

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaft
Professur für molekulare Ernährungsforschung, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Uwe Wenzel
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Untersuchung zur Rolle von Nrf2-Agonisten in der Regulation der Eisenhomöostase

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. troph.)

im Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und
Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Julia Martin

aus Wertheim

Gießen, 2017

Mit Genehmigung des Fachbereichs Agrarwissenschaften,
Ökotoxikologie und Umweltmanagement der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Prüfungskommission

1. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Wenzel
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Jürgen Stein
Prüfer: Prof. Dr. Gunter Eckert
Prüfer: Prof. Dr. Klaus Eder
Vorsitzende: Prof. Dr. Gertrud Morlock

Tag der Disputation: 26.04.2017

Der Mensch muss bei dem Glauben verharren,
daß das Unbegreifliche begreiflich sei:
Er würde sonst nicht forschen.

Johann Wolfgang von Goethe

Meiner Familie

Erklärung

gemäß der Promotionsordnung des Fachbereichs 09 vom 07. Juli 2004 § 17 (2)

Ich Erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

(Datum)

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungen	VI
Tabellen	VIII
Abkürzungen	IX
1. Einleitung	1
1.1 Eisen und seine biologische Bedeutung.....	1
1.2 Eisenhomöostase im Menschen	2
1.2.1 Intestinale Eisenabsorption	3
1.2.2 Zelluläre Eisenaufnahme und intrazellulärer Transport	5
1.2.3 Eisenspeicher	6
1.2.4 Eisenexport durch Ferroportin und Transport im Plasma	7
1.2.5 Intrazelluläre Eisenhomöostase.....	8
1.3 Heparin als systemischer Regulator der Eisenhomöostase.....	9
1.3.1 Heparin-Regulation durch den Eisenstatus.....	10
1.3.2 Heparin-Regulation durch Inflammation	13
1.3.3 Heparin-Regulation durch Erythropoese und Hypoxie	15
1.3.4 Eisenregulationsstörungen und Heparin.....	16
1.4 Anämie	17
1.4.1 Eisenmangelanämie.....	18
1.4.2 Anämie der chronischen Erkrankungen.....	19
1.4.3 Mischformen der Anämie	20
1.4.4 Therapie der Anämie	21
1.5 Nrf2-Signalweg.....	22
1.5.1 Nrf2 downstream Target Hämoxxygenase 1 (HO-1)	24
1.5.2 Nrf2-Aktivator Dimethylfumarat (DMF)	25
1.5.3 Nrf2-Aktivator 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ Prostaglandin J ₂ (15d-PGJ ₂)	26
1.5.4 Nrf2-Aktivator Sulforaphan (SFN).....	26
1.6 Die Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Oncostatin M (OSM).....	27

2.	Zielsetzung	29
3.	Material und Methoden.....	30
3.1	Material.....	30
3.1.1	Chemikalien	30
3.1.2	Einwegmaterialien	31
3.1.3	Geräte und Zubehör	32
3.1.4	Verwendete Kits.....	33
3.1.5	Verwendete Enzyme und Reagenzien	33
3.1.6	Verwendete Puffer und Lösungen	34
3.2	Zellbiologische Methoden.....	34
3.2.1	Kultivierung und Passagieren von adhären-ten Zellen	34
3.2.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	35
3.2.3	Lebendzellzahlbestimmung mit Trypanblau.....	36
3.2.4	Isolierung humaner Monozyten aus Leukozytenkonzentraten und Differenzierung zu Makrophagen	36
3.2.5	Aussäen der Zellen (HepG2)	37
3.2.6	Behandeln der Zellen (HepG2)	37
3.2.7	Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA	38
3.2.8	Transfektion von Zellen mit siRNA.....	38
3.2.9	Reportergenassay (Luciferaseassay).....	39
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	39
3.3.1	Agarosegelelektrophorese.....	39
3.3.2	Transformation von E.coli.....	40
3.3.3	Isolierung von Plasmid-DNA	40
3.3.4	Kontrollverdau der Plasmid-DNA.....	41
3.3.5	Zielgerichtete Mutagenese	41
3.3.6	Isolierung und Fällung von RNA aus Zellen und anschließende cDNA-Synthese	43
3.3.7	Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).....	44
3.4	Proteinbiochemie.....	46
3.4.1	Zelllyse für die zytoplasmatische und nukleäre Proteinernte	46
3.4.2	Zelllyse für Gesamtproteinernte.....	46
3.4.3	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	47
3.4.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	47
3.4.4	Western Blot und Immundetektion.....	48

3.5	Statistische Auswertung	49
4.	Ergebnisse	50
4.1	Untersuchung der Hpcidin-Expression	50
4.1.1	Einfluss der Zytokine IL-6 und OSM auf die Hpcidin-Expression	50
4.1.2	Untersuchung von Gegenregulatoren der Hpcidin-Expression	51
4.1.3	Untersuchung von Gegenregulatoren der Hpcidin-Expression in Makrophagen	54
4.1.4	Beteiligung von STAT3 an Induktion und Hemmung der Hpcidin-Expression	55
4.1.5	Untersuchung der Beteiligung von Nrf2 an der Hpcidin-Regulation	57
4.1.6	Untersuchung der Beteiligung von HO-1 an der Hpcidin-Expression	64
4.1.7	Untersuchung der Beteiligung des BMP-6-Signalwegs an der Hemmung der Hpcidin-Expression	67
4.2	Untersuchung der Auswirkung von DMF, SFN und 15d-PGJ ₂ auf weitere Parameter des Eisenstoffwechsels	69
4.2.1	Untersuchung der Beteiligung von Nrf2 an der Induktion von Ferroportin und Ferritin mRNA-Expression in HepG2-Zellen	71
4.2.2	Untersuchung der Beteiligung von HO-1 an der Ferroportin- und Ferritin-Induktion durch DMF und 15d-PGJ ₂ in HepG2-Zellen	74
5.	Diskussion	76
5.1	Einfluss von Zytokinen auf die Hpcidin-Expression	76
5.2	Möglichkeiten einer Beeinflussung der Zytokin-induzierten Hpcidin-Expression	77
5.2.1	Beeinflussung des IL-6/STAT3-Signalwegs	78
5.2.2	Beeinflussung des BMP-Signalwegs	79
5.3	Die Aktivierung von Nrf2 und dessen Auswirkung auf Parameter des Eisenstoffwechsels ..	81
5.3.1	Nrf2 und die Hpcidin-Expression	82
5.3.2	Nrf2 und weitere Eisenstoffwechselfparameter	83
5.3.3	Das Nrf2-Downstreamtarget HO-1 und dessen Einfluss auf die Hpcidin- Expression und weitere Parameter des Eisenstoffwechsels	85
5.4	Weitere Möglichkeiten der Beeinflussung der Hpcidin-Expression	86
5.5	Klinische Relevanz	88
6.	Zusammenfassung	92
7.	Summary	94
8.	Literaturverzeichnis	96

Inhaltsverzeichnis

9.	Danksagung	118
10.	Curriculum Vitae	120

Abbildungen

Abbildung 1: Eisenverteilung im menschlichen Körper	3
Abbildung 2: Eisenaufnahme in unterschiedlichen Zelltypen.....	4
Abbildung 3: Molekulare Struktur von Heparin.....	10
Abbildung 4: Mechanismen der Heparin Gen-Expression in Hepatozyten	11
Abbildung 5: Molekulare Mechanismen der inflammatorisch-vermittelten Heparin-Expression	13
Abbildung 6: Mechanismus der Interaktion von Nrf2 und Keap1.....	23
Abbildung 7: Molekularstruktur von DMF, SFN und 15d-PGJ ₂	26
Abbildung 8: Einfluss von IL-6 und OSM auf die Heparin-Expression.....	50
Abbildung 9: Effekte von DMF, SFN und 15d-PGJ ₂ auf die Heparin-Promotoraktivität	51
Abbildung 10: Hemmung der Zytokin-induzierten Heparin-Promotoraktivität durch DMF, SFN und 15d-PGJ ₂	52
Abbildung 11: Hemmung der Zytokin-induzierten Heparin mRNA-Expression durch DMF, SFN und 15d-PGJ ₂	53
Abbildung 12: Hemmung der IL-6-induzierten Heparin Protein-Expression durch DMF, SFN und 15d-PGJ ₂	54
Abbildung 13: Heparin-Expression in Typ1 Makrophagen	55
Abbildung 14: Hemmung der IL-6-induzierten Heparin-Promotoraktivität durch STAT3-Inhibierung	56
Abbildung 15: pSTAT-Proteinlevel nach 16h Behandlung mit Zytokinen, SFN, DMF und 15d-PGJ ₂	57
Abbildung 16: Induktion von Nrf2 durch DMF und 15d-PGJ ₂	58
Abbildung 17: Versuch der Hemmung der Nrf2-Translokation mit Trigonellin	59
Abbildung 18: Auswirkung der Nrf2-Überexpression auf die Heparin-Expression.....	60
Abbildung 19: Überexpression von Nrf2 und dessen Translokation in den Nucleus.....	61
Abbildung 20: Knockdown von Nrf2 und Auswirkung auf die Heparin-Expression.....	62
Abbildung 21: ARE-Mutation im Heparin-Promotor und Auswirkung auf die Heparin-Expression... ..	64
Abbildung 22: Hemmung von HO-1 durch ZnPP	65
Abbildung 23: HO-1 Proteinexpression durch ZnPP.....	66

Abbildung 24: Einfluss des HO-1-Knockdowns auf die Heparin-Expression	67
Abbildung 25: pSMAD1/5/8-Protein-Expression.....	68
Abbildung 26: Einfluss des BMP-RE2 auf die Heparin-Expression	69
Abbildung 27: Effekt von DMF, SFN und 15d-PGJ ₂ auf die Ferroportin und Ferritin-Expression in HepG2-Zellen.....	70
Abbildung 28: Effekt von DMF und 15d-PGJ ₂ auf die Ferroportin und Ferritin-Expression in Typ1 Makrophagen	71
Abbildung 29: Knockdown von Nrf2 und dessen Effekt auf die Induktion von Ferroportin und Ferritin durch DMF, SFN und 15d-PGJ ₂	73
Abbildung 30: Effekte des HO-1 k.d. auf die Ferroportin- und Ferritin-Induktion durch DMF und 15d- PGJ ₂	75
Abbildung 31: NAC hebt die 15d-PGJ ₂ -induzierte Heparin-Hemmung auf	88

Tabellen

Tabelle 1: Beispiele von Eisen-enthaltenden Proteinen [10, 11]	2
Tabelle 2: Minimale Hämoglobin- und Hämatokritwerte zur Abklärung einer Anämie [170]	18
Tabelle 3: Laborwerte bei IDA, ACD und Mischtyp IDA/ACI.....	20
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien	30
Tabelle 5: Verwendete Einwegmaterialien	31
Tabelle 6: Verwendete Geräte und Zubehör.....	32
Tabelle 7: Verwendete Kitsysteme.....	33
Tabelle 8: Verwendete Enzyme und Reagenzien	33
Tabelle 9: Verwendete Puffer und Lösungen.....	34
Tabelle 10: Verwendete Medien.....	35
Tabelle 11: Verwendete Plasmide.....	38
Tabelle 12: Kontrollverdau nach Transformation	41
Tabelle 13: PCR-Programm für zielgerichtete Mutagenese	42
Tabelle 14: Zusammensetzung Ansatz für zielgerichtete Mutagenese.....	42
Tabelle 15: Verwendete Primersequenzen für zielgerichtete Mutagenese	42
Tabelle 16: Zusammensetzung der cDNA Synthese	43
Tabelle 17: pRT-PCR Ansatz pro Probe.....	44
Tabelle 18: Verwendetes qRT-PCR Programm	45
Tabelle 19: Verwendete Primer-Oligonukleotide für die Expressionsanalyse	45
Tabelle 20: Zusammensetzung von Sammel- (4%) und Trenngel (10%)	48
Tabelle 21: Verwendete primäre Antikörper	49
Tabelle 22: Verwendete sekundäre Antikörper	49

Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
15d-PGJ ₂	15-Deoxy-Δ ^{12,14} -prostaglandin J ₂
Abb	Abbildung
ACI	Anämie der chronischen Inflammation
APS	Ammoniumperoxisulfat
ARE	Antioxidant response element
Bach1	Broad complex-Tramtrack-Bric-a-brac (BNB) and Cap'n`Collar (CNC) homolog1
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Komplementär DNA
CED	Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen
CF	Zytoplasmafraktion
CO	Kohlenstoffmonooxid
CRP	C-Reaktives Protein
C/EBPα	CCAAT/enhancer binding protein alpha
DcytB	Duodenales Cytochrom B
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMF	Dimethylfumarat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT-1	divalent metal-iron transporter 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoetin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERFE	Erythroferron
ERK1/2	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase 1/2
et al	Und andere
FAE	Fumarsäureester
FCS	Fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GDF15	Waschstums- und Differenzierungsfaktor 15
h	Stunde

Abkürzungen

HCP-1	Heme carrier protein 1
HFE	Hereditäre Hämochromatose/ High Iron Fe
HIF	Hypoxia-induzierter Faktor
HJV	Hämojuvelin
HO-1	Hämoxygenase-1
IL-6	Interleukin-6
IRE	Eisen-regulierende Elemente (Iron-responsive elements)
IRIDA	Eisen-refraktäre Eisen-defizitäre Anämie
IRP	Eisen-regulatorische Proteine (Iron regulatory proteins)
ISC	Eisen-Schwefel-Cluster (iron-sulfur-cluster)
IV	intravenös
JAK	Januskinase
k.d.	Knockdown
kb	Kilobasen
KEAP1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LB	Luria-Bertani
LIF	Leukaemia Inhibitory Factor
M	molar
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
Mut	Mutiert/Mutation
NF	Kernfraktion/Nukleärfraktion
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
Nrf2	nuclear factor erythroid 2-related factor
OSM	Oncostatin M
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
RE	Response Element
RES	Reticuloendotheliales System
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute ("rounds per minute")
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Quantitative "real time" Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Abkürzungen

sek	Sekunde
SFN	Sulforaphan
siRNA	Small interfering RNA
SMAD	Mothers against decapentaplegic (SMA and MAD related protein)
STAT	Signal transducer and activator of transcription
STEAP1	Six-transmembrane epitheliale antigen of the prostate
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TfR1	Transferrin-Rezeptor 1
TfR2	Transferrin-Rezeptor 2
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor beta (transforming growth factor beta)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	20 Polyoxeethylen-Sorbitan-Monolaurat
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen
α	anti

1. Einleitung

1.1 Eisen und seine biologische Bedeutung

Eisen besitzt die Fähigkeit, zwischen zwei Oxidationszuständen, Fe^{2+} und Fe^{3+} , zu wechseln, weshalb diesem essentiellen Spurenelement eine besondere Rolle für den menschlichen Organismus zukommt. Durch diese Redox-Eigenschaft ist Eisen Bestandteil vieler Proteine, die an einer Vielzahl von wesentlichen biochemischen Reaktionen, wie Sauerstofftransport oder Elektronentransport in der Atmungskette (aerobe Energiegewinnung), beteiligt sind (Tabelle 1). Dabei gibt es drei größere Klassen von Proteinen, die Eisen enthalten: Eisen-Schwefel-Cluster Proteine (*Iron-sulfur Cluster*, ISCs), die chemische Reaktionen katalysieren oder Komponenten der Elektronentransportkomplexe sind [1], Häm-enthaltende Proteine, die Funktionen im Sauerstofftransport erfüllen [2] und Eisen-enthaltende Enzyme, die an einer Vielfalt von Reaktionen beteiligt sind [3]. Die Erythropoese stellt beim Menschen dabei den biologischen Prozess mit dem höchsten Eisenbedarf dar, da Eisen für die Synthese von Häm, einem Porphyrinmolekül mit Fe^{2+} als Zentralatom, benötigt wird.

Obwohl Eisen bei all diesen Reaktionen eine wichtige Rolle spielt, hat es zugleich toxische Eigenschaften, wenn es ungebunden als freies Eisen vorliegt. Die Redox-Eigenschaft von Eisen zwischen den Oxidationsstufen zu wechseln, birgt die Gefahr der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, kurz ROS genannt. Freies Eisen katalysiert dabei die Fentonreaktion, wobei Fe^{2+} mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Lipidperoxiden zu hochreaktiven OH^\bullet , LO^\bullet und LOO^\bullet Radikalen reagiert [4]. Diese können zu DNA-Schädigungen, Lipidperoxidation oder abweichenden posttranslationalen Proteinmodifikationen und damit zu Zell- und Gewebeschäden führen [5–7].

Um solche toxischen Eisen-Effekte sowohl intra- als auch extrazellulär zu vermeiden, verfügt der Körper über Mechanismen, die das Vorliegen von freiem Eisen minimieren. Eisen, das nicht Bestandteil von funktionellen Proteinen ist, wird dafür an Transport- oder Speicherproteine in einer nicht toxischen Form gebunden [4]. Im Blut liegt Eisen zum Transport in oxidiertem Form (Fe^{3+}) an Transferrin gebunden vor [8], während es in der Zelle an das Eisenspeicherprotein Ferritin gebunden wird.

In der Nahrung kommt Eisen in zwei Formen vor: Dem anorganischen nicht-Häm Eisen und dem Häm-Eisen. In anorganischer Form liegt Eisen sowohl in pflanzlichen als auch in tierischen Lebensmitteln vor, allerdings mit geringer Bioverfügbarkeit für den menschlichen Körper. Häm-Eisen trägt im Gegensatz dazu zwar nur mit 10-15% zur totalen Eisenaufnahme in der nicht-vegetarischen Bevölkerung bei. Allerdings ist die Absorption des Häm-Eisens deutlich höher als die der anorganischen Form [9].

Tabelle 1: Beispiele von Eisen-enthaltenden Proteinen [10, 11]

Funktion	Proteinbeispiel	Klasse an Eisenproteinen
Sauerstofftransport	Hämoglobin und Myoglobin	Häm
Energieproduktion/Elektronen-transfer in Mitochondrien	Atmungskette Komplex I-III Cytochrom C, Cytochrom C Oxidase, Cytochrom C Reduktase, Cytochrom B und NADH Dehydrogenase	ISC Häm
Intermediärstoffwechsel und Detoxifikation	Ribonucleotid Reductase, Aminosäure Oxidasen, Fettsäuren Desaturasen, Cytochrom P450 Familie	ISC Häm
Nukleinsäureverarbeitung und DNA Replikation	Phosphoribosyl-pyrophosphat Aminotransferase, ATP Bindeprotein E1, DNA Primase, Elongationsprotein 3	ISC
Eisenspeicher und -transport	Transferrin und Ferritin	Fe ³⁺

Aufgrund der beschriebenen ambivalenten Eigenschaften von Eisen ist der Eisen-Metabolismus im menschlichen Körper sowohl intrazellulär als auch systemisch sehr streng reguliert, um eine Eisenüberladung des Körpers und damit eine erhöhte Gefahr der ROS-Generierung zu vermeiden und gleichzeitig eine ausreichende Versorgung mit Eisen zu gewährleisten [12]. Da auch Bakterien Eisen zur Proliferation benötigen, spielt die Regulation der Eisenhomöostase auch bei der Immunabwehr eine bedeutende Rolle [10].

1.2 Eisenhomöostase im Menschen

Beim erwachsenen Menschen verfügt der Körper über etwa 3-5 g Eisen. Diese Variation kommt sowohl durch Alters- und Gewichts- als auch durch Geschlechterunterschiede zustande [13]. Bis zu 80% des Eisens, etwa 2300 mg, liegt an Hämoglobin gebunden in Erythrozyten im Blut vor. Etwa 10% des Eisens ist als Myoglobin in der Muskulatur und anderen Geweben als Enzyme oder in Cytochromen gespeichert (350 mg). Der restliche Teil des Eisens ist in Makrophagen des Retikuloendothelialen Systems (RES) (500 mg) und Hepatozyten (200 mg) in Form von Ferritin und Hämosiderin gespeichert oder liegt im Knochenmark (150 mg) vor [14, 15].

Für die erythropoetische Aktivität benötigt der Körper pro Tag etwa 20 mg Eisen, das überwiegend aus dem Recycling von alten Erythrozyten, deren Lebensdauer etwa 120 Tage beträgt, durch Makrophagen bereitgestellt wird. Durch die Abschilferung von Darmepithel- und Hautzellen sowie durch Schweißproduktion und Menstruation kommt es zu täglichen Eisenverlusten von etwa 1-2 mg [16].

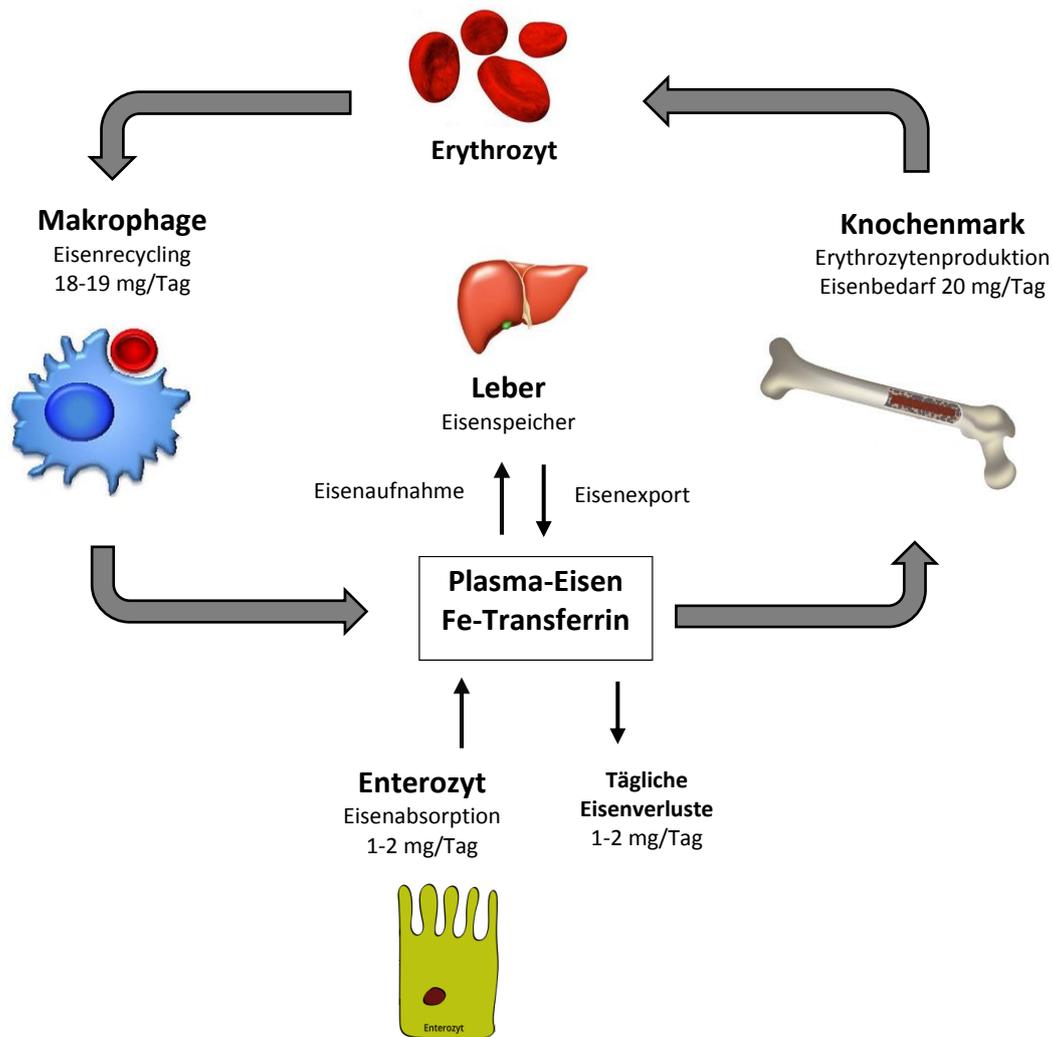


Abbildung 1: Eisenverteilung im menschlichen Körper

Der menschliche Körper benötigt eine tägliche Eisenaufnahme von ca. 25 mg, wovon 80% zur Erythropoese verwendet werden. Etwa 18-19 mg werden durch das Recycling von gealterten Erythrozyten bereitgestellt, 1-2 mg stammen aus der täglichen Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt. Modifiziert nach Yun *et al.* (2015) [14].

Dieser Verlust muss durch die Zuführung und Aufnahme von Eisen ausgeglichen werden [17] (Abbildung 1). Da es für Eisen keinen aktiven Prozess der Eisenausscheidung gibt, wird die Eisenhomöostase vor allem auf der Ebene der intestinalen Eisenabsorption reguliert [15].

1.2.1 Intestinale Eisenabsorption

Die Absorption von Eisen erfolgt im Duodenum und oberen Jejunum [18] und dient dazu, die minimalen Eisen-Verluste auszugleichen und dem Körper eben diese wieder über die Nahrung zuzuführen. Der Bedarf an Eisen beträgt dabei etwa 1-2 mg und steigt durch Blutverluste (Menstruation, Blutungen) sowie bei Schwangerschaft durch fetales Wachstum und Wachstum in der Kindheit durch die Vergrößerung des Blutvolumens an [10].

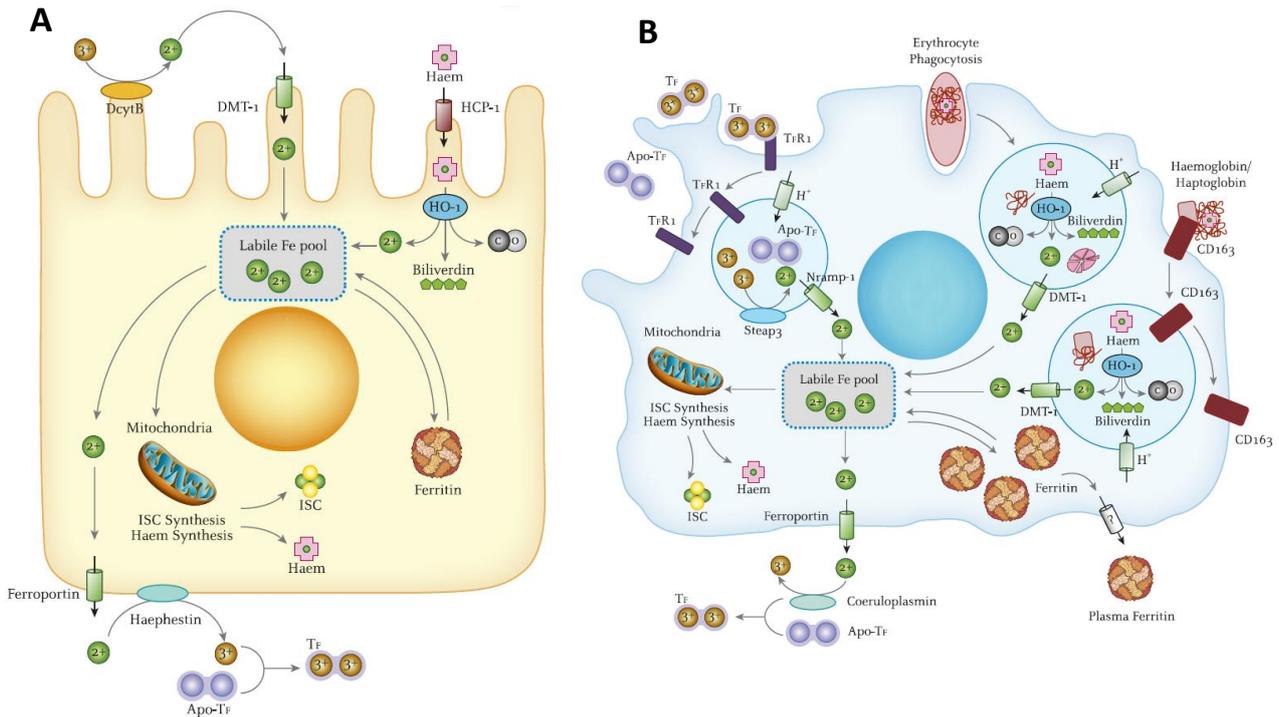


Abbildung 2: Eisenaufnahme in unterschiedlichen Zelltypen.

(A) Eisenaufnahme aus dem Darmlumen über die apikale Membran in den Enterozyten und Freisetzung von Eisen an der basolateralen Seite durch Ferroportin in den Blutkreislauf. (B) Eisenaufnahme in den Makrophagen und Freisetzung von Eisen ins Blutplasma. Modifiziert nach Evstatiev *et al.* (2011) [11].

In der Nahrung liegt Eisen in zwei Formen vor. Demensprechend erfolgt die Aufnahme von Eisen in den Enterozyten entweder als inorganisches oder als Häm-Eisen [17], wobei letzteres vor allem in Lebensmitteln tierischen Ursprungs und inorganisches Eisen überwiegend in pflanzlichen Lebensmitteln vorkommt. Die Häm-Eisen-Aufnahme trägt schätzungsweise nur zu 10-15% der totalen Eisenaufnahme bei, doch durch eine höhere Absorptionsrate macht die Aufnahme aus Häm-Eisen bei nicht-Vegetariern allerdings mindestens 40% des absorbierten Eisens aus [19, 20]. Inorganisches Nahrungseisen liegt meist in der oxidierten Form (Fe^{3+}) vor und ist vor allem bei einem pH-Wert >6 sehr unlöslich. Die Höhe an absorbiertem Eisen hängt von mehreren Faktoren ab: Dem Eisenstatus der Individuen, wobei die Absorptionsrate auf 30% ansteigen kann, und dem Gleichgewicht von Absorptionsinhibitoren und -verstärkern, die in der Nahrung vorliegen [9]. Während Phytate, Polyphenole, Calcium und Proteine aus Milch, Ei und Soja die Eisenabsorption durch Komplexbildung oder Veränderung der Löslichkeit vermindern, erhöht Ascorbinsäure durch die Fähigkeit inorganisches Eisen zu Fe^{2+} zu reduzieren die Eisenabsorption [9].

Inorganisches Eisen wird bereits im Magen durch das Vorliegen von Magensäure aus dem Lebensmittel freigesetzt und entweder chemisch durch Magensäure oder durch das Reduktaseenzym Duodenales Cytochrom B (DcytB, auch Ferrireduktase genannt) an der apikalen Membran der Darmschleimhaut zu

Fe^{2+} reduziert [21]. Ein erhöhter pH-Wert im Magen durch verminderte Magensäurebildung, beispielsweise durch Gastritis, oder eine veränderte Duodenalmukosa im Darm, beispielsweise durch chronisch entzündliche Darmerkrankungen, kann dabei zu einer reduzierten Eisenabsorption führen [22, 23]. Anschließend gelangt Fe^{2+} durch den apikalen divalenten Metalltransporter 1 (DMT-1) und die Bildung eines Protonengradienten in den Enterozyten [24] (Abbildung 2).

Häm-gebundenes Eisen wird durch das Häm Carrier Protein 1 (HCP-1), das in hohem Maße in Enterozyten exprimiert wird, durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in den Enterozyten aufgenommen [25, 26] (Abbildung 2, A). In der Zelle wird Eisen durch die Hämoxygenase-1 (HO-1) aus dem Protoporphyrinring freigesetzt und es entsteht Fe^{2+} , Biliverdin-IXa und Kohlenstoffmonoxid (CO) [27] (Abbildung 2, A).

Freies Eisen, aus beiden Eisenquellen stammend, gelangt in den Eisenpool und wird entweder in Form von Ferritin, dem Eisenspeicherprotein, gespeichert oder es gelangt für die Biosynthese von Häm und ISCs direkt in die Mitochondrien. Eine dritte Möglichkeit besteht im direkten Export von Eisen aus dem Enterozyten, wobei Fe^{2+} über den bislang einzig bekannten Eisen-Exporter Ferroportin, auch unter IREG1 bekannt, an das Plasma abgegeben wird (Abbildung 2, A) [28–30]. Da absorbierende Enterozyten eine Lebensdauer von nur zwei Tagen haben und danach in das Darmlumen abgeschiefert werden, entscheidet der basolaterale Transport über Ferroportin darüber, ob das oral aufgenommene Eisen in die Blutzirkulation gelangt oder durch die Abschilferung der Enterozyten verloren geht [31].

1.2.2 Zelluläre Eisenaufnahme und intrazellulärer Transport

Ein Mechanismus, den alle Zellen, die in den Eisenstoffwechsel involviert sind, gemeinsam haben, ist die Aufnahme von Transferrin-gebundenem Eisen. Zu diesen Zellen gehören Makrophagen des RES, Erythroblasten, die im Knochenmark vorliegen sowie Hepatozyten.

Transferrin gehört zu den wichtigsten Eisenbindungsproteinen und ist ein 80 kD großes Glycoprotein, das im Plasma zirkuliert [32]. Ein bis zwei Eisen-Ionen sind dabei reversibel mit hoher Affinität an Transferrin gebunden [33] und die intrazelluläre Aufnahme erfolgt über den Transferrin-Rezeptor 1 (TfR1), der auf allen am Eisenstoffwechsel beteiligten Zellen exprimiert wird [34, 35]. In Abbildung 2, B ist die Transferrin-Aufnahme am Beispiel von Makrophagen dargestellt. Nach Bindung von Eisen-gebundenem Transferrin an den TfR1 wird dieser Komplex endozytiert und es entstehen frühe Endosome. Durch Konformationsänderung des Transferrins bei niedrigerem pH-Wert im Endosom, der durch ATP-abhängige Protonenpumpen erzeugt wird, wird das Eisen wieder freigesetzt, durch die Metalloreduktase Steap1 zu Fe^{2+} reduziert und über den DMT-1 Transporter in der Endosommembran ins Zytosol transportiert [35]. Der TfR1-Transferrin-Komplex gelangt zurück auf die Zelloberfläche, wo

es durch höheren pH-Wert zur Freisetzung des Eisen-unbeladenen Transferrins (Apo-Transferrin) vom Rezeptor kommt [35] (Abbildung 2, B).

Eine weitere Form der Eisen-Aufnahme in Makrophagen besteht in der Form von Hämoglobin, das im Plasma an das Akut-Phase-Protein Haptoglobin gebunden wird. Durch den Rezeptor CD163, der stark auf der Membran von Makrophagen exprimiert wird [36], kommt es zu einer Bindung von CD163 mit dem Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex und schließlich zu dessen Endozytose [37] (Abbildung 2, B). Dieser Prozess spielt bei der Hämolyse, bei der die Erythrozytenmembran zerstört und dadurch das Hämoglobin in das Plasma übertritt, eine wichtige Rolle [36].

Eisen-Recycling spielt im Eisenstoffwechsel eine maßgebliche Rolle. Um das Eisen von gealterten Erythrozyten wieder zu verwerten, werden diese von Makrophagen in der Milz, in der Leber und im Knochenmark durch Phagozytose aufgenommen [38] (Abbildung 2, B). Makrophagen erkennen dabei gealterte Erythrozyten an einer Reihe von Markern auf der Oberfläche [39]. Nach der Phagozytose unterliegen die Erythrozyten in Lysosomen einer Hämolyse. Häm-gebundenes Eisen wird durch HO-1 zu freiem Eisen (Fe^{2+}) und über den DMT-1 Transporter in das Zytoplasma freigesetzt.

Wie genau der Transport von Eisen von der apikalen zur basolateralen Membran und innerhalb der Zelle erfolgt, ist bisher nicht vollständig geklärt [40]. Es wird angenommen, dass das zytosolische Eisen-Chaperon PCBP1 (*Poly (rC) binding protein 1*) Eisen aufnimmt und an Ferritin abgibt [41]. Ein weiterer Ansatzpunkt, der aus Studien mit reifenden Erythrozyten stammt, die eine hohe Menge an Eisen aufnehmen, weist darauf hin, dass Transferrin-enthaltende Endosome das Eisen direkt an die Mitochondrien abgeben und somit das Sauerstoff-reiche Zytosol umgehen [42]. Der Transport durch die Mitochondrienmembran erfolgt durch Mitoferrin 1 und 2 [43], wodurch Eisen an den Hauptort der Häm- und ISC-Synthese gelangt.

