorption gemessen und der Wert mit dem Proteingehalt der einzelnen Proben verrechnet. Für die Standard-Lösungen wurde Eisen(III)-Nitrat-Nonahydrat verwendet.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels gepaarten T-Tests mit zweiseitiger Verteilung. Für die Testung der Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnoff-Test angewendet. Alle Werte sind als Mittelwerte plus Mittelwertsfehler angegeben. Für nicht Normalverteilte Daten wurde der Wilcoxon-Test (zweiseitig) durchgeführt (für die quantitative Bestimmung von Hepcidin nach Stimulation mit 0,3 mM und 0,5 mM Palmitinsäure und für die quantitative Bestimmung von STAT3 nach Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure). Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

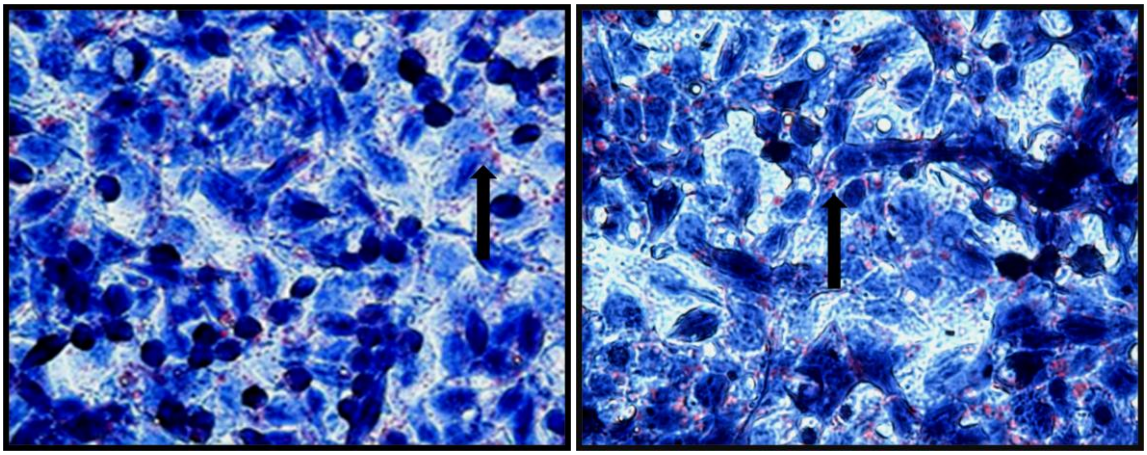
3 Ergebnisse

3.1 Etablierung des NAFLD-Zellmodelles

Um zu überprüfen, ob die Inkubation von HepG2- und Hep3B-Zellen mit Palmitinsäure geeignete Zellmodelle der NAFLD darstellen, wurde zum Nachweis der Fettakkumulation in den Leberzellen eine Öl-Rot-Färbung durchgeführt.

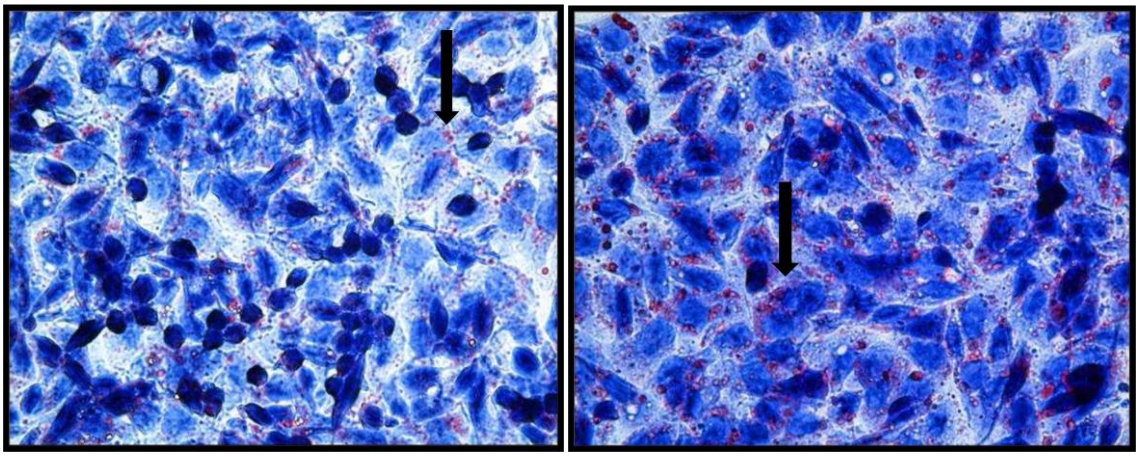
Die Öl-Rot-Färbung der HepG2-Zellen zeigte, dass die Stimulation mit Palmitinsäure in den Zellen zu einer proportionalen Zunahme der Menge und Größe der Fettvakuolen führte (Abb.6B). Die stärkste Ausprägung der Fetteinlagerungen fand sich nach Stimulation mit 1mM Palmitinsäure. Ab einer Konzentration von 0,3 mM Palmitinsäure waren erstmals deutliche Veränderungen in der Fetteinlagerung zu beobachten. Die Kontrollstimulation mit der höchsten verwendeten Konzentration an BSA (entspricht der Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure) zeigte dahingegen keine Veränderungen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb.6A). Die durchgeführte Öl-Rot-Färbung mit Hep3B-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen Palmitinsäure ergab dieselbe Proportionalität zur Konzentration von Fett wie in den HepG2-Zellen (Daten nicht gezeigt).

A

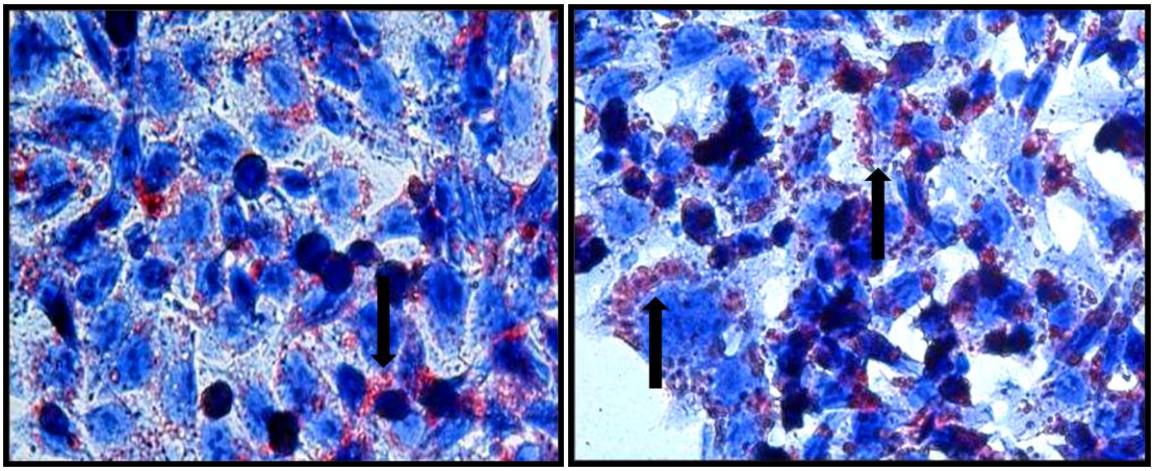


Unstimuliert **nur BSA**

B



Unstimuliert **0,3 mM Palmitinsäure**



0,5 mM Palmitinsäure **1 mM Palmitinsäure**

Abb.6: A: Öl-Rot-Färbung von HepG2-Zellen nach Stimulation mit Bovines Serumalbumin (BSA) (in Konzentration äquivalent zur Stimulation mit 1 Millimolar Palmitinsäure; 125 µl/ml) und zur Kontrolle nur mit Medium. B: Öl-Rot-Färbung von HepG2-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen Palmitinsäure (Pfeile zeigen auf Fetteinlagerungen). Die Versuche wurden viermal durchgeführt (400-fache Vergrößerung).

3.2 Effekt der Palmitinsäurestimulation auf die Hepcidin-Expression der Leberzelllinien

3.2.1 Analyse von Hepcidin auf RNA-Ebene mittels RT-PCR

Um die Wirkung von Palmitinsäure auf die RNA-Expression der Leberzelllinien HepG2 und Hep3B zu analysieren, wurden RT-PCR Untersuchungen durchgeführt.

In HepG2-Zellen zeigte sich bei Stimulation mit steigenden Konzentrationen Palmitinsäure eine proportionale Zunahme der Hepcidin mRNA, die ab einer Konzentration von 0,3 mM signifikante Unterschiede aufwies. Die Stimulation mit 0,1 mM Palmitinsäure führte zu einer Steigerung der relativen Expression von Hepcidin zu ß-Aktin um das 1,16-fache ($p=0,46$) gegenüber der Kontrolle (Abb.7). Die Stimulation mit 0,3 mM und 0,5 mM Palmitinsäure führten zu einer Steigerung der relativen Hepcidin Expression bezogen auf ß-Aktin um das 1,8-fache ($p<0,05$) und um das 2,15-fache ($p<0,05$) (Abb.7).

Die Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure führte hingegen zu einer signifikanten Erniedrigung der relativen Expression von Hepcidin zu ß-Aktin (Abb.7). In diesen Proben war die Hepcidin-Expression gegenüber der unstimulierten Kontrolle um 60 % niedriger ($p=0,002$).

Dahingegen führte die Kontrollstimulation der Zellen für 24 h selbst nach Zugabe der höchsten Konzentration an verwendeten BSA (entsprechend der Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure) zu keinem signifikanten Unterschied in der Expression verglichen mit der unstimulierten Kontrolle (Abb.7). Die relative Expression von Hepcidin zu ß-Aktin betrug in den mit BSA stimulierten Zellen das 1,14-fache der Hepcidin-Expression in der unstimulierten Kontrolle.

Um den Abfall von Hepcidin bei 1 mM Palmitinsäure zu bestätigen, wurde die Leberzelllinie Hep3B ebenfalls mit Palmitinsäure in dieser Konzentration stimuliert. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Abfall der relativen Expression von Hepcidin zu ß-Aktin gegenüber der Kontrolle (Abb.8). Die relative Hepcidin-Expression war hier sogar um 80 % erniedrigt ($p=0,009$).

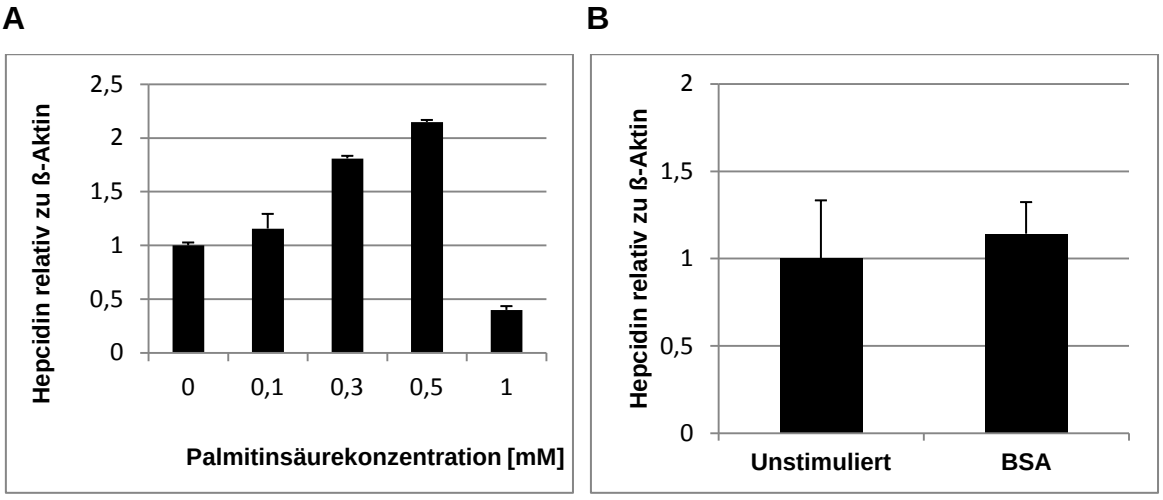


Abb.7: A: Mittlere relative Expression von Hepcidin in HepG2-Zellen nach 24 Stunden Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen Palmitinsäure (n=9 für 0 Millimolar, n=2 für 0,1; 0,3; 0,5 Millimolar, n=5 für 1 Millimolar). B: Mittlere relative Expression von Hepcidin in HepG2-Zellen nach 24 Stunden Stimulation mit Bovines Serumalbumin (BSA) (in Konzentration äquivalent zur Stimulation mit 1 Millimolar Palmitinsäure) verglichen mit unstimulierten Zellen (n=4).