1.2.3 Eisenspeicher

Hepatozyten und Makrophagen sind der Hauptort der Eisenspeicherung. In diesen Zellen wird Eisen intrazellulär im Zytoplasma und zu einem geringen Teil auch in Mitochondrien, in Ferritin gebunden und gespeichert, um das Vorliegen von Redox-sensitivem und dadurch toxischem freien Eisen zu minimieren. Ferritin ist ein ubiquitär vorkommendes Protein, das aus zwei Untereinheiten aufgebaut ist, wobei H- (*heavy*) und L-Untereinheiten (*light*) unterschieden werden. 24 von diesen Untereinheiten stellen zusammen die kugelförmige Apoferrinhülle dar. Die H- und L-Untereinheiten können zu unterschiedlichen Verhältnissen am Aufbau von Apoferritin beteiligt sein [44]. Ein Ferritin-Molekül kann bis zu etwa 4500 Eisenionen (Fe^{3+}) zusammen mit Sauerstoffatomen aufnehmen und im Kern als Fe_2O_3 speichern. Dabei besitzt die H-Untereinheit eine Ferroxidase-Aktivität, um Fe^{2+} zu Fe^{3+} zu

oxidieren und im Inneren der Ferritinhülle zu speichern [45]. Bei zellulär niedrigen Eisenspiegeln kann Eisen aus Ferritin freigesetzt werden, wobei der Prozess bislang nicht vollständig aufgeklärt ist.

Ferritin wird sowohl auf DNA- (über die ARE-Sequenz, Erklärung siehe Nrf2), als auch auf mRNA-Ebene reguliert [46], [47]. Während Entzündungen, Infektionen, oxidativer Stress und Eisenüberladung zu einer erhöhten Ferritinakkumulation in der Zelle führen, wird Ferritin durch einen Eisenmangel gehemmt, um Eisen verfügbar zu machen [47].

Obwohl Ferritin vorwiegend dazu dient, Eisen in Zellen zu speichern, liegt ein kleiner Teil auch im Plasma vor. Es gibt Hinweise darauf, dass Ferritin von Makrophagen, Hepatozyten und Kupfferzellen an das Blut abgegeben werden kann, doch die genauen Transportwege sind nicht abschließend geklärt [48]. Serum-Ferritin ist, im Vergleich zu intrazellulärem Ferritin, im Kern Eisen-arm. Die physiologische Bedeutung von Ferritin im Plasma ist nicht vollständig geklärt. Es scheint einem effizienten Eisentransport im Körper zu dienen [49, 50]. Die Bestimmung der extrazellulären Ferritinkonzentration findet in der Medizin Anwendung. Eine niedrige Ferritinkonzentration gibt dabei spezifisch Hinweis auf eine Eisenverarmung [51]. Darüber hinaus ist Ferritin ein Akut-Phase-Protein, das durch akute und chronische Entzündungen erhöht wird [52, 53].

Eine weitere Form der Eisenspeicherung findet durch das Eisenspeicherprotein Hemosiderin statt. Während es unter physiologischen Bedingungen nur in geringem Maße vorkommt, steigt es während einer Eisenüberladung stark an und spielt dabei eine protektive Rolle. Hemosiderin entsteht als eine Art Abbauprodukt von Ferritin nach dessen lysosomalen Abbau, wobei der genaue Ablauf bislang nicht genau aufgeklärt ist [54].

1.2.4 Eisenexport durch Ferroportin und Transport im Plasma

Wie bereits erwähnt, ist Ferroportin (auch bekannt als SCL40A1, Fpn1, MTP1 oder IREG1) der einzig bislang bekannte Eisentransporter, der freies Eisen (Fe^{2+}) aus der Zelle durch die Membran transportiert [29]. Dieser wird auf allen Zellen exprimiert, die Eisen aus den Zellen in das Plasma abgeben: Auf der basolateralen Membrane der duodenalen Enterozyten, der Membrane der RES Makrophagen, Hepatozyten und der Plazentazellen. Die Regulation der Ferroportin-Expression ist komplex und findet auf transkriptioneller, posttranskriptioneller und posttranslationaler Ebene statt und variiert je nach Zelltyp, um den systemischen Eisenfluss flexibel in unterschiedlichen Situationen kontrollieren zu können [55]. In Makrophagen induziert Häm, sowie die Aktivierung von Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) die Transkription von Ferroportin mRNA [56], während Eisen selbst die Translation von Ferroportin mRNA in Makrophagen erhöht. Darüber hinaus wird die Präsenz von Ferroportin posttranslational durch ein in der Leber gebildetes Peptidhormon reguliert, dem sogenannten Hepcidin, dessen Bindung an Ferroportin zur Internalisation und Degradation des

Transporters führt [28]. Diese Regulation stellt die wichtigste Regulation im Eisenstoffwechsel dar, weshalb auf das Peptidhormon Hepcidin genauer in Kapitel 1.3 eingegangen wird.

Bislang ist wenig bekannt über den Mechanismus, durch den Eisen durch Ferroportin transportiert wird [55]. Nachdem zweiwertiges Eisen durch den multitransmembranen Eisenexporter Ferroportin über die Membran transportiert wurde, wird es durch die im Serum zirkulierende Ferroxidase Ceruloplasmin und dessen intestinalen Homolog Haephaestin, die sich auf der Membranoberfläche von Enterozyten befinden, zu Fe^{3+} oxidiert (Abbildung 2 A,B) [57, 58]. In seiner oxidierten Form kann Eisen dann an das Plasma Transportprotein Transferrin gebunden werden [59].

Transferrin wird in der Leber synthetisiert und anschließend in die Blutzirkulation abgegeben. Es ist ein Glykoprotein, das Fe^{3+} mit hoher Affinität reversibel binden kann und je zwei Bindungsstellen für Fe^{3+} -Ionen aufweist (Fe_2Tf) [60]. Man unterscheidet drei Transferrin-Ladungszustände: Apo-Transferrin (apo-Tf), wenn Transferrin ohne gebundenes Eisen vorliegt, „monoferric“ Transferrin, wenn ein einzelnes Eisen-Ion gebunden ist, und holo-Transferrin (holo-Tf), wenn zwei Eisen-Ionen an Transferrin gebunden sind [61].

Die Aufnahme von Transferrin in die Zelle erfolgt wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben.

Nur etwa 30% des zirkulierenden Transferrins ist mit Eisen beladen, so dass im Falle einer Eisenüberladung eine ausreichende Pufferkapazität im Blut vorhanden ist [62].

1.2.5 Intrazelluläre Eisenhomöostase

Um auf zellulärer Ebene die Eisenhomöostase aufrechtzuerhalten, wird die Synthese von Proteinen, die in den Eisenstoffwechsel involviert sind, durch den Eisenstatus in der Zelle geregelt. Bei dieser Regulation spielt vor allem die posttranskriptionelle Kontrolle durch das IRE/IRP-System (*Iron-regulatory Elements/Iron-regulatory Proteins*) eine zentrale Rolle [63].

Zu den dabei regulierten Proteinen gehören u.a. Ferritin H und L als Speicherproteine, Transferrinrezeptor 1 und DMT-1 als Proteine der Eisenaufnahme, Ferroportin als Eisenexporter und einige Proteine der Eisenverwertung [64]. Bei niedrigen intrazellulären Eisenspiegeln binden die Eisenregulatorischen Proteine 1 und 2 an Eisen-regulatorische Elemente in der mRNA von regulatorischen Proteinen [4]. Die Bindung der IRPs hat je nach Lokalisation der Ziel-IREs unterschiedliche Auswirkungen. Entstehen IRP/IRE-Komplexe in der 5'-UTR (untranslatierten Region) einer mRNA (Ferritin H und L oder Ferroportin), wird deren Translation unterdrückt, während eine Bindung an die 3'-UTR einer TfR1-mRNA zu einer verstärkten Stabilität und Konzentration führt [65–67]. Dementsprechend sinkt die Ferritin- und Ferroportin-Konzentration im Falle eines niedrigen intrazellulären Eisenstatus, während die TfR1-Konzentration steigt, um das intrazelluläre Eisendefizit auszugleichen und Eisen für zelluläre metabolische Prozesse bereit zu stellen [4].

1.3 Hepcidin als systemischer Regulator der Eisenhomöostase

Da unterschiedliche Zelltypen an der Eisenhomöostase beteiligt sind, wobei die Leber als Eisenspeicher, Makrophagen als Zellen des Eisenrecyclings und die Enterozyten als Zellen der systemischen Eisenaufnahme fungieren, wird die Eisenhomöostase vom Körper systemisch reguliert. Ein Schlüsselfaktor dieser systemischen Regulation wurde erst im Jahre 2001 entdeckt: Hepcidin wurde als antimikrobielles Peptid (Defensin) aus dem Urin isoliert und nach dem Ursprungsort seiner Bildung, den Hepatozyten, benannt [68]. Die Verbindung von Hepcidin mit dem Eisenstoffwechsel wurde im gleichen Jahr bei der Suche nach Genen, die beim Vorliegen einer Eisenüberladung der Leber vermehrt in der Leber von Mäusen exprimiert werden, hergestellt [69]. Seine Funktion als systemischer Eisenregulator wurde durch Hepcidin-Knockout-Tiere bekannt, da diese Tiere eine massive Eisenüberladung durch ungehemmte Eisenabsorption im Darm aufwiesen [70]. Transgene Tiere mit einer Überexpression von Hepcidin [71] oder Tiere, denen Hepcidin injiziert wurden [72], litten hingegen an schwerer Eisen-defizitärer Anämie.

Seither ist die Expression und Wirkung des früher als LEAP-1 (*liver-expressed antimicrobial peptide*) bezeichneten antimikrobiellen Peptids intensiv beforscht worden.

Hepcidin wird vor allem in der Leber und zu einem geringen Teil in Makrophagen synthetisiert. Es wird durch das *HAMP*-Gen, das auf Chromosom 19 (19q13.1) lokalisiert ist, codiert. Zunächst erfolgt die Synthese als physiologisch inaktives 84 Aminosäuren langes Pre-Prohepcidin, das eine typische N-terminale 24 Aminosäuren lange endoplasmatische Retikulum Signalsequenz, die 25-Aminosäuren lange aktive Sequenz und eine Furin-Spaltungsstelle enthält [73, 74]. Die Reifung von Hepcidin findet in der Zelle statt, wobei die Prohormon-Konvertase Furin die inaktive Hepcidin-Vorstufe proteolytisch zu dem aktiven Hepcidin-25 spaltet [73]. N-terminale Degradation führt zu kürzeren Isoformen (Hepcidin-24, -23, -22 und -20), deren genaue Bedeutung bislang nicht bekannt ist [75–77]. Die molekulare Struktur von Hepcidin ist in Abbildung 3 dargestellt.

Schätzungsweise <3-89% des im Blut zirkulierenden Hepcidins ist an α -2-Makroglobulin und Albumin gebunden [78, 79].

Die Eliminationsmechanismen von Serum Hepcidin wurden bislang nur wenig untersucht. Die Ausscheidung über den Urin erfolgt relativ zügig innerhalb weniger Stunden [72] und Hepcidin wird dabei als 20-25 Aminosäure Peptid ausgeschieden [68]. Generell korrelieren die Hepcidin-Spiegel im Serum mit denen im Urin [80], mit der Ausnahme bei Vorliegen von Nierenerkrankungen [81].

Die Hauptwirkung von Hepcidin in der systemischen Eisenregulation wird durch die Bindung an den bislang einzig bekannten Eisenexporter Ferroportin vermittelt. Durch die Interaktion von Hepcidin mit Ferroportin wird der Eisenexporter ubiquitiniert, was zu dessen Internalisierung und lysosomale

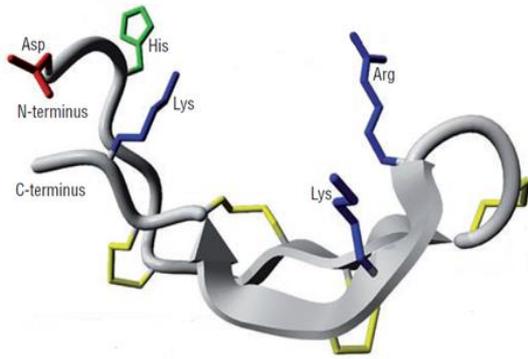


Abbildung 3: Molekulare Struktur von Hepcidin

Das Peptidrückgrat ist in grau dargestellt. Disulfidbrücken sind gelb, positiv geladene Aminosäureseitenketten sind blau und negative rot markiert. In grün ist das in der N-terminalen Region gelegene Histidin-enthaltende Bindemotiv dargestellt. Modifiziert nach Kemna *et al.* (2008) [83].

Degradation führt [28]. Somit reguliert Hepcidin den Zustrom von Eisen aus den Zellen in das Plasma: Durch die durch Hepcidin-Bindung hervorgerufene Verringerung der Ferroportin-Exporter in Enterozyten, Makrophagen und Hepatozyten verbleibt das Eisen in diesen Zellen des Eisenstoffwechsels und steht somit dem Organismus nicht mehr zur Verfügung [28, 82, 83]. Verbleibendes Eisen in den Enterozyten geht mit deren Abschilferung verloren, wodurch die natürlichen täglichen Eisenverluste nicht ausgeglichen werden können.

Die Expression des systemischen Eisenregulators Hepcidin ist fein reguliert. Während das Vorliegen einer Eisenüberladung, Infektion und Inflammation die Hepcidin-Expression hoch reguliert [84–86], führt ein Eisendefizit, Hypoxie, Anämie und verstärkte Erythropoese zu einer verminderten Hepcidin-Expression [87, 88] (Abbildung 4).

Auf die einzelnen Regulationsmechanismen wird im Folgenden genauer eingegangen.

1.3.1 Hepcidin-Regulation durch den Eisenstatus

Die Regulation der Hepcidin-Expression durch Eisen ist ein Mechanismus des Körpers, durch den es ermöglicht wird, sowohl die toxischen Effekte einer Eisenüberladung, als auch negative physiologische Folgen eines Eisenmangels zu vermeiden [89].

Einige Proteine, die auf der Oberfläche von Hepatozyten vorkommen, werden als sogenannte „Eisen-Sensoren“ betrachtet, wozu Hämojuvelin (HJV), hereditäre-Hämochromatose-Protein (HFE), TfR1 und TfR2 gehören [89] (Abbildung 4). Dabei spielen knochenbildungsanregende Proteine, sogenannte *Bone morphogenetic Proteins* (BMPs), eine wichtige Rolle. Diese sind Zytokine, die zur Familie der transformierenden Wachstumsfaktoren beta, kurz TGF- β , gehören [90].

Der BMP-SMAD-Signalweg spielt bei der Regulation der Hepcidin-Expression eine wesentliche Rolle. Dafür interagieren BMPs, maßgeblich BMP6 [91], mit dem BMP-Korezeptor Hämojuvelin (HJV) [92] als auch mit BMP-Rezeptor-Komplexen Typ 1 und Typ 2. Durch diese Interaktion wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die zu einer Phosphorylierung zytosolischer SMADs, zu denen SMAD1, SMAD5 und

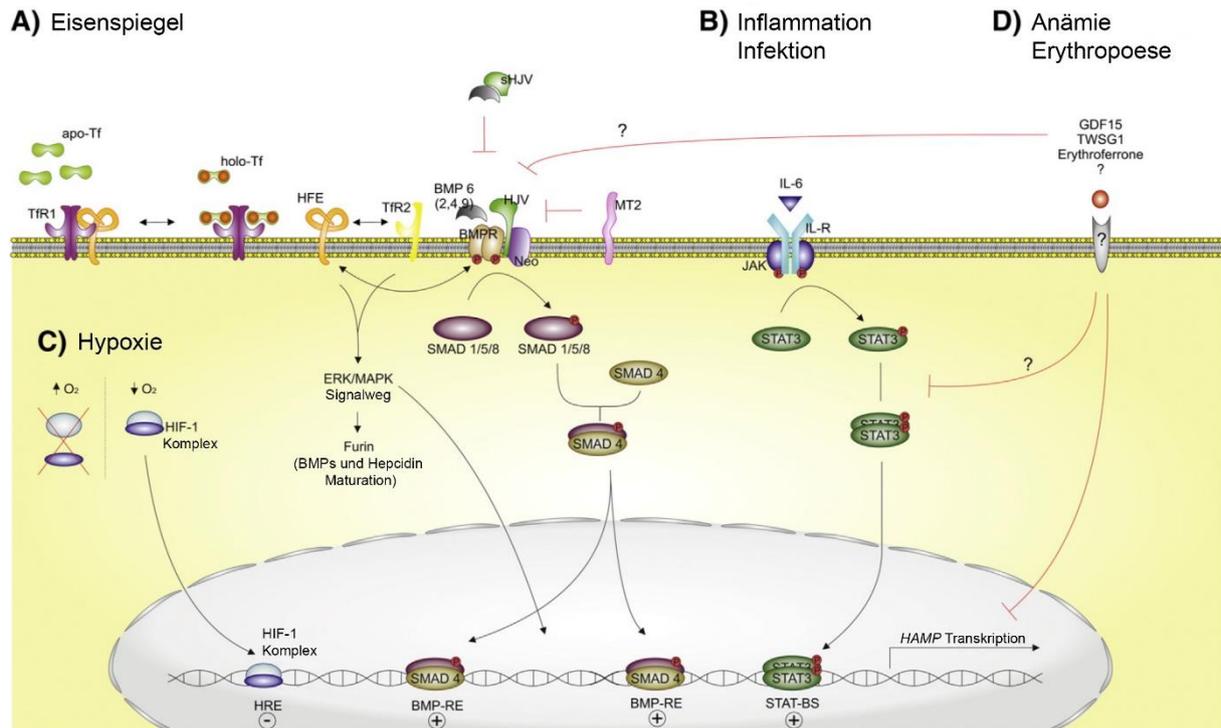


Abbildung 4: Mechanismen der Heparin Gen-Expression in Hepatozyten

(A) Erhöhte Eisenspiegel und (B) Entzündungen und Infektionen stimulieren die Heparin Genexpression, während (C) Hypoxie und (D) Anämie und Erythropoese die Expression unterdrücken. Die Mechanismen, die zu einer Hochregulation führen, beinhalten die Bindung von zirkulierenden Proteinen wie Holo-Tf, BMPs und IIs an Rezeptoren. Dadurch werden Signalkaskaden aktiviert, zu denen der ERK/MPK-, der SMAD- und JAK-STAT-Signalweg gehört und die zu einer erhöhten Heparin-Expression führen. Lösliche und membran-gebundene Proteine wie SHJV und MT2 hingegen können zu einer Hemmung des SMAD-Signalwegs führen. Bei Hypoxie wird der HIF-1 Proteinkomplex stabilisiert und kann an den Heparin-Promoter binden und die Heparin-Transkription zu unterdrücken. Während einer Anämie und erhöhten Erythropoese werden zirkulierende Proteine gebildet, die über bislang unbekannte Rezeptoren ihre hemmende Wirkung auf die Heparin-Expression vermitteln. Modifiziert nach Silva *et al.* (2015) [89].

SMAD8 gehören, führt [93, 92]. Die phosphorylierten SMADs komplexieren mit dem im Zytosol lokalisierten SMAD4, was zu einer Translokation dieses Komplexes in den Zellkern führt. Der Komplex bindet folglich an sogenannte BMP responsive Elemente (BMP-REs), die sich im Heparin-Promoter befinden. Dadurch wird die Transkription von Heparin induziert [94, 95].

Der Eisenstatus selbst reguliert die Aktivität des BMP6-SMAD-Signalwegs, wodurch die Heparin-Expression kontrolliert wird, doch die genauen Mechanismen sind bislang nicht vollständig geklärt [96]. Sowohl zirkulierendes als auch in der Leber gespeichertes Eisen scheint den Signalweg durch unterschiedliche Mechanismen zu stimulieren [97, 98]. Die Aufnahme von 65 mg oralem Eisen führte bei Gesunden zu einem über fünffachen Heparin-Anstieg innerhalb der ersten 24 Stunden [86]. In Mäusen korrelierte der Eisengehalt in der Leber positiv mit dem BMP6 mRNA Level und der Aktivität des BMP-SMAD-Signalwegs [99, 98]. Durch die Injektion eines neutralisierenden BMP6-Antikörpers konnte die Heparin-Induktion durch Eisen inhibiert werden [98]. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Eisen den BMP-SMAD-Signalweg zumindest teilweise durch die Regulation der BMP6-Expression

reguliert [96]. Eine neue Studie weist darauf hin, dass Leberendothelzellen der Hauptproduktionsort von BMP6 in der Leber sind, das parakrine Wirkungen auf Hämoujuvelin in Hepatozyten ausübt, um die Heparin-Expression und damit die Eisenhomöostase zu kontrollieren [100].

Auch die Membranproteine HFE und der Transferrin-Rezeptor 2 (TfR2) sind involviert in die Regulation der Eisen-abhängigen Heparin-Expression. HFE und/oder TfR2-Knockout-Tiere zeigen deutlich den Zusammenhang mit der Heparin-Regulation, da diese Tiere eine Eisenüberladung vorweisen [101, 102]. HFE liegt bei niedriger Zirkulation von Transferrin-gebundenem Eisen, dem holo-Transferrin, an TfR1 gebunden vor und scheint dadurch die Induktion der Heparin-Expression zu unterdrücken [85]. Es wird angenommen, dass bei erhöhter Zirkulation von holo-Transferrin, demnach bei hoher Transferrinsättigung, dieses an den TfR1 mit höherer Affinität bindet und HFE ersetzt. Durch die Verdrängung von HFE durch TfR1 kommt es zu einer Interaktion von HFE mit TfR2 [85, 103]. Der gebildete HFE-TfR2-Komplex bildet zusätzlich mit holo-Transferrin eine Art Signalkomplex. Dieser induziert die Phosphorylierung der extrazellulären Signal-regulierten Kinase (ERK1/2) und dessen ERK/Mitogen aktivierten Protein Kinase (MAPK) Signalweg (Abbildung 4, A) [104], was wiederum zu einer Erhöhung von pSMAD1/5/8 und damit zur Heparin-Expression führt [105].

Wie bereits erwähnt, reguliert der intrazelluläre Eisenstatus die Eisen-regulierenden Proteine (IRPs). Bei hohem Eisenstatus der Zelle können IRPs nicht mehr an die IREs im 3'-UTR der TfR1 mRNA binden, wodurch die TfR1 mRNA destabilisiert und vermindert translatiert wird. Dadurch komplexiert HFE vermehrt mit TfR2, was zu einer Induktion der Heparin-Expression führt [64].

Ein weiterer Mechanismus der Heparin-Regulation wird durch lösliches Hämoujuvelin (s-HJV) vermittelt (Abbildung 4, A). Dieses wirkt als löslicher Rezeptor, der BMPs bindet und somit die Interaktion mit dem Membran-gebundenen HJV verhindert, wodurch die Heparin-Expression während eines Eisenmangels vermindert wird [106].

Auch SMAD7 agiert als transkriptioneller Repressor der Heparin-Induktion, um eine überschießende Heparin-Antwort zu unterbinden und wirkt somit als Feedback-Inhibitor [107].

Es wird angenommen, dass auch die Transmembran-Serin-Protease *TMPRSS6*, die auch als Matriptase-2 (MT2) bezeichnet wird, ein weiterer Regulator des Eisenstatus ist, indem es bei einem Eisendefizit die Heparin-Induktion unterdrückt [108]. Vermittelt wird dieser Effekt durch einen MT2-induzierten Abbau des BMP-Korezeptors HJV, wodurch es zu einer Unterbindung des BMP-SMAD-Signalweges kommt und dadurch die Heparin-Expression vermindert wird [108, 109]. Mutationen im *TMPRSS6*-Gen bewirken folglich das Auftreten einer hereditären Eisen-defizitären Anämie, die durch hohe Heparin-Konzentrationen gekennzeichnet ist [110, 111, 108, 112].

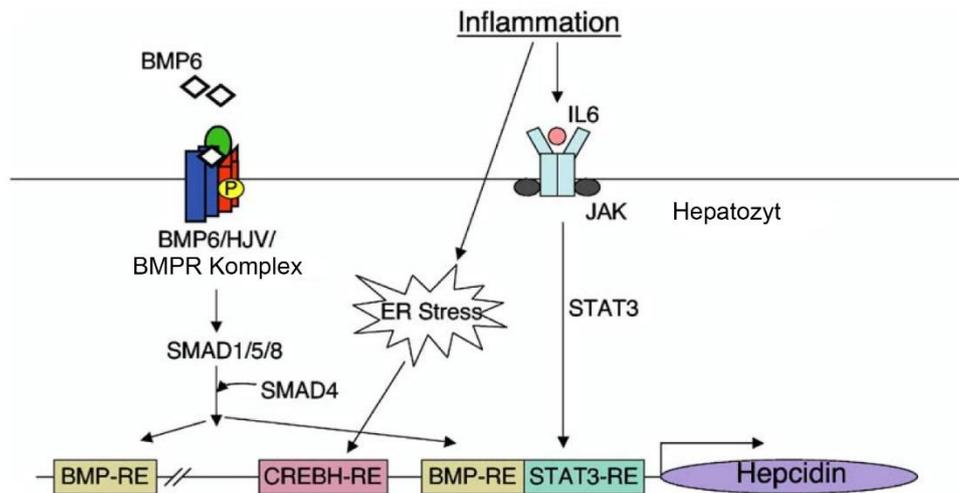


Abbildung 5: Molekulare Mechanismen der inflammatorisch-vermittelten Hepcidin-Expression

Durch Inflammation, die Zytokine wie IL-6 vermittelt, wird der JAK/STAT-Signalweg induziert. Phosphoryliertes STAT3 bindet an das STAT3 responsive Element im proximalen Hepcidin-Promotor und induziert dessen Expression. Dieser Signalweg ist abhängig von einem intakten BMP-responsiven Element, das auch im proximalen Hepcidin-Promotor lokalisiert ist. Zudem führt die Inflammation zu ER Stress, wodurch CREBH an dessen responsive Element bindet und zu einer Induktion von Hepcidin führt. Nach Babitt and Lin (2010) [140].

1.3.2 Hepcidin-Regulation durch Inflammation

Auch Pathogene benötigen zum Überleben und für die Proliferation Eisen. Dafür bedienen sich Erreger zur Deckung des eigenen Bedarfs am Eisenpool des Wirtes. Es gehört deshalb zum angeborenen und zur adaptiven Antwort des Immunsystems, den Erregern durch die Erzeugung einer Hypoferrämie im Plasma Eisen zu entziehen, um ihre Proliferation dadurch zu unterbinden [86].

Die Induktion der Hypoferrämie wird durch das Akut-Phase-Protein Hepcidin vermittelt [113], das durch seine Defensin-ähnliche Struktur anfänglich zur Gruppe der Defensine gezählt wurde [114, 68]. Patienten mit Sepsis, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), Myelom, Verbrennungen oder mit C-reaktiven Proteinspiegeln (CRP) >10 mg/dl weisen signifikant erhöhte Hepcidin-Plasmaspiegel auf [113, 115–118]. Der Grund hierfür liegt in der Entzündungs-vermittelten Aktivierung von Makrophagen [119]. Diese setzen im Falle einer Entzündung eine Reihe von Entzündungsfaktoren frei, zu denen Zytokine gehören. Unter diesen ist maßgeblich Interleukin-6 (IL-6) der Hauptregulator, der in Leberzellen die Hepcidin-Synthese stimuliert [120, 86, 121].

Dafür bindet IL-6 an seinen Membran-gebundenen IL-6-Rezeptor α der Leberzellen (gp80). Das IL-6-gp80 Dimer interagiert dadurch mit seiner Signal-transduzierenden Einheit gp130. Diese Komplexbildung führt zu einer Aktivierung der intrazellulären Januskinase 2 (JAK 2), welche Tyrosinreste der zytoplasmatischen Domäne der gp130 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung wiederum führt zu einer Dimerisierung von gp130 und dadurch zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung von

STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) [122–125] (Abbildung 4, B). Es folgt dadurch die Translokation von pSTAT3 in den Nukleus und dessen Bindung an STAT3 responsive Elemente im proximalen Hecpidin-Promotor, was zur Expression von Hecpidin führt [126–129] (Abbildung 4, A; Abbildung 5).

Neben IL-6 induzieren auch andere Zytokine, wie IL-1 [130], IL-22 [131], Oncostatin M, das auch zur IL-6 Familie gehört [132], sowie Interferon α [133] die Hecpidin-Expression durch den JAK/STAT-Signalweg. Ein STAT3-Knockout führt demnach zu einer Unterbindung der Hecpidin-Expression durch Zytokine [129]. Auch *Transforming Growth Factor β 1* (TGF- β 1) induziert die Hecpidin-Expression, allerdings über die Induktion von SMAD 1/5/8 und nicht über den JAK/STAT-Signalweg [134].

Bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), Endotoxine und Komponente der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien, bewirken pathogene inflammatorische Signale, wodurch die Hecpidin-Expression stimuliert wird. Diese Hecpidin-Induktion beruht dabei wahrscheinlich auf einem Zusammenspiel verschiedener Signalwege. Vorrangig kommt es jedoch zu einer LPS-induzierten Zytokin-Produktion, maßgeblich von IL-6, durch Monozyten und Makrophagen als Antwort des Immunsystems auf Pathogene, was schließlich zur Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges und damit zur Hecpidin-Induktion führt [121, 135, 136]. Mäuse, die mit einem IL-6 Antikörper behandelt und mit LPS stimuliert wurden, wiesen keine erhöhte Hecpidin-Expression auf [86].

Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass die Hecpidin-Induktion durch IL-6 einen intakten BMP-SMAD-Signalweg benötigt. Ein Knockout des Mediators SMAD4 [137], die Administration von löslichem HJV [138] oder von Inhibitoren der BMP Typ 1 Rezeptor-Kinase-Aktivität [139] beeinträchtigen jeweils die IL-6-induzierte Hecpidin-Aktivität [140]. Dieser Crosstalk zwischen den Signalwegen beruht zumindest teilweise auf der Aktivität des proximalen Promotors, da das STAT3 responsive Element neben dem proximalen BMP-responsiven Element (BMP-RE1) liegt und dessen Mutation zu einer verminderten IL-6-induzierten Hecpidin-Expression führt [95, 141].

Ein weiterer Signalweg, durch den proinflammatorische Zytokine und bakterielles LPS zu einer Hecpidin-Induktion führen können, wird durch Zytokin- und LPS-induzierten endoplasmatischen Retikulum (ER) Stress und die daraus resultierende „*unfolded Protein response*“ vermittelt [142]. Die erhöhte Expression und Spaltung des ER Stress-assoziierten Leber-spezifischen Transkriptionsfaktors CREBH (zyklisches AMP responsives Element-Bindungsprotein H), führt zu einer Aktivierung der Transkription von Akut-Phase-Proteinen in der Leber und durch die Bindung von CREBH an das responsive Element im Hecpidin-Promotor (CREBH-RE) zu einer Induktion der Hecpidin-Expression [143, 143] (Abbildung 5).

Durch Infektionen und bestehende Inflammation kommt es, vorrangig über die Produktion von IL-6, zu einer Induktion von Hecpidin, was wiederum zu einer Blockierung der Eisenfreisetzung aus Makrophagen und der intestinalen Absorption von Eisen führt und letztlich in einer Hypoferrämie

endet. Die daraus resultierende Anämie wird deshalb auch als Anämie der chronischen Inflammation bezeichnet und wird in Kapitel 1.4 näher beschrieben.

1.3.3 Heparin-Regulation durch Erythropoese und Hypoxie

Die Erythropoese dient der Neubildung von Erythrozyten, die eine Lebensdauer von 120 Tagen haben und von Makrophagen des retikuloendothelialen Systems zum Recycling von Eisen phagozytiert werden. Täglich müssen diese gealterten und phagozytierten Erythrozyten, die etwa 1 % der gesamten Erythrozyten ausmachen, im Knochenmark neu gebildet werden.

Für die Erythropoese wird eine große Menge an Eisen benötigt, weshalb bei hoher erythropoetischer Aktivität, der Inhibierung der Heparin-Expression eine große physiologische Bedeutung zukommt [144, 145]. Dafür wird die Heparin-Expression unabhängig vom Eisenstatus inhibiert.

Es konnte gezeigt werden, dass Erythropoetin (EPO) nicht direkt als Vermittler dieser Heparin-Inhibierung wirkt, sondern Heparin nur indirekt über EPO inhibiert wird [145]. Seither wurden einige Faktoren als Erythropoese-Regulatoren auf die Heparin-Expression vorgeschlagen [146].

Lange Zeit gab es Hinweise darauf, dass von Erythroblasten, den Vorläuferzellen der Erythrozyten, lösliche Faktoren abgegeben werden, die diesen Effekt vermitteln sollen [145]. Zu diesen Faktoren gehört der Wachstums- und Differenzierungsfaktor 15 (GDF15), ein Ligand der TGF- β /BMP Superfamilie sowie TWSG1 (*twisted gastrulation protein 1*) [147, 148]. Beide werden von Erythroblastenvorläuferzellen abgegeben. GDF15 aktiviert SMAD2 und SMAD3 und TWSG1 kann sowohl als BMP-Agonist, als auch -Antagonist wirken [149–152]. Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Heparin mRNA-Expression in primären Hepatozyten von Patienten mit β -Thalassämie, einer Synthesestörung der β -Globinkette des Hämoglobins, zumindest teilweise auf GDF15 zurück zu führen war [147]. Neuere translationale Studien fanden allerdings keine signifikante Auswirkung von GDF15 auf die Hemmung der Heparin-Expression, weder bei Vorliegen eines Eisendefizits [153, 154] noch bei einer Anämie der chronischen Inflammation [154]. Auch der Aderlass bei Wildtyp oder GDF15 Knockout-Mäusen zeigte keine unterschiedliche Auswirkung bezüglich der Hemmung der Heparin-Expression [155]. Zusammengefasst lässt sich aus diesen Studien somit schließen, dass GDF15 keinen notwendigen Einfluss auf die Hemmung der Heparin-Expression zu haben scheint [146]. Ähnliches lässt sich über TWSG1 berichten, da Studien auch hier keinen Zusammenhang zwischen verminderter Heparin-Expression und TWSG1 fanden, wodurch eine Verbindung zwischen GDF15 und TWSG1 und der Inhibition der Heparin-Expression fraglich bleibt [146, 156, 157].

Das Hormon Erythroferron (ERFE), das aus dem EPO-responsiven Gen exprimiert wird, ist ein relativ neu beschriebener Suppressor der Heparin-Expression [156]. Eine Injektion von Mäusen mit EPO führte zu einer signifikant erhöhten ERFE mRNA-Expression durch Erythroblasten. Ein Knockout von

ERFE hob dessen hemmende Wirkung auf die Heparin-Expression auf. Damit scheint ERFE eine bedeutende Rolle in der Vermittlung der Heparin-Hemmung unter Stress-Erythropoese zu spielen und der Effekt über den JAK2-STAT5-Signalweg vermittelt zu werden [156]. Weitere Studien sind nötig, um die exakte Rolle von ERFE in der Eisenhomöostase zu klären.

Neben erhöhter Erythropoese hemmt auch das Vorliegen einer Sauerstoffarmut, einer Hypoxie, die Heparin-Expression [158] und die Signalwege, die zu dieser Repression führen, scheinen eng miteinander verbunden zu sein [159]. Durch eine Minderversorgung des Körpers mit Sauerstoff, reagiert der Körper mit einer Erhöhung der Sauerstofftransportkapazität, gezeichnet durch eine Erhöhung der zirkulierenden EPO-Spiegel im Blut und Stimulierung der Erythropoese während hypoxischem Stress, um die Hämoglobinsynthese zu steigern [160, 158]. Dadurch wird vermehrt Eisen benötigt, weshalb es zu einer Hemmung der Heparin-Expression kommt, um vermehrt Eisen aufnehmen zu können [158].

Hypoxie-induzierte Faktoren (HIF) werden als Mediatoren der Hypoxie-induzierten Heparin-Hemmung diskutiert [161]. Als HIF werden eine Familie von Transkriptionsfaktoren bezeichnet, die Gene regulieren, welche in die Adaptation an Sauerstoffarmut involviert sind [161, 162]. HIFs sind Heterodimere, die posttranskriptional reguliert werden. Ist Sauerstoff vorhanden, werden die regulatorischen Untereinheiten, zu denen HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α gehören, degradiert, während bei Hypoxie keine Degradierung stattfindet. Somit akkumuliert und transloziert die regulatorische Untereinheit in den Kern und bindet an HIF-1 β , um als Heterodimer an Hypoxie-responsive Elemente zu binden. Einige Studien fanden einen direkten Effekt von HIF auf die Heparin-Expression durch Bindung an responsive Elemente im Heparin-Promotor [161]. Eine andere Studie wiederum konnte keinen direkten Effekt von HIF auf die Heparin-Hemmung nachweisen, da der Knockdown von HIF1 α oder HIF2 α nicht zu einer Aufhebung der Hypoxie-induzierten Heparin-Hemmung führte [163]. Somit ist die Rolle von Hypoxie-induziertem HIF nicht abschließend geklärt.

Durch die Induktion von Hypoxie bei gesunden Probanden konnte im Blut ein weiterer Faktor gefunden werden, der sogenannte PDGF-BB (*platelet derived growth factor*), dessen Konzentration invers mit der Konzentration von Heparin korreliert [158]. Die Autoren konnten zeigen, dass dieser Faktor ein Hauptinhibitor der Hypoxie-induzierten Heparin-Hemmung zu sein scheint.

1.3.4 Eisenregulationsstörungen und Heparin

Mutationen in Genen, die am Eisenstoffwechsel beteiligt sind, führen zu Störungen des Eisenstoffwechsels.

Bei der klassischen hereditären Hämochromatose (HH Typ1) kommt es aufgrund einer Mutation im HFE-Gen zu einer Eisenüberladung von Geweben und damit zu Gewebsschäden [164], da eine fehlende

Hepcidin-Expression zu einer erhöhten Ferroportin-Aktivität führt [165]. Neben der klassischen sind zwei Formen der juvenilen Hämochromatose bekannt. HH Typ2A wird durch eine Mutation im Hämojuvelin-Gen (HJV, auch HFE2) induziert [166], während Typ2B durch eine Mutation im Hepcidin-Gen selbst hervorgerufen wird [167], da auch diese Mutationen zur Verhinderung der Hepcidin-Expression führen. Eine weitere Form von Hämochromatose, die im Erwachsenenalter beginnt, wird durch Mutationen im TfR2-Gen hervorgerufen (HH Typ3) [168]. Auch die Mutation des Eisen-Exporters und gleichzeitigen Hepcidin-Rezeptors Ferroportin (FPN) führt zu einer zellulären Eisenüberladung (HH Typ4) [169].

Neben der Eisenüberladung können Mutationen in Genen, die zu einer unausgeglichene Hepcidin-Ferroportin-Achse führen, auch Anämien hervorrufen. Die Eisen-refraktäre Eisen-defizitäre Anämie (IRIDA) wird durch Mutationen im Matriptase-2-Gen (*TMPRSS6*-Gen) hervorgerufen, da diese Mutation einen Verlust der Hepcidin-Repression durch Matriptase-2 hervorruft [109, 111, 170].

Zwar ist die Anämie der chronischen Inflammation (ACI) nicht auf eine Mutation, aber dennoch auf eine Störung der Hepcidin-Ferroportin-Achse durch erhöhte Hepcidin-Expression zurückzuführen [113]. Im Folgenden wird näher auf die Anämie mit besonderer Berücksichtigung der ACI eingegangen.

1.4 Anämie

Eine Anämie liegt laut WHO 1998 dann vor, wenn der Hämoglobin- oder Hämatokritwert unter einem bestimmten alters- und geschlechtsspezifischen Grenzwert liegt, wobei der Hämatokritwert den Anteil von Erythrozyten im Blutvolumen darstellt. Diese Grenzwerte gelten für Personen, die auf Höhe des Meeresspiegels leben [171] und sind in Tabelle 2 dargestellt.

Klinische Symptome bei Eisenmangelanämie sind sehr unterschiedlich und können schleichend auftreten. Bei schweren Anämieformen können Müdigkeit, verminderte Leistungsfähigkeit, Belastungsdyspnoe, Schwindel und depressive Verstimmungen auftreten. Zu den objektiven Symptomen zählen Blässe der Haut und Schleimhäute, Tachykardie, rissige Haut, Haarausfall, Brüchigkeit der Nägel und Mundwinkelrhagaden, Glossitis, Zungenbrennen oder Schleimhautveränderungen des Ösophagus (Plummer-Vinson-Syndrom) [172]. Die Hauptsymptome der Anämie, die Dyspnoe und Tachykardie, werden durch verminderte Sauerstoffspiegel im Blut bedingt durch verminderte Hämoglobinwerte verursacht [173].

Anämien können aufgrund sehr unterschiedlicher Ätiologie auftreten, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

Tabelle 2: Minimale Hämoglobin- und Hämatokritwerte zur Abklärung einer Anämie [171]

	Hämoglobin (g/dL)	Hämatokrit (%)
Kinder ½ bis 5 Jahre	11,0	33
Kinder 5 bis 11 Jahre	11,5	34
Kinder 12 bis 14 Jahre	12,0	36
Nicht schwangere Frauen	12,0	36
Schwangere	11,0	33
Männer	13,0	39

1.4.1 Eisenmangelanämie

Ein Eisenmangel im Körper kann zu einer gestörten Blutbildung und damit zu einer Anämie führen und entsteht dann, wenn die Aufnahme den Bedarf nicht deckt. Die Entstehung eines Eisendefizits im Körper kann folgende unterschiedliche Ursachen haben: Malabsorption, erhöhter Bedarf und erhöhte Verluste [174–177].

Ursache einer Malabsorption können unterschiedliche Erkrankungen sein, wie z.B. Zöliakie, chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) oder durch duodenale Resektionen bedingt [177]. Ein erhöhter Eisenbedarf liegt während einer Schwangerschaft oder Stillzeit, aber auch während der Kindheit vor [177]. Blutverluste durch Regelblutungen, Blutspenden, Erkrankungen wie CED oder Operationen, die den Magen-Darm-Trakt betreffen, um nur einige zu nennen, können wichtige Ursachen eines Eisenmangels sein [178, 176].

Auch andere Faktoren, wie eine ungünstige und selektive Nahrungszusammensetzung oder die Eisen-Malabsorption beispielsweise durch verminderten Magen-pH-Wert oder durch eine entzündete Darmmukosa, können zu der Entstehung einer IDA beitragen [176, 179].

Zur Klassifikation der Anämie werden verschiedene Laborparameter herangezogen (Tabelle 3). Klassisches Merkmal der fortgeschrittenen Eisenmangelanämie ist ein erniedrigtes mittleres korpuskuläres Volumen (MCV) der Erythrozyten. Eine Transferrinsättigung (TfS) <20% und ein sehr niedriger Ferritin-Wert sind indikativ für eine Eisenmangelanämie [180]. Hilfreich kann auch das Heranziehen der Konzentration des löslichen Transferrinrezeptors (sTfR) bzw. der sTfR-Index (sTfR-Konzentration/log Ferritinkonzentration >2) sein. Diese sind beim Vorliegen einer Eisenmangelanämie erhöht [181–184]. Auch ein reduzierter retikulozytärer Hämoglobingehalt (CHr) ist ein Indikator von gegenwärtigem Eisenmangel [179]. Eine reduzierte Verfügbarkeit von Eisen für die Erythropoese resultiert im vermehrten Einbau von Zink anstelle von Eisen in das Protoporphyringerüst, weshalb Zinkprotoporphyrin (ZPP) anstelle von Häm entsteht. ZPP-Spiegel im Blut sind ein direkter Marker des

Eisenstatus im Knochenmark während der Erythropoese [179]. Erhöhtes ZPP deutet auf einen Eisenmangel hin.

1.4.2 Anämie der chronischen Erkrankungen

Entsteht die Anämie durch eine zugrunde liegende inflammatorische Grunderkrankung, die gekennzeichnet ist durch chronische Inflammation im Körper, so liegt eine Anämie der chronischen Entzündung (*Anemia of chronic inflammation*, ACI) vor [179]. Zu diesen chronischen entzündlichen Erkrankungen zählen u.a. chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) wie Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa, Infektionen, rheumatische Erkrankungen, chronische Nieren- oder auch Krebsleiden [144]. Auch schwere Adipositas ist assoziiert mit dem Vorliegen einer leichtgradigen Entzündung [185]. Diese resultiert aus der erhöhten Sekretion von Adipokinen und Zytokinen, die von dem vermehrten weißen Fettgewebe, wodurch Adipositas gekennzeichnet ist, freigesetzt werden [186, 187]. Diese führen bei adipösen Erwachsenen zu erhöhten Hepsidin-Konzentrationen im Serum, was wiederum die Entstehung einer ACI begünstigen [188, 189]. ACI ist nach der Eisenmangelanämie die zweit häufigste Anämieform [190].

Bei 60-80% aller Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen liegt ein Eisendefizit vor und eine Anämie wird bei etwa einem Drittel dieser Patienten diagnostiziert. Anämie stellt damit die häufigste extraintestinale Komplikation bei CED-Patienten dar [191].

Der Grund für die Entstehung der Anämie beim Vorliegen chronischer Entzündungen liegt in der erhöhten Expression von Hepsidin, die, wie bereits in Kapitel 1.3 beschrieben, durch das Vorliegen von proinflammatorischen Zytokinen bedingt ist und zu einer veränderten Eisenhomöostase führt [192, 193]. Durch die Expression von Hepsidin in der Leber wird der Eisenexport von Makrophagen des Reticuloendothelialen Systems (RES) durch die Reduktion des Exporters Ferroportin reduziert. Dadurch fällt die Transferrinsättigung ab und der Eisentransport zu den Erythroblasten im Knochenmark ist reduziert, was einen funktionellen Eisenmangel für die Erythropoese auslöst und die Erythropoese damit reduziert [194].

ACI ist charakterisiert durch vermindertes mittleres korpuskuläres Volumen (MCV), reduziertes Serum-Eisen und reduzierte totale Eisenbindungskapazität (TIBC). Charakteristisch ist zudem das Vorliegen von erhöhtem Serum Ferritin, das beim Bestehen einer Inflammation als Akut-Phase-Protein induziert wird. Inflammatorische oder maligne Erkrankungen, Lebererkrankungen oder eine Schwangerschaft können zu falsch normalen oder erhöhten Ferritinkonzentrationen führen und das Vorliegen eines Eisendefizits verschleiern. Deshalb sollte Ferritin immer unter Berücksichtigung des CRP-Wertes betrachtet werden (Tabelle 3). Ein erhöhter CRP-Wert (C-reaktives Protein) (CRP>5 mg/L) kann das Vorliegen einer Inflammation aufdecken und auf eine aktive Erkrankung hindeuten [179].

Im Gegensatz zum Vorliegen einer IDA kommt es im Falle einer ACI zu einem erniedrigten sTfR-F-Index, da der dabei errechnete Quotient durch das Vorliegen hoher Ferritinwerte abfällt.

1.4.3 Mischformen der Anämie

Gerade bei chronischen Erkrankungen liegt oftmals eine Mischform aus IDA und ACI vor, die oftmals durch das Vorliegen einer chronischen Entzündungsreaktion mit gleichzeitig vorhandenem absolutem Eisenmangel aufgrund von chronischem Blutverlust resultiert. Zur Unterscheidung werden deshalb verschiedene Laborparameter herangezogen, die in Tabelle 3 dargestellt sind [15]. Die Klassifikation der Anämie ist besonders deshalb von Bedeutung, um eine sinnvolle und ansprechende Therapie zu wählen.

Weitere Ursachen einer Anämie können zusätzlich in einem Vitamin B₁₂- und/oder Folsäuremangel begründet sein [195]. Vitamin B₁₂ und Folsäure dienen als Kofaktoren der DNA-Synthese, wodurch ein Mangel dieser Vitamine Auswirkungen auf die Erythropoese haben kann und zu megaloblastär-hyperchromen Erythrozyten führen kann [196, 197]. Deshalb sollten bei der Diagnosestellung Anämie auch die Serumspiegel von Vitamin B₁₂ und Folsäure berücksichtigt werden, um einen Vitaminmangel auszuschließen oder entsprechend zu behandeln [194, 198].

Tabelle 3: Laborwerte bei IDA, ACD und Mischtyp IDA/ACI

Laborwert	Normal	IDA	ACI	IDA/ACI
Eisen im Knochenmark	2-3	0-1	2	1-2
Eisen im Serum	40-165 µg/L	(↓)	↓	↓
MCV	80-96 fl	↓	↓ od. n	↓ od. n
Serum Ferritin	16-350 µg/L	↓	↑	↑ od. n
Transferrin	↑	↑	↓ od. n	↓
Transferrin-Sättigung	20-50 %	↓	↓	↓
*sTfR	0,8-2,2 mg/l	↑	↓ od. n	↑ od. n
*sTfR-F Index	hoch (>2)	hoch (>2)	niedrig (<1)	hoch (>2)
CHr	≥ 29 pg	↓↓	↓ od. n	↓ od. n
PHRC	1-5 %	>5%	<5 %	
*Zink Protoporphyrin	< 40 (µmol/mol Häm)	>80	≥80	≥80
C-reaktives Protein	<5 mg/L	n	↑↑	↑

*Werte variieren je nach Assaysystem

Chr: Hämoglobingehalt von Retikulozyten; PHRC: Prozent von Hypochromen Erythrozyten; sTfR: Serum Transferrin-Rezeptor; sTfR-F: löslicher Transferrin-Rezeptor/log Ferritin; n: normal (modifiziert nach Stein et al., 2012 [179])

1.4.4 Therapie der Anämie

Jede manifeste Anämie sollte therapiert werden [199]. Dazu kann eine orale Eisentherapie erfolgen oder intravenöse Eisensubstitutionspräparate verwendet werden. Die Entscheidung über die Form der Therapie ist abhängig vom Ausmaß sowie der Ätiologie der Anämie (IDA vs. ACI) [15].

Orale Eisensubstitution

Orales Eisen kann in der Dosierung 50-150 mg elementares Eisen/Tag eingenommen werden. Da Eisen(II) besser löslich ist und es damit eine höhere Bioverfügbarkeit hat, wird diese Verbindung bevorzugt gegeben [200]. Eine orale Eisensubstitution ist dann induziert, wenn eine milde Form der Anämie vorliegt (Hb >10g/dL) und es sich um eine Eisenmangelanämie handelt, da in diesem Fall eine normale intestinale Eisenabsorption vorliegt [201]. Kontraindiziert ist eine orale Substitution immer dann, wenn eine chronische Entzündung im Körper besteht, da, wie bereits erwähnt, das Eisen aus der Darmmukosa, aufgrund der Hepcidin-induzierten Degradation von Ferroportin, nicht in den Blutkreislauf gelangt [28]. Das Duodenum kann täglich nur etwa 10-20 mg des aufgenommenen Eisens resorbieren. Mehr als 90% bleibt nicht absorbiert im Darm zurück und sorgt häufig für gastrointestinale Nebenwirkungen. Zu diesen gehören Übelkeit, Flatulenz, Diarrhoe und Magenerosion [200, 179], wodurch letztlich auch die Adhärenz der Patienten sinken kann und entsprechend überprüft werden sollte [179, 202]. Darüber hinaus kann im Darm verbleibendes Eisen das Vorliegen einer chronischen Entzündung durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Fenton-Reaktion) im Darm verschlimmern, was sowohl Tierstudien als auch Studien an Patienten zeigen konnten [203–205, 179]. Ist nach vier Wochen keine wesentliche Verbesserung des Hämoglobinspiegels festzustellen (Hb-Zunahme <2g/dL in 4 Wochen) oder liegt eine Intoleranz auf orales Eisen vor, sollte eine intravenöse Eisentherapie durchgeführt werden.

Intravenöse Eisentherapie

Die intravenöse Gabe von Eisen ist eine oftmals besser verträgliche Therapieform bei Patienten, die unter den oben aufgeführten Nebenwirkungen leiden. Zudem sollten Patienten mit einer schweren Anämie (Hb<10g/dL) und Patienten mit hoher Entzündungsaktivität mit intravenösem (IV) Eisen therapiert werden [199], da dadurch u.s. die Anämie auf schnellerem Weg korrigiert werden kann, verglichen mit oraler Supplementation.

Intravenöses Eisen wird inzwischen in einem weiten Spektrum von Erkrankungen eingesetzt und gilt als effektiv und gut verträglich mit der Ausnahme von hochmolekularem Eisen-Dextran, das zu schweren anaphylaktischen Schocks geführt hat und deshalb inzwischen vom Markt genommen wurde [176, 206, 194, 207]. Eisen(III)-Carboxymaltose (Ferinject®), Eisen(III)-Hydroxid-Saccharose-Präparate (z.B. Venofer®) oder Eisen(III)-Gluconat-Sucrose-Komplex (Ferrlecit®) finden heute als IV

Eisenpräparate Anwendung und ermöglichen eine hohe Eisengabe (bis zu 1000 mg Eisen(III)-Carboxymaltose) in kurzer Zeit [177]. Der Eisenbedarf (elementarer Eisenbedarf) zur Korrektur der Anämie wird heute nicht mehr nach einer Formel berechnet, sondern grob auf Grundlage des Hämoglobinspiegels und des Körpergewichts geschätzt [15].

Der Nachteil einer IV Eisengabe liegt darin, dass der Patient über die Infusionszeit in einer professionellen Einrichtung bleiben muss, was die Kosten der Therapie ansteigen lässt [177]. Da die Ferritinwerte 4-8 Wochen nach intravenöser Eisentherapie erhöht sein können, sollten diese erst nach 8-12 Wochen überprüft werden [177]. Es wird dann von einem Ansprechen der Therapie gesprochen, wenn der Hämoglobinspiegel $\geq 2\text{g/dL}$ in 4-8 Wochen nach Eisengabe gestiegen und die Transferrinsättigung auf $\geq 30\%$ angestiegen ist. Therapieversagen kann vorkommen beim Vorliegen einer ACI, wobei die zusätzliche Behandlung mit Erythropoese-stimulierenden Substanzen in Betracht gezogen werden sollte [177].

Eine Bluttransfusion sollte erst als letztes Mittel der Wahl in Betracht gezogen werden, wenn es darum geht, eine lebensbedrohliche Situation schnellstmöglich zu therapieren [176].

1.5 Nrf2-Signalweg

Der *Nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2)-related factor 2*, kurz Nrf2, ist ein Redox-sensitiver Transkriptionsfaktor, der zu der cap'n`collar Subfamilie gehört und eine Leucin-Zipper-Struktur aufweist [208, 209]. Nrf2 spielt eine wesentliche Rolle in der zellulären Abwehr gegen oxidativen und elektrophilen Stress. Die Induktion des Nrf2-Signalwegs gehört aus diesem Grund zu den wichtigsten Mechanismen der Zellabwehr, indem es die Entgiftung von reaktiven und krebsfördernden Substanzen hervorruft [210, 211].

Um diese antioxidative Antwort zu induzieren, gibt es drei wichtige Komponente: *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1), *Nrf2* und *antioxidant response elements* (ARE), weshalb von dem Keap1-Nrf2-ARE-Signalweg gesprochen wird.

Unter normalen Bedingungen liegt Nrf2 im Zytoplasma von Zellen an Keap1 gebunden vor, das wiederum im Zytoskelett an Aktin verankert vorliegt und als negativer Regulator von Nrf2 dient [210]. Die Interaktion zwischen Nrf2 und Keap1 führt zu einer Ubiquitinierung von Nrf2 durch die Cullin 3(Cul3)-abhängige E3-Ubiquitin-Ligase [212], die mit der BTB-Domäne von Keap1 interagiert, was zu einer proteasomalen Degradation des markierten Nrf2 führt (Abbildung 6) [213, 214]. Durch diese Regulation von Nrf2 wird dessen Level in der Zelle auf niedrigem Niveau gehalten [210].

Eine Vielfalt an Stimuli können zu einer Aktivierung des Nrf2-Signalweges führen. Diese Stimuli interagieren mit bestimmten Cysteinresten von Keap1, wodurch diese zur Sulfensäure oxidiert oder durch Elektrophile alkyliert werden können [215–217]. Keap1 enthält 27 solcher Cysteinreste, von

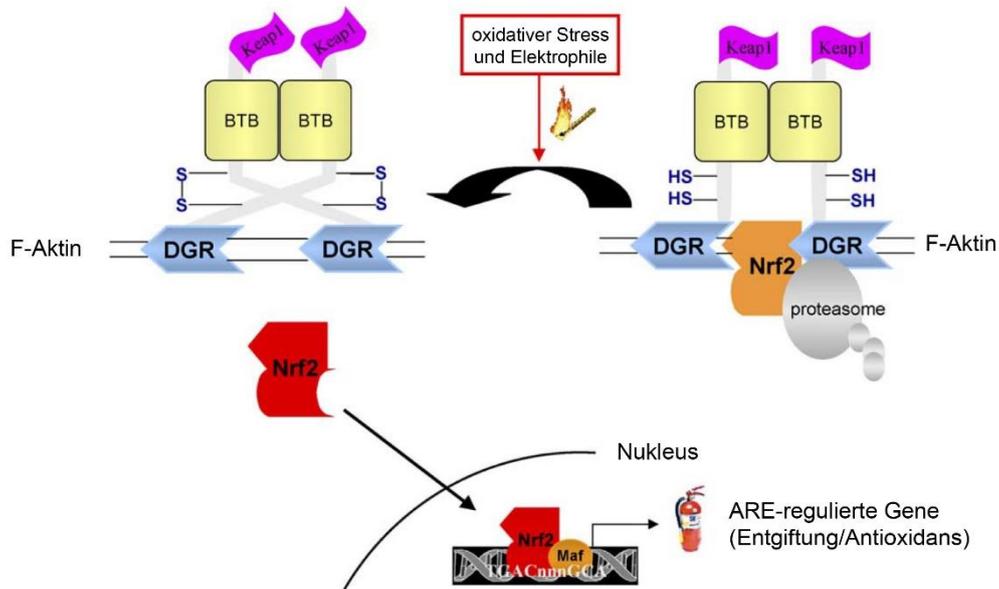


Abbildung 6: Mechanismus der Interaktion von Nrf2 und Keap1

Unter normalen Bedingungen liegt Nrf2 im Zytoplasma durch die Interaktion mit zwei Molekülen von Keap1 gebunden vor, was die Ubiquitinierung und proteasomale Degradation von Nrf2 fördert. Keap1 dimerisiert durch seine BTB-Domäne und ist durch die DGR-Region an Aktin gebunden. Bei oxidativem Stress und durch das Vorhandensein von Elektrophilen, interagieren diese mit Cysteinenresten von Keap1, was zu dessen Konformationsänderung und damit zur Freisetzung von Nrf2 und dessen Translokation in den Nucleus führt. Dort bindet Nrf2 an ARE (*antioxidant response element*) in Gen-Promotoren und aktiviert dadurch verschiedene Gene (modifiziert nach Lee *et al.* (2005) [211]).

denen sieben hoch reaktiv auf ROS und Elektrophile reagieren [218]. Die Modifikation dieser Thiol-Gruppen von Keap1 führt zu dessen Konformationsänderung, wodurch die Affinität zu Nrf2 sinkt und Nrf2 freigesetzt wird [210, 215]. Neu freigesetztes Nrf2 transloziert in den Nucleus und dimerisiert dort mit Mitgliedern der Maf (*masuloaponeurotic fibrosarcoma*) Proteinfamilie. Das entstehende Heterodimer fördert die Bindung von Nrf2 an AREs im Promotor von einer Vielzahl von zytoprotektiven und metabolischen Genen, zu denen Phase II Enzyme sowie antioxidative Stressproteine und zugehörigen Stressantwort-Proteine gehören, wodurch deren Transkription erhöht wird (Abbildung 6) [210, 219–221]. Die ARE-Sequenz beinhaltet als Kern-Nukleotid-Sequenz 5`-GTGACNNNGCN-3`, die im Promotor dieser Zielgene enthalten ist [208]. Zu diesen Nrf2-ARE gesteuerten Genen gehören NAD(P)H:Quinone Oxidoreduktase (NQO1), Glutathion S-Transferase (GST), Hämoxigenase-1 (HO-1), um nur wenige zu nennen, die eine Rolle bei der Zellentgiftung von zytotoxischen Elektrophilen und den ROS spielen [209]. Inzwischen ist bekannt, dass Nrf2 etwa 200 Gene reguliert, die in den Zellschutz (Biotransformation, Phase I, II und III), den Lipid- und Kohlenhydratmetabolismus, den Häm- und Eisenstoffwechsel und die Gentranskription involviert sind. Eine ausführliche Auflistung der Nrf2-regulierten Gene wurde von Hayes *et al.* (2014) beschrieben [222].

Nrf2 kann darüber hinaus auch Keap1-unabhängig durch Phosphorylierung beeinflusst werden. Die Nrf2-Phosphorylierung kann durch die Proteinkinase C (PKC), mitogenaktivierte Proteinkinasen

(MAPKs), Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und einige andere Proteinkinasen induziert werden, was die Translokation von Nrf2 beeinflussen kann [211, 223].

Da ROS- und Elektrophile-induzierte Mutationen eine kritische Rolle bei der Karzinogenese spielen, wurde Nrf2 als eines der bedeutendsten und vielversprechendsten molekularen Targets zur Chemoprävention betrachtet [208, 224]. Auch der Schutz vor chronischen Erkrankungen wie kardiovaskulären und neurogenerativen Erkrankungen sowie pulmonären Schäden konnte mit Nrf2 in Verbindung gebracht werden [225–227]. Studien konnten zeigen, dass Nrf2 auf proinflammatorische Stimuli reagiert und die Zellen vor inflammatorischen Schäden schützt [208, 228]. Nrf2-Knockoutmäuse entwickelten komplexe Krankheitsmanifestationen, die von Lupus-ähnlichen inflammatorischen Läsionen in sämtlichen Organen geprägt waren und zu einer früheren Mortalität aufgrund einer progressiven glomerulären Nephritis führten [229].

Eine Verbindung von Nrf2 mit dem Eisenstoffwechsel wurde bei Nrf2-defizitären Mäusen hergestellt. Sie wiesen einen entfärbten Zahnschmelz auf, den die Autoren auf eine Eisentransportstörung zurück führten [230]. Es konnte bei Nrf2-Knockout-Mäusen zudem gezeigt werden, dass eine Ernährungs-induzierte Eisenüberladung zu einer Aktivierung von Nrf2 und dessen zytoprotektiven Downstream-Genen führt. Die Nrf2-Aktivierung schützte Wildtyp-Mäuse vor dem hepatischen Zelltod, während Knockout-Mäuse eine progressive Leberschädigung erlitten [231].

Neben der Vielzahl an positiven Eigenschaften wurden dennoch auch die negativen Seiten des Nrf2-Signalweges, auch als „*dark side of Nrf2*“ bezeichnet, durch intensive Beforschung des Transkriptionsfaktors in den letzten Jahren bekannt. Beispielsweise unterstützt Nrf2 das Überleben von Karzinomzellen und verleiht den Zellen Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika und Radiotherapie [232], was die Doppelbedeutung des Nrf2-Signalweges deutlich macht.

1.5.1 Nrf2 downstream Target Hämoxigenase 1 (HO-1)

Die Hämoxigenase 1 (HO-1) gehört der Gruppe von Enzymen an, deren Transkription durch Nrf2 hochreguliert wird, wobei HO-1 ausgeprägte antiinflammatorische sowie antioxidative Eigenschaften aufweist [208]. Der HO-1-Promotor enthält eine ARE-Sequenz, weshalb die Induktion von Nrf2 zu einer erhöhten Expression von HO-1 in verschiedenen Zelltypen führt [233–235].

HO-1 katabolisiert den ersten enzymatischen Schritt der Hämdegradation, wodurch Kohlenmonoxid (CO), freies Eisen (Fe^{2+}) und Biliverdin entstehen, wobei letzteres durch die Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin (BR) konvertiert wird [236, 237].

Es sind zwei Isoformen der Hämoxigenase bekannt, HO-1 und HO-2. Während letztere eine nicht-induzierbare Isoform darstellt, die hauptsächlich in Gehirn und Hoden exprimiert wird [238], stellt HO-1 die induzierbare Isoform dar. Diese weist niedrige basale Expressionsspiegel in den meisten Zellen

und Geweben auf, deren Level durch eine Vielzahl an Stimuli stark ansteigen kann [239]. Zu diesen zählen hohe Häm-Konzentrationen, oxidativer Zellstress, radioaktive Strahlung, Schwermetalle, sowie Zytokine [240–242].

Die antioxidativen Eigenschaften von HO-1 wurden bislang auf die Bildung der antiinflammatorischen HO-1-Metabolite CO, Biliverdin und Bilirubin zurückgeführt [243, 244, 27, 245, 246]. Darüber hinaus werden heute weitere Effekte der Hämoxxygenase beschrieben, die wichtige physiologische Funktionen beinhalten, die nicht mit der enzymatischen Aktivität zusammenhängen. Beispielsweise werden Protein-Protein-Interaktionen beschrieben, in denen die Hämoxxygenase als Chaperon-ähnliches Protein wirkt. Darüber hinaus wurde eine HO-1-Isoform unter bestimmten Bedingungen auch im Zellkern und anderen Zellkompartimenten gefunden und dort die Aktivität von bestimmten nukleären Transkriptionsfaktoren reguliert [247]. Diese Aktivitäten wurden kürzlich auch als nicht-kanonische Funktionen von HO-1 zusammengefasst [248]. Die genauen Signalwege und Funktionen dieser nicht-kanonischen Funktionen bedürfen jedoch weiterer Untersuchungen.

1.5.2 Nrf2-Aktivator Dimethylfumarat (DMF)

Dimethylfumarat, kurz DMF, (Abbildung 7, A) gehört zu der Gruppe der Fumarsäureester (FAEs). Diese sind kleine Moleküle, die sich als wirkungsvoll bezüglich der Verbesserung von Psoriasis erwiesen haben und eine Reihe von immunmodulatorischen Effekten und antioxidativen Eigenschaften aufweisen [249, 250]. FAEs wurden in Deutschland durch die FDA als Fumaderm[®], das als Hauptwirkstoff DMF beinhaltet, im Jahr 1994 für schwere und später auch für moderate Plaque Psoriasis zugelassen [251].

In den darauf folgenden Jahrzehnten wurde DMF intensiv beforscht und zugrundeliegende Mechanismen der therapeutischen Effekte von DMF identifiziert und charakterisiert. Da DMF sowohl antiinflammatorische als auch antioxidative Eigenschaften aufweist, wurde DMF auch als effektives Therapeutikum bei der Multiplen Sklerose entdeckt [252, 253]. Seit 2013 ist DMF, auch als BG-12 bekannt, als gut charakterisiertes Medikament mit einem guten Sicherheitsprofil für Patienten mit rezidivierender-remitierender Multipler Sklerose (RRMS) als Tecfidera[®] zugelassen [254].

Wie bereits erwähnt gibt es eine Vielzahl an Aktivatoren des Nrf2-Signalwegs, zu denen auch DMF zählt [255]. Viele der Nrf2-aktivierenden Chemikalien sind elektrophil und fähig mit nukleophilen Thiolgruppen, zu denen Cystein-Sulfhydrylgruppen des Nrf2-Repressors Keap1 gehören, zu interagieren und dadurch Nrf2 freizusetzen [256]. Auch Dimethylfumarat reagiert mit dem Cysteinrest Cys151 des Keap1, was die Freisetzung von Nrf2 induziert [257].

SFN bewirkt pleiotrope Effekte und gilt als eines der potentesten Aktivatoren von Phase II Enzymen. Dadurch wird SFN chemopräventive sowie antioxidative Effekte zugeschrieben, die hauptsächlich auf die Aktivierung von Nrf2 zurück zu führen sind. Wie bereits für DMF und 15d-PGJ₂ beschrieben, interagiert auch SFN mit seiner elektrophilen Isothiozyanatgruppe (Abbildung 7, B) mit Cysteinresten des Repressors Keap1, wodurch Nrf2 freigesetzt wird [261].

Die chemopräventive Wirkung von SFN wird neben der Aktivierung von Nrf2 durch zahlreiche andere Effekte vermittelt. SFN wirkt zudem als Histon-Deacetylase-Inhibitor, wodurch SFN eine Rolle in der epigenetischen Regulation von Genen zukommt. Zudem kann SFN Apoptose induzieren sowie die Angiogenese hemmen [262–264].

Neben den beschriebenen antikarzinogenen Eigenschaften wirkt SFN auch antiinflammatorisch, indem es den Transkriptionsfaktor NF- κ B, wie bereits für 15d-PGJ₂ beschrieben, hemmt [208].

1.6 Die Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Oncostatin M (OSM)

Zur Familie der Interleukin-6 (IL-6) Zytokine gehören neben IL-6 u.a. auch IL-11 auch LIF (*leukemia inhibitory factor*) und OSM (Oncostatin M). Mitglieder dieser Zytokin-Familie können sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften aufweisen und spielen eine Rolle bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen der Proliferation und Differenzierung in der Immunregulation, Inflammation, Hämatopoese und Onkogenese [125, 265]. In der Leber stimulieren IL-6-Zytokine die Induktion von Genen der Akut-Phase-Antwort (CRP, Hcpidin).

Zur Signaltransduktion binden die Zytokine der IL-6-Familie an Plasmamembranrezeptorkomplexe, die sich spezifisch für jedes Zytokin zusammensetzen. IL-6 bindet zunächst an seine IL-6- α -Rezeptor-Untereinheit. Dadurch werden zwei Moleküle der signalgebenden Rezeptoruntereinheit gp130 (Glykoprotein 130) rekrutiert, die ein Homodimer bilden. Durch diese Komplexbildung aus IL-6/IL-6- α -Rezeptor/gp130/gp130 wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt [125]. OSM hingegen kann sowohl an den OSM-, als auch an den LIF-Rezeptor binden, wodurch ein Heterodimer mit der signaltransduzierenden Untereinheit gp130 gebildet wird [125]. Durch die Stimulation und die beschriebene Komplexbildung werden gp130-assoziierte Kinasen (JAKs) aktiviert, die einen zytoplasmatischen Teil von gp130 phosphorylieren. An diese wiederum binden STAT-Faktoren, vor allem STAT3 und STAT1, die dadurch selbst phosphoryliert werden, Dimere bilden und in den Kern translozieren, um die Transkription von Zielgenen zu regulieren [125]. Aufgrund dieser Signalkaskade wird von dem JAK/STAT-Signalweg gesprochen, der durch IL-6-Zytokine aktiviert wird [266].

Obwohl gp130 ubiquitär exprimiert wird, ist die Anzahl an Zelltypen, die auf bestimmte Zytokine der IL-6-Familie reagieren, beschränkt, da die spezifischen α -Untereinheiten (LIF-R, OSM-R, IL-6-R) eingeschränkt exprimiert und stark reguliert sind [125].

Um eine überschießende Signalwirkung von IL-6-Zytokinen zu vermeiden, existiert ein negativer Feedback-Mechanismus. So genannte SOCS (*Suppressor of Cytokine Signaling*) binden an JAKs, um die weitere Signaltransduktion zu inhibieren [265, 267].

Die Expression der Zytokine wird stark reguliert und unter normalen Umständen auf niedrigem Niveau gehalten, während durch Infektion, Trauma oder anderen Stresssituationen eine Kaskade an Ereignissen in Gang gesetzt wird, die typisch ist beim Vorliegen einer Inflammation, wozu die Leukozytose, Thrombozytose, Lymphozytenaktivierung und Akut-Phase-Protein-Synthese gehören [268]. Die Regulation und Expression des IL-6-Gens ist der Funktion von IL-6 angepasst und der IL-6-Promotor enthält Bindungsstellen für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren zu denen u.a. NF- κ B, CREB und C/EBP gehören [268]. Es reagiert als eine Art systemisches Alarmsignal, um verschiedene Abwehrmechanismen in Gang zu setzen, um eine Schädigung von Gewebe zu vermeiden [268]. Zu den IL-6 produzierenden Zellen gehören vorrangig Makrophagen/Monozyten, T-Zellen, Mastzellen und Endothelzellen [269]. Die Produktion von IL-6 wird in Makrophagen unter anderem durch TNF- α , PGE₂, LPS und oxidativem Stress induziert [270].