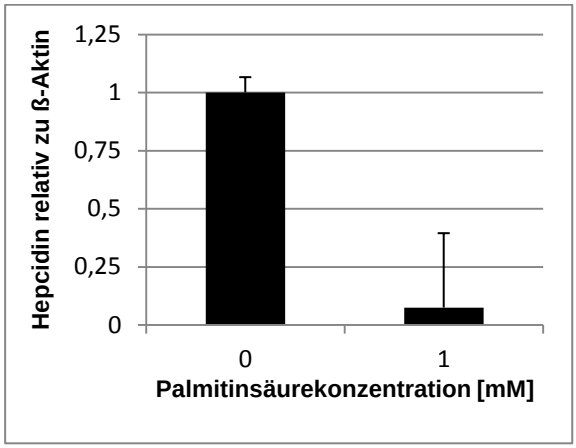


Abb.8: Mittlere relative Expression von Hepcidin in Hep3B-Zellen nach 24 Stunden Stimulation mit 1 Millimolar Palmitinsäure (n=2).

3.2.2 Untersuchung von Hepcidin auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analysen

Die durchgeführten Western-Blot-Analysen mit dem Hepcidin-spezifischen N-terminalen Antikörper EG(5)-HepN/2 identifizierten eine immunreaktive Bande

bei 8 kDa in dem Zell-Lysat der humanen Hepatoma-Zellen HepG2. Die Größe entspricht der berechneten molekularen Masse, die aus der cDNA-Sequenz des Hepcidin Pro-Hormons abgeleitet werden kann. Es wurden jeweils 20 µg Protein pro Probe aufgetragen. Nach Stimulation mit 0,4 mM Palmitinsäure zeigte sich eine mit der Kontrolle vergleichbare Intensität der Bande. Die Stimulation der Zellen mit 1 mM Palmitinsäure führte im Gegensatz dazu zu einer deutlichen Abschwächung der Bande gegenüber der unstimulierten Kontrolle (Abb.9).

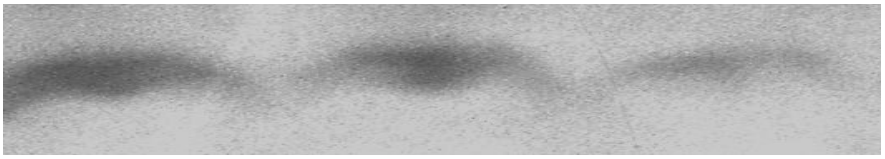
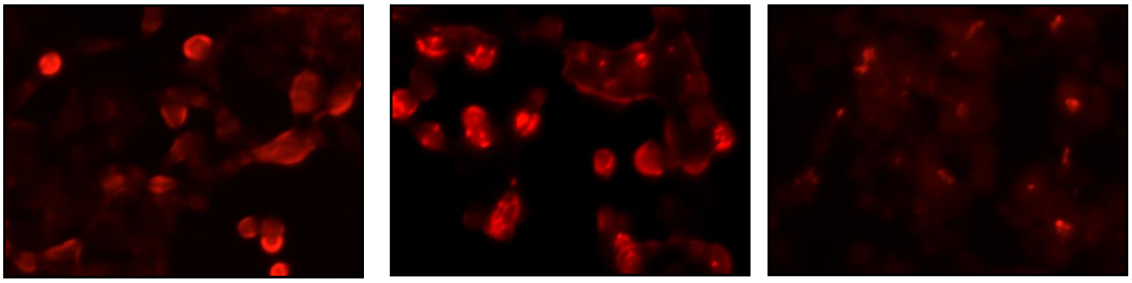


Abb.9: Western-Blot-Analyse von HepG2-Zellen nach 24 Stunden Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen Palmitinsäure. Der Antikörper EG(5)-HepN erkennt das Prohepcidin bei 8 Kilodalton. Es zeigt sich ein Abfall der Hepcidin-Konzentration nach Stimulation mit 1 Millimolar Palmitinsäure (n=3).

3.2.3 Untersuchung von Hepcidin auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenz-Analysen

In den Immunfluoreszenz-Analysen sollten die Ergebnisse der Palmitinsäure-Stimulation auf Proteinebene bestätigt werden. In den unstimulierten Zellen konnte Hepcidin mit Hilfe des spezifischen Antikörpers EG(5)-HepN/2 im Zytoplasma und an der Membran der Zellen nachgewiesen werden. Die Stimulation mit 0,4 mM Palmitinsäure zeigte eine deutliche Steigerung des Fluoreszenzsignales und zudem eine vermehrte Detektion von Hepcidin im Zytoplasma.
Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von 1 mM Palmitinsäure zu einer deutlichen Minderung der Intensität im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (Abb.10).



Unstimuliert **0,4 mM Palmitinsäure** **1 mM Palmitinsäure**

Abb.10: Immunfluoreszenz-Analysen von HepG2-Zellen nach 24 Stunden Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen Palmitinsäure. Der Antikörper ist gegen den N-Terminus des Pro-Hepcidin-Moleküls gerichtet (n=3) (200-fache Vergrößerung).

3.3 Analyse der Postexpositionsstimulation mit Fe-NTA und IL-6

Um zu untersuchen, in wieweit Hepcidin in den mit Fett stimulierten Zellen noch auf eine externe Zugabe von Hepcidin-stimulierenden Mediatoren reagiert, wurde eine Postexpositionsstimulation mit IL-6 und Eisen durchgeführt.

Die quantitative RT-PCR-Analyse der Postexpositionsstimulation von HepG2 Zellen mit IL-6 und Eisen nach 24 Stunden Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure ergab keine signifikante Änderung der relativen Expression von Hepcidin zu ß-Aktin ($p>0,05$). Die Zugabe von IL-6 führte zwar zu einer Steigerung der relativen Expression gegenüber den nur mit Palmitinsäure stimulierten Zellen, war aber immer noch um 50% niedriger als die Hepcidin-Expression in der weder mit Palmitinsäure noch mit IL-6 stimulierten Kontrolle (Abb.11). Die Zugabe von Eisen nach Palmitinsäure Stimulation führte sogar zu einer Erniedrigung der relativen Hepcidin Expression um 22 % (Abb.11).

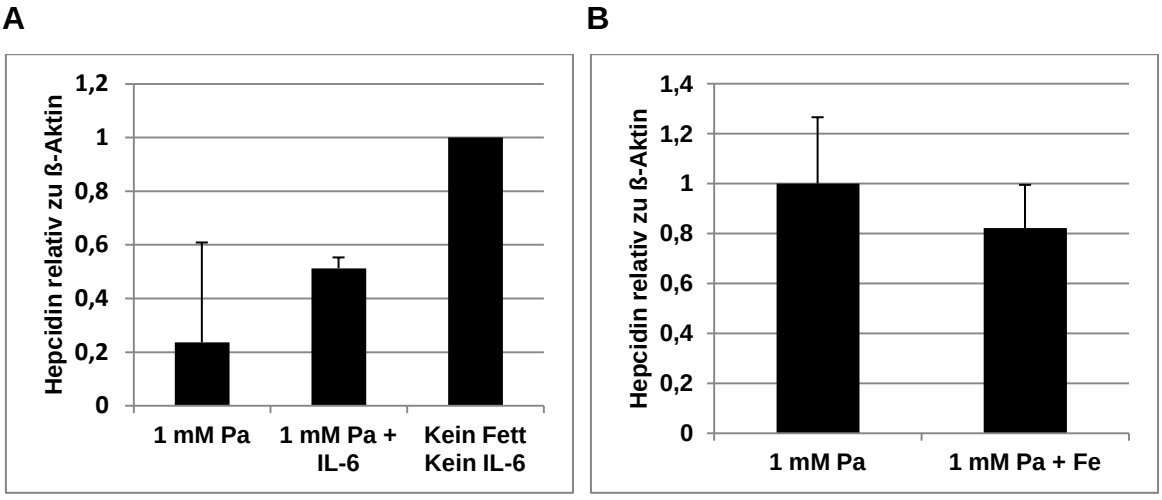


Abb.11: Mittlere relative Expression von Hepcidin in HepG2-Zellen nach 24 Stunden Stimulation mit 1 Millimolar Palmitinsäure und darauf folgender (A) vierstündiger Inkubation mit Interleukin 6 (n=2), (B) zweiundsiebzigstündiger Inkubation mit nicht-Transferrin-gebundenem Eisen (Fe-NTA) (n=2).

3.4 Effekt der Palmitinsäurestimulation auf die Proteine der Hepcidin-regulierenden-Signalkaskaden

3.4.1 Analyse der IL-6-Signalkaskade

Um die Ursache der Palmitinsäure-Wirkung auf die Hepcidin-Expression zu ermitteln, wurde zuerst der zentrale Hepcidin-Stimulator IL-6 analysiert.

Die Stimulation mit steigender Konzentration Palmitinsäure führte zu einem proportionalen Anstieg der relativen IL-6 Expression, die ab einer Konzentration von 0,5 mM Palmitinsäure signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle aufwies.

In der quantitativen RT-PCR-Analyse der Zellen nach 24 h Stimulation mit 0,3 mM Palmitinsäure zeigte sich eine Erhöhung der relativen Expression von IL-6 zu ß-Aktin um das 2,4-fache ($p>0,05$), die Stimulation der Zellen mit 0,5 mM Palmitinsäure führte zu einer Erhöhung der IL-6 Expression um das 3,6-fache ($p<0,05$). Die höchste Expression von IL-6 wurde nach Stimulation der Zellen mit 1 mM Palmitinsäure detektiert, wobei die Expression gegenüber der Kontrolle um das 23-fache ($p<0,05$) erhöht war (Abb.12).

Um die Diskrepanz der Down-Regulation von Hepcidin bei Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure trotz stark erhöhtem IL-6 zu ergründen, wurde STAT3, ein essentielles Protein der IL-6-Signalkaskade, analysiert.

Die Analyse der Expression von STAT3 relative zu ß-Aktin zeigte ähnlich wie IL-6 bei Zugabe von 1 mM Palmitinsäure eine drastische Erhöhung der Expression um das 43-fache ($p<0,05$) gegenüber der Kontrolle (Abb.12).

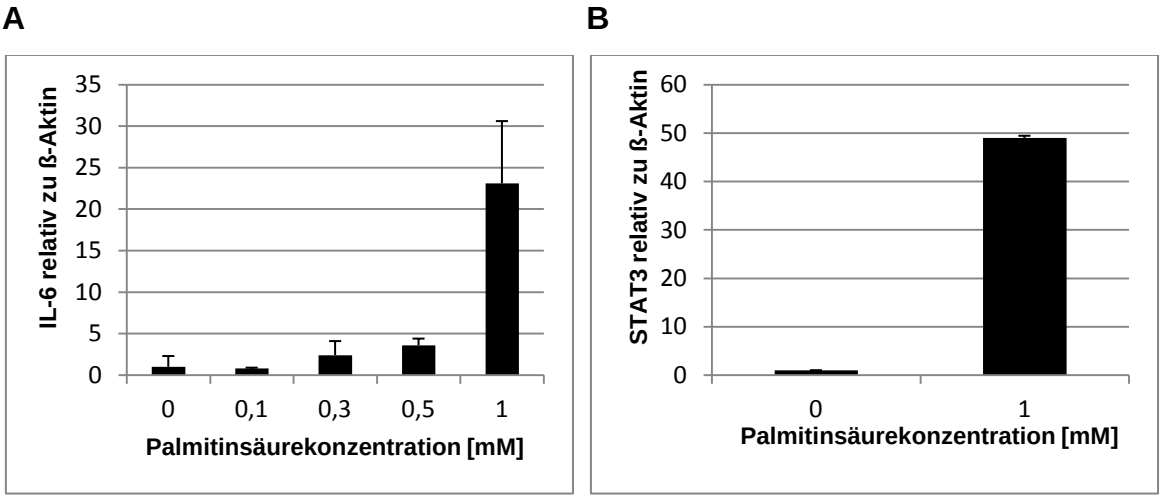


Abb.12: A: Mittlere relative Expression von Interleukin 6 in HepG2-Zellen nach 24 Stunden Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen Palmitinsäure (n=4). B: Mittlere relative Expression von Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) nach 24 Stunden Stimulation mit 1 Millimolar Palmitinsäure (n=3 und n=5).

3.4.2 Analyse des BMP6-Signalweges

Um die beobachtete Down-Regulation des Hepcidin-Levels bei Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure weiter aufzuklären, wurden in nachfolgenden Experimenten weitere Hepcidin-stimulierende-Signalkaskaden mittels RT-PCR auf RNA-Ebene untersucht. Als Erstes wurde die Expression des zweiten zentralen Hepcidin-Stimulators BMP6 sowie der Proteine seiner Signalkaskade SMAD4 und HJV erforscht.

Die quantitative Analyse der mRNA Expression von BMP6 in HepG2 Zellen nach Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure zeigte eine eindeutige Steigerung der Expression gegenüber der unstimulierten Kontrolle (Abb.13). Die relative Expression von BMP6 zu ß-Aktin war dabei um das 14-fache erhöht ($p=0,008$).

Auch die Expression von SMAD4 und HJV waren nach Zugabe von Palmitinsäure signifikant erhöht. Die relative Expression von SMAD4 zu ß-Aktin war um das 1,44-fache (p=0,02), die von HJV sogar um das 1000-fache (p=0,045) gegenüber der Kontrolle erhöht (Abb.13).

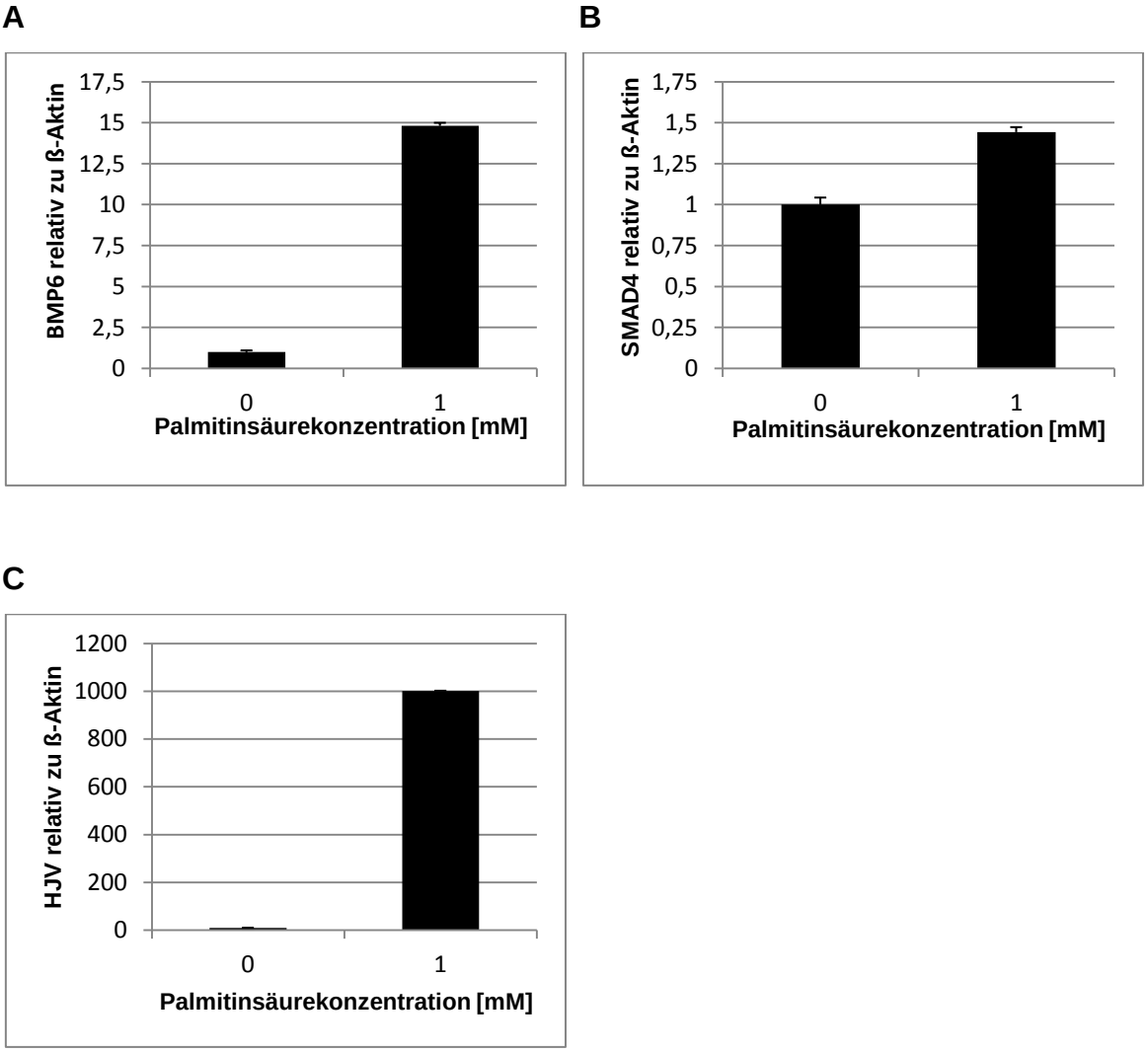


Abb.13: Mittlere relative Expression in HepG2-Zellen nach 24 Stunden Stimulation mit 1 Millimolar Palmitinsäure. A: Expression von Bone-Morphogenetic-Protein 6 (BMP6) (n=4). B: Expression von mothers against decapentaplegic homolog 4 (SMAD4) (n=3). C: Expression von Hämojuvelin (HJV) (n=3).

3.4.3 Analyse des TFR2/HFE-Signalweges

Eine weitere Signalkaskade in der Hepcidin-Stimulation ist der TFR2/HFE-Signalweg. Um diesen zu untersuchen, wurde die relative Expression von TFR2 und HFE unter 1 mM Palmitinsäure-Stimulation ermittelt.

Die quantitative RT-PCR-Analyse ergab, dass dieser Signalweg durch die Palmitinsäure-Stimulation nur gering beeinflusst ist. Die relative Expression von TFR2 war gegenüber den Kontrollzellen um das 1,92-fache erhöht, aber die Unterschiede waren nicht signifikant (p>0,05) (Abb.14). Die Stimulation mit Palmitinsäure übte auch keinen Einfluss auf die Expression von HFE aus. Sie betrug das 1,05-fache (p=0,96) der Expression in der unstimulierten Kontrolle (Abb.14).

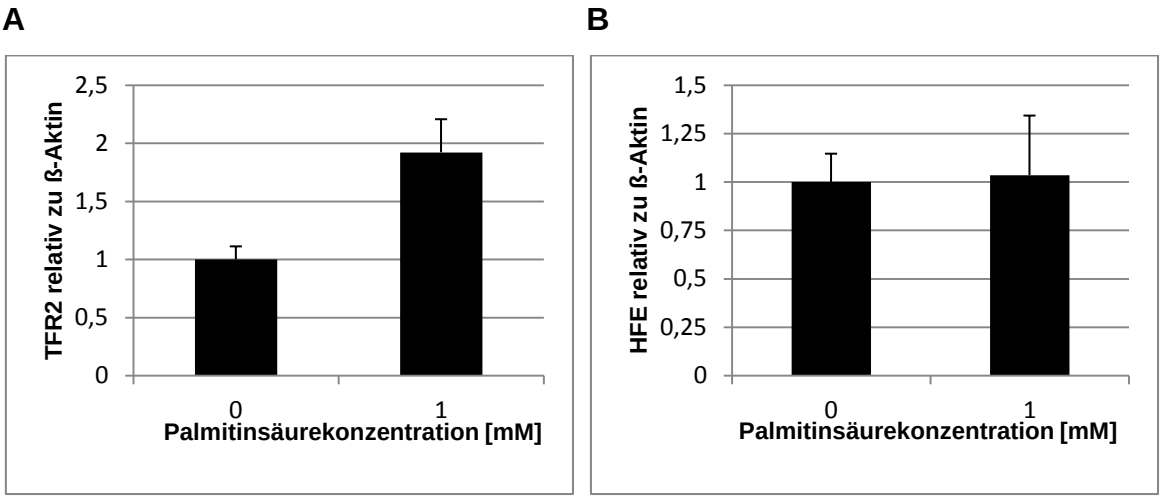


Abb.14: Mittlere relative Expression in HepG2-Zellen nach 24 Stunden Stimulation mit 1 Millimolar Palmitinsäure. A: Expression von Transferrinrezeptor 2 (TFR2) (n=5). B: Expression vom Humanen-Hämochromatose-Protein (HFE) (n=4).

3.5 Effekt der Palmitinsäurestimulation auf den Eisenstoffwechsel der HepG2-Zellen

3.5.1 Effekt der Palmitinsäure auf die Proteine des Eisenstoffwechsels

Um zu überprüfen, ob die Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure auch zu Auswirkungen in dem Eisenstoffwechsel führt, wurde die Expression der Eisentransporter IREG1 und TFR1 ermittelt.

Die Analyse mittels quantitativer RT-PCR zeigte für IREG1 eine um das 4,4-fach erhöhte Expression in den mit 1 mM Palmitinsäure stimulierten Zellen gegenüber der unstimulierten Kontrolle (p=0,013) (Abb.15). Die Expression von TFR1 zeigte hingegen einen entgegengesetzten Verlauf. So führte die Stimulation der Zellen mit 1 mM Palmitinsäure zu einer verminderten relativen Expression von TFR1, die um 54 % (p=0,01) gegenüber den Kontrollzellen erniedrigt war (Abb.15).

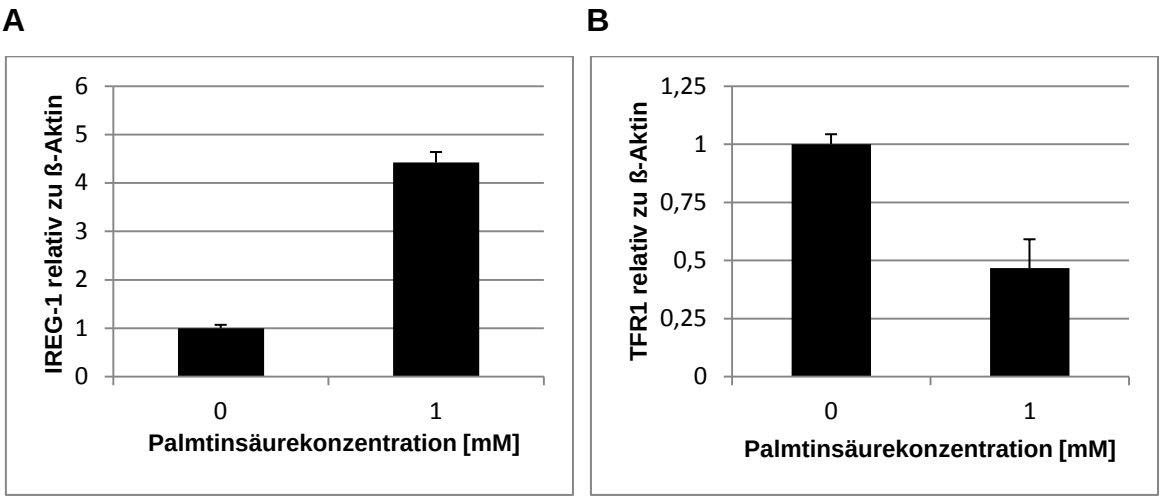


Abb.15: Mittlere relative Expression in HepG2-Zellen nach 24 Stunden Stimulation mit 1 Millimolar Palmitinsäure. A: Expression von Ferroportin (n=3). B: Expression von Transferrinrezeptor 1 (TFR1) (n=3).

3.5.2 Effekt der Palmitinsäure auf die Eisenaufnahme der HepG2-Zellen

Um zu untersuchen ob die Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure zu Änderungen der Eisenaufnahme der Zelle führt, wurde der Eisengehalt der HepG2-Zellen nach Stimulation mit und ohne Fett gemessen.

In den mit 1 mM Palmitinsäure und Eisen stimulierten Zellen zeigte sich ein um das 3,81-fache erhöhte Eisengehalt gegenüber den nur mit BSA (in der Konzentration entsprechend der Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure) und Eisen stimulierten Kontrollen (p=0,0007) (Abb.16).

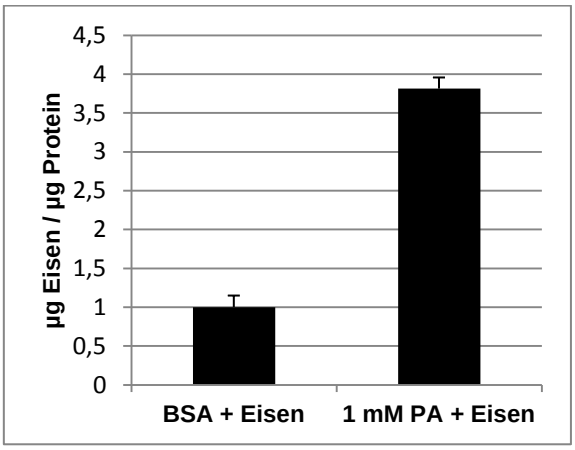


Abb.16: Mittlere Eisengehalt bezogen auf den Proteingehalt in HepG2-Zellen nach 24 Stunden Stimulation mit 1 Millimolar Palmitinsäure und Eisen verglichen mit Bovines Serumalbumin (BSA) und Eisen stimulierten Kontrollen (n=4).

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der Einfluss von gesättigter Fettsäure auf den zentralen Eisenregulator Hepcidin, seine stimulierenden Mediatoren (IL-6, BMP6), die Proteine ihrer Signalkaskaden (HJV, HFE, TFR2, STAT3, SMAD4), die Proteine des Eisenstoffwechsels (IREG-1, TFR1), sowie den Eisengehalt in einem *in-vitro* Modell der NAFLD untersucht.

Für die Entwicklung eines *in-vitro* Modelles der NAFLD wurden HepG2- und Hep3B-Zellen mit Palmitinsäure stimuliert, um die Zellen einem übermäßigen Angebot an freien Fettsäuren auszusetzten. Da die NAFLD als Akkumulation von Fett in den Hepatozyten definiert ist (Neuschwander-Tetri und Caldwell 2003, Musso et al. 2003, De Gottardi et al. 2007, Byrne 2010), wurde mittels Öl-Rot-Färbung histologisch kontrolliert, ob die Zellen die angebotenen freien Fettsäuren auch einlagern. Die histologische Untersuchung der Zellen ergab, dass man schon ab einer Konzentration von 0,3 mM Palmitinsäure eine deutliche Zunahme der Fetteinlagerungen in den Zellen beobachten konnte und die Fetteinlagerungen proportional zu der Konzentration an Palmitinsäure in den Zellen anstieg (Abb.6).