IL-6 übt eine Reihe von Funktionen im Organismus aus, da es nicht nur an B-Zellen, sondern auch an T-Zellen, Hepatozyten, hämatopoetischen Progenitorzellen und Fibroblasten wirkt [265].

Die kontinuierliche Überproduktion von IL-6 wurde inzwischen als Pathogenese einer Vielzahl von inflammatorischer Erkrankungen erkannt, zu denen Rheumatoide Arthritis und chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) gehören [265, 271].

Auch OSM wird von einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen exprimiert, zu denen aktivierte Makrophagen, Monozyten, T-Zellen und Dendritische Zellen zählen [272]. Als Mitglied der IL-6-Familie hat OSM zwar redundante Funktionen dieser Zytokine, doch darüber hinaus scheint OSM einzigartige Effekte zu induzieren, die wahrscheinlich durch die spezifischen Rezeptoren aktiviert werden [272]. Ursprünglich wurde das Interesse an OSM durch die anti-proliferative und damit konträre Wirkung zu IL-6 geweckt [273]. Daten weisen außerdem auf eine wichtige Rolle von OSM bei der Unterdrückung von Autoimmunerkrankungen hin [274]. Durch die pleiotropen Wirkungen und Fähigkeit von OSM viele Organsysteme mit zu regulieren, ist ein weiterführendes Verständnis seiner vielfältigen Wirkungen notwendig, um OSM als Ansatzpunkt möglicher neuer Therapien nutzen zu können [272].

2. Zielsetzung

Patienten mit chronischen Entzündungen, wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, leiden häufig an Anämie, die sich bei diesen Patienten als Anämie der chronischen Entzündung (ACI) manifestiert. Grund dafür ist die entzündungsbedingte Sekretion proinflammatorischer Zytokine, die in der Leber das Akut-Phase-Protein Hepcidin induzieren. Dieses wirkt als Rezeptorligand an dem einzigen bekannten Eisenexporter Ferroportin und induziert dessen Internalisation und Degradation. Dadurch verbleibt das Eisen in den am Eisenstoffwechsel beteiligten Zellen und steht dem Körper nicht mehr für die Bildung neuer Hämoglobin-haltiger Erythrozyten zur Verfügung, weshalb sich eine Anämie manifestiert.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, mögliche neue Stoffe zu finden, die der Zytokin-induzierten Hepcidin-Expression entgegenwirken können und deren molekulare Signalwirkung zu untersuchen. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf eine mögliche Beteiligung des Transkriptionsfaktors Nrf2 gelegt und dessen Rolle bei der Eisenhomöostase untersucht werden. Zu den untersuchten Parametern des Eisenstoffwechsels gehörten dabei insbesondere, neben der Regulation von Hepcidin, die Parameter Ferritin als Eisenspeicherprotein und Ferroportin, dem Eisenexporter.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

Chemikalien Name	Hersteller
Acrylamid	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 99,8%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyde Load Dye	Ambion lifetechnologies, Karlsruhe Deutschland
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Luria Broth Base (Miller's LB Broth Base) [®]	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Methanol	VWR International, Darmstadt
Nariumacetat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
SDS (sodium dodecyl sulfate)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Tris	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trizol Reagent	ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
UltraPure Agarose	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

3.1.2 Einwegmaterialien

Tabelle 5: Verwendete Einwegmaterialien

Name	Hersteller
15 ml, 50 ml Reaktionsgefäße (Falcon)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml Vollpipetten	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
6 Well, 96 well plates	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
60/15 mm Gewebekulturschalen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
75 ml, 175 ml, 250 ml Gewebekulturflaschen	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Agar Schalen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Kryoröhrchen 2 ml PP	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Objektträger und Deckgläser	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pasteurpipetten	VWR International, Darmstadt, Deutschland
PP-PCR-Platten 96 well	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Membran (PVDF)	GE Healthcare Amersham (Buckinghamshire, GB)
Zellschaber	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Klebefolie für MicroAmp®Fast 96-Well Reaction Plate (0.1 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
MicroAmp®Fast 96-Well Reaction Plate (0.1 ml)	Life Technologies (applied biosystems), Darmstadt, Deutschland
10er, 12er, 15er Käbme (1.5 mm)	bsb 11 Biotech Service blu, Nottuln, Deutschland
Spacerplatten (1.5 mm)	bsb 11 Biotech Service blu, Nottuln, Deutschland
0,22 µm, 0.45 µm Spritzenfilter	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nitrocellulose Membran Pierce 0,45 µm	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
1,5 ml, 2 ml Eppi	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
0,5-10 µl, 200 µl, 1000 µl Spitzen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland

3.1.3 Geräte und Zubehör

Tabelle 6: Verwendete Geräte und Zubehör

Geräte und Zubehör	Hersteller
DNA Elektrophorese Apparatur	Bio-Rad, München, Deutschland
Gelelektrophoresekammer - Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Gelelektrophoresekammer Criterion™ Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Mikroplatten-Photometer Infinite®M200 micropolarte reader	Tecan Group, Ltd., Männedorf
Inkubatoren für Zellkulturen	BINDER, Tuttlingen, Deutschland
Kühlzentrifuge J2-21	Beckman, Krefeld, Deutschland
Mikroskop, Olympus CK-2	Olympus, Japan
Nano Drop 2000c	NanoDrop Technologies, USA
Odyssey Infrarot-Aufnahmesystem	LI-COR Biotechnology, Bad Homburg
peqSTAR Thermocycler	PEQLAB-VWR International GmbH, Erlangen, Deutschland
Pipettierhilfe, Accu- jet® pro	Brand, Wertheim, Deutschland
Schüttelinkubator MaxQ4000	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Sicherheitswerkbank HERAsafe®	Kendro-Heraeus Sepatech, Berlin, Deutschland
Kipp-/Rollenmischer Stuart Roller Mixer	Stuart, Staffordshire, UK
StepOne™ Real-Time PCR System	Life Technologies (applied biosystems), Darmstadt, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
UV-Transilluminator GelDoc	Bio-Rad, München, Deutschland
VV3 Vortexer	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Großwedel
Zellzählssystem – TC10 Automated Cell Counter	Bio-Rad, München, Deutschland
Zentrifuge - Varifuge 3.0R	Kendro-Heraeus Sepatech, Berlin, Deutschland

3.1.4 Verwendete Kits

Tabelle 7: Verwendete Kitsysteme

Verwendete Kits	Hersteller
Dual-Glo® Luciferase Assay System Kit	Promega, Mannheim, Deutschland
High Capacity RNA-to-cDNA Kit	Life Technologies (Applied Biosystems®), Darmstadt, Deutschland
Lipofectamine® LTX mit Plus™ Reagent	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Nuclear Extract Kit	Active Motif®, La Hulpe, Belgien
NucleoBond® Xtra Maxi / Maxi Plus Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Plasmid Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

3.1.5 Verwendete Enzyme und Reagenzien

Tabelle 8: Verwendete Enzyme und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
100bp-Größenstandard	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
1Kb-Größenstandard	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
6x DNS Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Complete protease inhibitor cocktail (EDTA free)	Roche, Mannheim, Deutschland
Desoxynucleotid-Mischung (dNTP; 10mM je Nucleotid)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
DNA Restriktionsendonucleasen: XhoI, HindIII-HF	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
DNase I (RNase-free)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X)	Life Technologies (Applied Biosystems®), Darmstadt, Deutschland
Precision Plus Protein™ Standards (All blue)	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland

3.1.6 Verwendete Puffer und Lösungen

Tabelle 9: Verwendete Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
TAE Puffer	40 mM TRIS 1 mM EDTA 1,14 % (v/v) Essigsäure
EtBr-Lösung	2mg/ml Ethidiumbromid (EtBr)
Trypanblau-Färbelösung	0,4% Trypanblau 0,9% NaCl
PBS-T	PBS 0,1% Tween-20
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
Transferpuffer (ohne SDS)	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% Methanol
Laufpuffer (SDS-PAGE) 10x	250 mM Tris 1,92 M Glycin 1% SDS
SDS-Probenpuffer (5x)	250 mM Tris/HCl, pH 8,0 5 mM EDTA, pH 8,0 10% SDS 10% Mercaptoethanol 50% Glycerol 0,05% Bromphenolblau

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung und Passagieren von adhärenenten Zellen

Alle Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), das 10 % hitze-inaktiviertes fetales Kälberserum (FKS), 1 % nicht-essentielle Aminosäuren, 1 % Natriumpyruvat und 1 % Penicillin/Streptomycin enthält, kultiviert. Die Lagerung der verwendeten Zellen erfolgte bei 37°C in einem 5% CO₂ Inkubator bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%.

Tabelle 10: Verwendete Medien

Medium Inhaltsstoffe	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM	Life Technologies (Gibco®), Darmstadt, Deutschland
Fötiales Kälberserum (FCS)	Life Technologies (Gibco®), Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	Life Technologies (Gibco®), Darmstadt, Deutschland
Penicillin / Streptomycin	Life Technologies (Gibco®), Darmstadt, Deutschland
Trypsin EDTA	Life Technologies (Gibco®), Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM ohne Phenolrot	Life Technologies (Gibco®), Darmstadt, Deutschland
MEM, nicht-essentielle Aminosäuren, 100x	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Opti-MEM Reduced Serum Medium	Life Technologies (Gibco®), Darmstadt, Deutschland
RPMI Medium 1640	Life Technologies (Gibco®), Darmstadt, Deutschland

Die Zellen wurden zwei Mal pro Woche passagiert. Dafür wurden die adhärennten Zellen mit 3 ml Trypsin-EDTA (TE) gewaschen und in 6 ml TE für 5-8 Minuten im Inkubator zum Ablösen der Zellen inkubiert. Die gelösten Zellen wurden in 9 ml Medium resuspendiert und die entstandene Zellsuspension in einem 15ml Falcon bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurden die Zellen in 2 ml frischem Medium zur Verminderung der Zellklumpenbildung mit einer Kanüle resuspendiert und je nach Dichte der Zellen 0,3-0,5 ml des Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit 25ml neuem Medium aufgefüllt.

Die Zellen wurden maximal bis Passage 30 für Versuche verwendet und danach verworfen.

3.2.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Für die Lagerung der Zellen über einen längeren Zeitraum wurden diese wie oben beschrieben abtrypsinisiert und nach dem Zentrifugationsschritt in antibiotikafreiem Medium resuspendiert, auf ca. 9ml Medium aufgefüllt und mit dem Zellzähler gezählt. Die gewünschte Zellanzahl wurde in ein neues Falcon überführt und nochmals zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (antibiotikafreies Medium + 10% DMSO) resuspendiert und das Volumen entsprechend so aufgefüllt, dass in pro ml Medium 5 Millionen Zellen gelöst waren. Je 1ml der Suspensionslösung wurde pro Kryoröhrchen überführt und bei -80°C eingefroren.

Für ein schonendes Auftauen wurden die Zellen in vorgewärmten Medium resuspendiert und in einer mittleren Zellkulturflasche ausgesät.

3.2.3 Lebendzellzahlbestimmung mit Trypanblau

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20 ml Zellsuspension in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 20 µl Trypanblau-Lösung (0,4% (w/v) Trypanblau; 0,81% (w/v) NaCl; 0,06% (w/v) KH_2PO_4) vorsichtig resuspendiert. Mittels des Zellzahlgerätes „TC10 automated Cell Counter“ wurde die Zellzahl bestimmt.

3.2.4 Isolierung humaner Monozyten aus Leukozytenkonzentraten und Differenzierung zu Makrophagen

Zur Isolierung von Monozyten wurden Leukozytenkonzentrationen, sogenannte Buffy-Coats, aus venösem Blut gesunder, erwachsener Spender isoliert. Die Konzentrate wurden über den Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes in Frankfurt bezogen.

Die Isolierung erfolgte unter einer Sicherheitswerkbank und wurde separat für jeden Spender durchgeführt. In 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 10 ml 5%-Dextranlösung in 1x PBS vorgelegt und mit 30-40 ml Leukozytenkonzentrat vermischt. Anschließend sedimentierten die Erythrozyten für 30 min bei RT sodass die gewonnenen Plasmaüberstände vorsichtig auf 10 ml Lymphozytenseparationsmedium (LSM) in 50 ml Zentrifugenröhrchen geschichtet werden konnten.

Durch die anschließende Dichtezentrifugation für 10 min bei 2300 rpm und RT ohne Bremse trennten sich die verschiedenen Zelltypen charakteristisch in Thrombozyten, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) bzw. Monozyten und polymorphkernige Leukozyten (PMNL) mit den restlichen Erythrozyten auf. Dabei lagen die PMNL unten vor mit einem darüber liegenden Monozyte-Ring und einer ganz oben liegenden Thromozytenüberstand.

Nach der Dichtezentrifugation wurde das thromozytenreiche Plasma oberhalb des Rings mit einer 25 ml Pipette abgenommen und verworfen, um die Zellen des Monozytenrings mit einer Pipette in ein neues Zentrifugenröhrchen überführen zu können. Die isolierten Zellen wurden mit 1x PBS resuspendiert und bei 1500 rpm für 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet ein zweites Mal gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in vorgewärmten (37°C) RPMI Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin resuspendiert und auf Zellkulturschalen ausgesät. Die Zellen eines Spenders wurden hierfür in 80 ml Medium suspendiert und auf 8 Kulturschalen zu je 10 ml verteilt. Es erfolgte eine einstündige Inkubation der Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 , in der die im Medium enthaltenen Monozyten am Zellkulturschalenboden adhärten.

Differenzierung zu Makrophagen

Nach der einstündigen Inkubation wurde das Medium entnommen und die adhärenierten Monozyten zwei Mal mit 5 ml vorgewärmten (37°C) RPMI Medium (1% Penicilin/Streptomycin) gewaschen. Pro Kulturschale wurden danach 10 ml RPMI Medium mit 1% Pen/Strep und 5% Humanplasma hinzugegeben. Im Brutschrank wurden die Monozyten bei 37°C und 5% CO₂ für sieben Tage unter zweimaligem Waschen mit Medienwechsel zu Makrophagen differenziert. Die Differenzierung wurde regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert. Auch diese Arbeitsschritte erfolgen unter einer Sterilbank.

Differenzierung zu M1-Makrophagen (Makrophagen Typ1)

Während der siebentägigen Differenzierung der Monozyten wurde den Zellen an allen Tagen 10 ng/ml GM-CSF (Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender-Faktor) und von Tag sechs bis sieben 10 ng/ml IFN- γ (Interferon- γ) zugesetzt.

Die Inkubation der Makrophagen mit Substanzen erfolgte am 7. Tag nach dem Aussäen in 10 ml RPMI-Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin und 5% Humanplasma.

3.2.5 Aussäen der Zellen (HepG2)

Für das Aussäen der Zellen wurden die Zellen wie beschrieben passagiert. Ein Teil der Zellen wurde in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät, der andere Teil auf ca. 8 ml mit neuem Medium aufgefüllt und wie beschrieben gezählt.

Je nach Versuch wurden die Zellen in 96well-Platten mit je 10 000 Zellen/well in 100 μ l Medium ausgesät. Dafür wurde ein Ansatz für 110 wells hergestellt und mittels Multistep-Pipette ausgesät.

Für Versuche im 6well-Format wurden 0,3 Mio bzw. 1 Mio Zellen/well in 2 ml Medium ausgesät. Auch hierfür wurde vorher ein entsprechender Ansatz hergestellt.

Für die Proteinanalysen wurden die Zellen in Zellkulturschalen von 6mm Durchmesser in 5 ml Medium ausgesät.

3.2.6 Behandeln der Zellen (HepG2)

Wenn nicht anders beschrieben, wurden je nach Versuch die Zellen für die Behandlung am Vortag passagiert und auf Zellkulturplatten in 10% FCS HI Medium ausgesät. Zur Untersuchung wurden die Zellen mit den entsprechenden Substanzen in 1% FCS HI Medium für die angegebene Zeiten inkubiert.

3.2.7 Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA

Bei der Transfektion handelt es sich um eine Methode, bei der fremde RNA/DNA in Zellen eingebracht wird. Für die Transfektion zum Einbringen von Plasmid-DNA wurde die Zellen am Tag (~24h zuvor) im 96-well Format mit 10.000 Zellen/well ausgesät. Bei einer Konfluenz von ~70-80% wurden die Zellen mittels dem Lipofektamin® LTX Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben transfiziert. Dafür wurde ein Ansatz für die zu transfizierenden Wells hergestellt. Pro well wurde 200ng Plasmid-DNA mit 12 ng/well des Renilla-Kontrollplasmids vermengt und auf ein Endvolumen von 20 µl mit Opti-MEM® Medium aufgefüllt. Nach Zugabe von 0,1 µl Plus™ Reagent mit einer Inkubationszeit von 5 min wurde pro well 0,5 µl Lipofectamine™ LTX Reagent dazu gegeben und für weiter 25 min inkubiert. Zwischenzeitlich wurde das Medium der Zellen durch Absaugen entfernt und durch 100 µl/well antibiotikafreies weißes 10% DMEM Medium ersetzt. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde 20 µl des Ansatzes pro well mit der Multistep-Pipette pro well hinzu pipettiert. 24 h nach der Transfektion konnte das Medium entfernt und durch Behandlungsmedium für den Versuchsablauf ersetzt werden.

Tabelle 11: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
-2762 HepLuc	Hepcidin-Promotor von 2762 bp in pGL4.17 basic (Luciferase Reporter Gen)	Olivier Loreal, University of Rennes [275]
pRL-SV40	pRL Renilla Luciferase Reporter Vector	Promega
HepLuc_Mut_ ARE	Eingefügte Punktmutation in ARE-Sequenz 5`-GTGACN/NGC-3` im Hepcidin-Promotor	Zielgerichtete Mutagenese mit -2762 HepLuc
HepLuc_Mut BMP-RE2	Eingefügte Punktmutation in BMP-RE2-Sequenz im Hepcidin-Promotor	Zielgerichtete Mutagenese mit -2762 HepLuc

3.2.8 Transfektion von Zellen mit siRNA

Bei der transienten Transfektion von Zellen mit siRNA (short interfering RNA) lagert sich die verwendete siRNA an die komplementäre Nukleotidsequenz eines Zielgens an, unterbindet dadurch die Translation der RNA und sorgt somit zur Degradation dieser.

Für die Transfektion in HepG2-Zellen wurde Lipofektamin RNAiMAX™ (Thermo Fisher Scientific) und ein spezielles Herstellerprotokoll für diesen Zelltyp zur reversen Transfektion verwendet. Dabei wurden die Zellen zeitgleich mit dem Aussäen in 6-well-Platten transfiziert. Dazu wurde die

gewünschte Menge an siRNA, wenn nicht anders beschrieben 100 pmol siRNA, in ein Reaktionsgefäß pipettiert, mit 500 µl OptiMEM-Medium aufgefüllt, mit 5 µl RNAiMax versetzt und für 15 min inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ein Zellansatz mit 0,3 Mio Zellen in 2,5 ml Antibiotika-freiem Medium/well für die entsprechende well-Anzahl hergestellt und in die wells pipettiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde der siRNA-Ansatz zu den Zellen hinzu gegeben und für 24h bei 37°C inkubiert, bevor die Zellen für den jeweiligen Versuch behandelt wurden.

3.2.9 Reporterassay (Luciferaseassay)

Der Reporterassay wird verwendet, um die Aktivität und Regulation eines Promotors zu analysieren. Das Reportergen, in diesem Fall die Firefly-Luciferase, befindet sich direkt hinter dem zu untersuchenden Promoter. Durch Bindung eines Transkriptionsfaktors an den Promotor wird je nach aktivierenden oder inhibierenden Eigenschaften dieses Faktors die Expression der Luciferase induziert oder inhibiert. Zur Normierung des Lumineszenzsignals der Firefly-Luciferase auf das Zellexpressionsniveau der Plasmide wurde die Renilla-Luciferase, die sich hinter einem Housekeeping-Gen befindetet, verwendet.

Nach der transienten Transfektion (siehe Transfektion der Zellen mit Plasmid-DNA) und der gewünschten Inkubationszeit wurde die Aktivität der Firefly- und Renilla-Luciferase nach Herstellerprotokoll mittels Dual-Luciferase® Reporter Assay System von Promega ermittelt. Dazu wurde das Inkubationsmedium aus den wells abgesaugt, durch 50 µl weißes DMEM-Medium ersetzt und 50 µl Dual-Glo Luciferase Reagenz hinzugegeben. Nach 10 min lichtgeschützter Inkubation bei RT auf einem Plattenschüttler wurden die lysierten Zellen in eine weiße Lumitrac 200 Platte (Greiner Bio-One) mit der Mehrkanal-Pipette überführt und die Firefly-Luciferase-Aktivität am Tecan Infinite® M200 Mikropplatten-Photometer (Tecan Group) ausgelesen. Um anschließend die Luciferase-Aktivität zu stoppen und gleichzeitig die Renilla-Luciferase zu messen, wurde 50 µl frisch angesetzten Stop&Glo Substrat (Promega) zugegeben, für 10 min bei RT lichtgeschützt inkubiert und am Infiite® M200 Mikropplatten-Photometer gemessen. Die gemessenen Lumineszenzwerte der Firefly-Luciferase wurden mit den Werten der Renilla-Luciferase ins Verhältnis gesetzt, um Werte für die relativen Lumineszenzeinheiten zu erhalten.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Agarosegelelektrophorese

Um RNA und DNA-Moleküle gemäß ihrer Größe aufzutrennen, wird die Agarosegelelektrophorese verwendet. Die Auftrennung erfolgt aufgrund der negativen Ladung des Phosphatrückgrades von

Nukleinsäuren, die durch Anlegen einer Spannung zur Anode wandern. Die Nukleinsäuren werden hinsichtlich ihrer Größe aufgetrennt, da kleine Nukleinsäure-Fragmente schneller durch die Agarose-Matrix wandern können. Entsprechend der aufzutrennenden Nukleinsäure-Moleküle wurde 1% oder 2% (w/v) Agarose in TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst, Ethidiumbromid dazu gegeben, in eine horizontale Gelkammer gegossen und mit einem Kamm versehen. Das auspolymerisierte Gel wurde in eine mit 1x TAE gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt. Etwa 2000 ng DNA bzw. RNA-Proben wurden auf 4 µl mit MQ versetzt und mit 3 µl Formaldehyde Load Dye versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Durch das Anlegen von 100 Volt erfolgte die Separation elektrophoretisch. Durch die Einlagerung des Ethidiumbromids in die DNA bzw. RNA wurden die Nukleinsäuren mit dem UV-Transilluminator bei 254/365 nm sichtbar gemacht und dokumentiert.

3.3.2 Transformation von E.coli

Um DNA zu vervielfältigen, werden Bakterienzellen verwendet. Die Transformation dient dem Einbringen von DNA in kompetente Bakterienzellen. Für die Transformation in SURE (Stop Rearrangement Events)-Bakterien wurde 1 µl DNA mit 100 µl Bakterien für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte für 45 sec bei 42°C eine kurze Hitzeschockperiode, um die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterien zu bewirken. Anschließend wurden die Bakterien für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 500 µl LB Medium folgte die Regeneration der Bakterien für 1 bei 37°C auf dem Schüttler. Anschließend wurde für 10 min auf höchster Stufe zentrifugiert, um die Bakterien zu verdichten, der Überstand grob verworfen und die mit dem restlichen Medium resuspendierte Bakterienlösung auf eine vorgewärmte Ampicillin-haltige Agar-LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung der Plasmid-DNA mittels Bakterienlyse wurde das NucleoBond® Xtra Maxi Kit von Macherey-Nagel entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Dafür wurden am Tag zuvor Bakterienklone, die auf der Ampicillin-haltigen Agar-LB-Platte gewachsen waren, gepickt und über Nacht in 500 ml Ampicillin-haltigen LB-Medium bei 37°C und 300 rpm kultiviert. Zur Isolierung der DNA aus den Bakterien wurden das Bakterien-haltige Medium für 10 min bei 5500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und mittels Kit und Herstellerangabe wurde die DNA geerntet, gewaschen und gelöst.

3.3.4 Kontrollverdau der Plasmid-DNA

Um zu überprüfen, ob bei der Transformation der Plasmid-DNA die spezifischen Plasmide vervielfältigt wurde, wurde ein Kontrollverdau durchgeführt. Dabei werden die spezifischen Schnittstellen der Insertation der Fragmente verwendet. Da bei dem HepLuc-Plasmid Konstrukt, der 2762 bp lange Hepcidin-Promoter zwischen den Restriktionsstellen Xpn1 und Xho1 in den pGL4.17 Basisvektor (Promega) eingefügt wurde, konnten diese Stellen für den Verdau verwendet werden. Der Ansatz dafür ist in Tabelle 12 dargestellt. Dieser wurde für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte bei 80°C für 20 min die Hitzeinaktivierung der Enzyme und der Ansatz wurde auf ein 1% Agarosegel aufgetragen (siehe Agarosegelelektrophorese), um nach der Größenauftrennung die zwei Größenspezifischen DNA-Fragmente unter dem UV-Transilluminator sichtbar zu machen

Tabelle 12: Kontrollverdau nach Transformation

Kontrollverdau-Ansatz	
Plasmid (~600 ng)	x µl
Puffer 4 NEB (10x)	5 µl
Restriktionsendonuklease KpnI-HF™ (NEB)	1 µl
Restriktionsendonuklease XhoI (NEB)	1 µl
BSA (100x)	0,5 µl
MQ	y µl
Gesamtansatz	50 µl

3.3.5 Zielgerichtete Mutagenese

Die zielgerichtete Mutagenese ist ein Verfahren, bei dem speziell entworfene Primer verwendet werden, um eine gewünschte Mutation in doppelsträngige Plasmid-DNA einzufügen [276]. Dazu wurde ein Mastermix-Ansatz aus Mutationsprimer, Puffer, Enzym und Plasmid-DNA hergestellt (Tabelle 14) und im PCR-Cycler unter Verwendung des PCR-Programms, wie in Tabelle 13 beschrieben, inkubiert. Die verwendeten Mutationsprimer sind in Tabelle 15 aufgeführt. Anschließend wurde 10 µl der PCR-Probe mit *DNA Loading Dye* auf ein 1 %iges Agarosegel zur Kontrolle aufgetragen (siehe Agarosegelelektrophorese), um sicherzustellen, dass nur eine DNA-Bande zu sehen war. Bei positivem Agarosegel wurde das Ursprungs-Plasmid verdaut. Dazu wurden die verbleibenden 40 µl der PCR-Probe mit 1 µl DpnI (10 u/µl) und 5µl (10 x) BSA versetzt und für 45 min bei 37°C inkubiert. Zur Überprüfung der bestehenden Mutation in der doppelsträngigen Plasmid-DNA wurde die Probe zur DNA-Sequenzierung (Scientific Research and Development GmbH (SRD), Bad Homburg) abgegeben.

Bei positivem Sequenzierungsergebnis wurden 5 µl der verdauten PCR-Probe zur Transformation in kompetente Bakterien verwendet (siehe Transformation von E.coli).

Tabelle 13: PCR-Programm für zielgerichtete Mutagenese

PCR-Programm		
Zyklus 1 (1 x)	95°C für 30 sek	Start
Zyklus 2 (16-18 x)	95°C für 15 sek	Denaturierung
	(60°C) für 1 min	Anlagerung
	72°C für 15 min (Pfu I: 2 min/kbp)	Verlängerung
Zyklus 3 (1x)	72°C für 5 min	Ende
Zyklus 4	Unendlich	Lagerung

Tabelle 14: Zusammensetzung Ansatz für zielgerichtete Mutagenese

Mutagenese-Ansatz	
Reaktionspuffer (10 x Pfu Puffer)	5 µl
50 ng Plasmid	x µl
Forward Primer (50 µM)	1 µl
Reverse Primer (50 µM)	1 µl
dNTP mix (10 Mm)	1 µl
Pfu (2,5 u/µl)	1 µl
MQ	y µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 15: Verwendete Primersequenzen für zielgerichtete Mutagenese

Verwendete Primersequenz	
HepLuc_Mut ARE	fwd 5`-CCGGGCTCTGGTAACTTGACTGACACTGGATG-3`
	rev 5`-CATCCAGTGTCAGTCAAGTTACCAGAGCCCGG-3`
HepLuc_Mut BMP-RE2	fwd 5`-CCTTGCACCAAGGCTCTGGTGCCTGTGCTGTGACCC-3`
	rev 5`-GGGTACAGCACAGGCACCAGAGCCTTGGTGCAAGG-3`

3.3.6 Isolierung und Fällung von RNA aus Zellen und anschließende cDNA-Synthese

Zur Isolierung von RNA wurden die Zellen in 6-well-Schalen ausgesät und ca. 24 h später für die entsprechende Inkubationszeit behandelt. Nach Ende dieser Behandlungszeit wurden die Zellen mit eiskalten PBS gewaschen, in 1 ml Trizol aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach ca. 10 minütiger Inkubation auf Eis wurde 200 µl Chloroform zugegeben, 15 sec auf höchster Stufe gevortext und nochmals 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 4°C und 12000 g für 30-45 min zentrifugiert. Die obere RNA-haltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl 2-Propanol, 5 µl 3M NaAc und 1 µl Glycoblu, zur Visualisierung der RNA, versetzt und bei -20°C für 3 h oder über Nacht gefällt. Im Anschluss folgte ein Zentrifugationsschritt für 30-45 min bei 4°C und 12000 g. Nach sorgfältigem Verwerfen des Überstandes wurde das entstandene RNA-Pellet mit 500 µl 70%-Ethanol-Lösung zum Waschen des Pellets versetzt und nochmals für 30-45 min bei 4°C und 12000 G zentrifugiert. Zur Trocknung des RNA-Pellets wurde der Überstand wieder sorgfältig entfernt und nach 5-10 min wurde das Pellet in 32 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Der anschließende Verdau der enthaltene DNA erfolgte durch Zugabe von 4 µl 10x Reaction Buffer mit MgCl₂ (Thermo Scientific) und 2 µl DNase I (1 U/µl, Thermo Scientific), wobei dieser Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert wurde. Darauf folgend wurde die RNA zur Verbesserung der Reinheit mit 200 µl Ethanol, 1 µl Glycoblu und 4 µl Natriumacetat (3 M) wieder gefällt und für mind. 30 min bei -80°C gefällt. Anschließend wurde für 30-45 min bei 4°C und 12000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei RT für 5-10 min getrocknet. Nach Resuspension in 20-35µl DEPC-Wasser und lösen des Pellets für 5 min im Thermomixer bei 37°C wurde mittels NanoDrop 2000c die Konzentration der RNA photometrisch bestimmt. Zur Überprüfung der RNA-Integrität wurde anschließend etwa 2000 ng RNA über ein 1%iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Agarosegelelektrophorese).

Für die cDNA Synthese wurde 2000 ng RNA eingesetzt und entsprechend auf ein Endvolumen von 9 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt (Tabelle 16). Die reverse Transkription der RNA zu cDNA erfolgte durch den Einsatz des *High Capacity RNA-to-cDNA Kits* (Thermo Fisher Scientific) entsprechend den Herstellerangaben. Dieser Ansatz wurde für 1h bei 37°C und anschließend 5 min bei 95°C im PCR-Cycler inkubiert.

Tabelle 16: Zusammensetzung der cDNA Synthese

cDNA Synthese Ansatz	
RT Puffer (2 x)	10 µl
Enzym Mix (20x)	1 µl
2000 ng RNA Probe	9 µl
Gesamtvolumen	20 µl

3.3.7 Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Um die Genexpression in Zellen zu analysieren und gleichzeitig die Expression zu quantifizieren, wurde die qRT-PCR angewendet. Dazu wurde die aus der RNA umgeschriebene cDNA und die DNA-abhängige Polymerase eingesetzt, welche einzelsträngige DNA als Vorlage nutzt. Zudem wurde Gen-spezifische Primer bestehend aus Oligonukleotiden verwendet. Die cDNA wird dabei mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Dazu lagern sich die Primer in vorwärts sowie rückwärts Richtung an die DNA-Vorlage an. Durch einen thermischen Zyklus, der aus einem Denaturierungsschritt zur Dissoziation doppelsträngiger DNA, einem Hybridisierungsschritt zur Anlagerung der Primer an die Einzelstränge sowie einem Verlängerungsschritt zur Anlagerung weiterer Nukleotide an den Primer um einen komplementären DNA-Strang zu erzeugen, erfolgt die exponentielle Amplifikation der Template-Sequenz. Die Quantifizierung erfolgte mit dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, der sich während der Amplifikation an die DNA anlagert und zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität führt. Dabei steigt die Fluoreszenzintensität proportional mit der Menge an PCR-Produkt an, was Rückschlüsse auf die Genexpression der Zielgene zulässt. Das dabei ablaufende PCR Programm ist in Tabelle XY dargestellt.

Für den qRT-PCR Ansatz wurde die cDNA (s. cDNA-Synthese) 1:5 verdünnt und die Primer in einer Konzentration von 2 pmol/µl eingesetzt. Der genaue PCR Ansatz für eine Probe ist in Tabelle 17 zusammengetragen.

Nach dem Pipettieren des PCR-Reaktionsansatzes in eine 96-well Platte wurde die Platte für 1 min bei 1800 rpm zentrifugiert und anschließend mit dem PCR-Cycler (StepOnePlus, Applied Bioscience) analysiert. Das Protokoll für das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 18 dargestellt.

Zur Quantifizierung der DNA-Amplifikation wurde die $\Delta\Delta C_t$ Methode nach Livak *et al.* verwendet [277].

Zur Normierung der amplifizierten DNA wurde das Referenz-Gen GAPDH verwendet.

Die Analyse der PCR-Fragmente erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

Tabelle 17: pRT-PCR Ansatz pro Probe

pRT-PCR-Ansatz	
SYBR Green qPCR Master mix (2 x)	12,5 µl
Primer forward	3,75 µl
Primer reverse	3,75 µl
MQ	4 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Tabelle 18: Verwendetes qRT-PCR Programm

PCR-Programm		
Zyklus 1 (1 x)	95°C für 10 min	Start
Zyklus 2 (40 x)	95°C für 15 sek	Denaturierung, Anlagerung
	60°C für 1 min	Verlängerung
Zyklus 3 (1x)	95°C für 15 sek	Ende der Verlängerung sowie
Zyklus 4 (1x)	60°C für 1 min	Schmelzkurvenbestimmung
Zyklus 5 (1 x)	95°C für 15 sek	
Zyklus 6	Unendlich	Lagerung

Tabelle 19: Verwendete Primer-Oligonukleotide für die Expressionsanalyse

Bezeichnung Zielgen	Primer-Oligonukleotidsequenz	Tm (°C)
Hepcidin	fwd 5'-CAGCTGGATGCCCATGTTC-3'	
	rev 5'-CGCAGCAGAAAATGCAGATG-3'	
Ferritin (FTH1)	fwd 5'-TGGGAGCGCCCGAAT-3'	
	rev 5'-CCAGGGTGTGCTTGTCAAAGA-3'	
Ferroportin	fwd 5'-AGTCATCGGCTGTGGCTTTATT-3'	
	rev 5'-CGTACTCCACGCACATGGA-3'	
HO-1	fwd 5'-CAGGCAGAGGGTGATAGAAGAG-3'	
	rev 5'-GGAGCGGGTGTGAGTGG-3'	
Nrf2	fwd 5'-GGACATGGATTTGATTGACATAC-3'	
	rev 5'-CTCCTTTTGGAGTTGTTCTTGT-3'	
NQO1	Fwd 5' CAATTCAGAGTGGCATTTC-3'	
	Rev 5' GAAGTTTAGGTCAAAGAGG-3'	
GAPDH	fwd 5'-GGCCTCCAAGGAGTAAGACC-3'	
	rev 5'-AGGGGAGATTCAGTGTGGTG-3'	

3.4 Proteinbiochemie

3.4.1 Zelllyse für die zytoplasmatische und nukleäre Proteinernte

Um die Proteine aus den behandelten Zellen nach der gewünschte Inkubationszeit zu ernten und dabei gleichzeitig Proteine aus dem Zytoplasma und dem Nukleus zu trennen, wurde das *Nuclear Extract Kit* von Active Motif® verwendet und das Herstellerangaben vorgegangen. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt und die Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C. Zunächst wurde Medium verworfen und die Zellen mit 800 µl des zuvor nach Herstellerangaben angesetzten PBS/Phosphataseinhibitor-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden danach in 1 ml des Puffers mit einem Zellschaber abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Zelllösung für 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 250 µl des vorher nach Herstellerangaben angesetzten hypotonischen Puffers durch mehrmaliges auf und ab pipettieren gelöst und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 15 µl Detergenz hinzugefügt, für 10 sek gevortext und für 30 sek bei 14000 x g bei 4°C zentrifugiert. Die dadurch im Überstand erhaltene Zytoplasmaproteinfraktion (CF) wurde in ein neues beschriftetes Reaktionsgefäß gründlich überführt und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Das verbleibende Zellpellet, das Zellfraktionsbestandteile und den Zellkern enthielt, wurde in 25 µl des frisch angesetzten Lysepuffers (CLB) resuspendiert, um den Zellkern zu lysieren, mit 1,3 µl Detergenz versetzt und für 10 sek gevortext. Anschließend erfolgte ein Inkubationsschritt für 30 min auf einem Plattenschüttler bei 150 Mot 1/min und auf Eis. Danach wurden die Reaktionsgefäße für 10 min bei 12000 x g zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene Kernproteinfraktion (NF) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, bei -80°C eingefroren oder direkt zur Proteinbestimmung nach Bradford weiterverwendet.