Das für die Entwicklung des NAFLD *in-vitro* Modelles die gesättigte Fettsäure Palmitinsäure verwendet wurde, hat mehrere Gründe. Auf der einen Seite sind die gesättigten Fettsäuren der Hauptbestandteil von tierischen Fetten, wohingegen in Fisch und Pflanzenöl hauptsächlich ungesättigte Fettsäuren vorkommen. Vor allem die vermehrte Aufnahme von tierischen Fetten und somit gesättigten Fettsäuren führt zur Erhöhung des Plasma- und Gesamt Cholesterins sowie der Triglyceride (Spady and Dietschy 1985, Mensink et al. 2003, Berglund et al 2007, Siri-Tarino et al.2010) und ist somit wahrscheinlich an der NAFLD-Pathogenese beteiligt (Sullivan 2010, Yki-Järvinen 2010). Darüber hinaus konnten Studien zeigen, dass eine Reduktion der mit der Nahrung aufgenommen gesättigten Fettsäuren und ein Ersatz durch ungesättigte Fettsäuren die Triglyceride und das Cholesterin signifikant senken (Mensing und Katan 1992, Ginsberg et al. 1998, Mensing et al 2003, Siri-Tarino et al. 2010).

Auf der anderen Seite ist Palmitinsäure eine der am häufigsten vorkommenden gesättigten Fettsäuren in tierischen und pflanzlichen Fetten und Ölen. Desweiteren stellt Palmitinsäure im menschlichen Organismus ein Hauptedukt der

Fettsäuresynthese dar, aus dem die meisten länger gesättigten und ungesättigten Fettsäuren synthetisiert werden (Löffler 2003, Folkerts 2005, Horn 2009).
Als Dauer der Stimulation wurde ein Zeitraum von vierundzwanzig Stunden gewählt, um dem Fett genügend Wirkdauer zu geben und um Veränderungen auf der RNA- sowie Protein-Ebene in den Zellen wahrnehmen zu können. Die Konzentration von 1 mM Fettsäure wurde schon von anderen Arbeitsgruppen mit einem ähnlichen Versuchsaufbau als die Konzentration angesehen, welche den Einstrom von Fettsäuren in die Leber und die intrazelluläre Lipidakkumulation bei Steatose-Patienten am besten simuliert (Gómez-Lechón *et al*. 2007, Moya *et al*. 2010). Als minimale Konzentration wurde in dieser Arbeit 0,1 mM Palmitinsäure gewählt, da ab dieser Konzentration erstmals eine vermehrte Lipidablagerung in den Zellen mittels Öl-Rot-Färbung beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Fettsäuren werden physiologisch im Serum an Albumin gebunden transportiert und so den Zellen präsentiert. Um dies zu berücksichtigen, wurde die Palmitinsäure vor Stimulation der Zellen an 10 % BSA komplexiert. Dabei wurde das molare Verhältnis von Fettsäure zu Albumin 5:1 gewählt, im Gegensatz zu dem physiologischen Verhältnis im Serum von 2:1 (Joshi-Barve et al. 2007). Dadurch sollte der Zustand einer Fettüberladung, wie sie bei Adipositas und Insulinresistenz vorkommt, simuliert werden. Unter diesen Umständen steigt das molare Verhältnis von Fettsäure zu Albumin im Serum bis zu 7,5:1 an (Listenberger et al. 2001, Joshi-Barve et al. 2007).

Da das verwendete BSA nicht zu 100 % frei von Fettsäure war und um einen eigenen Effekt des BSA auszuschließen, wurde bei den durchgeführten Versuchen jeweils eine Kontrolle nur mit BSA stimuliert. Dabei konnte kein Unterschied zwischen den unstimulierten und den nur mit BSA stimulierten Kontrollen gefunden werden (Abb.6).

Neben der HepG2-Zelllinie wurde auch die Hep3B-Zelllinie mit Palmitinsäure stimuliert, um die Wirkung von Fett auf Hepcidin in einer zweiten Leberzelllinie nachzuweisen und somit die Ergebnisse zu bestätigen. Auch in den Hep3B-Zellen konnte in der Öl-Rot-Färbung eine zunehmende Einlagerung von Fett in den

Zellen proportional zu der Konzentration an Palmitinsäure gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).
Nach der Etablierung des NALFD *in-vitro* Modelles wurden die Zellen auf RNA- sowie Protein-Ebene analysiert. In der durchgeführten quantitativen RT-PCR zeigte sich in den HepG2-Zellen bis zu einer Konzentration von 0,5 mM Palmitinsäure eine zur Fettsäurekonzentration proportionale Hochregulation der Hepcidin-mRNA (Abb.7). Die Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure führte hingegen zu einem signifikanten Abfall des Hepcidin-mRNA-Levels in HepG2 sowie Hep3B Zellen (Abb.7 und Abb.8).
Diese Ergebnisse konnten auf Protein-Ebene mittels Western-Blot- und Immunfluoreszenz-Analysen bestätigt werden (Abb.9 und Abb.10). Auch hier wurde bei niedrigeren Konzentrationen Palmitinsäure vor allem in der Immunfluoreszenz zuerst ein erhöhtes Hepcidin-Level detektiert. Bei Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure, kam es wie auf RNA-Ebene in beiden Analysen zu einem deutlichen Abfall.

Die anfängliche Hochregulation von Hepcidin in den HepG2-Zellen bei Stimulation mit 0,3 mM und 0,5 mM Palmitinsäure lässt sich auf den immunmodulierenden Effekt von Palmitinsäure zurückführen. Die Hepcidin-Expression kann *in-vivo* wie auch *in-vitro* durch Eisen und einige Entzündungsmediatoren induziert werden (Fein et al. 2007, Lee and Beutler 2009). Der wichtigste Entzündungsmediator ist IL-6 (Nemeth et al. 2003, Nemeth und Rivera et al. 2004, Lee et al.2005). Der Effekt von Palmitinsäure auf das Immunsystem konnte von mehreren Arbeitsgruppen in verschiedenen Zellreihen gezeigt werde. So fanden Swati et al. 2007 heraus, dass die Stimulation von HepG2-Zellen mit Palmitinsäure in den oben genannten Konzentrationen zu einer signifikanten Aktivitätssteigerung des nuklearen Faktor kappaB (Nf-kB) führte. Nf-kB stimuliert seinerseits die Expression von IL-6 (Joshi-Barve et al. 2007).
Die Stimulation von Adipozyten mit Palmitinsäure führte genau wie in HepG2-Zellen zu Aktivierung von Nf-kB und dadurch zur Induktion des zentralen Hepcidin-Stimulators IL-6 (Ajuwon und Spurlock 2005). Neben IL-6 wurde ein weiteres zentrales Zytokin, TNF-α induziert (Ajuwon und Spurlock 2005), welches neben seiner bedeutenden Rolle bei Entzündungen ein wichtiger Bestandteil der

Pathogenese der NASH zu sein scheint (Angulo 2002, Duvnjak et al. 2007, Byrne et al. 2010).

Ähnliche Befunde ließen sich auch in dem hier verwendeten NALFD *in-vitro* Modell nachweisen. So ergaben quantitative RT-PCR-Analysen, dass die Zellen schon ab einer Konzentration von 0,3 mM Palmitinsäure erhöhte IL-6 Werte aufwiesen. Die Stimulation mit 0,5 mM und 1 mM Palmitinsäure führten zu noch höheren IL-6-Werten im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb.12). Desweiteren zeigte auch STAT3, ein Protein der intrazellulären IL-6-Signalkaskade, eine erhöhte Expression nach Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure (Abb.12). Darüber hinaus konnte in weiterführenden Experimenten der Arbeitsgruppe auch ein Anstieg des zentralen Zytokins TNF-α gezeigt werden (unveröffentlichte Daten von Frau Katrin Müller).
Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die in den Zellen durch Stimulation mit 0,3 mM bzw. 0,5 mM Palmitinsäure hervorgerufene Entzündungsreaktion ursächlich für die signifikant erhöhte Hepcidin-Expression sein könnte. Außerdem zeigen die Befunde, dass die Hemmung der Hepcidin-Expression bei Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure unabhängig von der in den Zellen stattfindenden Entzündungsreaktion zu sein scheint. Das Hepcidin-Level fällt trotz erhöhter Werte von IL-6 (Abb.12) und TNF-alpha (unveröffentlichte Daten von Frau Katrin Müller) signifikant ab. Daraus lässt sich schließen, dass Palmitinsäure in den Zellen zu einer Hemmung der Hepcidin-Stimulation führt, die selbst durch den starken Hepcidin-Stimulator IL-6 nicht beeinflussbar zu sein scheint. Darüber hinaus spricht dieser Befund dafür, dass die Stimulation mit Palmitinsäure die Hepcidin-Regulation durch die IL-6-Signalkaskade inhibiert. Da STAT3 parallel zu IL-6 ansteigt, muss die Palmitinsäure die IL-6-Signalkaskade in nachgeschalteten Signalwegen hemmen.
Schließlich verdeutlichen diese Befunde erstmals in einem Zellversuch, dass Hepcidin durch eine Steatose-äquivalente-Dosis an gesättigter Fettsäure auf RNA- sowie Proteinebene signifikant gehemmt wird. Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, dass die Hemmung der Hepcidin-Expression durch Palmitinsäure an der Entstehung der NAFLD bedingten Hyperferritinämie und Eisenüberladung beteiligt sein und das Hepcidin somit eine Verbindung zwischen Eisenstoffwechsel und hepatischen Fettstoffwechsel darstellen könnte.

Da Palmitinsäure in höheren Konzentrationen nicht nur Entzündungsinduzierend sondern auch lipotoxisch wirkt und die Apoptose in Zellen steigert (Gómez-Lechón et al. 2007, Joshi-Barve et al. 2007), wurden die Zellen in weiterführenden Versuchen der Arbeitsgruppe zusätzlich zu Palmitinsäure auch mit dem Apoptoseinhibitor z-VAD-fmk (Pancaspaseinhibitor) behandelt um zu prüfen, ob der beobachtete Effekt in den Zellen unabhängig von dem Zelltod induziert werden kann. Es zeigte sich, dass die Hepcidin-Level auf RNA-Ebene nach Fettstimulation unabhängig vom Zelltod reguliert werden (unveröffentlichte Daten von Frau Katrin Müller).

Um zu untersuchen in wieweit Hepcidin in den mit Fett stimulierten Zellen noch auf externe Zugabe von den oben genannten Stimuli reagiert, wurde eine Postexposition-Stimulation mit IL-6 und Eisen durchgeführt. Die quantitative RT-PCR der Postexposition-Stimulation von HepG2 mit IL-6 und Eisen nach 24 h Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure zeigte jedoch, dass keiner dieser Induktoren die Hepcidin–Expression signifikant beeinflussen konnte. Einzig nach IL-6 Stimulation kam es zu einer Erhöhung des Hepcidin-Levels, welche aber immer noch niedriger als das Hepcidin-Level der Zellen war, die zur Kontrolle weder mit Palmitinsäure noch mit IL-6 stimuliert wurden (Abb.11). Nach Eisen-Stimulation kam es sogar zu einer weiteren Verminderung der Hepcidin-RNA-Expression in den Zellen (Abb.11), obwohl in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass die hier verwendete Eisenmenge zu Hochregulation von Hepcidin in HepG2-Zellen führt (Fein et al.2007).
Diese Befunde bestätigen die Annahme, dass die Hemmung der Hepcidin-Expression so stark zu sein scheint, dass selbst die physiologischen Induktoren in den Zellen zu keiner signifikanten Expressionssteigerung mehr führen können. Diese drastische Einwirkung auf Hepcidin könnte eine Erklärung dafür darstellen, dass einige NAFLD-Patienten insbesondere ab dem NASH-Stadium eine progrediente Eisenüberladung entwickeln, obwohl Hepcidin-stimulierende-Faktoren wie erhöhtes Eisen und Entzündungsmediatoren vorhanden sind.

Um die beobachtete Down-Regulation des Hepcidin-Levels bei Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure weiter zu analysieren, wurde in nachfolgenden Experimenten der Hepcidin-stimulierenden Mediator BMP6, sowie die Proteine der Hepcidin-

Regulierenden Signalkaskade (HJV, HFE, TFR2, SMAD4) auf RNA-Ebene untersucht.

Die Auswertung der quantitativen RT-PCR zeigte, dass die Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure in den Zellen zu einer signifikant erhöhten Transkription der Proteine des BMP6-Signalweges führte. So zeigten der zentrale Hepcidin-Induktor BMP6 sowie SMAD4, ein Protein der intrazellulären BMP6-Signalkaskade, und HJV, Bestandteil des BMP-Rezeptorkomplexes zum Teil extrem erhöhte RNA-Level (Abb.13).
Die erhöhten BMP6-, SMAD4- und HJV-Werte könnten auf einen gestörten Eisenstoffwechsel im Sinne einer Eisenüberladung in den Zellen hinweisen. So konnte, wie bereits beschrieben, in *smad4-null Mäusen,* die durch diese Mutation eine Eisenüberladung entwickelten, gezeigt werden, dass die hepatische BMP6-Expression von erhöhten intrazellulären Eisen hochreguliert wird (Kautz et al. 2008). Auch Versuche mit HFE-Hämochromatose-Mäusen bestätigten die Hochregulation von BMP6 durch Eisen (Corradini et al. 2009, Kautz et al. 2009). Desweiteren zeigten Patienten mit physiologisch (Hämochromatose unabhängig) erhöhten intrazellulären Eisen signifikant erhöhte HJV-Werte (Gleeson et al. 2007). Die Gesamtheit der Befunde weist somit darauf, dass auch in dem hier verwendeten Zellmodell eine durch erniedrigtes Hepcidin-Level hervorgerufene intrazellulär erhöhte Eisenkonzentration vorliegt. Die gezeigte Erhöhung der SMAD4 Expression könnte somit als funktionelle Konsequenz aus der hochregulierten BMP6 Expression gesehen werden.
Da BMP6 der stärkste Hepcidin-Induktor des BMP-Signalweges (Andriopoulos et al. 2009, Meynard et al.2009) und HJV ein entscheidendes Protein der Hepcidin-Regulation ist, dessen Mutation zu einem massiven Hepcidin-Mangel führt (Papanikolaou et al. 2005), verdeutlicht dieser Befund darüber hinaus, dass die Hepcidin-Regulation mittels der BMP6-Signalkaskade in den Zellen ähnlich der IL-6-Kaskade durch die Fettstimulation inhibiert wird.

In weiterführenden Experimenten wurden die Hepcidin-regulierenden Mediatoren TFR2 und HFE mittels quantitativer RT-PCR analysiert.

Der TFR2/HFE-Signalweg scheint im Gegensatz zu dem BMP6-Signalweg durch die Fettstimulation sehr gering beeinflusst zu sein. TFR2 zeigte leicht erhöhte Werte nach 24 h Stimulation wohingegen HFE völlig unverändert blieb (Abb.14).

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse folgende Schlüsse zu: Einerseits scheint die Palmitinsäure assoziierte Hemmung der Hepcidin-Expression unabhängig von den oben genannten Signalkaskaden zu sein, da die Expression keines der Proteine im Gegensatz zu Hepcidin durch Palmitinsäure negativ beeinflusst wurde. Andererseits verstärken diese Ergebnisse die oben beschriebene Annahme, dass die Auswirkung des Fetts auf die Expression von Hepcidin so stark zu sein scheint, dass selbst die physiologischen Stimuli keine erhebliche Expressionssteigerung mehr herbeiführen können. Es kommt zu einem Abfall des Hepcidin-Levels trotz der erhöhten Expressionen der Hepcidin-Induktoren und der Proteine der Hepcidin-regulierenden Signalkaskaden. Der drastische Anstieg der Transkription der Proteine des BMP6-Signalweges weist zudem auf einen gestörten Eisenstoffwechsel im Sinne einer Eisenüberladung in den Zellen hin, der durch das verminderte Hepcidin-Level verursacht sein könnte.

In einem nächsten Schritt wurde die Wirkung der Fettstimulation auf die Proteine des Eisenstoffwechsels untersucht. Dafür wurde in HepG2-Zellen nach vierundzwanzigstündiger Stimulation mit 1mM Palmitinsäure die RNA-Expression von IREG1, den einzig bekannten Eisenexporter der Zelle und TFR1, ein Hauptrezeptor für Holotransferrin analysiert. Die Auswertung der quantitativen RT-PCR ergab, dass eine Stimulation mit Palmitinsäure zu einem signifikanten Anstieg der IREG1-Expression und zu einem signifikanten Abfall der TFR1-Expression führt (Abb.15).
Die Expression von IREG-1 und TFR1 wird über sogenannte IRPs (Iron Responsive Proteins) reguliert (Barisani et al. 2008). IRPs sind Proteine, deren Funktion durch den intrazellulären Eisengehalt der Zelle reguliert wird. Bei hohen Eisenkonzentrationen in der Zelle binden sie an IREs (Iron Responsive Elements) in mRNA-Transkripten verschiedener Gene und beeinflussen dadurch deren Expression (Frazer and Anderson 2005). So führt die Bindung von IRPs an das IRE von TFR1 zu einer Repression der TFR1-Expression (Gunshin et al. 2001), wohingegen die Bindung der IRPs an das IRE des IREG1-Gens zu einer

Hochregulation der IREG-1-Expression führt (Lymboussaki et al. 2003). Aufgrund dieses physiologischen Regulationsmechanismus von TFR1 und IREG-1 lassen sich die oben genannten Befund wie folgt interpretieren. Die verminderte Expression von TFR1 und die hochregulierte Expression von IREG-1 nach Stimulation mit 1mM Palmitinsäure deuten, genau wie das BMP6- und SMAD4-Expressionsmuster, auf eine durch das Fett hervorgerufene Eisenstoffwechselstörung im Sinne einer Eisenüberladung hin. Daraus folgt, dass die Zellen in dem hier verwendeten Modell nach Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure eine Eisenüberladung aufweisen könnten. Andererseits deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Zellen unter Fettstimulation die hepatischen Eisentransporter so regulieren, dass es zu einem Verminderten Eisenimport und vermehrten Eisenexport kommt, um somit einer Eisenüberladung entgegenwirken.
In weiterführenden Experimenten der Arbeitsgruppe konnte kürzlich außerdem gezeigt werden, dass die Stimulation mit Palmitinsäure in den Zellen nicht nur die Expression von IREG-1 und TFR1 sondern auch von Ferritin, dem Eisenspeicher im Organismus (Petrides 2003) signifikant beeinflusst. Schon ab einer Konzentration von 0,1 mM Palmitinsäure kommt es in den Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der Ferritin-Expression, die proportional zur Konzentration an Palmitinsäure ansteigt (unveröffentlichte Daten von Frau Katrin Müller). Die höchsten Ferritin-Werte wurden bei Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure gemessen (unveröffentlichte Daten von Frau Katrin Müller). Diese Befunde bestärken die Annahme, dass es nach Fettstimulation in den Zellen zu einer Eisenüberladung kommt.

Um zu untersuchen, inwieweit die Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure wirklich zu einer Beeinflussung der Eisenaufnahme der Zellen führt, wurden Eisenabsorptionsmessungen bei 535 nm durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen für 24 h entweder mit 1 mM Palmitinsäure und 20 µg/ml Eisenammoniumcitrat (FAC) oder mit BSA (in der Konzentration entsprechend der Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure) und 20 µg/ml FAC stimuliert. Die Auswertung der Absorptionsmessung zeigte, dass es in den mit Palmitinsäure stimulierten Zellen zu einer signifikant erhöhten Einlagerung von Eisen gegenüber der mit BSA stimulierten Kontrolle kommt. Dieses Ergebnis bestätigt die aufgrund der Befunde angenommene Eisenüberladung der Zellen nach Fettstimulation. Sie zeigen somit,

dass die in dem hier verwendeten *in-vitro* Modell, durch Palmitinsäure hervorgerufenen Beeinträchtigung des Hepcidin-Stoffwechsels zu einer Störung der Eisenhomöostase der Zelle führt und belegen die Annahme, dass der Hepcidin-Stoffwechsel eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der NAFDL-assoziierte Eisenüberladung spielen könnte.

In zwei vor kurzem veröffentlichten Arbeiten wurde die Auswirkung von Fett auf den Eisenstoffwechsel in einem Maus-Modell (Tsuchiya et al. 2010) und in NAFLD-Patienten (Barisani et al. 2008) untersucht.
Für ihr Maus-Modell fütterten Tsuchiya et al. 6 Wochen alte männliche Mäuse für 12 Wochen entweder mit einer normalen oder einer Cholin-Defizienten-Diät (CD-Diät) und verwendetet somit für ihre Versuche ein gut etabliertes Tier-Modell der NAFLD (Ansteen und Goldin 2006, Tsuchiya et al. 2010).
Mittels quantitativer RT-PCR wurde die RNA-Expression verschiedener Gene u.a. Hepcidin, HJV, TFR1, TFR2 und Ferroportin analysierten. Die Untersuchung der Hepcidin-Expression in den Hepatozyten ergab, dass die Fütterung von Mäusen mit CD-Diät zu einer signifikanten Erniedrigung der Hepcidin-Expression führte (Tsuchiya et al. 2010). Damit bestätigt dieses Experiment den in Zellen beobachtete Effekt der Stimulation mit 1 mM Palmitinsäure auf Hepcidin.
Auch die Analyse von HJV, TFR1 und TFR2 ergaben ähnliche Ergebnisse wie die Zellversuche. So kam es in den Hepatozyten der Steatose-Mäuse wie in den Zellen zu einer signifikant erhöhten Expression von HJV, erhöhten Werten von TFR2, sowie einer signifikanten Repression von TFR1 (Tsuchiya et al. 2010). Einzig Ferroportin zeigte einen kontroversen Verlauf. So kommt es in dem Zellmodell zu einer signifikanten Expressionssteigerung von Ferroportin, wohingegen in den Mäusen ein signifikanter Abfall von Ferroportin zu beobachten war (Tsuchiya et al. 2010). Da wie oben beschrieben Ferroportin über ein IRE reguliert wird, wäre auf Grund des erhöhten Eisengehaltes der Leber der Tiere eine vermehrte Expression von Ferroportin zu erwarten. Die Autoren vermuten für diesen kontroversen Verlauf einen direkten Effekt des Fettes auf Ferroportin, da TFR1 noch über das IRE reguliert zu sein scheint (Tsuchiya et al. 2010).
Das in dem hier verwendetem NAFLD-Zell-Modell keine Verminderung des Ferroportin-Levels, sondern sogar eine signifikante Steigerung gefunden wurde, könnte mit der unterschiedlichen Dauer der Fettstimulation zusammenhängen.

Wie oben beschrieben wurden die Zellen 24 h Stunden mit Fett stimuliert und der Ferroportin-Wert könnte aufgrund des angenommenen erhöhten Eisengehaltes der Zellen akut hochreguliert sein. Die Mäuse hingegen entwickelten die NAFLD über einen Zeitraum von 12 Wochen. Dieser große Unterschied in der Zeitspanne könnte eine Ursache für die unterschiedlichen Befunde darstellen und darauf hindeuten, dass die Wirkung von Fett auf die Expression von Ferroportin zeitabhängig ist. Desweiteren unterliegen die Hepatozyten in dem Maus-Modell viel komplexeren Regulationsmechanismen im Vergleich zu den HepG2-Zellen.
Nichtsdestotrotz müssen weitere Versuche mit dem Zellmodell zeigen, ob eine Stimulation mit Fett über längere Zeiträume zu einem anderen Expressionsmuster von Ferroportin führen.
Im Gegensatz zu Tsuchiya et al. untersuchten Barisani et al. die Auswirkung von Fett auf den Hepcidin- und Eisenstoffwechsel in neunundvierzig Patienten. Die Patienten, die eine NAFLD und zusätzlich eine Hyperferritinämie und Eisenüberladung aufwiesen, fassten sie unter dem Begriff DHIO (Dysmetabolic-Hepatic Iron Overload syndrome) zusammen. Als Negativ-Kontrolle wurden Patienten mit einer NAFLD ohne Beeinträchtigung des Eisenstoffwechsels untersucht. Als Positiv- Kontrollen analysierte die Arbeitsgruppe Patienten mit HFE-Hämochromatose und ß-Thalassämie Major (n=6), zwei Erkrankungen, die mit einer erheblichen Verminderung der Hepcidin-Expression einhergehen und daraus folgend zu einer Eisenüberladung des Organismus führen (Kattmis et al 2006, Pietrangelo 2007).
Die Autoren untersuchten in einem ersten Schritt mittels quantitativer RT-PCR die Expression von Proteinen des Eisen- und Hepcidin-Stoffwechsels und setzten sie dann ins Verhältnis zu dem Serumferritin und Totalen Eisen Score (TIS) der Patienten. Neben der Hepcidin-Expression wurde u.a. die Expression von Ferroportin, TFR1, TFR2, HFE, HJV und IL-6 analysiert (Barisani et al. 2008).
In den Biopsien der DHIO- und NAFLD-Gruppe zeigte sich zwar kein signifikanter Unterschied in der totalen hepatischen Hepcidin-Expression, dafür waren die Hepcidin-Werte aber im Verhältnis zu den gemessenen Eisenparametern, Serumferritin und TIS in der DHIO-Gruppe signifikanten erniedrigt. Darüber hinaus korrelierten in der DHIO-Gruppe die Hepcidin-Werte der Leber mit keinem der gemessenen Eisenindices (Barisani et al. 2008). Diese Befunde beweisen, dass in der DHIO-Gruppe die hepatische Hepcidin-Expression inadäquat bezogen auf den