3.4.2 Zelllyse für Gesamtproteinernte

Um alle Proteine aus den Zellen zu lösen (Gesamtzellextrakt), wurde auch hierfür die Kitkomponenten des *Nuklear Extract Kit* von Active Mofif® verwendet und nach dem Protokoll der Gesamternte vorgegangen (whole cell extraction). Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt und die Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C. Zunächst wurden das Medium entfernt und die Zellen mit 1 ml zuvor nach Herstellerangaben angesetztem eiskaltem PBS/Phosphatase Inhibitor Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml frisch hinzugefügtem selbigen Puffer mit einem Zellschaber abgeschabt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 300 µl zuvor nach Herstellerangaben angesetztem Gesamtlysepuffer (CLB) durch mehrmaliges auf und ab pipettieren resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis auf einem Schüttler bei 150 rpm wurden die Reaktionsgefäße für 30 sek gevortext

und es folgte ein 20 min Zentrifugationsschritt bei 14000 x g. Der Überstand wurde in ein neues beschriftetes Reaktionsgefäß überführt und entweder bei -80°C eingefroren und es wurde mit der Proteinkonzentrationsbestimmung fortgefahren.

3.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Der Bradford-Assay ist eine kalorimetrische Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250. Der Farbstoff bildet dabei Komplexe mit Aminosäuren, wobei es zu einem Absorptionsshift von 470 nm auf 595 nm kommt [278]. Die Proteinproben wurde dazu vorher 1:50 verdünnt und 10 µl der Verdünnung auf eine 96-well Platte in Triplikaten pipettiert. Anschließend wurden 200 µl des 1:5 verdünnten Bradfordlösung auf die Proben gegeben, für 5 min bei RT inkubiert und am Mikroplatten-Photometer bei 595 nm gemessen. Die Proteinbestimmung erfolgte durch gleichzeitiges pipettieren einer Standardproteingerade, wozu der ebenfalls 1:50 verdünnte jeweilige Puffer und eine definierte Bovine Serumalbumin Proteinkonzentration verwendet wurde.

3.4.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels diskontinuierlicher Polyacrylamid Gelelektrophorese, wobei die Proteine hinsichtlich ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Durch die Verwendung von sodium dodecyl sulfate (SDS) werden die Proteine mit negativer Ladung versehen, wodurch sie nach Anlegen eines elektrischen Feldes zunächst durch das großporige Sammelgel wandern. Anschließend werden sie in einem kleinerporigen Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. 80 µg Protein wurden dafür nach der Proteinkonzentrationsbestimmung auf 22,5 µl mit MQ aufgefüllt und mit 7,5 µl SDS-Ladepuffer (250 mM Tris-HCL pH 6,8, 8% SDS, 40% Glycerol, 20% 2-Mercaptoethanol, 0,05% Bromphenolblau) versetzt und für 5 min bei 95°C aufgekocht. Die Gele wurden vor der Verwendung selbst hergestellt und die Zusammensetzung ist in Tabelle 20 aufgeführt. Die Auftrennung erfolgte durch zunächst langsames Einlaufen bei 90 V und 20 min durch das Sammelgel und weiteren ~90 min bei 120 V in einer vertikalen Laufkammer.

Tabelle 20: Zusammensetzung von Sammel- (4%) und Trenngel (10%)

Sammelgel (4%)	(μ l)	Trenngel (10%)	(μ l)
30% Acrylamid	533	30% Acrylamid	2333
0,5M Tris-HCL, ph=6,8	1008	1,5M Tris-HCL, ph=8,8	1773
10% SDS	40	10% SDS	70
MQ	2389	MQ	2744
APS	24	APS	72
TEMED	6	TEMED	8

Die Mengenverhältnisse beziehen sich auf eine Geldicke von 1,5mm und 1 Gelkammer

3.4.4 Western Blot und Immundetektion

Im Anschluss an die Separation der Proteine durch die SDS-PAGE wurde die Wetblot-Methode angewandt, um die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran zu transferieren [279]. In eine Blotting-Kassette, die in einer mit Transferpuffer gefüllte Wanne gelegt wird, werden folgende Teile aufeinander geschichtet: Ein getränkter Schwamm, 4 Whatman-Filterpapiere, das SDS-Gel (Sammelgel vorher abgetrennt), die Nitrozellulosemembran, erneut 4 Whatman-Filterpapiere und ein weiterer Schwamm. Die Kassette wird danach zusammengeklappt und vertikal in die Wetblot-Apparatur gestellt. Durch das Anlegen einer Spannung von 90 V erfolgt 85 min der Proteintransfer. Nach dieser Zeit wurde die Kassette wieder auseinander gebaut und die Membran für 1h bei RT in Blockierlösung (Odyssey Blocking Buffer 1:1 mit PBS verdünnt) inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Anschließend konnte die Membran mit dem Primärantikörper bei 4°C über Nacht inkubiert werden. Nach der Inkubationsphase wurde die Membran drei Mal mit Waschlösung (PBS mit 0,1% Tween-20) für 5 min bei RT gewaschen und 1 weiteres Mal mit reinem PBS. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Fluorophor-konjugiertem Sekundärantikörper für 1h bei RT. Danach wurde die Membran wieder drei Mal mit Waschlösung und ein Mal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Detektion des Antikörpers im Odyssey Infrarot-Aufnahmesystem bei einer Wellenlänge von 700 nm (rot) oder 800 nm (grün). Die Analyse der Western Blots erfolgte mit der Software Image Studio Lite (Version 5.2, LI-COR).

Tabelle 21: Verwendete primäre Antikörper

Primärer Antikörper	Molekular- gewicht	Verdünnung	Inkubationszeit und -temperatur	Hersteller
<i>β-Aktin, mouse</i>	42 kDa	1 : 10.000	1h bei RT	Sigma
<i>HO-1, rabbit</i>	28 kDa	1 : 1.000	24 h bei 4°C	Cell Signaling
<i>Lamin A/C, rabbit</i>	70 kDa	1 : 1.000	24 h bei 4°C	Cell Signaling
<i>Nrf2, rabbit</i>	98 kDa	1 : 1.000	24 h bei 4°C	Cell Signaling
<i>Phospho-Stat3, rabbit</i>	86 kDa	1 : 1.000	24 h bei 4°C	Cell Signaling
<i>Stat3, rabbit</i>	86 kDa	1 : 1.000	24 h bei 4°C	Cell Signaling
<i>pSMAD1/5/8, rabbit</i>	60 kDa	1 : 1.000	24 h bei 4°C	Cell Signaling

Tabelle 22: Verwendete sekundäre Antikörper

sekundärer Antikörper	Verdünnung	Inkubationszeit und -temperatur	Hersteller
<i>donkey-anti-rabbit, IRDye 800</i>	1 : 5.000	1h bei RT	LI-COR
<i>donkey-anti-rabbit, IRDye 680</i>	1 : 10.000	1h bei RT	LI-COR
<i>goat-anti-mouse, IRDye 800</i>	1 : 10.000	1h bei RT	LI-COR
<i>goat-anti-mouse, IRDye 680</i>	1 : 10.000	1h bei RT	LI-COR
<i>goat-anti-rabbit, IRDye 800</i>	1 : 10.000	1h bei RT	LI-COR

3.5 Statistische Auswertung

Die statistischen Untersuchungen zur Expressionsanalyse wurde mittels einer ANOVA Analyse (one-way bzw. Two-way ANOVA, Tukey`s Post-Hoc-Test) unter Verwendung der Software GraphPad-Prism 7.0 ermittelt. Wenn nicht anders beschrieben, sind alle Daten als Mittelwert \pm SEM angegeben. Als signifikant gelten Werte $p < 0,05$ mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$. Als nicht signifikant (ns) gelten Werte $p > 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Hecpidin-Expression

4.1.1 Einfluss der Zytokine IL-6 und OSM auf die Hecpidin-Expression

Zur Untersuchung der Auswirkung von Zytokinen auf die Hecpidin-Expression in der Leber wurden HepG2-Zellen verwendet. Interleukin-6 (IL-6) und Oncostatin M (OSM) wurden als Zytokine aus der IL-6-Familie zur Stimulation verwendet und, wenn nicht anders beschrieben, immer in der Konzentration 10 ng/ml eingesetzt. Zur Analyse der Hecpidin-Promotoraktivität wurde ein Luciferaseplasmid mit vorgefertigtem Volllänge-Hecpidin-Promotor (-2762 bp) verwendet.

Nach einer 6h und 16h Inkubationsdauer wurde die Hecpidin-Promotoraktivität, wie in Kapitel 3.2.7 beschrieben, mittels Reporterassay und die Hecpidin mRNA-Expression mittels qRT-PCR gemessen.

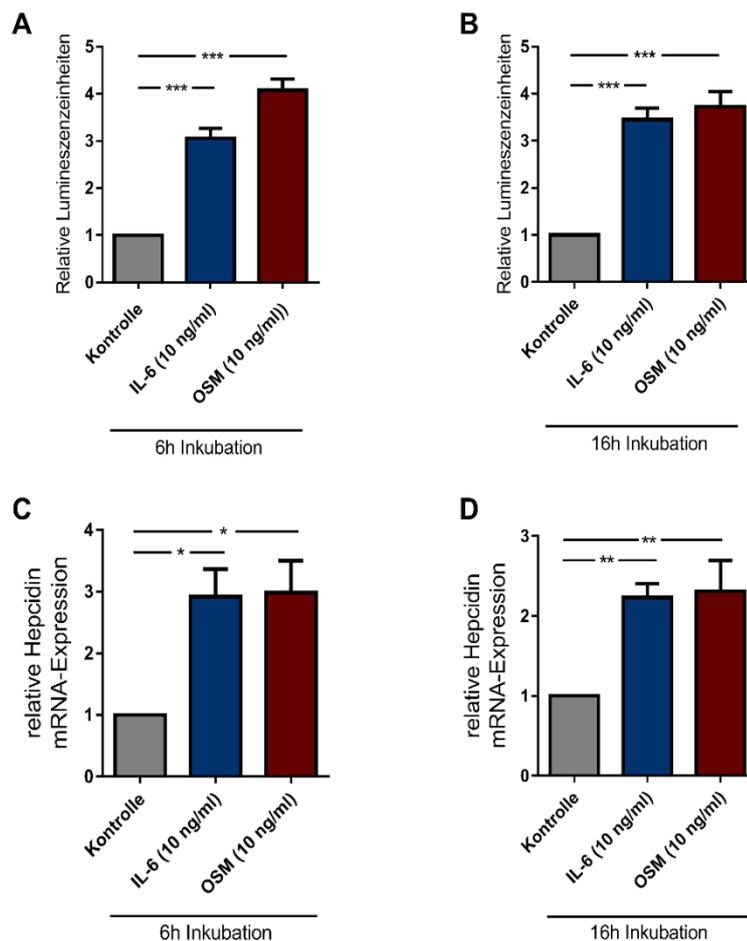


Abbildung 8: Einfluss von IL-6 und OSM auf die Hecpidin-Expression

HepG2 Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-6 oder OSM für 6h (A,C) oder 16h (B,D) behandelt. Anschließend wurde die Hecpidin-Promotoraktivität mittels Reporterassay (A,B) und die Hecpidin mRNA-Expression mittels qRT-PCR (C,D) gemessen. Beide Zytokine aktivierten die Hecpidin-Expression auf Promotor- und mRNA-Ebene signifikant. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert+SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten (*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

Sowohl die Behandlung mit IL-6 als auch OSM führten nach 6h und 16h zu einer etwa drei- bis vierfachen signifikanten Induktion der Heparin-Promotoraktivität (Abbildung 8 A,B). Auch die Heparin mRNA-Expression wurde durch die Behandlung mit IL-6 und OSM nach 6h und 16h signifikant auf das zwei- bis dreifache Level, verglichen mit der Kontrolle, induziert (Abbildung 8 C,D).

4.1.2 Untersuchung von Gegenregulatoren der Heparin-Expression

Auf der Suche nach möglichen Gegenregulatoren der Zytokin-induzierten Heparin-Expression wurde die Fumarsäure Dimethylfumarat (DMF), das Isothiocyanat Sulforaphan (SFN) und das Prostaglandin 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ Prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) verwendet und ihre Effekte auf den systemischen Eisenregulator Heparin untersucht. Alle drei Substanzen verbindet die Fähigkeit, als Elektrophile zu agieren und den Transkriptionsfaktor Nrf2 zu aktivieren.

Zur Untersuchung der Effekte von DMF, SFN und 15d-PGJ₂ auf die Heparin-Promotoraktivität wurden HepG2-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von DMF (10, 50 und 100 μ M) für eine

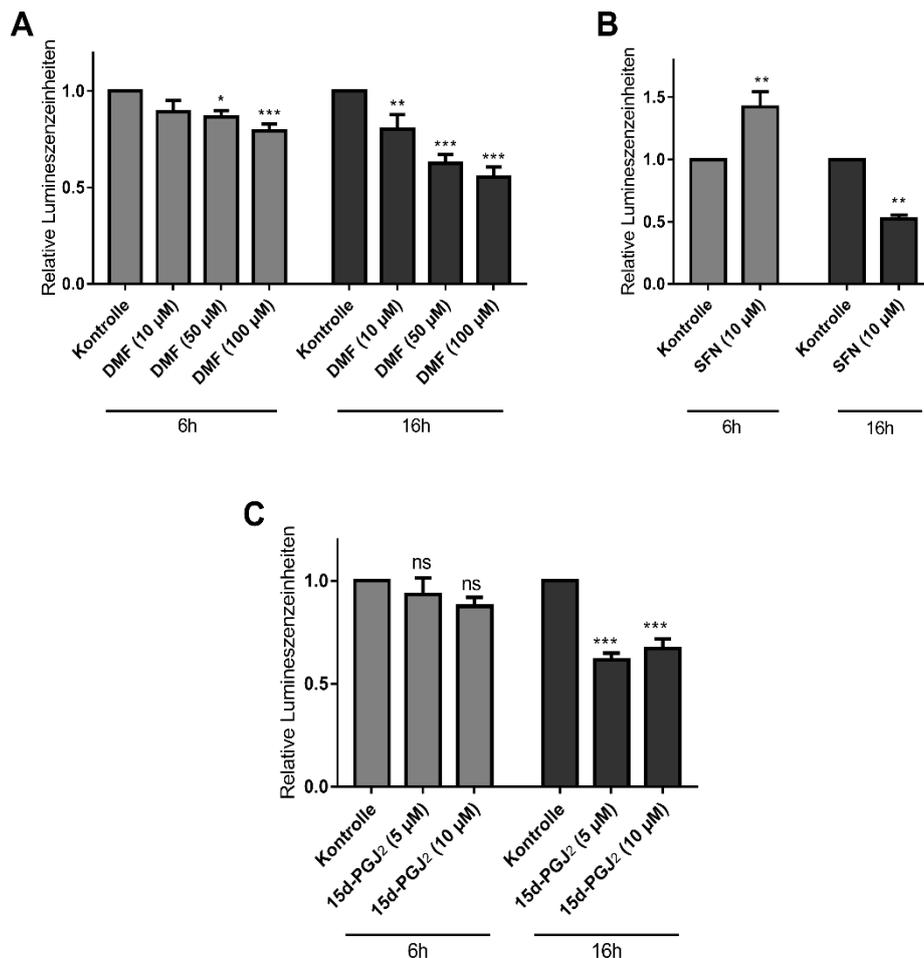


Abbildung 9: Effekte von DMF, SFN und 15d-PGJ₂ auf die Heparin-Promotoraktivität

Der Effekt unterschiedlicher Konzentrationen von DMF (A) und 15d-PGJ₂ (C) sowie von 10 μ M SFN (B) auf die Heparin-Promotoraktivität wurde nach 6h und 16h mittels Reporterassay untersucht. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert+SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, ^{ns} $p > 0,05$, bezogen auf die Kontrolle).

Inkubationsdauer von 6h und 16h behandelt (Abbildung 9, A). Bereits nach 6h konnten die DMF-Konzentrationen 50 und 100 μM die Hepcidin-Promotoraktivität im Vergleich zur Kontrolle signifikant hemmen. Nach 16h Inkubationsdauer zeigte sich eine signifikante Hemmung der Hepcidin-Promotoraktivität bei allen DMF-Konzentrationen. Die deutlichste Hemmung zeigte sich bei 100 μM DMF und einer Inkubationszeit von 16h, wobei die Promotoraktivität im Vergleich zur Kontrolle um etwa 50% gesenkt wurde (Abbildung 9, A). Da die DMF-Konzentration 100 μM damit den prominentesten Effekt nach 16h vermittelte, wurde diese Konzentration und Inkubationsdauer für anschließende Experimente verwendet.

Interessanterweise induzierte SFN, im Vergleich zur Kontrolle, die Hepcidin-Promotoraktivität nach 6h Inkubationsdauer signifikant auf das 1,5-fache. Nach 16h Inkubation mit SFN zeigte sich eine signifikante Hemmung der Hepcidin-Promotoraktivität um etwa 50% (Abbildung 9, B).

15d-PGJ₂ zeigte bei einer Inkubationsdauer von 6h weder bei 5 μM noch bei 10 μM einen signifikanten Einfluss auf die Hepcidin-Promotoraktivität. Erst nach 16h Inkubationsdauer konnten beiden Konzentrationen die Hepcidin-Promotoraktivität signifikant um ca. 30% hemmen (Abbildung 9, C).

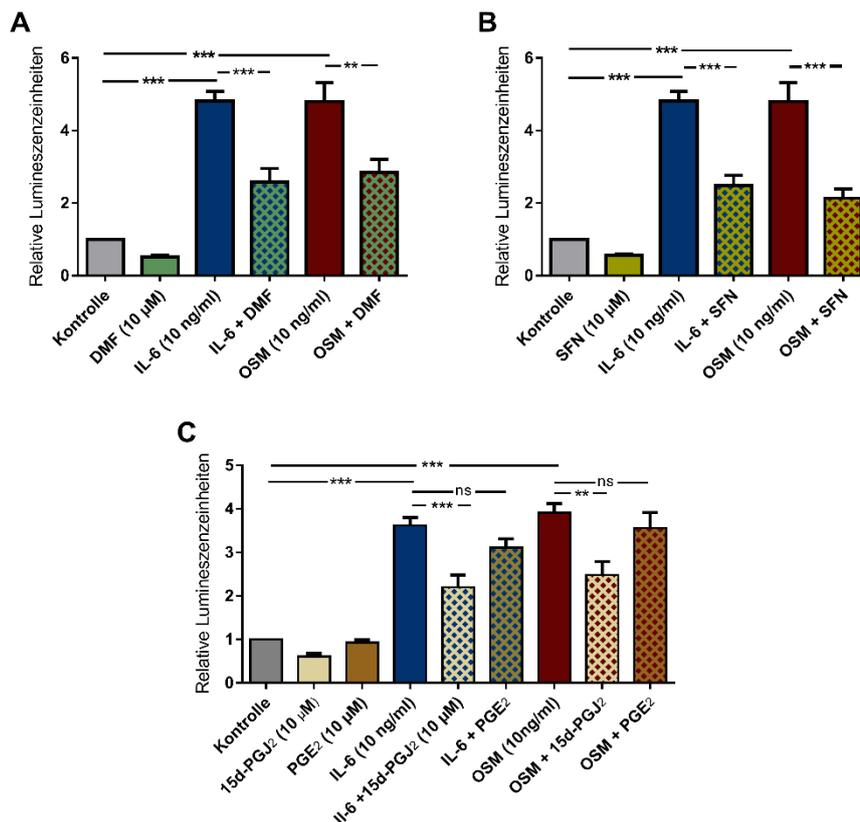


Abbildung 10: Hemmung der Zytokin-induzierten Hepcidin-Promotoraktivität durch DMF, SFN und 15d-PGJ₂

HepG2-Zellen wurden mit 10 ng/ml der Zytokine IL-6 und OSM und den Substanzen DMF (100 μM), SFN (10 μM) oder 15d-PGJ₂ (10 μM) alleine oder in der Kombination von Zytokin mit DMF (A), SFN (B), 15d-PGJ₂ oder PGE₂ (C) für 16h behandelt. Anschließend wurde die Promotoraktivität mittels Reporterassay untersucht. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert+SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, ^{ns} $p > 0,05$, bezogen auf die Kontrolle).

Nachdem alle drei Substanzen nach 16h einen hemmenden Effekt auf die Hepcidin-Expression gezeigt haben, wurde weiter untersucht, ob die Substanzen der Zytokin-induzierten Hepcidin-Expression entgegen wirken können. Dazu wurden HepG2-Zellen mit DMF (100 μ M), SFN (10 μ M) oder 15d-PGJ₂ (10 μ M) sowie den Zytokinen IL-6 oder OSM alleine oder in den Kombinationen für 16h behandelt und mittels Reportergenassay die Hepcidin-Promotoraktivität gemessen (Abbildung 10). Sowohl DMF (A) als auch SFN (B) und 15d-PGJ₂ (C) konnten nach 16h Koinkubation mit dem Zytokin IL-6- oder OSM, deren signifikant induzierte Hepcidin-Promotoraktivität auf etwa die Hälfte reduzieren.

Um ferner zu zeigen, dass es sich bei der Inhibition der Hepcidin-Expression durch 15d-PGJ₂ um einen spezifischen Effekt dieses cyclopentanischen Prostaglandins handelt, wurde als Kontrolle das proinflammatorische PGE₂ verwendet. PGE₂ konnte der Zytokin-induzierten Hepcidin Promotoraktivität nicht entgegenwirken (Abbildung 10, C), was deutlich die Spezifität von 15d-PGJ₂ zeigt.

Die Gegenregulation der Zytokin-induzierten Hepcidin-Expression durch DMF, SFN und 15d-PGJ₂ wurde nicht nur auf Promotorebene, sondern auch auf mRNA-Ebene untersucht. Dafür wurden

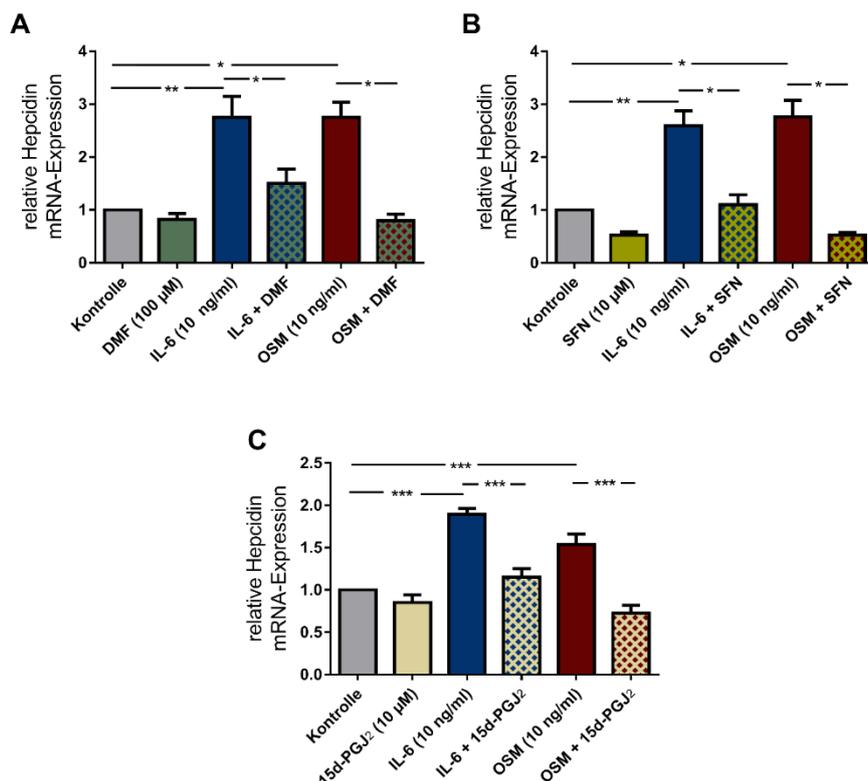


Abbildung 11: Hemmung der Zytokin-induzierten Hepcidin mRNA-Expression durch DMF, SFN und 15d-PGJ₂

HepG2-Zellen wurden mit 10 ng/ml der Zytokine IL-6 und OSM und den Substanzen DMF (100 μ M), SFN (10 μ M) oder 15d-PGJ₂ (10 μ M) alleine oder in der Kombination von Zytokin mit DMF (A), SFN (B) oder 15d-PGJ₂ (C) für 16h behandelt. Anschließend wurde die Hepcidin mRNA-Expression mittels qRT-PCR untersucht. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert+SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten (**p<0,01, ***p<0,001, *p<0,05, ^{ns}p>0,05, bezogen auf die Kontrolle).

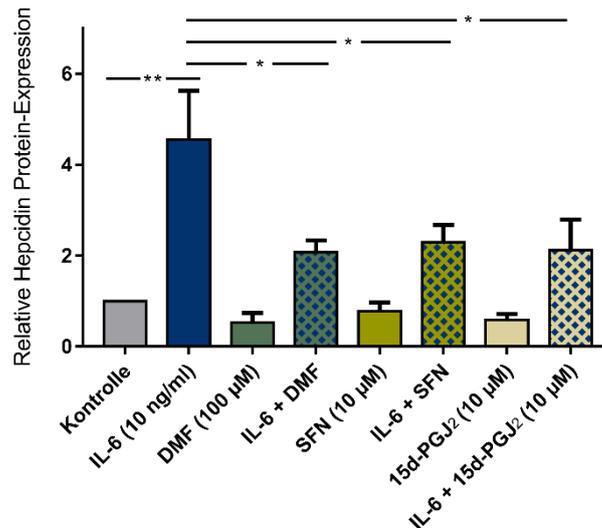


Abbildung 12: Hemmung der IL-6-induzierten Hepcidin Protein-Expression durch DMF, SFN und 15d-PGJ₂

HepG2-Zellen wurden mit IL-6 (10 ng/ml) und den Substanzen DMF (100 µM), SFN (10 µM) und 15d-PGJ₂ alleine oder in Kombination für 16h behandelt. Anschließend wurde der Überstand für die Analyse der Hepcidin Protein-Expression mittels LC-MS/MS gesammelt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert+SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten (**p<0,001, **p<0,01, *p<0,05, ⁿp>0,05, bezogen auf die Kontrolle).

HepG2-Zellen 16h mit den entsprechenden Substanzen behandelt und anschließend mRNA für die qRT-PCR isoliert. Die Koinkubation von IL-6 oder OSM mit DMF (Abbildung 11, A), SFN (B) oder 15d-PGJ₂ (C) konnte jeweils der Zytokin-induzierten Hepcidin mRNA-Expression signifikant entgegen wirken.

Um folglich die beobachteten Effekte der Hemmung der Hepcidin-Expression von der Promotor- und mRNA-Ebene auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurde nach 16h Inkubation mit den jeweiligen Substanzen eine LC-MS/MS-Messung durchgeführt, um die Proteinkonzentration von Hepcidin im Zellüberstand zu messen. Dabei kam es nach einer 16h Inkubation mit IL-6 (10 ng/ml) zu einem etwa vierfachen Anstieg des Hepcidin-Proteins (Abbildung 12). Diese Hepcidin-Protein-Induktion durch IL-6 konnte durch die Koinkubation mit DMF (100 µM), SFN (10 µM) oder 15d-PGJ₂ (10 µM) signifikant auf etwa die Hälfte reduziert werden (Abbildung 12)(p<0,05). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Hepcidin-Expression auf der Ebene der Transkriptionsinitiation reguliert wird und Ergebnisse der Promotorebene auch auf Ergebnisse der mRNA- und Proteinebene übertragen werden können.

4.1.3 Untersuchung von Gegenregulatoren der Hepcidin-Expression in Makrophagen

Neben Leberzellen können auch Makrophagen zur Hepcidin-Expression beitragen. Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Substanzen DMF und 15d-PGJ₂ auf die Hepcidin-Expression in Makrophagen ausüben, wurden Monozyten aus dem Vollblut gesunder Spender isoliert und nach sieben Tagen Ausdifferenzierung zu Typ1 Makrophagen mit IL-6 (10 ng/ml), DMF (100 µM) und 15d-PGJ₂ (10 µM)

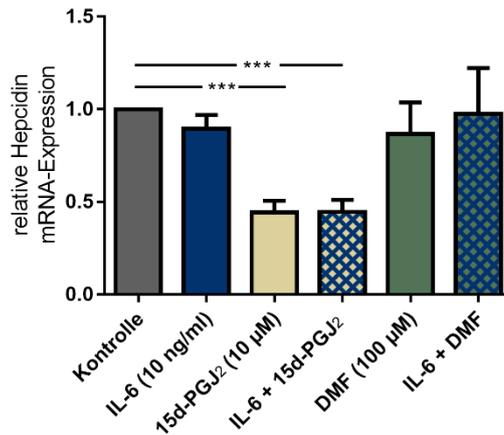


Abbildung 13: Hepcidin-Expression in Typ1 Makrophagen

Ausdifferenzierte Typ1 Makrophagen wurden zur Analyse der Hepcidin-Expression für 16h mit IL-6 (10 ng/ml), 15d-PGJ₂ (10 µM) und DMF (100 µM) alleine oder in Kombination behandelt. Anschließend wurde die Hepcidin mRNA-Expression mittels qRT-PCR untersucht. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert+SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten (***) $p < 0,001$.

alleine oder in Kombination für 16h inkubiert. Anschließend wurde mRNA für die Analyse der Hepcidin-Expression mittels qRT-PCR geerntet.

Es konnte gezeigt werden, dass Makrophagen (Typ 1) nicht auf den Stimulus mit den Zytokinen IL-6 und OSM reagieren (getestet für beide Zytokine, dargestellt für IL-6, Abbildung 13), was vermuten lässt, dass Makrophagen zwar die primäre Quelle der Zytokin-Expression darstellen [272], selbst aber nicht sensitiv auf die Zytokine sind. Die Behandlung von 15d-PGJ₂ alleine oder in Kombination mit IL-6 führte hingegen zu einer signifikanten Inhibierung der Hepcidin mRNA-Expression auf etwa die Hälfte verglichen mit der Grundstimulation der Kontrolle ($p < 0,001$). Die Inkubation mit DMF hatte hingegen keine signifikante Auswirkung auf die Hepcidin-Expression, auch wenn eine tendenziell leichte Verringerung zu erkennen war (Abbildung 13). Daraus lässt sich ableiten, dass vor allem das Prostaglandin 15d-PGJ₂ einen interessanten Regulator der Hepcidin-Expression in Makrophagen (Typ1) darstellt, welcher unabhängig von IL-6 wirkt.

4.1.4 Beteiligung von STAT3 an Induktion und Hemmung der Hepcidin-Expression

Um den in der Literatur beschriebenen Signalweg der Hepcidin-Expressionsaktivierung durch IL-6 über den JAK/STAT-Signalweg zu bestätigen, wurden HepG2-Zellen mit 10 ng/ml IL-6 alleine sowie IL-6 und dem STAT3-Inhibitor S3I-201 (Sigma Aldrich) behandelt. Nach 16h Inkubation wurde die Hepcidin-Promotoraktivität mittels Reporterassay gemessen. Die Koinkubation von IL-6 mit 100 µM S3I-21 konnte die IL-6-induzierte Hepcidin-Promotoraktivität signifikant auf etwa die Hälfte reduzieren ($p < 0,01$) (Abbildung 14). Dies bestätigte die IL-6-induzierte Hepcidin-Promotoraktivierung durch den

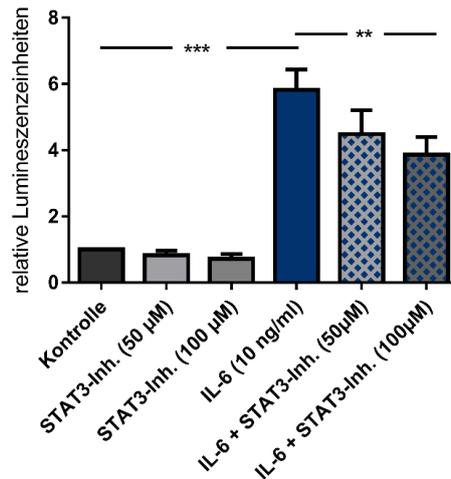


Abbildung 14: Hemmung der IL-6-induzierten Hecpudin-Promotoraktivität durch STAT3-Inhibierung

HepG2-Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-6 alleine sowie mit IL-6 und verschiedenen Konzentrationen des STAT3-Inhibitors S3I-201 für 16h behandelt. Zur Untersuchung der Hecpudin-Promotoraktivität wurde der Reporterassay durchgeführt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert+SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten (**p<0,001, **p<0,01).

JAK/STAT-Signalweg. Um zu überprüfen, ob die Substanzen DMF, SFN und 15d-PGJ₂ Einfluss auf diese Signaltransduktion der Zytokine nehmen und dadurch der beobachtete Effekt der Hecpudin-Expressionshemmung durch die Substanzen zu erklären ist, wurden der JAK-STAT-Signalweg genauer untersucht.

Da es, wie bereits beschrieben, bei der Signaltransduktion der Zytokine zu einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 kommt, wurde die Intensität der pSTAT3-Bildung in HepG2-Zellen bei der Behandlung mit Zytokinen und der Koinkubation mit Zytokinen und den Substanzen auf Proteinebene untersucht. Dafür wurden HepG2-Zellen für 16h mit IL-6 (10 ng/ml), DMF (100 µM), SFN (10 µM) oder 15d-PGJ₂ (10 µM) inkubiert und anschließend für die Gesamtproteinextraktion lysiert. Mittels Western-Blot-Analyse wurden pSTAT3, STAT3 und Aktin anschließend immunologisch detektiert. In Abbildung 15 sind exemplarische Blots für die Wirkung von SFN und DMF (Abbildung 15, A) sowie von 15d-PGJ₂ (Abbildung 15, B) dargestellt. Es konnte kein Einfluss von SFN, DMF oder 15d-PGJ₂ auf die Phosphorylierung von STAT3 nach 16h (Abbildung 15) und früheren/späteren Zeitpunkten (6h, 24h, nicht dargestellt) beobachtet werden. Im Rahmen der Masterarbeit von Anne Lopicz (2016) wurde die Wirkung von DMF und 15d-PGJ₂ auf die Phosphorylierung von STAT3 zudem densitometrisch untersucht und gerade beschriebene Ergebnisse bestätigt.