Eisengehalt des Körpers ist und verdeutlichen somit , dass diese Patienten einen gestörten Hepcidin-Stoffwechsel aufweisen (Barisani et al. 2008).
Daraus schlussfolgerte die Arbeitsgruppe, dass Hepcidin in DHIO-Patienten durch anderen Mechanismen außer Eisen reguliert sein muss (Barisani et al. 2008). Dies bestärkt das Ergebnis der Postexposition-Stimulation in den Zellen, die zeigt, dass Eisen Hepcidin nach Stimulation mit Fett nicht mehr zu regulieren scheint.
Die Expressionsanalyse der Proteine des Eisenstoffwechsels TFR1 und Ferroportin in den Patienten der DHIO-Gruppe ergab ähnliche Verläufe wie in dem Tiermodell. So zeigte sich auch hier eine signifikante Erniedrigung der TFR1- und IREG1-Expression (Barisani et al. 2008).
Die Untersuchung der Hepcidin-Regulierenden Proteine HFE, TFR2, HJV ergab im Gegensatz zu den Zellversuchen keinen signifikanten Unterschied in der NAFLD und DHIO-Gruppe. Die Analyse des Entzündungsmediators IL-6 hingegen zeigte dieselbe Tendenz wie in den Zellen. So wiesen die Patienten der DHIO-Gruppe erhöhte IL-6 und somit Entzündungs-Werte gegenüber der NAFLD-Gruppe auf.
Die Unterschiede zwischen dem Zellversuch und den Ergebnissen dieser Studie könnten wie im Maus-Modell damit zusammenhängen, dass die Leber viel komplexeren Regulationsmechanismen unterliegt als es in einem *in-vitro*-Modell der Fall ist. Auch die Tatsache, dass als Negativ-Kontrolle nicht gesunde sondern schon an NAFLD erkrankte Patienten genommen wurden, könnte eine Rolle spielen.

Wie schon länger bekannt, entwickeln Patienten mit einer Alkohol-induzierte Fettleber ähnlich zu NAFLD Patienten auch eine Eisenüberladung der Leber (Chapman et al.1982, Irving et al. 1988, De Feo et al 2001, Harrison-Findik 2007), die die Progression der Erkrankung negativ beeinflusst (Harrison-Findik 2007). Interessanterweise konnte kürzlich von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass Hepcidin ursächlich für die Eisenüberladung zu sein scheint (Bridle et al. 2006, Harrison-Findik et al. 2006). Darüber hinaus zeigten mehrere Experimente, dass die Hemmung der Hepcidin-Expression durch oxidativen Stress via Reaktiven Sauerstoff- Radikalen (ROS) vermittelt ist (Harrison-Findik et al. 2006, Choi et al. 2007, Harrison- Findik et al. 2007).

Die NAFLD ist der Alkohol-induzierten Fettleber zumindest morphologisch sehr ähnlich (Duvnjak et al. 2007). Desweiteren führt wie oben bereits beschrieben die Überladung der Leber mit freien Fettsäuren zu vermehrten Bildung von ROS (Angulo 2002, Duvnjak et al. 2007, Byrne et al. 2010). Dies konnte auch in Tierversuchen gezeigt werden, in denen Ratten mit Hoch-Fettiger-Diät gefüttert wurden (Vial et al.2011). Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass auch in der Fett- bedingten Dysregulation von Hepcidin ROS eine entscheidende Rolle spielen könnten. Auch die Ergebnisse der Postexposition-Stimulation der Zellen mit Eisen sprechen für diese Theorie. Bei diesem Experiment zeigte sich in den Zellen die Tendenz, dass eine Zugabe von Eisen zu einer noch niedrigeren Hepcidin-Expression führte als in den nicht mit Eisen stimulierten Kontrollen (Abb.11). Da Eisen selbst zu Ausbildung von ROS in Zellen führt, könnte man diesen Befund so deuten, dass der durch das Eisen zusätzlich hervorgerufene oxidative Stress, die Hepcidin-Expression noch weiter negativ beeinflusst. Diese Feststellung wäre somit eine Bekräftigung der oben genannten Theorie. Weiterführende Versuche müssen nun zeigen, ob in der fettinduzierten Hepcidin-Dysregulation simultan zur alkoholinduzierten Fettleber ROS die entscheidende Rolle spielen.

Zusammenfassend lässt sich aus der Gesamtheit der oben diskutierten Befunde folgende Hypothese aufstellen. Die Fetteinlagerung in Hepatozyten führt zu einer Fett-bedingten Entzündungsreaktion in den Zellen. Der dadurch hochregulierte Entzündungsmediator IL-6 induziert die Hepcidin-Expression. Überschreitet die Fettüberladung jedoch eine Grenze, induziert das Fett in den Leberzellen eine, eventuell durch ROS bedingte, Supprimierung der Hepcidin-Expression. Die Beeinträchtigung ist so ausgeprägt, dass selbst durch physiologische Hepcidin-Stimulatoren wie Eisen, IL-6 und BMP6 keine Steigerung der Expression mehr zu erreichen ist. Die Supprimierung von Hepcidin führt zu einem erhöhten Eisengehalt in den Hepatozyten. Das erhöhte Eisen beeinflusst letztendlich die Expression von Proteinen des Eisen- und Hepcidin-Stoffwechsels wie BMP6, SMAD4, HJV, IREG1 und TFR1 (Abb.16).

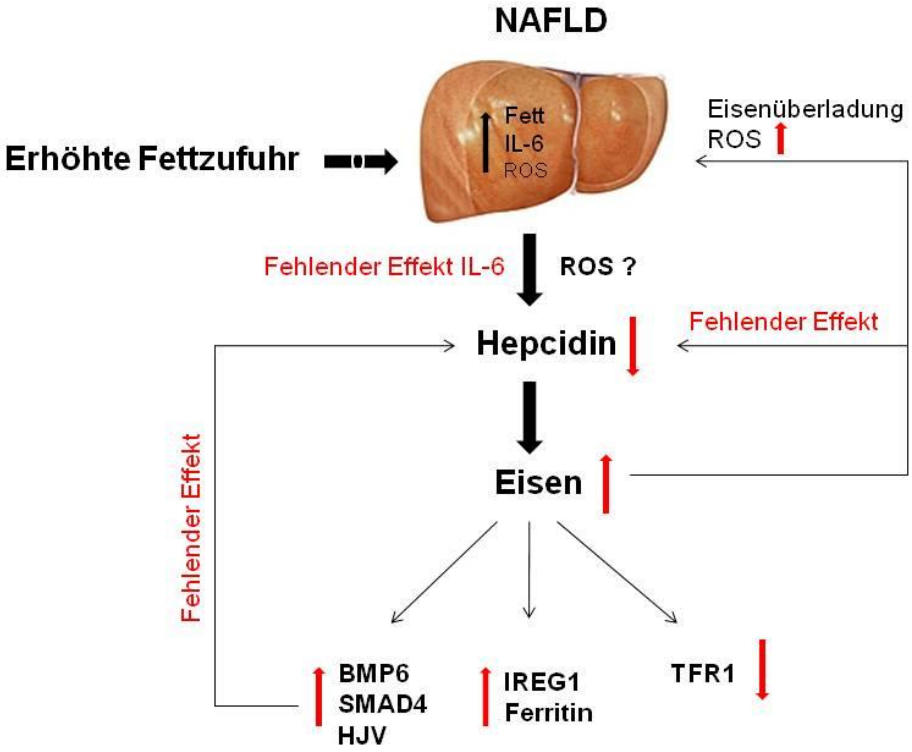


Abb. 16: Hypothese zur Auswirkung der hepatischen Fettüberladung auf den Hepcidin- und Eisenstoffwechsel. Interleukin (IL), Reaktive Sauerstoffspecies (ROS), Bone morphgenic protein (BMP), Ferroportin (IREG1), Transferrinrezeptor (TFR), Hämojuvelin (HJV), mothers against decapentaplegic homolog (SMAD).

5 Zusammenfassung

Die nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) stellt in unserer heutigen Zeit aufgrund der steigenden Anzahl übergewichtigen Menschen ein zunehmendes medizinisches Problem dar. Häufig werden in Zusammenhang mit der NALFD bei Patienten Eisenüberladungen beobachtet, die die Progredienz der Erkrankung von einer simplen Steatose hin zu einer nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH), Leberfibrose und in manchen Fällen sogar zum hepatozellulären Karzinom negativ beeinflussen können. Der genaue Pathomechanismus dieser sekundären Eisenüberladung ist allerdings bislang noch nicht geklärt. Eine gestörte Regulation des zentralen Eisenregulators Hepcidin könnte eine entscheidende Rolle spielen.

In dieser Arbeit konnte die Wirkung von gesättigten Fettsäuren auf das zentrale Eisenhormon Hepcidin als mögliche Ursache für die Eisenüberladung dargelegt werden. Durch molekularbiologische und biochemische Methoden konnte auf RNA- sowie Protein-Ebene gezeigt werden, dass durch Stimulation der Leberzelllinien HepG2 und Hep3B mit einer Steatose-äquivalenten-Dosis Palmitinsäure die Hepcidin-Expression signifikant runter-reguliert wird.

Um den dahinterstehenden Pathomechanismus besser zu verstehen, wurden mit molekularbiologischen Methoden auf RNA-Ebene die Expression der Hepcidin-Stimulierenden-Mediatoren BMP-6 (Bone-Morphogenetic-Protein-6) und IL-6 (Interleukin-6) sowie der Proteine ihrer Signalkaskaden HJV (Hämojuvelin), HFE (Humane-Hämochromatose-Protein), SMAD4 (Mothers against decapentaplegic homolog 4), STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), TFR2 (Transferrinrezeptor-2) nach Stimulation mit der Steatose-äquivalenten-Dosis Palmitinsäure analysiert.

Die Zellversuche konnten zeigen, dass die Expression von IL-6 und BMP-6 sowie aufgrund funktioneller Konsequenz auch STAT3 und SMAD4 durch die Stimulation mit Fett drastisch erhöht waren. Diese Befunde deuten daraufhin, dass neben der fettinduzierten Entzündung zusätzlich auch eine Eisenüberladung in den Zellen vorliegt. Auch der Hepcidin-Regulierende-Mediator HJV war nach Stimulation mit Palmitinsäure drastisch erhöht, was die Annahme der intrazellulären Eisenüberladung bestätigt.

Der HFE/TFR2 Signalweg hingegen scheint durch die Fettstimulation unbeeinträchtigt zu sein.

Die Stimulation der Zellen nach Fettexposition mit IL-6 und Eisen sollte zeigen ob die Hemmung der Hepcidin-Expression durch diese zwei zentralen Stimulatoren aufgehoben werden kann. Die molekularbiologische Untersuchung zeigte, dass weder Eisen noch IL-6 die Hepcidin-Werte nach Fettstimulation nennenswert positiv beeinflussen konnten.

Schließlich wurde die Auswirkung von Palmitinsäure auf den Eisenstoffwechsel untersucht. Dafür wurde Ferroportin, der einzig bekannte Eisenexporter der Zelle und TFR1 (Transferrinrezeptor-1), ein Hauptrezeptor für Holotransferrin, mittels molekularbiologischer Methode untersucht. Die Analyse ergab einen signifikant erhöhten Wert für Ferroportin, wohingegen TFR-1 signifikant abfiel. Auch diese Befund sprechen dafür, dass es durch Stimulation mit Palmitinsäure zu einer Eisenüberladung in den Zellen kommt.

Um zu untersuchen, ob die Eisenaufnahme der Zellen wirklich durch die Fettstimulation beeinflusst wird, wurden Eisenabsorptionsmessungen durchgeführt. Hierfür wurde der Eisengehalt in HepG2-Zellen gemessen, die entweder mit Palmitinsäure und Eisen oder zur Kontrolle mit BSA und Eisen stimuliert wurden. Die Auswertung der Ergebnisse bestätige die Beeinflussung des Eisenstoffwechsels durch Fett. In den mit Palmitinsäure stimulierten Zellen zeigte sich ein signifikant erhöhter Eisengehalt gegenüber der Kontrolle.

In Ihrer Gesamtheit sprechen die Ergebnisse für einen direkten Effekt von freien Fettsäuren auf den Hepcidin-Stoffwechsel. Die durch das Fett verursachte Down-Regulation der Hepcidin-Expression führt zu einer intrazellulären Eisenüberladung der Hepatozyten und beeinflusst dadurch die Expression der Proteine der Hepcidin-regulierenden-Signalkaskaden und des Eisenstoffwechsels. Somit zeigen die Ergebnisse, dass Hepcidin eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der NAFLD bedingten Eisenüberladung und Hyperferritinämie spielen und eine Verbindung zwischen Eisen- und Fettstoffwechsel darstellen könnte. Des Weiteren belegen die Befunde, dass die Supprimierung von Hepcidin durch Fett unabhängig von den bisher bekannten Hepcidin-regulierenden-Signalwegen abläuft.

Weiterführende Experimente müssen nun zeigen, über welchen pathobiochemischen Prozess die Dysregulation von Hepcidin verursacht wird und wie man sich die gewonnen Erkenntnisse bei der Therapie der NAFLD zu Nutze machen kann.

6 Literaturverzeichnis

1. Aigner E, Theurl I, Theurl M, Lederer D, Haufe H, Dietze O, Strasser M, Datz C, Weiss G: Pathways underlying iron accumulation in human nonalcoholic fatty liver disease. Am J Clin Nutr 87: 1374-1383 (2008)

2. Ajuwon KM, Spurlock ME: Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNF alpha expression in 3T3–L1 adipocytes. J Nutr 135: 1841-1846 (2005)

3. Anderson GJ, Frazer DM, McLaren GD: Iron absorption and metabolism. Curr Opin Gastroenterol 25: 129-135 (2009)

4. Andriopoulos B Jr, Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S, Grgurevic L, Knutson MD, Pietrangelo A, Vukicevic S, Lin HY, Babitt JL: BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. Nat Genet 41: 482-487 (2009)

5. Angulo P: Nonalcoholic fatty liver disease. N Engl J Med 346: 1221-1231 (2002)

6. Anstee QM, Goldin RD: Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. Int J Exp Pathol 87: 1-16 (2006)

7. Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, 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 38: 531-539 (2006)

8. Babitt JL, Huang FW, Xia Y, Sidis Y, Andrews NC, Lin HY: Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. J Clin Invest 117: 1933-1939 (2007)

9. Barisani D, Pelucchi S, Mariani R, Galimberti S, Trombini P, Fumagalli D, Meneveri R, Nemeth E, Ganz T, Piperno A: Hepcidin and iron-related gene expression in subjects with Dysmetabolic Hepatic Iron Overload. J Hepatol 49: 123-133 (2008)

10. Berglund L, Lefevre M, Ginsberg HN, Kris-Etherton PM, Elmer PJ, Stewart PW, Ershow A, Pearson TA, Dennis BH, Roheim PS, Ramakrishnan R, Reed R, Stewart K, Phillips KM: Comparison of monounsaturated fat with carbohydrates as a replacement for saturated fat in subjects with a high metabolic risk profile: studies in the fasting and postprandial states. Am J Clin Nutr 86: 1611-1620 (2007)

11. Blackburn GL, Mun EC: Effects of weight loss surgeries on liver disease. Semin Liver Dis 24: 371-379 (2004)

12. Brian Young, Joshua Zaritsky: Hepcidin for Clinicians. Clin J Am Soc Nephrol 4: 1384-1387 (2009)

13. Bridle K, Cheung TK, Murphy T, Walters M, Anderson G, Crawford DG, Fletcher LM: Hepcidin is down-regulated in alcoholic liver injury: implications for the pathogenesis of alcoholic liver disease. Alcohol Clin Exp Res 30: 106-112 (2006)

14. Byrne CD: Fatty liver: Role of inflammation and fatty acid nutrition. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 82: 265-271 (2010)

15. Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Battle EH, Driscoll CJ: Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. Hepatology 29: 664-669 (1999)

16. Calzolari A, Raggi C, Deaglio S, Sposi NM, Stafsnes M, Fecchi K, Parolini I, Malavasi F, Peschle C, Sargiacomo M, Testa U: TFR2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. J Cell Sci 119: 4486-4498 (2006)

17. Camaschella C, Roetto A, Calì A, De Gobbi M, Garozzo G, Carella M, Majorano N, Totaro A, Gasparini P: The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. Nat Genet 25: 14-15 (2000)

18. Chapman RW, Morgan MY, Laulicht M, Hoffbrand AV, Sherlock S: Hepatic iron stores and markers of iron overload in alcoholics and patients with idiopathic hemochromatosis. Dig Dis Sci 27: 909-916 (1982)

19. Chen J, Chloupkova M, Gao J, Chapman-Arvedson TL, Enns CA: HFE modulates transferrin receptor 2 levels in hepatoma cells via interactions that differ from transferrin receptor 1-HFE interactions. J Biol Chem 282: 36862-36870 (2007)

20. Choi SO, Cho YS, Kim HL, Park JW: ROS mediate the hypoxic repression of the hepcidin gene by inhibiting C/EBPalpha and STAT-3. Biochem Biophys Res Commun 356: 312-317 (2007)

21. 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 137: 1489-1497 (2009)

22. De Domenico I, Ward DM, Langelier C, Vaughn MB, Nemeth E, Sundquist WI, Ganz T, Musci G, Kaplan J: The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. Mo Biol Cell 18: 2569-2578 (2007)

23. De Feo TM, Fargion S, Duca L, Cesana BM, Boncinelli L, Lozza P, Cappellini MD, Fiorelli G: Non-transferrin-bound iron in alcohol abusers. Alcohol Clin Exp Res 25: 1494-1499 (2001)

24. De Gottardi A, Vinciguerra M, Sgroi A, Moukil M, Ravier-Dall'Antonia F, Pazienza V, Pugnale P, Foti M, Hadengue A: Microarray analyses and molecular profiling of steatosis induction in immortalized human hepatocytes. Lab Invest 87: 792-806 (2007)

25. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ: Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Invest 115: 1343-1351 (2005)

26. Duvnjak M, Lerotić I, Barsić N, Tomasić V, Virović Jukić L, Velagić V: Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol 13: 4539-4550 (2007)

27. Eisenstein RS: Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. Ann Rev Nutr 20: 627-662 (2000)

28. Falzacappa MVV, Muckenthaler MU: Hepcidin: Iron-hormone and anti-microbial peptide. Gene 364: 37-44 (2005)

29. Fassio E, Alvarez E, Dominguez N, Landeira G, Longo C: Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsies. Hepatology 40: 820-826 (2004)

30. Fein E, Merle U, Ehehalt R, Herrmann T, Kulaksiz H: Regulation of hepcidin in HepG2 and RINm5F cells. Peptides 28: 951-957 (2007)

31. Folkerts M: Lipide und Lipidstoffwechsel. In Dettmer U, Folkerts M, Kärchler E, Sönnichsen A (Hrsg): Intensivkurs Biochemie. 1. Auflage, Elsevier, München, S.83-123 (2005)

32. Forsythe-Pribanic C. http://www.getprograde.com/How-to-lose-weight-fast-with-lipotropic-nutrients.html (24.3.2011)

33. Frazer DM, Anderson GJ: Iron imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 289: G631-G635 (2005)

34. Frazer DM, Anderson GJ, Ramm GA, Subramaniam VN, Powell LW: How much iron is too much? Expert Rev Gastroenterol Hepatol 2: 287-290 (2008)

35. Galaris D, Pantopoulos K: Oxidative Stress and Iron Homeostasis: Mechanistic and Health Aspects. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 45: 1-23 (2008)

36. Ganz T: Cellular iron: ferroportin is the only way out. Cell Metab 1: 155-157 (2005)

37. Ganz T, Nemeth E: Iron imports. IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 290: G199-G203 (2005)

38. Ganz T: Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 507: 29-35 (2006)

39. Gao J, Chen J, Kramer M, Tsukamoto H, Zhang AS, Enns CA: Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. Cell Metab 9: 217-227 (2009)

40. Garrick MD, Dolan KG, Horbinski C, Ghio AJ, Higgins D, Porubcin M, Moore EG, Hainsworth LN, Umbreit JN, Conrad ME, Feng L, Lis A, Roth JA, Singleton S, Garrick LM: DMT1: A mammalian transporter for multiple metals. BioMetals 16: 41-54 (2003)

41. George DK, Goldwurm S, MacDonald GA, Cowley LL, Walker NI, Ward PJ, Jazwinska EC, Powell LW: Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. Gastroenterology 114: 311-318 (1998)

42. Ginsberg HN, Kris-Etherton P, Dennis B, Elmer PJ, Ershow A, Lefevre M, Pearson T, Roheim P, Ramakrishnan R, Reed R, Stewart K, Stewart P, Phillips K, Anderson N: Effects of reducing dietary saturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in healthy subjects: the DELTA Study, protocol 1. Arterioscler Thromb Vasc Biol 18: 441-449 (1998)

43. Gleeson F, Ryan E, Barrett S, Russell J, Crowe J: Hepatic iron metabolism gene expression profiles in HFE associated hereditary hemochromatosis. Blood Cells Mol Dis 38: 37-44 (2007)

44. Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, Jiménez N, Castell JV, O'Connor JE: A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. Chem Biol Interact 165: 106-116 (2007)

45. Goswami T, Andrews NC: Hereditary hemochromatosis protein HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. J Biol Chem 281: 28494-28498 (2006)

46. Gunshin H, Allerson CR, Polycarpou-Schwarz M, Rofts A, Rogers JT, Kishi F, Hentze MW, Rouault TA, Andrews NC, Hediger MA: Iron-dependent regulation of the divalent metal ion transporter. FEBS Lett 509: 309-316 (2001)

47. Harrison-Findik DD, Schafer D, Klein E, Timchenko NA, Kulaksiz H, Clemens D, Fein E, Andriopoulos B, Pantopoulos K, Gollan J: Alcohol metabolism-mediated oxidative stress down-regulates hepcidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression. J Biol Chem 281: 22974-22982 (2006)

48. Harrison-Findik DD: Role of alcohol in the regulation of iron metabolism. World J Gastroenterol 13: 4925-4930 (2007)

49. Harrison-Findik DD, Klein E, Crist C, Evans J, Timchenko N, Gollan J: Iron-mediated regulation of liver hepcidin expression rats and mice is abolished by alcohol. Hepatology 46: 1979-1985 (2007)

50. Horn F: Soffwechsel der Lipide. In: Horn F (Hrsg): Biochemie des Menschen. 4. Auflage, Thieme, Stuttgart, S.123-170 (2009)

51. Hunter HN, Fulton DB, Ganz T, Vogel HJ: The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. J Biol Chem 277: 37597-37603 (2002)

52. Irving MG, Halliday JW and Powell LW: Association between alcoholism and increased hepatic iron stores. Alcohol Clin Exp Res 12: 7-13 (1988)

53. Jaeschke H: Inflammation in response to hepatocellular apoptosis. Hepatology 35: 964-966 (2002)

54. Johnson MB, Enns CA: Regulation of transferrin receptor 2 by transferrin: diferric transferrin regulates transferrin receptor 2 protein stability. Blood 104: 4287-4293 (2004)

55. Joshi-Barve S, Barve SS, Amancherla K, Gobejishvili L, Hill D, Cave M, Hote P, McClain CJ: Palmitic Acid Induces Production of Proinflammatory Cytokine Interleukin-8 from Hepatocytes. Hepatology 46: 823-830 (2007)

56. Kattamis A, Papassotiriou I, Palaiologou D, Apostolakou F, Galani A, Ladis V, Sakellaropoulos N, Papanikolaou G: The effects of erythropoetic activity and iron burden on hepcidin expression in patients with thalassemia major. Haematologica 91: 809-812 (2006)

57. 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 the mouse liver. Blood 112: 1503-1509 (2008)

58. Kautz L, Meynard D, Besson-Fournier C, Darnaud V, Al Saati T, Coppin H, Roth MP: BMP/Smad signaling is not enhanced in Hfe-deficient mice despite increased Bmp6 expression. Blood 114: 2515-2520 (2009)

59. Kawabata H, Yang R, Hirama T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF, Koeffler HP: Molecular Cloning of Transferrin Receptor 2: A NEW MEMBER OF THE TRANSFERRIN RECEPTOR-LIKE FAMILY. J Biol Chem 274: 20826-20832 (1999)

60. Kawabata H, Fleming RE, Gui D, Moon SY, Saitoh T, O'Kelly J, Umehara Y, Wano Y, Said JW, Koeffler HP: Expression of hepcidin is downregulated in TfR2 mutant mice manifesting a phenotype of hereditary hemochromatosis. Blood 105: 376-381 (2005)

61. Khashab MA, Liangpunsakul S, Chalasani N: Nonalcoholic fatty liver disease as a component of the metabolic syndrome. Current Gastroenterology Reports 10: 73-80 (2008)

62. Knutson MD: Iron-Sensing Proteins that Regulate Hepcidin and Enteric Iron Absorption. Annual Review of Nutrition 30: 149-171 (2010)

63. Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J: Iron overload and cofactors with special reference to alcohol, hepatitis C virus infection and steatosis/insulin resistance. World J Gastroenterol 13: 4699-4706 (2007)

64. Krause A, Neitz S, Magert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, Adermann K: LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. FEBS letters 480: 147-150 (2000)

65. 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 53: 735-743 (2004)

66. 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. Journal of Endocrinology 184: 361-370 (2005)

67. Kulaksiz H, Fein E, Redecker P, Stremmel W, Adler G, Cetin Y: Pancreatic beta-cells express hepcidin, an iron-uptake regulatory peptide. J Endocrinol 197: 241-249 (2008)