Daraus lässt sich die Schlussfolgerung ableiten, dass die Substanzen DMF, SFN und 15d-PGJ₂ keinen hemmenden Effekt auf die Signaltransduktion der Zytokine IL-6 und OSM durch eine Veränderung der pSTAT3-Bildung ausüben. Der beobachtete Hemmeffekt der Substanzen auf die Hecpudin-Expression ist damit nicht durch Veränderungen dieses Signalweges zu erklären.

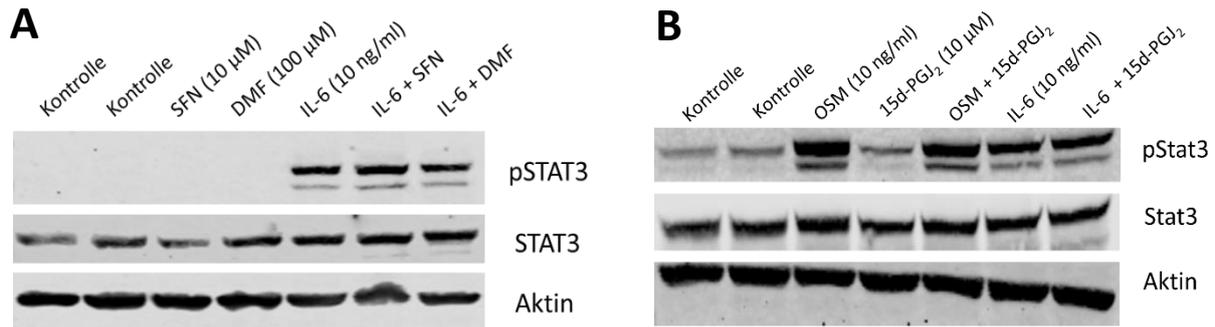


Abbildung 15: pSTAT-Proteinlevel nach 16h Behandlung mit Zytokinen, SFN, DMF und 15d-PGJ₂

HepG2-Zellen wurden für 16h mit den Substanzen IL-6, DMF, SFN und den Kombinationen (A) oder IL-6, OSM und 15d-PGJ₂ (B) inkubiert. Anschließend wurde das Gesamtprotein der Zellen geerntet. Mittels Western-Blot-Analyse wurden pSTAT3, STAT3 und Aktin immunologisch detektiert. Dargestellt sind exemplarische Blots.

4.1.5 Untersuchung der Beteiligung von Nrf2 an der Hepcidin-Regulation

Auf der Suche nach den Mechanismen, die den Hemmeffekt auf die Hepcidin-Expression durch die Substanzen DMF, SFN und 15d-PGJ₂ vermitteln, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Fokus auf den Transkriptionsfaktor Nrf2 gelegt.

Alle Substanzen, die verwendet wurden und eine hemmende Wirkung auf die Hepcidin-Expression vermitteln, sind in der Literatur beschriebene Nrf2-Aktivatoren. Deshalb wurde folglich die Involvierung dieses Transkriptionsfaktors in der Vermittlung der Hepcidin-Inhibierung untersucht.

Induktion von Nrf2 durch DMF und 15d-PGJ₂

Zunächst wurde deshalb die Induktion des Transkriptionsfaktors Nrf2 und dessen Translokation in den Zellkern für die Substanzen DMF und 15d-PGJ₂ untersucht. Dafür wurden HepG2 Zellen für 16h behandelt und anschließend die Zytoplasma- und Kernproteinfraktionen getrennt isoliert. Mittels Western-Blot-Analyse wurde die Präsenz von Nrf2 im Kern immunologisch nachgewiesen. In Abbildung 16 sind exemplarische Western-Blots dargestellt. Es konnte keine Nrf2-Proteinexpression im Zytoplasma gemessen werden. Es zeigt sich jedoch eine deutliche Aktivierung der Nrf2-Proteinexpression durch die Substanzen 15d-PGJ₂ (Abbildung 16, A) und DMF (Abbildung 16, B) in der Kernfraktion, die nicht beeinflusst wird durch die Behandlung mit Zytokinen. Auch hierfür wurden im Rahmen der Masterarbeit von Anne Lopicz (2016) densitometrische Auswertungen der Anreicherung von Nrf2 in der nuklearen Fraktion durchgeführt, die oben genannte Ergebnisse bestätigen.

Um ferner die Aktivität von Nrf2 zu bestätigen, wurde die Induktion der Nrf2-Downstreamtargets NQO-1 und HO-1 auf mRNA-Ebene durch die Substanz 15d-PGJ₂ gezeigt. Sowohl NQO-1 (Abbildung 16, C) als auch HO-1 (Abbildung 16, D) wurden signifikant durch die 16h Inkubation mit 15d-PGJ₂ (10 µM) auf mRNA-Ebene induziert.

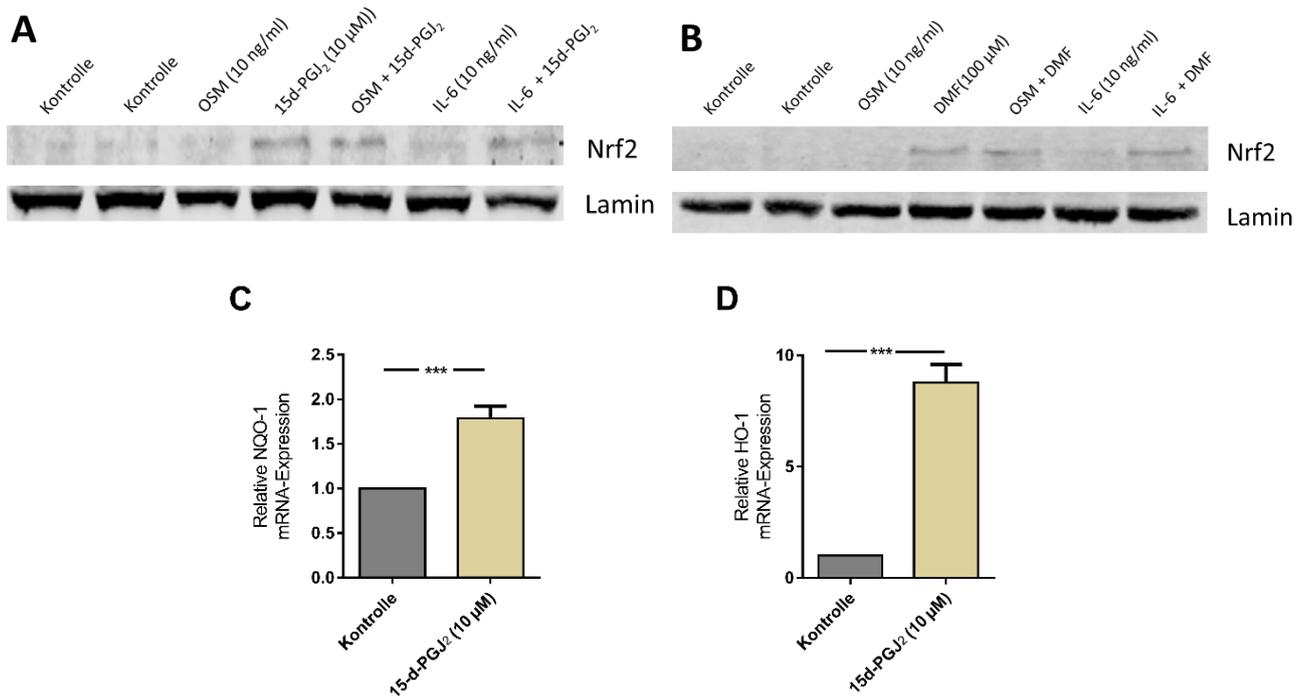


Abbildung 16: Induktion von Nrf2 durch DMF und 15d-PGJ₂

HepG2-Zellen wurden mit OSM, IL-6, 15d-PGJ₂ und DMF alleine oder in Kombination inkubiert. Anschließend wurde Zytoplasma- und Kernfraktion für die Westernblotanalyse getrennt gewonnen (A und B) oder mRNA zur Analyse der mRNA-Expression der Nrf2-Downstreamtargets NQO-1 (C) und HO-1 (D) extrahiert und mittels qRT-PCR ausgewertet. Nrf2 wurde in der Kernfraktion immunologisch detektiert (A,B). Die mRNA-Daten sind dargestellt als Mittelwert+SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten (**p<0,01).

Hemmung der Nrf2-Translokation mit Trigonellin

Um den Effekt von aktiviertem Nrf2 auf die Hecpudin-Promotoraktivität zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst versucht, die Translokation von Nrf2 in den Nukleus und dadurch dessen Aktivität zu unterbinden. Dafür wurde das Alkaloid Trigonellin (Sigma-Aldrich), das in der Literatur als Nrf2-Translokations-Inhibitor beschrieben wurde, verwendet. HepG2-Zellen wurden dafür mit IL-6 (10 ng/ml), 15d-PGJ₂ (10 µM), DMF (100 µM) und deren Kombination sowie den Kombinationen aus IL-6+15d-PGJ₂+Trignoellin (5µM) bzw. IL-6+DMF+Trigonellin behandelt. Nach 16h Inkubation wurde die Hecpudin-Promotoraktivität mittels Reporterassay untersucht (Abbildung 17). Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen den Behandlungen IL-6+15d-PGJ₂ bzw. IL-6+DMF und deren zusätzlicher Behandlung mit Trigonellin (5 µM) beobachtet werden.

Mittels Western-Blot konnte jedoch gezeigt werden, dass Trigonellin in unterschiedlicher Konzentration nicht, wie in der Literatur beschrieben, zu einer Hemmung der Translokation von Nrf2 führt (Daten in Masterarbeit von Anne Lopicz, 2016). Somit konnten durch die zusätzliche Behandlung mit Trigonellin keine Rückschlüsse auf die Involvement von Nrf2 bei der beobachteten Inhibition der Hecpudin-Expression durch DMF und 15d-PGJ₂ gezogen werden.

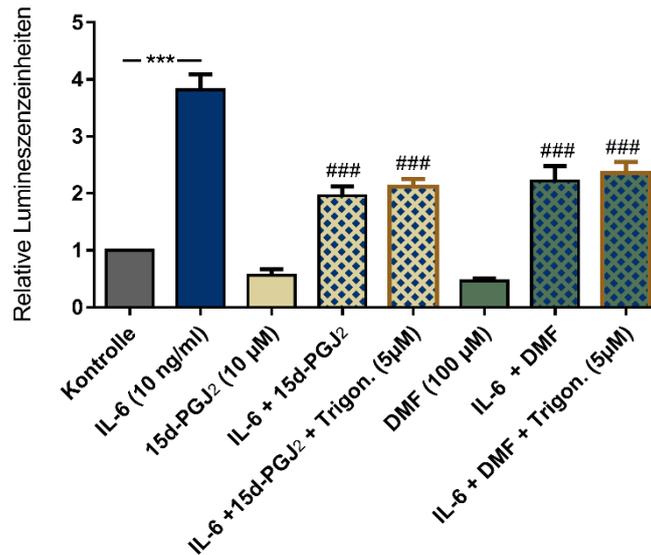


Abbildung 17: Versuch der Hemmung der Nrf2-Translokation mit Trigonellin

HepG2-Zellen wurden für 16h mit IL-6 (10 ng/ml), 15d-PGJ₂ (10 µM), DMF (100 µM) und Trigonellin (5 µM) alleine oder in Kombination, wie dargestellt, inkubiert. Anschließend wurde die Hepcidin-Promotoraktivität mittels Reporterassay untersucht. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert+SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten (***) $p < 0,001$ zur Kontrolle; ### $p < 0,001$ zur IL-6-Behandlung).

Überexpression von Nrf2

Um weiter der Frage nachzugehen, in wie weit Nrf2 Effekte auf die Hepcidin-Expression ausübt, wurde ein Nrf2-Überexpressionsplasmid verwendet. Dazu wurden HepG2-Zellen mit dem Nrf2-Überexpressionsplasmid oder einem Kontrollplasmid (*mock*) transfiziert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und nach 16h wurde mRNA für die qRT-PCR extrahiert. Die Transfektion mit dem Überexpressionsplasmid führte zu einer signifikanten Induktion der Nrf2 mRNA-Expression (Abbildung 18, A) ($p < 0,05$). Es zeigte sich, dass die Überexpression von Nrf2 auch zu einer leichten Induktion der mRNA-Expression des Nrf2-Downstreamtargets HO-1 führte (Abbildung 18, B), was zeigt, dass Nrf2 nicht nur überexprimiert wird, sondern das gebildete Nrf2 auch aktiv ist. Allerdings war die Induktion von HO-1 statistisch nicht signifikant. Da Nrf2 zur Aktivität im Zellkern vorliegen muss, sollte sichergestellt werden, dass Nrf2 auch in den Zellkern transloziert wird, weshalb die Translokation von Nrf2 immunologisch mittels Western-Blot nachgewiesen wurde. Dazu wurden HepG2-Zellen mit dem Nrf2-Überexpressionsplasmid oder einem Kontrollplasmid (*mock*) transfiziert und eine untransfizierte Kontrolle mitgeführt. 24h nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und nach 16 weiteren Stunden die Zytoplasma- und Nuklearproteinfraktion aus den Zellen getrennt isoliert, um die Zeiten der 16h-Behandlung für die Hepcidin-Expressionsanalyse beizubehalten. Mittels Western-Blot-Analyse wurde die Präsenz von Nrf2 in den beiden Fraktionen nachgewiesen (Abbildung 19).

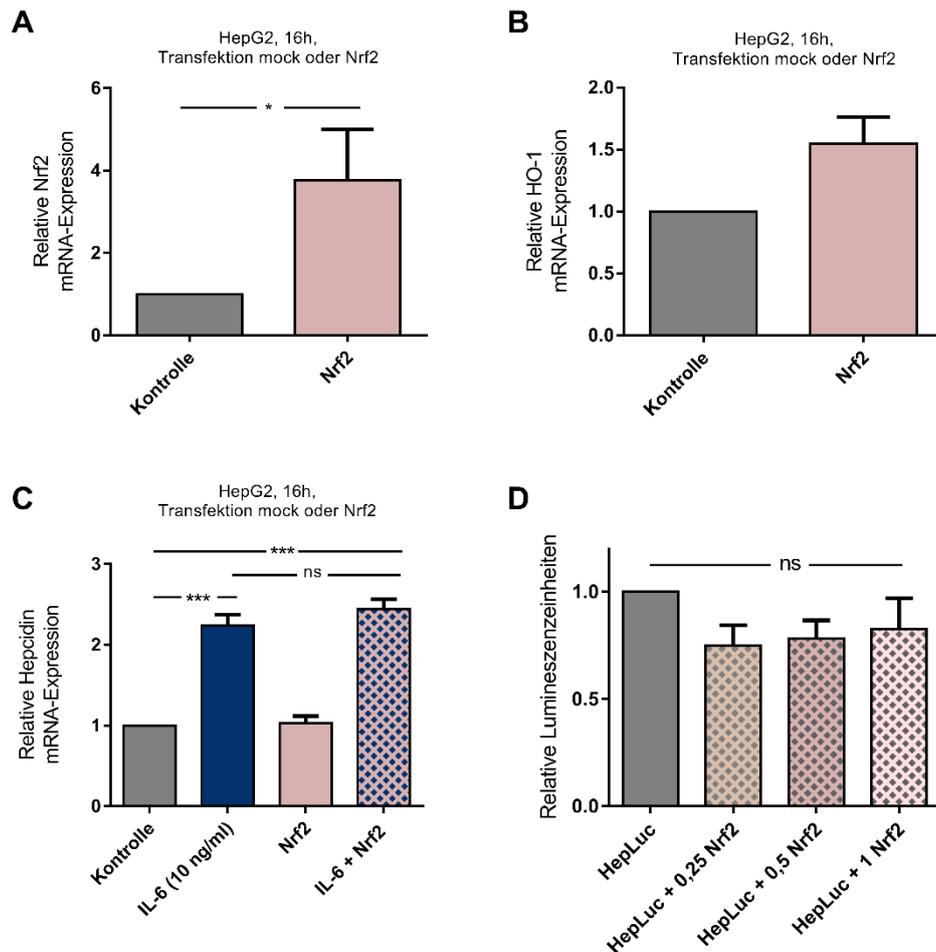


Abbildung 18: Auswirkung der Nrf2-Überexpression auf die Hepcidin-Expression

HepG2 Zellen wurden mit einem Nrf2-Überexpressionsplasmid oder einem Kontrollplasmid (mock) transfiziert und für 16h mit neuem Medium oder mit IL-6 (10 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurden mRNA extrahiert und qRT-PCR durchgeführt, um die mRNA-Expression von Nrf2 (A), HO-1 (B) oder Hepcidin (C) zu untersuchen. Der Einfluss der Nrf2-Überexpression auf die Hepcidin-Promotoraktivität wurde mittels Reporterassay untersucht, wozu HepG2-Zellen mit HepLuc und unterschiedlichen Konzentration des Nrf2-Überexpressionsplasmids für 16h inkubiert wurden. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert+SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten (**p<0,01, ***p<0,001, *p<0,05).

Sowohl in der Zytoplasma- (Abbildung 19, A), als auch in der Nuklearfraktion (Abbildung 19, B) konnte Nrf2 detektiert werden. Um zu überprüfen, ob nun Nrf2 eine Auswirkung auf die Hepcidin-Expression ausübt und der IL-6-induzierten Hepcidin-Expression entgegenwirkt, wurden HepG2-Zellen wie eben beschrieben mit einem Kontrollplasmid für alle nicht-Nrf2-Behandlungen (mock für Kontrolle und IL-6) oder dem Nrf2-Überexpressionsplasmid (vgl. Abbildung 18, C: Nrf2 alleine oder IL-6+Nrf2) transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen entsprechend behandelt und nach 16h Inkubation mRNA zur qRT-PCR-Analyse der Hepcidin-Expression extrahiert (Abbildung 18, C). Weder die Transfektion mit Nrf2 ohne weitere Behandlung hatte Auswirkungen auf die Hepcidin-Expression noch konnte die Nrf2-Überexpression der IL-6-induzierten Hepcidin-Expression entgegenwirken. Auch auf Reporter-Ebene hatte eine anteilige Kotransfektion mit einer Nrf2-Überexpressionsplasmidmenge von 0,25, 0,5,

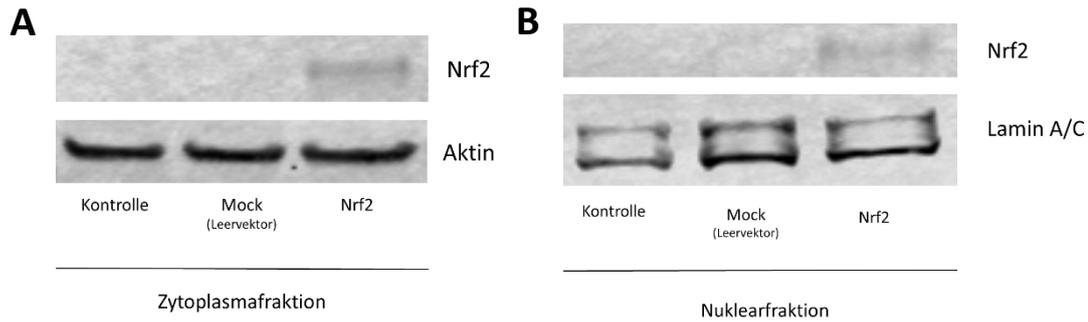


Abbildung 19: Überexpression von Nrf2 und dessen Translokation in den Nukleus

HepG2 Zellen wurden mit einem Nrf2-Überexpressionplasmid, oder einem Kontrollplasmid transfiziert und zusätzlich eine untransfizierte Kontrolle mitgeführt. Zur Überprüfung der effektiven Translokation wurde das Medium nach 24h gewechselt. Nach weiteren 16h wurden Proteine der Zytoplasma- (A) und Nuklearfraktion (B) separiert und mittels Western-Blot die Nrf2-Translokation in den Nukleus immunologisch detektiert. Dargestellt ist ein exemplarischer Blot.

0,75 oder der gleichen Menge des HepLuc-Plasmids keine Auswirkung auf die Hepcidin-Promotoraktivität (Abbildung 18, D).

Diese Daten deuten auf keinen Zusammenhang zwischen Hepcidin und einer Nrf2-Beteiligung hin.

Knockdown von Nrf2

Um weiter der Frage nachzugehen, ob Nrf2 bei der Hemmung der Hepcidin-Expression involviert ist, wurde ein Knockdown von Nrf2 mittels spezifischer Nrf2-siRNA durchgeführt, um die Genexpression von Nrf2 und damit dessen Aktivität zu senken.

Dafür wurden HepG2-Zellen zeitgleich beim Aussäen revers mit Nrf2-spezifischer siRNA oder als Kontrolle mit nonsense RNA transfiziert (Abbildung 20). 24h nach der Transfektion mit Lipofektamin wurde das Medium gewechselt und mit entsprechenden Behandlungen für weitere 16h inkubiert.

Um die Knockdown-Effizienz der Nrf2-siRNA-Transfektion zu überprüfen, wurde die Nrf2 mRNA-Expression von nonsense-transfizierten und unbehandelten Zellen mit Nrf2-siRNA-transfizierten und unbehandelten Zellen verglichen (Abbildung 20, A). Die Nrf2 mRNA-Expression konnte durch die Transfektion mit spezifischer siRNA um 85% gesenkt werden.

Um die Wirksamkeit des Nrf2-Knockdowns zu zeigen, wurden transfizierte Zellen mit den Nrf2-Aktivatoren 15d-PGJ₂ (5 µM), DMF (100 µM) und SFN (10 µM) behandelt und die mRNA-Expression des Nrf2-Downstreamtargets HO-1 untersucht (Abbildung 20, B). Die induzierte HO-1 mRNA-Expression durch 15d-PGJ₂ konnte durch die Transfektion mit Nrf2-siRNA signifikant auf etwa ein Viertel der Induktion gesenkt werden. Die HO-1 mRNA-Induktion durch DMF und SFN konnte durch die Transfektion mit Nrf2 siRNA fast vollständig gehemmt werden (Abbildung 20, B). Diese Ergebnisse zeigen deutlich die Wirksamkeit des Nrf2-Knockdowns.

Die 16h Behandlung mit IL-6 (10 ng/ml) zeigte, dass Nrf2 siRNA-transfizierte Zellen eine signifikant höhere IL-induzierte Hecpudin-Expression aufwiesen als IL-6-behandelte Zellen, die mit nonsense transfiziert wurden (Abbildung 20, C) ($p < 0,01$). Dieses erste Ergebnis deutet darauf hin, dass Nrf2 der IL-6-induzierten Hecpudin-Expression entgegenzuwirken scheint.

Um weiter der Frage nachzugehen, inwieweit Nrf2 bei der Gegenregulation der IL-6-induzierten Hecpudin-Expression durch die Substanzen 15d-PGJ₂, DMF und SFN, die beschriebene Nrf2-Aktivatoren sind, beteiligt ist, wurden nonsense- und Nrf2 siRNA-transfizierte Zellen mit IL-6 (10 ng/ml), 15d-PGJ₂

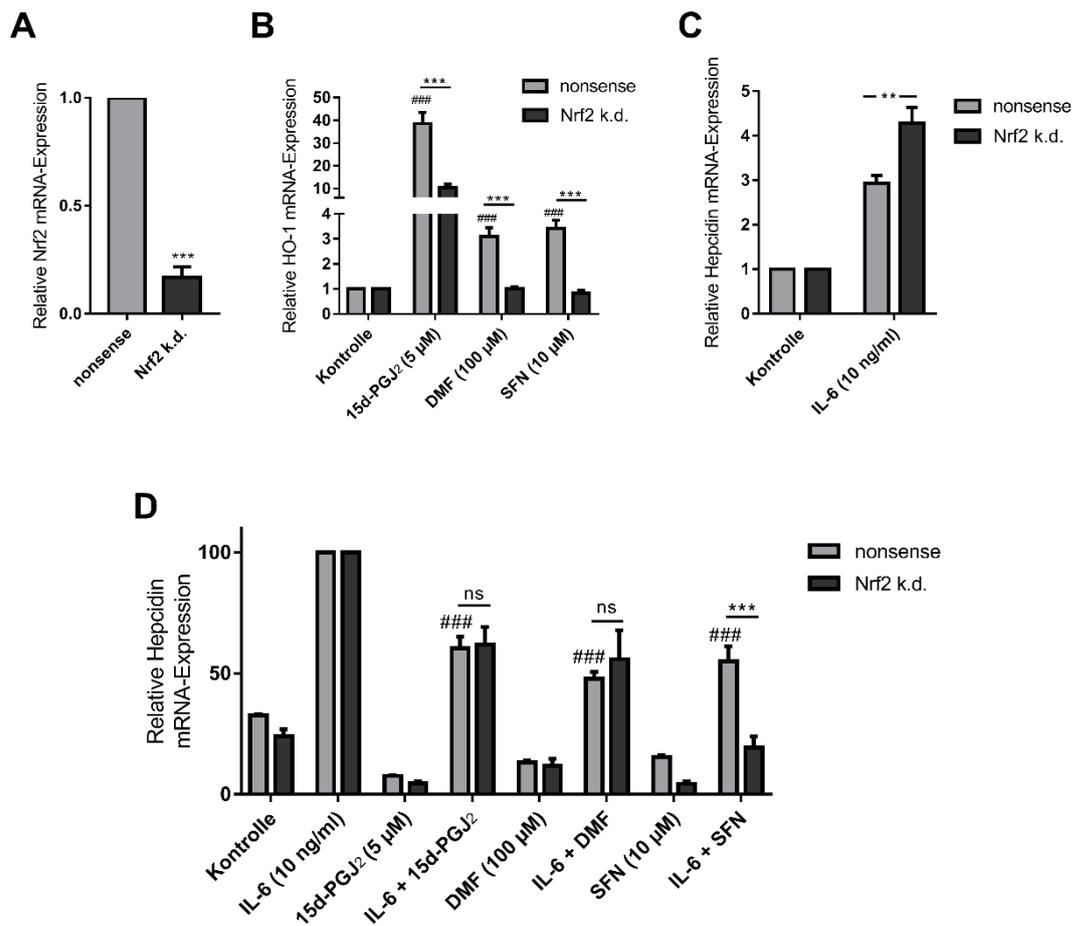


Abbildung 20: Knockdown von Nrf2 und Auswirkung auf die Hecpudin-Expression

HepG2-Zellen wurden zeitgleich mit dem Aussäen revers mit spezifischer Nrf2 siRNA oder nonsense RNA als Kontrolle mittels Lipofektion transfiziert. Nach 24h wurde das Medium gewechselt und für weitere 16h mit den entsprechenden Substanzen inkubiert. Zur Überprüfung der Knockdown-Effizienz wurde von unbehandelten, transfizierten Zellen nach 16h mRNA extrahiert und die Nrf2 mRNA-Expression mittels qRT-PCR quantifiziert (A). Zur weiteren Untersuchung eines wirksamen Nrf2-Knockdowns wurden Zellen für 16h mit 15d-PGJ₂ (5 μM), DMF (100 μM) oder SFN (10 μM) behandelt und die Auswirkung des Knockdowns auf die Induktion des Nrf2-Downstreamtargets HO-1 untersucht. Zur Untersuchung der Auswirkung der Nrf2-siRNA-Transfektion auf die Hecpudin-Expression wurden nonsense transfizierte und Nrf2 siRNA-transfizierte Zellen mit IL-6 (10 ng/ml) alleine (C) oder IL-6 (10 ng/ml), 15d-PGJ₂ (5 μM), DMF (100 μM) und SFN (10 μM) und deren Kombinationen behandelt (D). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert+SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten (** $p < 0,001$, * $p < 0,01$, * $p < 0,05$, ^{ns} $p > 0,05$; ### $p < 0,001$ verglichen mit IL-6).

(5 μM), DMF (100 μM) und SFN (10 μM) alleine oder in Kombination 24h nach der Transfektion für weitere 16h behandelt. Anschließend wurde mRNA für die qRT-PCR isoliert.

Um den Einfluss der unterschiedlichen IL-6-Induktionen auf die Hecpudin-Expression zwischen nonsense- und Nrf2-siRNA-transfizierten Zellen zu normieren, wurde die Induktion der Hecpudin mRNA-Expression durch IL-6 auf 100% gesetzt und die entsprechenden Behandlungen darauf normiert (Abbildung 20, D). Alle drei Substanzen (15d-PGJ₂, DMF und SFN) hemmten nach wie vor die IL-6-induzierte Hecpudin-Expression. Es gab bei den Substanzen 15d-PGJ₂ und DMF keinen Unterschied zwischen den nonsense- und Nrf2-siRNA-transfizierten Zellen. Die Behandlung mit SFN führte bei den Nrf2-siRNA-transfizierten Zellen zu einer signifikant stärkeren Inhibierung der Hecpudin-Expression, verglichen mit nonsense-transfizierten Zellen ($p < 0,001$) (Abbildung 20, D).

Zusammengefasst deuten diese Nrf2-Knockdown-Daten darauf hin, dass Nrf2 keine Rolle zu spielen scheint bezüglich der beobachteten Hemmung der Hecpudin-Expression durch die drei verwendeten Substanzen.

Mutation des ARE-Responsiven Elements im Hecpudin-Promotor

Im Laufe dieses Projektes publizierte Bayele *et al.* (2015) [280] eine Arbeit, in der eine ARE-Sequenz im Hecpudin-Promotor gefunden wurde, an der Nrf2 bindet und dadurch eine Auswirkung auf die Hecpudin-Expression aufweist.

Diese beschriebene ARE-Sequenz konnte auch in dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Vollängen-Hecpudin-Promotorplasmid gefunden werden. Um folglich die Effekte dieser Nrf2-Bindungsstelle auf die Hecpudin-Promotoraktivität zu untersuchen, wurden die publizierten ARE-Mutationsprimer verwendet, eine Ziel-gerichtete Mutagenese durchgeführt und das HepLuc_Mut ARE-Plasmid erhalten. Die eingefügte Mutation wurde durch eine Sequenzierung bestätigt. Zur Analyse der Auswirkung dieser Mutation wurden HepG2-Zellen mit dem HepLuc oder dem HepLuc_Mut ARE-Plasmid transfiziert und nach 24h für 16h mit IL-6 (10 ng/ml), 15d-PGJ₂ (10 μM), DMF (100 μM) oder SFN (10 μM) alleine oder in Kombination inkubiert.

Es zeigte sich, dass die Grundstimulation der Hecpudin-Promotoraktivität bei den Zellen, die mit dem HepLuc_Mut ARE-Plasmid transfiziert wurden, signifikant höher war ($p < 0,05$) (Abbildung 21, A), verglichen mit HepLuc-transfizierten Zellen. Die beobachtete signifikante Hemmung der IL-6-induzierten Hecpudin-Promotoraktivität durch DMF, 15d-PGJ₂ und SFN unterschied sich hingegen in HepLuc- und HepLuc_Mut ARE-transfizierten Zellen nicht (Abbildung 21, B).

Somit scheint die ARE-Sequenz an der Grundstimulation der Hecpudin-Promotoraktivität beteiligt zu sein, jedoch keinen Einfluss auf die beobachtete Hemmung der Zytokin-induzierten Hecpudin-Promotoraktivität durch die Substanzen DMF, SFN und 15d-PGJ₂ auszuüben.

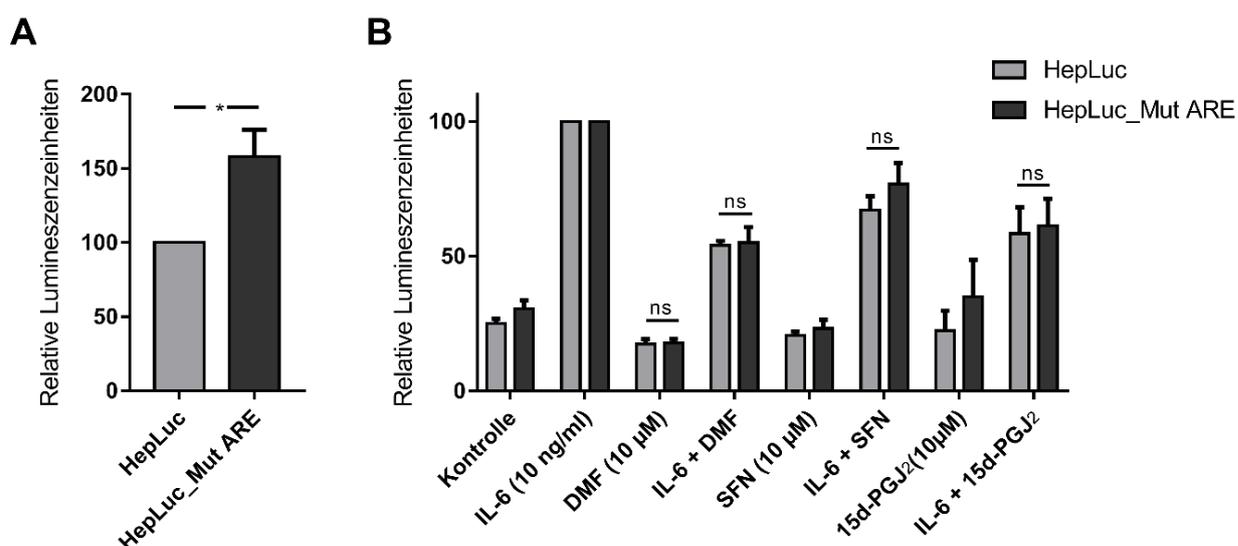


Abbildung 21: ARE-Mutation im Hecpidin-Promotor und Auswirkung auf die Hecpidin-Expression

HepG2-Zellen wurden mit dem normalen Vollängen-Hecpidin-Promotor (HepLuc) mittels Lipofektion transfiziert oder mit dem Hecpidin-Promotor mit mutierter ARE-Sequenz (HepLuc_Mut ARE). Die Grundstimulation der Hecpidin-Promotoraktivität der beiden Hecpidin-Promotorplasmiden wurde mittels Reporterassay gemessen (A). Die unterschiedlich transfizierten Zellen wurden jeweils mit IL-6 (10 ng/ml), DMF (100 µM), SFN (10 µM) oder 15d-PGJ₂ alleine oder in Kombination für 16h behandelt und mittels Reporterassay die Hecpidin-Promotoraktivität gemessen und die Aktivität auf die IL-6-Behandlung normiert (B). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert+SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, ^{ns} $p > 0,05$).

4.1.6 Untersuchung der Beteiligung von HO-1 an der Hecpidin-Expression

Um auszuschließen, dass das Nrf2-Downstreamtarget HO-1 an der Hemmung der Hecpidin-Expression beteiligt ist, da bei dem Nrf2-Knockdown eine Restaktivierung des Nrf2-Downstreamtargets HO-1, gerade bei der Behandlung mit 15d-PGJ₂, bestehen blieb, wurde die Involvierung von HO-1 in weiteren Experimenten untersucht.

Hemmung der HO-1-Aktivität durch Inhibitoren

Zunächst wurde versucht, durch die Inkubation mit dem in der Literatur beschriebenen kompetitiven HO-1-Inhibitor Zinkprotoporphyrin IX (ZnPP IX) die Auswirkung einer HO-1-Hemmung auf die Hecpidin-Expression zu untersuchen. Die 16h Inkubation von HepG2-Zellen mit ZnPP (5 µM) zeigte eine signifikante Hemmung der Hecpidin-Promotoraktivität verglichen mit der Kontrolle ($p < 0,001$) (Abbildung 22). Um zu sehen, wie sich im Vergleich zu dem kompetitiven Inhibitor ZnPP eine Induktion von HO-1 durch Hämin, dem Substrat der HO-1, auf die Hecpidin-Promotoraktivität auswirkt, wurden die Zellen für 16h mit 5 µM Hämin behandelt (Abbildung 22, A).

Überraschenderweise hatte auch die Inkubation mit Hämin eine signifikante Hemmung der Hecpidin-Promotoraktivität zur Folge. Um folglich zu sehen, ob die zusätzliche Behandlung von ZnPP zu IL-6 (10 ng/ml) und den Gegenregulatoren der Hecpidin-Expression DMF (100 µM) und 15d-PGJ₂ (10 µM) eine Auswirkung auf die Hecpidin-Promotoraktivität hat, wurden HepG2-Zellen für 16h mit den entsprechenden Kombinationen inkubiert (Abbildung 22, B). Die zusätzliche Behandlung von IL-6+DMF+ZnPP bzw. IL-6+15d-PGJ₂+ZnPP zeigte eine tendenziell stärkere Inhibition verglichen mit den Behandlungen ohne zusätzliches ZnPP. Allerdings war diese Tendenz nicht statistisch signifikant. Fraglich blieb zudem auch, welchen genauen Einfluss ZnPP auf die HO-1-Aktivität ausübt, da durch die Inkubation mit ZnPP die HO-1-Proteinexpression induziert wurde (Abbildung 23). Deshalb konnte durch die Verwendung des kompetitiven HO-1 Inhibitors ZnPP die mögliche Rolle von HO-1 bei der Hecpidin-Expression nicht geklärt werden.

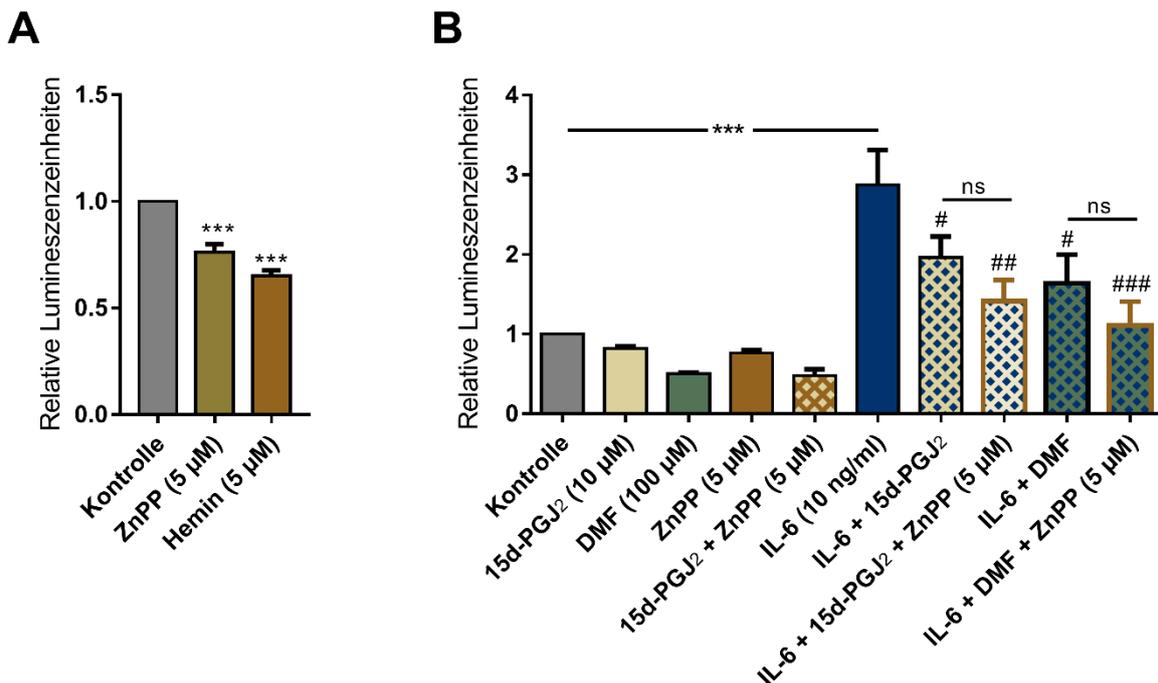


Abbildung 22: Hemmung von HO-1 durch ZnPP

HepG2 Zellen wurden 24h nach Transfektion mit HepLuc mit dem HO-1-Inhibitor ZnPP (5 µM) oder dem HO-1-Aktivator Hemin (5 µM) (A) oder mit IL-6 (10 ng/ml), 15d-PGJ₂ (10 µM), DMF (100 µM) und ZnPP (5 µM) oder der Kombinationen, wie oben dargestellt (B), für 16h inkubiert. Anschließend wurde zur Analyse der Hecpidin-Promotoraktivität der Reporterassay durchgeführt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert+SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten (***)p<0,001, ^{ns}p>0,05; ####p<0,001, ##p<0,01, #p<0,05 im Vergleich mit IL-6).

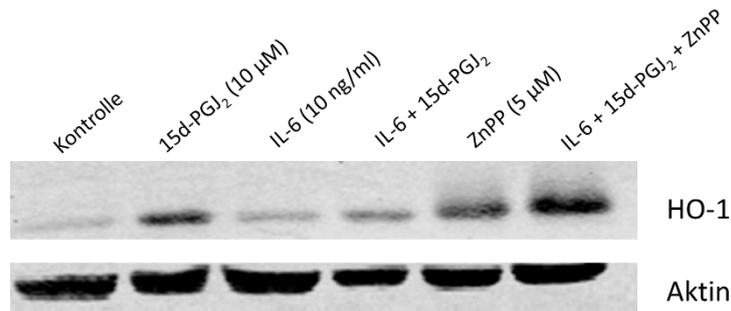


Abbildung 23: HO-1 Proteinexpression durch ZnPP

Zur Analyse der HO-1 Proteinexpression wurden HepG2 Zellen mit 15d-PGJ₂ (10µM), IL-6 (10 ng/ml), ZnPP (5 µM) oder in Kombinationen für 16h inkubiert und anschließend Proteine geerntet. Mittels Western-Blot-Analyse wurde die HO-1 Proteinexpression immunologisch detektiert. Dargestellt ist ein exemplarischer Blot.

HO-1-Knockdown

Um folglich den Einfluss von HO-1 auf die Hepsidin-Expression und dessen Beteiligung bei der Gegenregulation der Zytokin-induzierten Hepsidin-Expression durch DMF und 15d-PGJ₂ zu untersuchen, wurde ein spezifischer HO-1-Knockdown durchgeführt. Dazu wurden HepG2-Zellen revers mit spezifischer HO-1 siRNA oder als Kontrolle mit nicht spezifischer nonsense-RNA transfiziert. Zur Kontrolle der Knockdown-Effizienz wurden die Zellen 24h nach der Transfektion mit neuem Medium behandelt und nach weiteren 16h mRNA geerntet und mittels qRT-PCR die HO-1 mRNA-Expression bestimmt. Dabei zeigte sich eine signifikante HO-1-Knockdown-Effizienz von etwa 85 % verglichen mit der nonsense-transfizierten Kontrolle (Abbildung 24, A).

Um die Auswirkungen des HO-1-Knockdowns auf die Zytokin-induzierte Hepsidin-Expression und den gegenregulatorischen Effekt von DMF und 15d-PGJ₂ zu untersuchen, wurden HepG2-Zellen 24h nach der Transfektion mit IL-6 (10 ng/ml), DMF (100 µM) und 15d-PGJ₂ (10 µM) sowie deren Kombination, wie in Abbildung 24 (B) dargestellt, für 16h inkubiert. Es war kein statistisch signifikanter Unterschied bei der Hemmung der Hepsidin-Expression durch die Koinkubation von IL-6+DMF sowie IL-6+15d-PGJ₂ zwischen HO-1 siRNA-transfizierten und nonsense-transfizierten Zellen zu beobachten (Abbildung 24, B).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass auch HO-1 nicht an der Hemmung der Zytokin-induzierten Hepsidin-Expression durch DMF und 15d-PGJ₂ beteiligt ist.

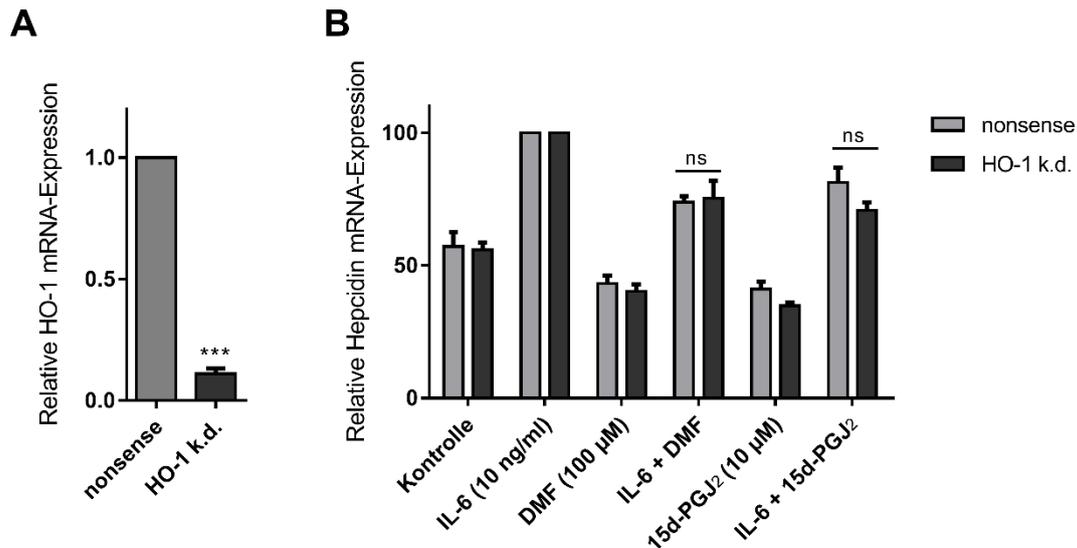


Abbildung 24: Einfluss des HO-1-Knockdowns auf die Heparidin-Expression

HepG2-Zellen wurden mit spezifischer HO-1 siRNA oder zur Kontrolle mit nonsense RNA revers transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen mit neuem Medium (A) oder mit IL-6 (10 ng/ml), DMF (100 µM) und 15d-PGJ₂ (10 µM) oder der Kombination (B) für 16h inkubiert und anschließend RNA für die qRT-PCR isoliert. In (A) wurde die Knockdown-Effizienz der HO-1 mRNA-Expression verglichen mit der nonsense Transfektion untersucht, die Auswirkung des HO-1-Knockdowns auf die Heparidin mRNA-Expression in (B). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert+SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten (^{ns}p>0,05).

4.1.7 Untersuchung der Beteiligung des BMP-6-Signalweges an der Hemmung der Heparidin-Expression

Da weder eine Beteiligung des IL-6-Signalweges noch des Transkriptionsfaktors Nrf2 an der Hemmung der Zytokin-induzierten Heparidin-Expression zu erkennen waren, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Beteiligung des BMP-Signalweges bei der beobachteten Heparidin-Expressionshemmung durch DMF, SFN und 15d-PGJ₂ ansatzweise untersucht.

Zunächst wurde die Induktion der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktorkomplexes SMAD1/5/8 durch die verwendeten Behandlungen untersucht. HepG2-Zellen wurden dazu für 16h mit IL-6 (10 ng/ml), DMF (100 µM), SFN (10 µM) oder 15d-PGJ₂ (5 und 10 µM) und den Kombinationen inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden die Zellen für die Gesamtproteinextraktion lysiert. Mittels Western-Blot wurde die pSMAD1/5/8-Proteinexpression immunologisch detektiert (Abbildung 25, A,B). Es konnte keine Induktion durch IL-6 oder eine Hemmung der pSMAD1/5/8-Proteinbildung durch DMF, SFN (Abbildung 25, A) oder 15d-PGJ₂ (Abbildung 25, B) beobachtet werden.

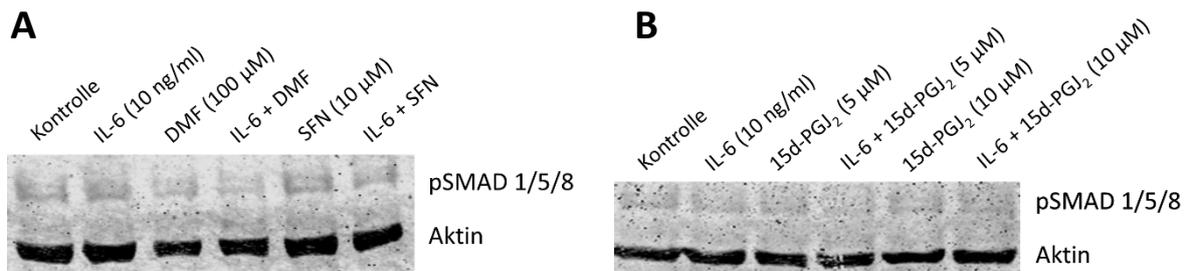


Abbildung 25: pSMAD1/5/8-Protein-Expression

Zur Analyse der pSMAD1/5/8-Protein-Expression wurden HepG2-Zellen für 16h mit IL-6 (10 ng/ml), DMF (100 µM), SFN (10 µM) (A) oder IL-6 mit 15d-PGJ₂ (5µM und 10 µM) (B) inkubiert und das Gesamtprotein geerntet. Mittels Western-Blot-Analyse wurden die pSMAD1/5/8-Proteinexpression immunologisch detektiert. Dargestellt ist ein exemplarischer Blot für die Behandlungen mit SFN und DMF (A) und 15d-PGJ₂ (B).

Dieses erste Ergebnis deutet darauf hin, dass die Substanzen keinen Einfluss auf die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktorkomplexes pSMAD/1/5/8 nehmen und damit den BMP-Signalweg nicht beeinflussen.

Um den Effekt der Substanzen auf den BMP-Signalweg weiter zu untersuchen, wurde der Effekt auf der Hecpudin-Promotorebene untersucht. Wie in Abbildung 5 dargestellt, bindet der durch den BMP-Signalweg-induzierte pSMAD1/5/8-SMAD4-Komplex an zwei verschiedene gelegene BMP responsive Elemente, dem proximalen BMP-RE1, das nahe dem STAT3-RE liegt, und dem distalen BMP-RE2. Da das intakte proximal gelegene BMP-RE1 nötig ist, um den IL-6-Effekt über das STAT3-Element zu induzieren [95, 141], wurde das distale BMP-RE2 mittels Mutagenese mutiert, um die Bindung des Transkriptionsfaktorkomplexes zu verhindern. Dadurch wurde das HepLuc_BMP RE2 erhalten.

Um die Auswirkung dieser Mutation zu untersuchen, wurden HepG2 Zellen mit HepLuc_BMP RE2 oder zur Kontrolle mit dem Volllängen-Hecpudin-Promotor HepLuc transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen mit IL-6 (10 ng/ml), DMF (100 µM), SFN (10 µM) und 15d-PGJ₂ (5 und 10 µM) alleine oder in Kombination, wie in Abbildung 26 dargestellt, für 16h inkubiert. Anschließend wurde mittels Reporteragen-Assay die Hecpudin-Promotoraktivität gemessen.

Es zeigte sich, dass das BMP-RE2 wesentlich zur Grundstimulation der Hecpudin-Promotoraktivität beiträgt (Abbildung 26, A). Im Vergleich zu HepLuc-transfizierten Zellen war die Grundstimulation bei HepLuc_Mut RE2-transfizierten Zellen um etwa 35% signifikant niedriger ($p < 0,001$). Bezüglich der Hemmung der IL-6-induzierten Hecpudin-Promotoraktivität durch DMF, SFN und 15d-PGJ₂ zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen HepLuc- und HepLuc_Mut RE2-transfizierten Zellen ($p > 0,05$). Folglich spielt die Mutation des BMP-RE2 keine Rolle bei der beobachteten Hemmung der IL-6-induzierten Hecpudin-Promotoraktivität.

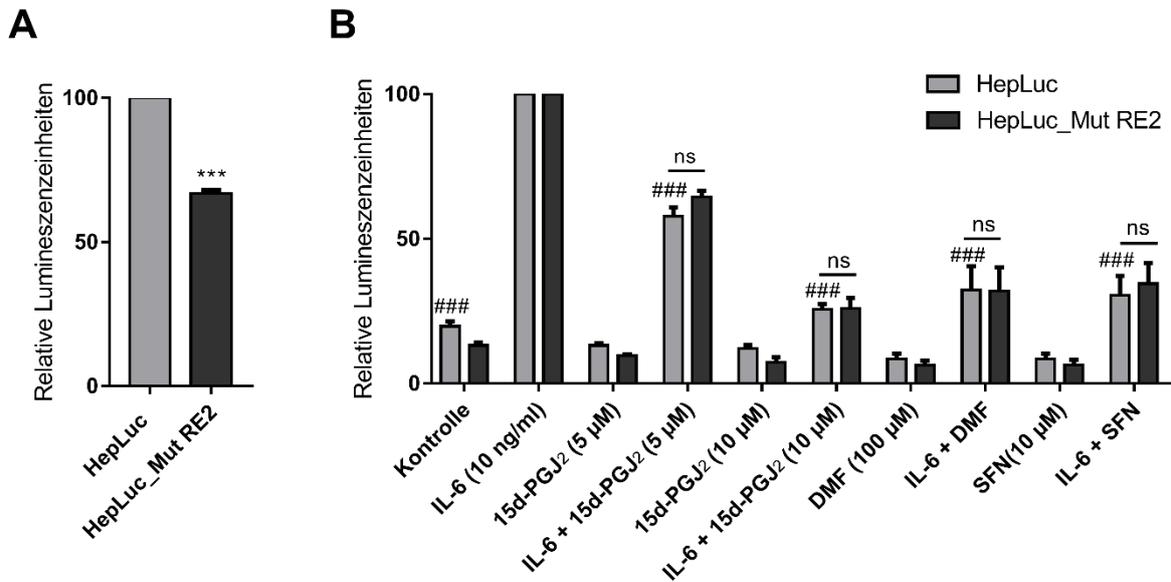


Abbildung 26: Einfluss des BMP-RE2 auf die Hepcidin-Expression

Zur Überprüfung des Einflusses des BMP-RE2 auf die Hepcidin-Promotoraktivität wurden HepG2-Zellen mit dem Vollängen-Hepcidin-Promotorplasmid (HepLuc) oder dem Hepcidin-Promotorplasmid mit mutiertem RE2 (HepLuc_MutRE2) transfiziert. 24h danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen entsprechend behandelt. Zur Kontrolle der Grundstimulation der Plasmide auf die Hepcidin-Promotoraktivität wurden die Zellen nur mit neuem Medium inkubiert (A). Zur Kontrolle des Einflusses des RE2 auf die Zytokin-induzierte Hepcidin-Expression und deren Gegenregulation wurden die Zellen für 16h mit IL-6 (10 ng/ml), 15d-PGJ₂ (5 und 10 µM), DMF (100 µM), und SFN (10 µM) oder deren Kombination inkubiert. Anschließend wurde die Hepcidin-Promotoraktivität mittels Reporter-Gen-Assay analysiert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert+SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten (***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05, ^{ns}p>0,05; ###p<0,001 verglichen mit IL-6).

Die Frage durch welchen Signalweg die beobachtete Hepcidin-Hemmung durch die Substanzen DMF, SFN, 15d-PGJ₂ vermittelt wird, konnte im Laufe dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden und Bedarf deshalb der Untersuchung möglicher weiterer Signalwege.

4.2 Untersuchung der Auswirkung von DMF, SFN und 15d-PGJ₂ auf weitere Parameter des Eisenstoffwechsels

Neben dem Effekt der Substanzen auf die Hepcidin-Expression, wurde deren Auswirkung auf weitere Parameter des Eisenstoffwechsels untersucht.

Es wurde dabei besonderes Augenmerk auf die Expression des einzig bekannten Eisentransporters Ferroportin gelegt, der zugleich den Hepcidin-Rezeptor darstellt. Wie bereits in Kapitel 1.3 beschrieben, führt die Bindung von Hepcidin an Ferroportin zu dessen Internalisierung und

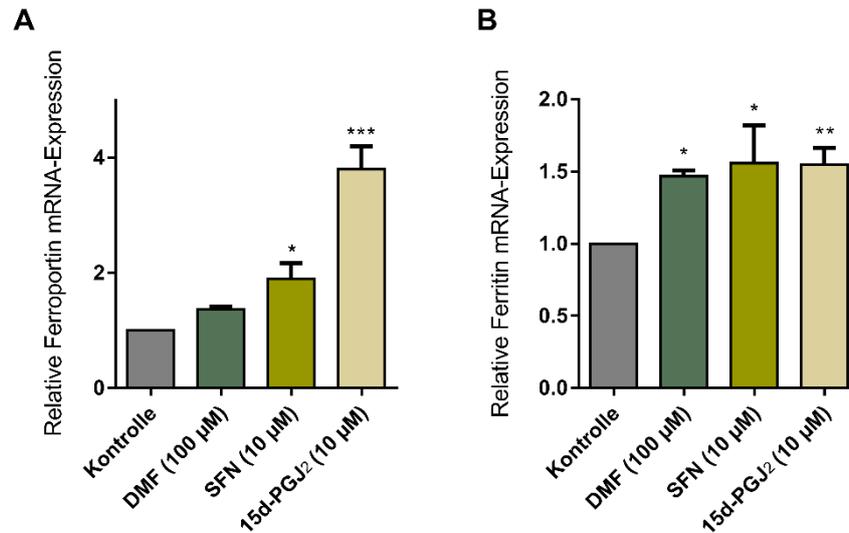


Abbildung 27: Effekt von DMF, SFN und 15d-PGJ₂ auf die Ferroportin und Ferritin-Expression in HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden für 16h mit den Substanzen DMF (100 µM), SFN (10 µM) und 15d-PGJ₂ (10 µM) inkubiert. Anschließend wurde die RNA isoliert und mittels qRT-PCR die Ferroportin mRNA-Expression (A) und Ferritin mRNA-Expression (B) quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert+SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten (**p<0,01, ***p<0,001, *p<0,05, verglichen der Kontrolle).

Degradation, wodurch Eisen in der Zelle verbleibt, was letztlich zu einem funktionellen Eisenmangel führt.

Zudem wurde der Effekt der Substanzen auf die Ferritin-Expression (FTH) untersucht, welches als Eisenspeicher in der Zelle wirkt.

HepG2-Zellen

Wie in Abbildung 27 A dargestellt, induzierten SFN und 15d-PGJ₂ die Ferroportin mRNA-Expression in HepG2-Zellen signifikant auf das zwei- bzw. 3,8-fache im Vergleich zur Kontrolle (*p<0,05 und ***p<0,001), während DMF tendenziell leicht die Expression induziert. Alle drei Substanzen hingegen induzieren die Ferritin mRNA-Expression signifikant (*p<0,05, **p<0,01).

Typ1-Makrophagen

Da Makrophagen, wie bereits erwähnt, ebenfalls in den Eisenstoffwechsel involviert sind, wurde der Effekt von DMF und 15d-PGJ₂ auch in Typ1 Makrophagen untersucht.

Dafür wurden ausdifferenzierte Typ1 Makrophagen mit DMF (100 µM) oder 15d-PGJ₂ (10 µM) für 16h inkubiert. Anschließend wurden die RNA isoliert und mittels qRT-PCR die Ferroportin und Ferritin mRNA-Expression bestimmt.

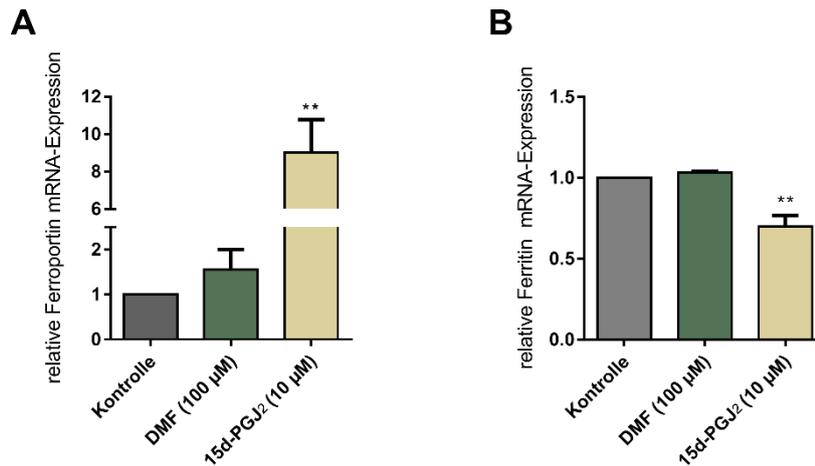


Abbildung 28: Effekt von DMF und 15d-PGJ₂ auf die Ferroportin und Ferritin-Expression in Typ1 Makrophagen

Ausdifferenzierte Typ 1 Makrophagen wurden für 16h mit DMF (100 µM) und 15d-PGJ₂ (10 µM) behandelt. Anschließend wurde die RNA isoliert und mittels qRT-PCR die Ferroportin mRNA-Expression (A) und Ferritin mRNA-Expression (B) quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert+SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten (**p<0,001, **p<0,01, *p<0,05, verglichen mit der Kontrolle).

15d-PGJ₂ (10 µM) induzierte die Ferroportin mRNA-Expression signifikant auf das Achtfache verglichen mit der Kontrolle (**p<0,01), während DMF (100 µM) die Ferroportin mRNA-Expression zwar nicht statistisch signifikant, aber dennoch auf das 1,6-fache im Vergleich zur Kontrolle induzierte (Abbildung 28, A).

DMF (100 µM) zeigte keinen Effekt auf die Ferritin mRNA-Expression in Typ1 Makrophagen (Abbildung 28, B). 15d-PGJ₂ (10 µM) hingegen senkte überraschenderweise die Ferritin mRNA-Expression in Makrophagen signifikant (**p<0,01) um etwa 30%, was konträr ist zu dessen Effekt in HepG2-Zellen, da 15d-PGJ₂ die Ferritin mRNA-Expression in diesen Zellen signifikant induzierte (Abbildung 27, B).

4.2.1 Untersuchung der Beteiligung von Nrf2 an der Induktion von Ferroportin und Ferritin mRNA-Expression in HepG2-Zellen

Um den Signalweg des Effekts von DMF, SFN und 15d-PGJ₂ auf die Ferroportin- und Ferritin-Expression aufzuschlüsseln, wurde zunächst die Beteiligung des Transkriptionsfaktors Nrf2 an den beobachteten Effekten in HepG2-Zellen untersucht. Wie bereits in Abbildung 16 gezeigt, induzierten die Substanzen DMF und 15d-PGJ₂ Nrf2, weshalb durch ein Knockdown dieses Transkriptionsfaktors dessen Involvierung geprüft wurde.

Die Knockdown-Effizienz der mit spezifischer Nrf2-siRNA behandelten Zellen betrug etwa 85% (Abbildung 29, A). Die Funktionalität des Knockdowns konnte ferner durch die signifikant niedrigere mRNA-Expression des Downstream-Targets HO-1 gezeigt werden (Abbildung 29, B), die bei der Behandlung mit 15d-PGJ₂ (5 µM) zwar noch vorhanden, aber dennoch auf ein Viertel der Induktion, verglichen mit den nonsense-transfizierten Zellen, gesenkt werden konnte. Bei den Behandlungen mit DMF (100 µM) und SFN (10 µM) hingegen zeigte sich eine fast vollständige Aufhebung der HO-1-Induktion bei Nrf2-siRNA transfizierten Zellen, verglichen mit nonsense-transfizierten Zellen.

Die Behandlung von nonsense-transfizierten Zellen mit DMF (100 µM) führte zu einer signifikanten Induktion der Ferroportin mRNA-Expression (*p<0,05) auf das etwa 1,5-fache, verglichen mit der Kontrollbehandlung (Abbildung 29, C). Auch die Koinkubation von DMF mit IL-6 (10 ng/ml) induzierte die Ferroportin mRNA-Expression, wenn auch nicht statistisch signifikant. Bei Nrf2 k.d. Zellen war der induzierende Effekt von DMF aufgehoben (Abbildung 29, C). Die Expression der Ferritin mRNA konnte bei der Kontroll-transfizierten Zellen durch DMF signifikant (p<0,001) auf das etwa 1,5-fache induziert werden. Auch diese Induktion wurde signifikant (**p<0,001) durch die Transfektion mit Nrf2 siRNA inhibiert (Abbildung 29, D).

Die Behandlung mit SFN (10 µM) und die Koinkubation von SFN mit IL-6 (10 ng/ml) führte zu einer signifikanten Erhöhung der Ferroportin mRNA-Expression (**p<0,001) auf das etwa 2,5-fache, verglichen mit der Kontrolle (Abbildung 29, E) und induzierte ebenfalls die Ferritin mRNA-Expression signifikant (Abbildung 29, F). Auch diese Effekte waren bei Nrf2 k.d. Zellen nach SFN Behandlung nicht mehr vorhanden und damit signifikant gehemmt (Abbildung 29, E,F).

Diese Beobachtung trifft ebenfalls auf die Behandlung von Kontroll- und Nrf2-siRNA-transfizierten Zellen mit 15d-PGJ₂ (5 µM) und 15d-PGJ₂ mit IL-6 (10 ng/ml) für die Ferroportin mRNA-Expression zu (Abbildung 29, G), die nur bei Kontroll-transfizierten Zellen signifikant induziert wurde. Interessanterweise induzierte 15d-PGJ₂ auch die Ferritin mRNA-Expression auf das etwa 1,5-fache. Diese Induktion wurde jedoch nicht durch einen Nrf2 k.d. aufgehoben, sondern unterschied sich nicht zwischen Kontroll- und Nrf2 siRNA-transfizierten Zellen (Abbildung 29, H).

Zusammengefasst zeigt der Nrf2 Knockdown, dass die beobachtete Induktion der Ferroportin mRNA-Expression durch die Behandlung mit DMF, SFN und 15d-PGJ₂ oder bei der Koinkubation mit IL-6 durch den Transkriptionsfaktor Nrf2 vermittelt wird. Dieses Ergebnis trifft auch auf die beobachtete Ferritin-Induktion durch DMF und SFN zu, allerdings nicht für die Behandlung mit 15d-PGJ₂.

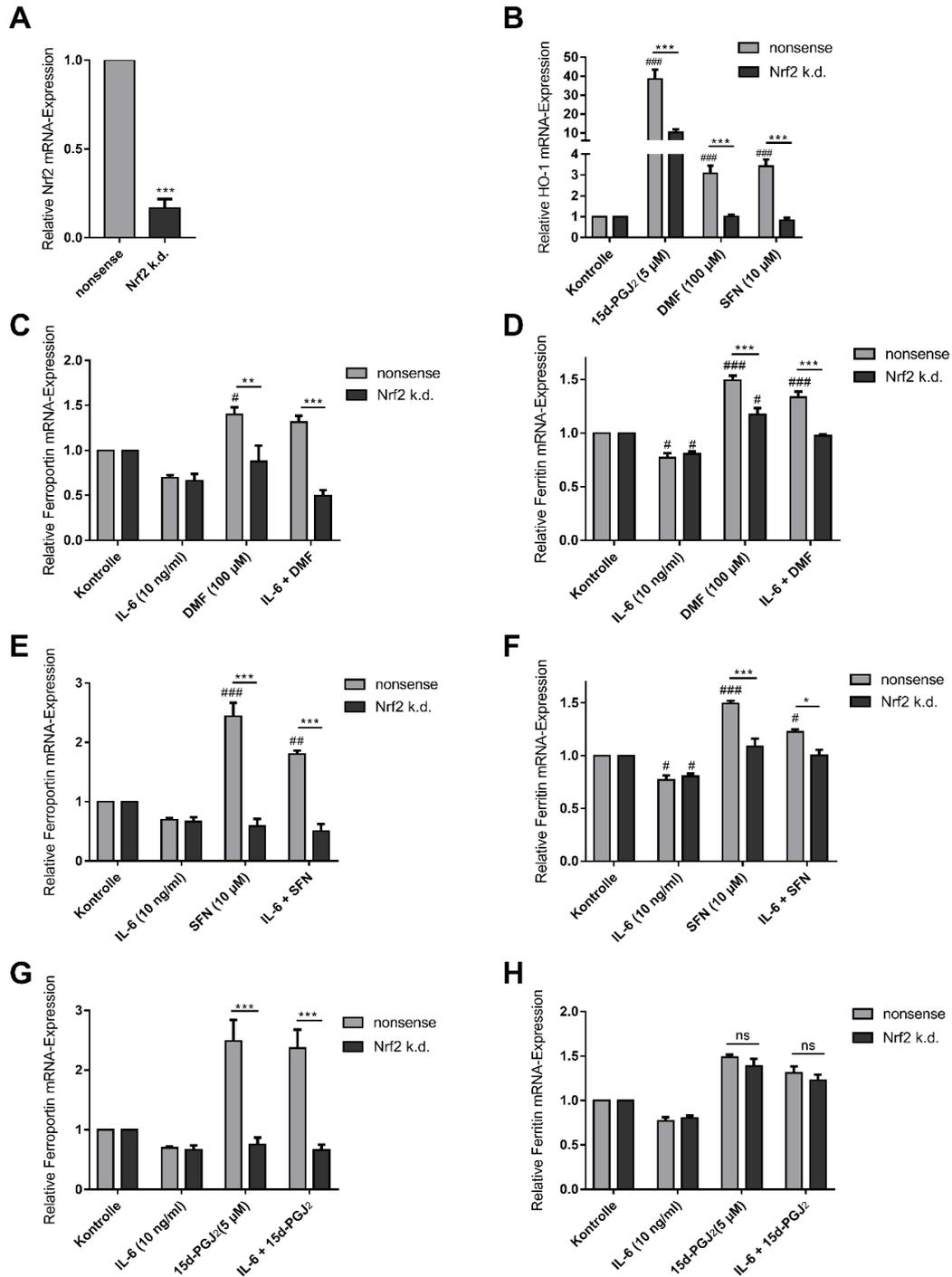


Abbildung 29: Knockdown von Nrf2 und dessen Effekt auf die Induktion von Ferroportin und Ferritin durch DMF, SFN und 15d-PGJ₂

HepG2-Zellen wurden beim Aussäen entweder mit spezifischer Nrf2-siRNA oder als Kontrolle mit nonsense-siRNA transfiziert und nach 24h für 16h mit entsprechenden Substanzen behandelt. Anschließend wurde RNA isoliert und mittels qRT-PCR die entsprechenden mRNA-Expressionen untersucht. In (A) ist die Nrf2-Knockdown-Effizienz von transfizierten, unbehandelten Zellen dargestellt. (B) zeigt den Einfluss des Knockdowns auf die HO-1 mRNA-Expression durch die Substanzen DMF, SFN und 15d-PGJ₂. In (C), (E) und (G) ist der Einfluss des Knockdown und der Behandlungen auf die Ferroportin mRNA-Expression, in (D), (F) und (H) auf die Ferritin mRNA dargestellt. Die Behandlung von IL-6 (10 ng/ml) und DMF (100 μM) zeigt die Abbildung (C) und (D), mit SFN (10 μM) (E) und (F) und mit 15d-PGJ₂ (5 μM) (G) und (H). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert+SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten (***)p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 und ###p<0.001.##p<0.01.#p<0.05 verglichen mit der Kontrolle).

4.2.2 Untersuchung der Beteiligung von HO-1 an der Ferroportin- und Ferritin-Induktion durch DMF und 15d-PGJ₂ in HepG2-Zellen

Um weiter zu untersuchen, ob der Transkriptionsfaktor Nrf2 direkt die Effekte von DMF und 15d-PGJ₂ auf die Ferroportin und Ferritin mRNA-Expression vermittelt

oder das Nrf2-Downstreamtarget HO-1 involviert ist, wurde ein HO-1 Knockdown durchgeführt.

Dazu wurden HepG2 Zellen mit spezifischer HO-1 siRNA oder zur Kontrolle mit nonsense siRNA revers transfiziert und nach 24h für weitere 16h mit IL-6 (10 ng/ml), DMF (100 µM) und 15d-PGJ₂ (10 µM) oder deren Kombinationen inkubiert (Abbildung 30). Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde die RNA extrahiert und mittels qRT-PCR die Effekte der Behandlungen auf die Ferroportin und Ferritin mRNA-Expression analysiert.

DMF induzierte die Ferroportin-Expression signifikant (* $p < 0,05$) auf das etwa 1,5-fache, verglichen mit der Kontrolle. Diese Induktion war tendenziell niedriger bei HO-1 k.d. Zellen und war signifikant niedriger bzw. nicht mehr vorhanden bei HO-1 k.d. Zellen, die mit IL-6+DMF-behandelt wurden, verglichen mit den Kontroll-transfizierten Zellen (* $p < 0,05$) (Abbildung 30, A). Die signifikant durch DMF- bzw. IL-6+DMF induzierte Ferritin mRNA-Expression (** $p < 0,001$) war in Zellen, die mit HO-1 siRNA transfiziert wurden, nicht mehr vorhanden (Abbildung 30, B).