68. Lee P, Peng H, Gelbart T, Wang L, Beutler E: Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. Proc Natl Acad Sci USA 102: 1906-1910 (2005)

69. Lee PL, Beutler E: Regulation of hepcidin and iron-overload disease. Annu Rev Pathol 4: 489-515 (2009)

70. Levy JE, Jin O, Fujiwara Y, Kuo F, Andrews NC: Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. Nat Genet 21: 396-399 (1999)

71. Lewis JR, Mohanty SR: Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Review and Update. Digestive Diseases and Sciences Vol 55: 560-578 (2010)

72. Lin L, Valore EV, Nemeth E, Goodnough JB, Gabayan V, Ganz T: Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. Blood 110: 2182-2189 (2007)

73. Listenberger LL, Ory DS, Schaffer JE: Palmitate-induced Apoptosis Can Occur through a Ceramide-independent Pathway. The Journal of biological chemistry 276: 14890-14895 (2001)

74. Löffler G: Stoffwechsel der Triacylglycerine und Fettsäuren. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg): Biochemie & Pathobiochemie. 7. Auflage, Springer, Berlin Heidelberg New York, S. 434-460 (2003)

75. Lymboussaki A, Pignatti E, Montosi G, Garuti C, Haile DJ, Pietrangelo A: The role of the iron responsive element in the control of ferroportin1/IREG1/MTP1 gene expression. J Hepatol 39: 710-715 (2003)

76. Mackenzie B, Garrick MD: Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 289: 981-986 (2005)

77. Malaguarnera L, Madeddu R, Palio E, Arena N, Malaguarnera M: Heme oxygenase-1 levels and oxidative stress-related parameters in non-alcoholic fatty liver disease patients. J Hepatol 42: 585-591 (2005)

78. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M: Nonalcoholic Fatty Liver, Steatohepatitis, and the Metabolic Syndrome. Hepatology 37: 917-923 (2003)

79. McCullough AJ: Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. J Clin Gastroenterol 40: 17-29 (2006)

80. Mendler MH, Turlin B, Moirand R, Jouanolle AM, Sapey T, Guyader D, Le Gall JY, Brissot P, David V, Deugnier Y: Insulin resistance–associated hepatic iron overload. Gastroenterology 117: 1-10 (1999)

81. Mensink RP, Katan MB: Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. Arterioscler Thromb 12: 911-919 (1992)

82. Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB: Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. Am J Clin Nutr 77: 1146-1155 (2003)

83. 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 148: 2663-2668 (2007)

84. Meynard D, Kautz L, Darnaud V, Canonne-Hergaux F, Coppin H, Roth MP: Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. Nat Genet 41: 478-481 (2009)

85. Moya M, Gómez-Lechón MJ, Castell JV, Jover R: Enhanced steatosis by nuclear receptor ligands: a study in cultured human hepatocytes and hepatoma cells with a characterized nuclear receptor expression profile. Chem Biol Interact 184: 376-387 (2010)

86. Musso G, Gambino R, De MF, De Michieli F, Cassader M, Rizzetto M, Durazzo M, Fagà E, Silli B, Pagano G: Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 37: 909-916 (2003)

87. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T: Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. Blood 101: 2461-2463 (2003)

88. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T: IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormon Hepcidin. J Clin Invest 113: 1271-1276 (2004)

89. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J: Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. Science 306: 2090-2093 (2004)

90. Nemeth E, Roetto A, Garozzo G, Ganz T, Camaschella C: Hepcidin is decreased in TFR2 hemochromatosis. Blood 105: 1803-1806 (2005)

91. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH 2003: Nonalcoholic Steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference. Hepatology 37: 1202-1219 (2003)

92. Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N, Cassader M, David E, Cavallo-Perin P, Rizzetto M: Non-alcoholic steatohepatitis, insulin resistance and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. Hepatology 35: 367-372 (2002)

93. Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis JI, Bogdanos D, Tsimirika K, MacFarlane J, Goldberg YP, Sakellaropoulos N, Ganz T, Nemeth E: Hepcidin in iron overload disorders. Blood 105: 4103-4105 (2005)

94. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T: Hepcidin, a Urinary Antimicrobial Peptide Synthesized in the Liver. The Journal of Biological Chemistry 276: 7806-7810 (2001)

95. Petrides PE: Spurenelemente. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg): Biochemie & Pathobiochemie. 7. Auflage, Springer, Berlin Heidelberg New York, S. 698-719 (2003)

96. Pietrangelo A: Hereditary hemochromatosis. Biochimica et Biophysica Acta 1763: 700-710 (2006)

97. Pietrangelo A: Hemochromatosis: An Endocrine Liver Disease. Hepatology 46: 1291-1301 (2007)

98. 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 276: 7811-7819 (2001)

99. Piperno A, Vergani A, Salvioni A, Trombini P, Vigano M, Riva A, Zoppo A, Boari G, Mancia G: Effects of venesections and restricted diet in patients with the insulin-resistance hepatic iron overload syndrome. Liver Int 24: 471-476 (2004)

100. Postic C, Girard J: Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. J Clin Invest 118: 829-838 (2008).

101. Ramey G, Deschemin JC, Vaulont S: Cross-talk between the mitogen activated protein kinase and bone morphogenetic protein/hemojuvelin pathways is required for the induction of hepcidin by holotransferrin in primary mouse hepatocytes. Haematologica 94: 765-772 (2009)

102. Ramm GA, Ruddell GR: Hepatotoxicity of Iron Overload: Mechanisms of Iron-Induced Hepatic Fibrogenesis. Semin Liver Dis 25: 433-449 (2005)

103. Robb A, Wessling-Resnick M: Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin. Blood 104: 4294-4299 (2004)

104. Schmidt PJ, Toran PT, Giannetti AM, Bjorkman PJ, Andrews NC: The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. Cell Metab 7: 205-214 (2008)

105. Schwarz P, Kübler JA, Strnad P, Müller K, Barth TF, Gerloff A, Feick P, Peyssonnaux 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 61: 193-201 (2012)

106. Silvestri L, Pagani A, Nai A, De Domenico I, Kaplan J, Camaschella C: The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. Cell Metab 8: 502-511 (2008)

107. Siri-Tarino PW, Sun Q, Hu FB, Krauss RM: Saturated fatty acids and risk of coronary heart disease: modulation by replacement nutrients. Curr Atheroscler Rep 12: 384-390 (2010)

108. Spady DK, Dietschy JM: Dietary saturated triacylglycerols suppress hepatic low density lipoprotein receptor activity in the hamster. Proc Natl Acad Sci U S A 82: 4526-4530 (1985)

109. Strnad P, Schwarz P, Rasenack MC, Kucukoglu O, Habib RI, Heuberger D, Ehehalt R, Müller MW, Stiehl A, Adler G, Kulaksiz H: Hepcidin is an antibacterial, stress-inducible peptide of the biliary system. PLoS One 6: e16454 (2011)

110. Sullivan S: Implications of diet on nonalcoholic fatty liver disease. Curr Opin Gastroenterol 26: 160-164 (2010)

111. 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 103: 10289-10293 (2006)

112. Tsuchiya H, Akechi Y, Ikeda R, Nishio R, Sakabe T, Terabayashi K, Matsumi Y, Ashla A A, Hoshikawa Y, Kurimasa A, Suzuki T, Ishibashi N, Yanagida S, Shiota G: Suppressive effects of retinoids on iron-induced oxidative stress in the liver. Gastroenterology 136: 341-350 (2009)

113. Tsuchiya H, Sakabe T, Akechi Y, Ikeda R, Nishio R, Terabayashi K, Matsumi Y, Hoshikawa Y, Kurimasa A, Shiota G: A close association of abnormal iron metabolism with steatosis in the mice fed a choline-deficient diet. Biol Pharm Bull 33: 1101-1104 (2010)

114. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Bugianesi E, Marchesini G, Manzini P, Vanni E, Fargion S: Iron depletion by phlebotomy improves insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia: evidence from a case-control study. Am J Gastroenterol 102: 1251-1258 (2007)

115. Vial G, Dubouchaud H, Couturier K, Cottet-Rousselle C, Taleux N, Athias A, Galinier A, Casteilla L, Leverve XM: Effects of a high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver. J Hepatol 54: 348-356 (2011)

116. Wallace DF, Summerville L, Crampton EM, Frazer DM, Anderson GJ, Subramaniam VN: Combined deletion of Hfe and transferrin receptor 2 in mice leads to marked dysregulation of hepcidin and iron overload. Hepatology 50: 1992-2000 (2009)

117. 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 2: 399-409 (2005)

118. Wessling-Resnick M: Iron imports. III. Transfer of iron from the mucosa into circulation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 290: G1-6 (2005)

119. West AP Jr, Giannetti AM, Herr AB, Bennett MJ, Nangiana JS, Pierce JR, Weiner LP, Snow PM, Bjorkman PJ: Mutational analysis of the transferrin receptor reveals overlapping HFE and transferrin binding sites. J Mol Biol 313: 385-397 (2001)

120. Xia Y, Babitt JL, Sidis Y, Chung RT, Lin HY: Hemojuvelin regulates hepcidin expression via a selective subset of BMP ligands and receptors independently of neogenin. Blood 111: 5195-5204 (2008)

121. Yan E, Durazo F, Tong M, Kurt Hong: Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis, Identification, Progression, and Management. Nutrition Reviews 65: 376-384 (2007)

122. Yanagitani A, Yamada S, Yasui S, Shimomura T, Murai R, Murawaki Y, Hashiguchi K, Kanbe T, Saeki T, Ichiba M, Tanabe Y, Yoshida Y, Morino S, Kurimasa A, Usuda N, Yamazaki H, Kunisada T, Ito H, Murawaki Y, Shiota G: Retinoic Acid Receptor Dominant Negative Form Causes Steatohepatitis and Liver Tumors in Transgenic Mice. Hepatology 40: 366-375 (2004)

123. Yki-Järvinen H: Nutritional modulation of nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance: human data. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 13: 709-714 (2010)

124. Young B, Zaritsky J: Hepcidin for clinicians. Clin J Am Soc Nephrol 4: 1384-1387 (2009)

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Hasan Kulaksiz für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren und insbesondere für seine große Unterstützung und enge Betreuung.

Frau Peggy Schwarz danke ich für die geduldige Einarbeitung in die Methoden, die Beantwortung vieler Fragen und für die große Hilfsbereitschaft.

Ich danke weiterhin Frau Katrin Müller für ihre tatkräftige Unterstützung und enge, freundschaftliche Zusammenarbeit während meiner Labortätigkeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. med. Pavel Strnad für die freundliche Hilfe während meiner Tätigkeit im Labor und während der Ausarbeitung meiner Daten.

Ein besonderes Dankeschön gilt der Abteilung Innere Medizin I der Universitätsklinik Ulm und dem ehemaligen Leiter Herrn Prof. Dr. med. Guido Adler für die Bereitstellung von Forschungsmitteln, Geräten und Materialien.

Ich möchte aber vor allem meiner Mutter und meinem Vater danken, die mich mein gesamtes Leben liebevoll unterstützt, gefördert und getragen haben. Ohne diese beiden einzigartigen Menschen wäre Alles nicht möglich gewesen.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Rayan Issa Habib	
Geburtsdatum	03.10.1983	
Gerburtsort	Dernbach	
Familienstand	ledig	
Eltern	Marita Habib	Betriebswirtin
	Dr. Amir Habib	Chefarzt der Inneren Abteilung des DRK Krankenhauses Diez

SCHULAUSBILDUNG

1990-1994	Karl-von-Ibell – Grundschule	Diez
1994-1996	Orientierungsstufe	Diez
1996-2003	Sophie-Hedwig-Gymnasium	Diez
Abschluss:	Allgemeine Hochschulreife/ Abitur (2,2)	

ZIVILDIENST

Juli 2003 - April 2004	Zivildienst als Rettungssanitäter beim DRK Kreisverband Rhein-Lahn

STUDIUM

2004-2005	Chemiestudium (auf Diplom) an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
2005-2007	Medizinstudium an der Albert-Szent-Györgyi-Universität Szeged, Ungarn
Abschluss:	Physikum (1,44)
Seit 2007	Medizinstudium an der Universität Ulm
Abschluss:	voraussichtlich 2. Staatsexamen 05/2012

EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

Aufgrund dieser Promotionsarbeitsarbeit und Mitarbeit bei weiteren Projekten wurden folgende Publikationen erstellt:

1. **Habib RI**, Müller K, Schwarz P, Fritz S, Strnad P, Adler G, Kulaksiz H: Gestörte Hepcidin-Regulation bei Steatosis hepatis: Ursache der Hyperferritinämie. Z Gastroenterol 48: P411 (2010)

2. Strnad P, Schwarz P, Rasenack MC, Kucukoglu O, **Habib RI**, Heuberger D, Ehehalt R, Müller MW, Stiehl A, Adler G, Kulaksiz H: Hepcidin is an antibacterial, stress-inducible peptide of the biliary system. PLoS One 6: e16454 (2011)