Auch die Behandlung mit 15d-PGJ₂ und IL-6+15d-PGJ₂ induzierten die Ferroportin mRNA-Expression signifikant auf das etwa Zweifache, verglichen mit der Kontrolle. Zellen, die hingegen mit HO-1 siRNA transfiziert wurden, zeigten keine signifikante Induktion der Ferroportin-Expression (Abbildung 30, C). Die Ferritin mRNA-Expression wurde ebenfalls durch die Behandlung mit 15d-PGJ₂ bzw. IL-6+15d-PGJ₂ signifikant (** $p < 0,001$) auf das etwa 1,5-fache induziert (Abbildung 30, D). Zwar wurde die mRNA-Expression von Ferritin auch von HO-1 k.d. Zellen signifikant induziert (* $p < 0,05$), allerdings war die Induktion signifikant niedriger als bei Kontroll-transfizierten Zellen gleicher Behandlung (Abbildung 30, D).

Zusammengefasst zeigen die Daten des HO-1-Knockdowns, dass das Nrf2-Downstreamtarget HO-1 an der Induktion der Ferroportin und Ferritin mRNA-Expression durch die Behandlung mit DMF maßgeblich beteiligt ist. Auch an der Induktion durch die Behandlung mit 15d-PGJ₂ ist HO-1, zumindest teilweise, beteiligt.

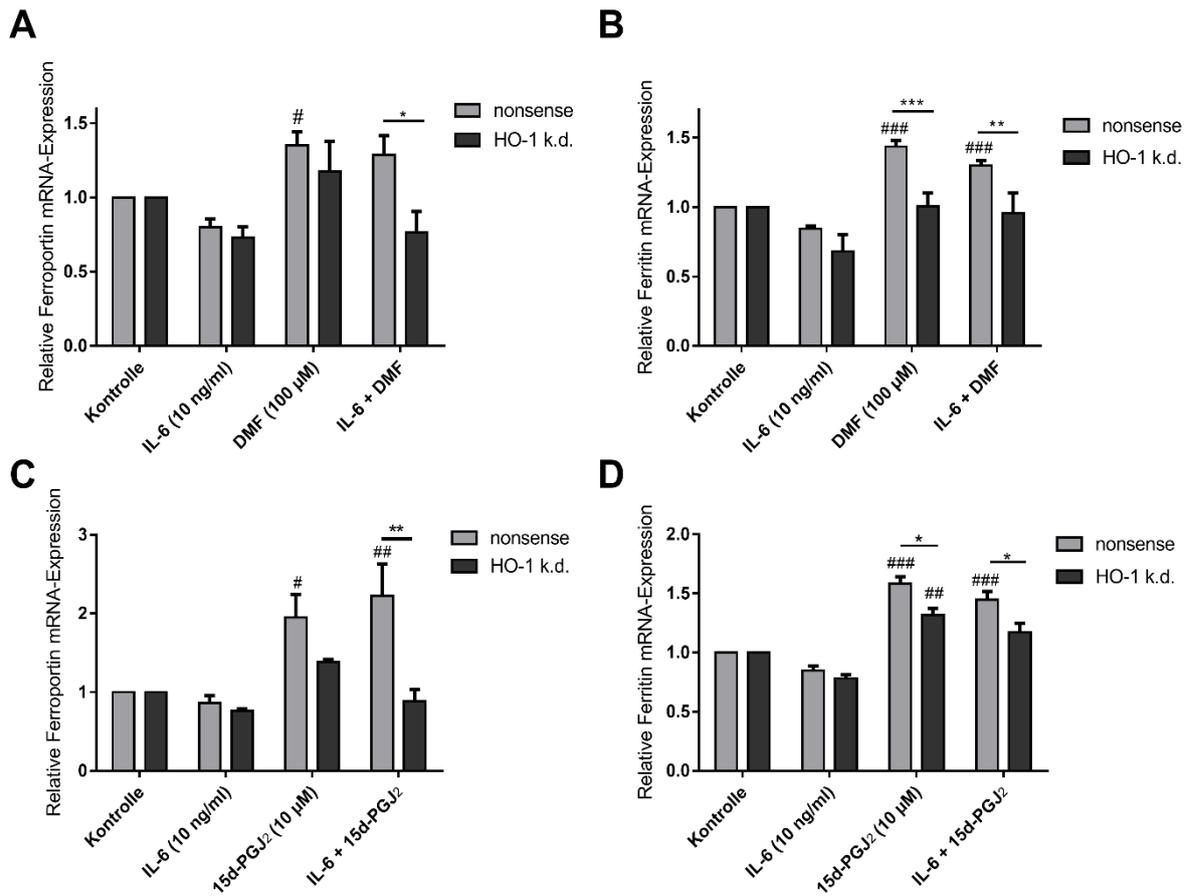


Abbildung 30: Effekte des HO-1 k.d. auf die Ferroportin- und Ferritin-Induktion durch DMF und 15d-PGJ₂

HepG2-Zellen wurden beim Aussäen revers mit spezifischer HO-1 siRNA oder als Kontrolle mit nonsense-siRNA transfiziert und nach 24h für weitere 16h mit IL-6 (10 ng/ml), DMF oder deren Kombination (A, B), oder mit IL-6 (10 ng/ml), 15d-PGJ₂ (10 μ M) und deren Kombination (C, D) behandelt. Anschließend wurde RNA isoliert und mittels qRT-PCR die entsprechenden mRNA-Expressionen untersucht. Die Effekte auf die Ferroportin mRNA-Expression zeigen die Abbildungen (A) und (C), Effekte auf die Ferritin mRNA-Expression (B) und (D). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert+SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ und ### $p < 0,001$, ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrolle).

5. Diskussion

Hepcidin ist in seiner Funktion als systemischer Eisenregulator inzwischen seit 15 Jahren bekannt. Seine Expression, die vorrangig in der Leber und zu einem geringeren Anteil in Makrophagen stattfindet, ist im Falle von chronischen Entzündungen im Körper erhöht und das Resultat einer transkriptionellen Aktivierung maßgeblich durch die proinflammatorischen Zytokine der IL-6-Familie [132, 10]. Die Freisetzung von Hepcidin ins Serum führt zu einer Bindung von Hepcidin an den einzig bekannten Eisentransporter Ferroportin und zu dessen Ubiquitinierung, Internalisierung und letztlich zur Degradation. Somit verbleibt Eisen in den Zellen des Eisenstoffwechsels, zu denen Makrophagen, Enterozyten und Leberzellen gehören. Diese Restriktion der Eisenverfügbarkeit führt zu einem funktionellen Eisenmangel und damit zu der Entwicklung einer Anämie der chronischen Inflammation. Diese ist eine verbreitete systemische Komplikation bei Patienten, die an einer chronischen Entzündung, wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, leiden und deren Lebensqualität dadurch beeinträchtigt ist [194, 281, 86, 282]. Aus diesem Grund ist die Korrektur der Anämie bei diesen Patienten von wesentlicher Bedeutung.

Herkömmliche Therapieoptionen wie orale und parenterale Eisensupplementation oder die Verwendung von Erythropoese-stimulierenden Substanzen führen manchmal durch schlechtes Ansprechen, gerade beim Vorliegen einer ACI, nicht zu der gewünschten Korrektur der Anämie [283]. Deshalb ist die Suche nach Möglichkeiten einer direkten Beeinflussung der Hepcidin-Ferroportin-Achse in den Fokus der Wissenschaft gerückt, um Substanzen zu finden, die eine zügige Korrektur der Anämie bewirken können.

Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus darauf gelegt, Substanzen zu finden, die Einfluss auf die Regulierung der Hepcidin-Ferroportin-Achse nehmen können.

Im Folgenden werden die einzelnen Punkte einer möglichen Beeinflussung dieser Achse näher diskutiert.

5.1 Einfluss von Zytokinen auf die Hepcidin-Expression

IL-6 spielt bei der Immunabwehr des Körpers gegen unbekanntes Pathogen eine bedeutende Rolle und ist ein wesentlicher Vermittler der Entzündung im Körper. Das Zytokin dient dazu, die Zellapoptose während der Entzündung zu verhindern und spielt eine Rolle in der Entwicklung, der Immunregulation, dem Zellwachstum und der Zellhomöostase [284, 285]. Entsprechend ist die IL-6-Expression und damit die IL-6-Serumspiegel bei chronischen Entzündungen im Körper, wie sie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vorliegen, stark erhöht und korrelieren bei CED-Patienten mit der Entzündungsaktivität [286, 287, 281].

Auch die OSM Protein-Expression war in Biopsien von Patienten mit aktiver CED erhöht, doch die genaue Funktion von OSM bei der Pathogenese und dem Krankheitsgeschehen von CED ist bislang nicht abschließend geklärt [288].

Inzwischen etabliert ist die Rolle der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und OSM bei der Induktion der Hepcidin-Expression [289]. Wie wichtig IL-6 bei der durch Bakterien induzierten Hepcidin-Expression ist, zeigt eine Studie an Mäusen. Während eine bakterielle Infektion bei normalen Mäusen zu einer hohen Hepcidin-Expression führte, zeigten IL-6 KO-Mäuse keinen Anstieg der Hepcidin-Expression [136]. Eine weitere Studie an adipösen Mäusen zeigte jedoch, dass die durch Adipositas induzierte Entzündung auch unabhängig von IL-6 bei IL-6 KO-Mäusen zu einem Hepcidin-Anstieg führte und somit auf eine Beteiligung anderer Zytokine an der Hepcidin-Induktion hindeutete [290].

Auch der Signalweg, durch den IL-6 und OSM die Hepcidin-Expression vermitteln, ist bekannt. Beide Zytokine induzieren durch Bindung an die jeweiligen Rezeptoren den JAK-STAT-Signalweg, wodurch letztlich STAT3 aktiviert und in den Zellkern transloziert wird, an das STAT3-responsive Element im Hepcidin-Promotor bindet und den Hepcidin-Promotor aktiviert [127, 128, 126, 132].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass die Zytokine IL-6 und OSM in der Konzentration 10 ng/ml, die Hepcidin-Expression in HepG2-Zellen auf Promotor- und mRNA-Ebene induzieren und die Ergebnisse damit mit anderen Studien übereinstimmt [132, 291]. Für IL-6 wurde dieser Effekt auch auf Proteinebene nachgewiesen. Auch die STAT3-Aktivierung und Translokation in den Nukleus konnte bestätigt werden.

Die Zytokine wurden deshalb als geeignete Entzündungsmediatoren angesehen und zur Imitierung einer chronischen Entzündung im Körper eingesetzt.

5.2 Möglichkeiten einer Beeinflussung der Zytokin-induzierten Hepcidin-Expression

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Substanzen gesucht, die in der Lage sind, die beschriebene Zytokin-induzierte Hepcidin-Expression zu inhibieren. Dabei wurden die Substanzen SFN sowie, nach bestem Wissen, zum ersten Mal auch DMF und 15d-PGJ₂ gefunden, die in der Lage sind die Hepcidin-Expression auf Promotor-, mRNA und Proteinebene zu inhibieren.

Mögliche Signalwege, die an der Hemmung der Hepcidin-Expression beteiligt sein könnten, wurden folglich untersucht.

5.2.1 Beeinflussung des IL-6/STAT3-Signalwegs

Bisherige pharmakologische Bemühungen die Hepcidin-Ferroportin-Achse zu beeinflussen und die Hepcidin-Expression zu hemmen, haben u.a. an der Zytokin-vermittelten Hepcidin-Expression angesetzt und versucht den Hepcidin-Überschuss zu minimieren.

Die Administration von monoklonalen IL-6 Antikörpern (Siltuximab) oder IL-6-Rezeptor Antikörpern (Tocilizumab) führte beispielsweise bei Morbus Castleman Patienten zu niedrigeren Hepcidin-Spiegeln und verbesserten damit die Anämie dieser Patienten, indem der IL-6-STAT-Signalweg unterbunden wurde [292, 293]. Auch bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis verbesserte die Behandlung mit Tocilizumab das Vorliegen der Anämie durch verringerte Hepcidin-Spiegel [294], ebenso bei Arthritis in Affen [295]. Dennoch ist der großer Nachteil einer solchen Anämie-Behandlung mit Biologicals, dass sie starke Nebenwirkungen nach sich ziehen kann und deshalb der Einsatz solcher Therapeutika überlegt und nach Abwägen stattfinden sollte [296].

Studien in Zellen und Mäusen induzierten eine Hemmung der STAT3-Aktivierung durch die Verwendung von STAT3-Inhibitoren, zu denen Curcumin, AG490 und PpYLTK zählen. Diese Klasse an Hepcidin-Inhibitoren scheiterten an einer mögliche Weiterentwicklung vor allem aufgrund ihrer sehr unspezifischen Wirkung und können damit nicht gezielt zur Hepcidin-Hemmung eingesetzt werden [297–299].

Um zu überprüfen, ob die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Substanzen DMF, SFN und 15d-PGJ₂ zu einer Veränderung des IL-6/STAT3-Signalwegs führen, wurde die Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 auf Proteinebene untersucht. Es konnte kein verändertes Phosphorylierungsniveau von STAT3 oder einer veränderte Translokation von pSTAT3 in den Nukleus zu den Zeitpunkten 6h, 16h und 24h festgestellt werden. Auf Grundlage dieser Daten ist davon auszugehen, dass die hier verwendeten Substanzen somit keinen Einfluss auf den IL-6/STAT3-Signalweg ausüben und den beobachteten Effekt der Hepcidin-Hemmung über einen anderen Signaltransduktionsweg vermitteln.

Dennoch gibt es Arbeiten, die zeigen, dass 15d-PGJ₂ sowie DMF zu einer Hemmung der pSTAT3-Bildung führen. Rajasingh *et al.* (2006) konnten eine Inhibierung der LIF-induzierten pSTAT3-Bildung durch 15d-PGJ₂ (15-30 µM) nach 2h in embryonalen Mäusestammzellen nachweisen [300]. Hosoi *et al.* (2015) zeigten eine Hemmung der Leptin-induzierten pSTAT3-Bildung durch die Koinkubation mit 15d-PGJ₂ nach 2-4h in Neuroblastom-Zellen [301]. Durch weitere Versuche mit PPAR-γ Agonisten und dem PPAR-γ-Antagonisten GW9662 zeigten die Autoren, dass der beobachtete Effekt der 15d-PGJ₂-induzierten pSTAT3-Hemmung, zumindest teilweise, durch PPAR-γ vermittelt wird [301].

Auch im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde GW9662 eingesetzt, um zu überprüfen, ob die 15d-PGJ₂-vermittelte Hepcidin-Hemmung durch die zusätzliche Inkubation mit dem PPAR-γ-Inhibitor aufgehoben wird. Es konnte jedoch kein Einfluss der zusätzlichen GW9662-Behandlung zu IL-6+15d-

PGJ₂ festgestellt werden (Daten nicht dargestellt), weshalb die Involvierung von PPAR- γ bei den hier untersuchten Effekten ausgeschlossen und nicht weiter verfolgt wurde.

Die unterschiedlichen Ergebnisse kommen eventuell durch die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien, unterschiedlicher Inkubationszeiträume und unterschiedlicher 15d-PGJ₂-Konzentrationen zustande.

In Chondrozyten zeigten Li *et al.* (2014) eine Inhibierung der TNF- α -induzierten pSTAT3-Bildung durch 50 μ M DMF nach 24h [302]. Auch in Maus-Präadipozyten wurden durch die Behandlung mit 75 μ M DMF die basalen STAT3-Spiegel im untersuchten Zeitraum von 0,5-6h gehemmt [303].

Diese Daten konnte in der hier vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Grund könnte auch hierfür in den unterschiedlich verwendeten Stimuli, Zelltypen, Zeiten und Konzentrationen liegen.

5.2.2 Beeinflussung des BMP-Signalwegs

Eine wichtige Rolle bei der Induktion der Hecpidin-Expression spielt der BMP-Signalweg. Durch Bindung von BMP6 an den BMP-Rezeptor kommt es zur Aktivierung und Phosphorylierung der SMAD-Proteine SMAD1/5/8, die an zwei BMP-responsive Elemente am Hecpidin-Promotor binden und die Transkription induzieren [91, 92].

Interessanterweise wird die entzündungsbedingte Anämie zwar maßgeblich durch IL-6 und den STAT3-Signalweg und die damit verbundene Hecpidin-Expression induziert, allerdings scheint der STAT3-Signalweg durch die BMP-abhängige SMAD-Aktivierung zusätzlich beeinflusst zu werden, jedoch nicht umgekehrt [304–307].

Ein Ansatz der Interaktion zwischen den beiden Signalwegen wurde durch die entzündungsbedingte Induktion von Aktivin B gefunden. Die LPS-Behandlung von Mäusen induzierte die Hecpidin- als auch Aktivin B-Expression. Es konnte gezeigt werden, dass Aktivin B zu einer Phosphorylierung von SMAD 1/5/8 führt und damit auch unabhängig von IL-6 zu einer Hecpidin-Induktion führen kann [308].

Zur Hemmung der Hecpidin-Expression, auch im Falle der Anämie der chronischen Inflammation, wurde pharmakologisch an verschiedenen Stellen des BMP-Signalwegs angesetzt.

Heparine zeigen eine hohe Affinität, BMPs zu binden. Patienten, die mit Heparin gegen tiefe Venenthrombose behandelt wurden, wiesen reduzierte Serum-Hecpidinspiegel auf [309]. Da jedoch die Eigenschaften von Heparin, als Antikoagulans zu wirken, nicht für die Reduktion eines Hecpidin-Exzess gedacht sind, wurden Veränderungen an der Heparinstruktur vorgenommen, die zu einer verminderten antikoagulativen Aktivität führten und dennoch die Hecpidin-Induktion inhibierten. Ihre Wirksamkeit und Sicherheit muss in randomisierten kontrollierten Studien noch sichergestellt werden [296, 310].

Auch bei HJV, dem BMP-Korezeptor, wurde angesetzt, um die Heparin-Induktion zu inhibieren. Ein dafür entwickelter monoklonaler HJV-Antikörper reduzierte die Heparin-Expression in Ratten und Affen [311]. In Ratten- und Mausmodellen, die eine Anämie aufgrund von chronischer Inflammation aufwiesen, führte die Administration dieses Antikörpers durch die Heparin-Inhibition zu einer Korrektur der Anämie [312]. Auch die Administration eines löslichen HJV-Fusionsproteins konnte die Heparin-Expression im Tiermodell inhibieren [304], scheiterte jedoch in einer klinischen Phase 2 Studie an der Rekrutierung von anämischen Patienten mit chronischer Nierenerkrankung im Endstadium (*ClinicalTrials.gov*, NCT01873534).

Kleine Moleküle, wie Dorsomorphin und das Dorsomorphin-Derivat LDN-193189, wirken als Inhibitoren des BMP-SMAD-Signalwegs durch eine Antagonisierung des BMP Typ I-Rezeptors. Die Verabreichung von LDN-193189 schwächte eine Entzündungs-bedingte Anämie im Tiermodell ab [304]. Die Weiterentwicklung dieser Moleküle scheiterte jedoch auch hier letztlich an ihrer unspezifischen Wirkung [313, 296].

Auf der Suche nach Heparin-Inhibitoren konnten Mu *et al.* (2015) das Flavonoid Myricetin identifizieren, dass *in vitro* und *in vivo* die BMP6- und IL-6-induzierte Heparin-Expression hemmen konnte [314]. Die Autoren zeigten, dass Myricetin nicht die Phosphorylierung von STAT3 hemmte, aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten (6-24h) zu einer Hemmung der pSMAD1/5/8-Bildung führte, worauf der hemmende Effekt des Flavonoids zurückzuführen ist. Auch die Behandlung von HepG2-Zellen und Mäusen mit schwarzem Sojabohnensamenschale-Extrakt (BSSCE) bewirkte eine Verringerung der Heparin-Expression [315]. Auch die BSSCE-Behandlung führte nicht zu einer Veränderung der IL-6-induzierten STAT3-Phosphorylierung, aber verringerte die Bildung von pSMAD1/5/8 zum Zeitpunkt 9-24h, worauf die Autoren die reduzierte Heparin-Expression zurückführten [315].

Um zu überprüfen, inwieweit die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Substanzen einen Einfluss auf den BMP-SMAD-Signalweg nehmen und darüber der beobachtet Hemmeffekt auf die Heparin-Expression zu erklären ist, wurde die Phosphorylierung von SMAD1/5/8 untersucht. Auf Proteinebene konnte jedoch zum gewählten Zeitpunkt (16h) kein Unterschied gesehen werden.

Casnovas *et al.* (2014) zeigten durch Heparin-Promotoranalysen, wie der IL-6-Signalweg und der BMP-Signalweg additiv auf die Heparin-Expression wirken können. Die Autoren mutierten die unterschiedlichen Bindungsstellen im Heparin-Promotor, STATmut, BMP-RE1mut und BMP-RE2mut, und verglichen die Induktion von IL-6 und BMP und deren Kombination auf die Heparin-Promotoraktivierung [307]. Sie zeigten, dass bei einer BMP-RE1-Mutation eine extrem niedrige Grundaktivierung der Heparin-Promotoraktivität vorlag. IL-6 führte bei diesem Mutationskonstrukt kaum zu einer Aktivierung des Heparin-Promotors. Dieses Ergebnis wurde durch andere Publikation

untermauert [95, 141], woraus geschlossen werden kann, dass ein intaktes BMP-RE1 notwendig ist, damit IL-6 die Heparin-Expression induziert.

Um auf Promotorebene zu untersuchen, ob DMF, SFN oder 15d-PGJ₂ auf den SMAD-Signalweg einwirken, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit folglich das BMP-RE2 mutiert, wodurch die SMAD-Bindung an dieser Stelle des Promotors verhindert wird und folglich den Signalweg abschwächt. Durch die Mutation konnte eine Reduktion der Heparin-Promotor-Grundaktivierung festgestellt werden, was das Ergebnis anderer Studien widerspiegelt [307]. Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen der inhibierenden Wirkung der verwendeten Substanzen zwischen dem Wild-Typ Heparin-Promotor und dem BMP-RE2-Mutations-Promotor festgestellt werden.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit der BMP-Signalweg bezüglich einer möglichen Vermittlung des Hemmeffektes auf die Heparin-Expression durch die verwendeten Substanzen DMF, SFN und 15d-PGJ₂ nicht weiter verfolgt.

5.3 Die Aktivierung von Nrf2 und dessen Auswirkung auf Parameter des Eisenstoffwechsels

Oxidativer oder elektrophiler Stress kann durch Schädigung von Lipiden, Proteinen und Nucleinsäuren die normale Zellfunktion stark beeinträchtigen. Diese Veränderungen stehen in engem Zusammenhang mit dem Alterungsprozess und alterstypischen Erkrankungen wie neurodegenerative und kardiovaskuläre Erkrankungen sowie Krebs [316–318]. Der Transkriptionsfaktor Nrf2 gilt als einer der bedeutendsten Transkriptionsfaktoren zur Abwehr solcher Zellschädigungen, indem er die Expression von weit über 100 relevanter Gene reguliert [319]. Zu diesen Genen gehören antioxidative Proteine, Entgiftungsenzyme der Phase I und II, Transportproteine und einige Transkriptionsfaktoren, um nur einige zu nennen [319].

Die hier im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Substanzen DMF, SFN und 15d-PGJ₂ sind allesamt etablierte Nrf2-Aktivatoren [319, 261, 255–257, 259, 215]. Die Ergebnisse dieser vorliegenden Arbeit konnten die Nrf2-Aktivierung durch die Substanzen anhand der Translokation von Nrf2 in den Zellkern bestätigen, was immunologisch mittels Western Blot nachgewiesen werden konnte. Auch die Induktion der Nrf2-Downstreamtargets (HO-1, NQO1) bestätigte die Nrf2-Aktivierung. Ob und in wieweit die Aktivierung von Nrf2 Parameter des Eisenstoffwechsels beeinflusst, sollte überprüft werden.

5.3.1 Nrf2 und die Hepcidin-Expression

Da weder eine Beeinflussung des IL-6/STAT-Signalwegs noch eine Beeinflussung des BMP-SMAD-Signalwegs durch die Behandlung mit DMF, SFN und 15d-PGJ₂ zu beobachten war, stellte sich die Frage, ob die Nrf2-Aktivierung durch die Substanzen an der Hepcidin-Inhibierung beteiligt war. Diese Untersuchung der Involvierung von Nrf2 an der Hepcidin-Expression war somit zentraler Aspekt der vorliegenden Arbeit.

Zeitgleich mit dem Voranschreiten dieser Arbeit publizierte Bayele *et al.* (2015) einen Zusammenhang der Hepcidin-Expression mit Nrf2 [280]. Im Rahmen dieser Studie wurde gezeigt, dass Phytoöstrogene, insbesondere Quercetin, durch die Nrf2-Aktivierung zu einer erhöhten Hepcidin-Expression in Leberzellen führte. Zudem wiesen die Autoren eine etablierte Nrf2-Bindestelle, die sogenannte ARE-Sequenz, im Hepcidin-Promotor nach. Durch dessen Mutation wurde die Hepcidin-Induktion durch die Phytoöstrogene aufgehoben. Bayele *et al.* (2015) verwendeten ein Hepcidin-Promotorplasmid, das nicht mit dem in der hier vorliegenden Arbeit gleichzusetzen ist, da es nur eine Teilsequenz des Hepcidin-Promotors sowie mehrere zusätzlich einklonierte ARE-Sequenzen enthielt [280].

Eine natürlich enthaltene ARE-Sequenz konnte in dem in dieser Arbeit verwendeten HepLuc-Konstrukt, das den natürlichen Vollängen-Hepcidin-Promotor enthielt, bestätigt werden. Die Mutation dieser Sequenz, wodurch das HepLuc_AREmut-Konstrukt entstand, hob jedoch nicht die inhibierende Wirkung von SFN, DMF oder 15d-PGJ₂ auf die Hepcidin-Expression auf. Dies deutet darauf hin, dass eine direkte Bindung von Nrf2 an die ARE-Sequenz im Hepcidin-Promotor nicht für die Hemmung der IL-6-induzierten Hepcidin-Expression verantwortlich ist.

Interessanter weise führte die ARE-Mutation jedoch zu einer erhöhten Hepcidin-Grundstimulierung in unbehandelten Zellen, verglichen mit HepLuc-transfizierten Zellen, was damit auf eine hemmende Wirkung dieser Sequenz auf die Hepcidin-Expression hinweist und damit konträr zu den Ergebnissen von Bayele *et al.* [280] ist. Auch gegensätzlich sind die Ergebnisse einer Nrf2-Überexpression auf die Hepcidin-Promotoraktivität. Während Bayele *et al.* (2015) eine Hepcidin-Induktion durch eine Nrf2-Überexpression zeigten, konnte eine Überexpression im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede liefern, sondern eher eine Tendenz der erniedrigten Hepcidin-Expression beobachtet werden. Tanaka *et al.* (2012) konnten an Nrf2-KO-Mäusen zeigen, dass diese Mäuse verglichen mit Wildtyp-Mäusen höhere basale Hepcidin-Expressionswerte aufwiesen [320]. Dieses Ergebnis passt zu der in dieser vorliegenden Arbeit gezeigten höheren Grundstimulierung durch eine Mutation der ARE-Sequenz. Es lässt sich dadurch die Hypothese ableiten, dass die ARE-Sequenz im Hepcidin-Promotor die basale Hepcidin-Expression mitregulieren könnte. Eine weitere Studie mit Nrf2 KO-Mäusen zeigte jedoch, dass die Hepcidin-Expression sich bei diesen Mäusen nicht zu normalen

Wildtyp-Mäusen unterschied [231]. Somit sind die Daten aus Nrf2-KO-Zellen/Mäusen zwischen den Studien konträr und die Involvierung von Nrf2 bei der Heparin-Expression nicht eindeutig.

Um der Frage nach dem Einfluss von Nrf2 auf die Heparin-Expression weiter nachzugehen, wurde zunächst versucht, die DMF und 15d-PGJ₂-induzierte Nrf2-Translokation in den Zellkern zu hemmen. Es wurde in einigen Studien gezeigt, dass eine Behandlung mit dem Alkaloid Trigonellin zu einer solchen Inhibierung der Nrf2-Translokation in den Zellkern führt [321–323]. Das Ergebnis dieser Studien konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da die zusätzliche Behandlung mit Trigonellin nicht die Translokation von Nrf2 aufhob.

Um den Nrf2-Signalweg folglich zu unterdrücken, wurde ein Nrf2-Knockdown in HepG2-Zellen durchgeführt. Durch die Senkung der Nrf2-Expression um etwa 85% konnte allerdings kein Unterschied zu Kontrollzellen bezüglich der inhibitorischen Wirkung von DMF, SFN und 15d-PGJ₂ beobachtet werden. Da Knockdown-Versuche keine vollständige Hemmung des Nrf2-Signalwegs zulassen, bleibt die Frage bestehen, ob die Nrf2-Restaktivität ausreichen würde, um Nrf2-Effekte zu vermitteln. Die Expression des Nrf2-Downstreamtargets HO-1 zeigt jedoch, dass insbesondere im Falle von DMF und SFN keine Induktion von HO-1 durch den Knockdown stattfindet. Auch die Induktion von HO-1 durch 15d-PGJ₂ wurde auf ein Viertel der Induktion in Kontroll-transfizierten Zellen abgeschwächt. Deshalb ist davon auszugehen, dass diese sinkenden Induktionen des Nrf2-Downstreamtargets HO-1 auch auf die Heparin-Expression übertragen werden kann. Da diese jedoch nicht durch den Nrf2 Knockdown beeinflusst wird, deuten diese Daten darauf hin, dass Nrf2 nicht an der hemmenden Wirkung der Zytokin-induzierten Heparin-Expression beteiligt ist.

Diese Daten werden untermauert durch Versuche an Makrophagen. Die LPS-induzierte Heparin-Expression in Maus-Peritonealmakrophagen konnte durch zusätzliche Behandlung mit SFN gehemmt werden [56]. Diese Hemmung war bei Makrophagen aus Nrf2-KO-Mäusen nicht aufgehoben, weshalb auch diese Autoren einen Nrf2-unabhängigen Effekt postulierten [56].

5.3.2 Nrf2 und weitere Eisenstoffwechselfparameter

Wie bereits erwähnt, spielt Ferroportin als bislang einzig bekannter Eisentransporter im Eisenstoffwechsel eine besondere Bedeutung. Zirkulierendes Heparin bindet an Ferroportin und induziert dadurch dessen Internalisierung und Degradation, weshalb Eisen in der Zelle verbleibt und somit dem Körper nicht mehr zur Verfügung steht [28].

Pharmakologisch wurde deshalb versucht auch an Ferroportin anzusetzen, um die Bindung von Heparin an Ferroportin zu unterbinden und damit in die Heparin-Ferroportin-Achse zu intervenieren [296]. Fung *et al.* (2013) identifizierten das Thiaminderivat Fursultiamin, das in der Lage war an

Ferroportin zu binden und dadurch die Bindung von Heparin unterdrückte [324]. Allerdings bestätigte sich dessen Wirksamkeit *in vivo* nicht, weshalb Fursultiamin nur nach einer Weiterentwicklung als Heparin-Antagonist eingesetzt werden könnte [296]. Ein monoklonaler Ferroportin Antikörper LY2928057 wurde in zwei Phase 1 Studien an Gesunden (*ClinicalTrials.gov*: NCT01330953) sowie an anämischen Patienten mit chronischer Nierenerkrankung und Hämodialyse (*ClinicalTrials.gov*: NCT01991483) getestet. Studienergebnisse sind dazu bislang nicht veröffentlicht.

Hinweise auf eine Involvierung von Nrf2 in den Eisenstoffwechsel lieferte eine Studie an Nrf2 KO-Mäusen, die Entfärbungen der natürlichen braun-gelben Farbe ihrer Zähne aufwiesen. Die natürliche Farbe ist durch Eiseneinlagerungen bedingt. Die Autoren führten die Entfärbung auf einen gestörten Eisentransport und damit veränderte Eisendeposition im Zahnschmelz zurück [230].

Dass Nrf2 Ferroportin regulieren kann, zeigte Harada *et al.* (2011) in Makrophagen [56]. Während LPS die Ferroportin mRNA-Expression senkte, konnte die Behandlung mit dem Nrf2-Aktivator DEM die Ferroportin mRNA-Expression induzieren [56]. Durch den Einsatz von Nrf2-KO-Makrophagen konnten die Autoren nachweisen, dass die Induktion der Ferroportin mRNA Nrf2-abhängig war.

Eine ARE-Sequenz konnte auch im Ferroportin-Promotor nachgewiesen und mittels gezielter Mutagenese eine Nrf2-abhängige Ferroportin-Expression gezeigt werden [325]. Im Falle einer Nrf2-Aktivierung durch oxidativen Stress gehört die Ferroportin-Induktion zu der antioxidativen Antwort, indem oxidativer Stress, der durch eine Eisenansammlung in der Zelle bedingt ist, vermindert wird, indem das Eisen durch Ferroportin aus der Zelle geschleust wird [325].

Ob die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Substanzen DMF, SFN und 15d-PGJ₂ auch in der Lage sind, nicht nur die Heparin-Expression zu inhibieren, sondern auch die Ferroportin-Expression zu regulieren, um die Heparin-Ferroportin-Achse zu beeinflussen, war zentraler Aspekt der Untersuchungen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle Substanzen die Ferroportin mRNA-Expression induzierten, wobei sich 15d-PGJ₂ als stärkster Aktivator herausstellte. Durch einen Nrf2-Knockdown in HepG2-Zellen war die Ferroportin-Induktion durch die Substanzen nicht mehr vorhanden, was eine eindeutige Nrf2-abhängige Ferroportin mRNA-Expression aufzeigte und damit mit anderen Studien übereinstimmte [56, 325]. Leider gab es keinen zu erwerbenden Ferroportin Antikörper, der in HepG2-Zellen zuverlässig die Ferroportin Proteinexpression anzeigte, weshalb diese Daten nicht auf Proteinexpressionsebene untersucht wurden.

Da Ferritin als Eisenspeicherprotein eine Rolle im Eisenstoffwechsel spielt und auch eine nachgewiesene ARE-Sequenz im Promotor enthält [326], wurde auch die Ferritin-Expression untersucht. Die Substanzen DMF, SFN und 15d-PGJ₂ induzierten die Ferritin mRNA-Expression. Ein

Knockdown von Nrf2 führte bei DMF und SFN zu einer signifikanten Hemmung der Ferritin-Expression, wenn doch die Ferritin-Aktivierung bei den Knockdown-Zellen nicht komplett verschwunden war. Interessanterweise führte die Behandlung mit 15d-PGJ₂ trotz Nrf2 Knockdown nicht zu einer signifikanten Hemmung der Ferritin-Expression, was darauf hindeutet, dass möglicherweise auch andere (Transkriptions-) Faktoren zu der Ferritin-Induktion beitragen, wie es beispielsweise für JunD, einen AP1 Basic-Leucin-Zipper Transkriptionsfaktor, gezeigt wurde [326]. Auch die Induktion von Ferritin als Eisenspeicherprotein ist als Teil der antioxidativen Antwort zu verstehen, um oxidativem Stress durch freies Eisen zu minimieren, indem es in Ferritin gebunden wird [222].

5.3.3 Das Nrf2-Downstreamtarget HO-1 und dessen Einfluss auf die Heparin-Expression und weitere Parameter des Eisenstoffwechsels

Der tatsächliche Signalweg, durch den die Substanzen DMF, SFN und 15d-PGJ₂ die Zytokin-induzierte Heparin-Expression inhibieren, konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht abschließend geklärt werden. Der Fokus lag auf dem Transkriptionsfaktor Nrf2, der sich jedoch nicht als Übermittler der Heparin-Inhibierung heraus stellte.

Dennoch gibt es Arbeiten, die das Nrf2-Downstreamtarget HO-1 mit einer Heparin-Regulation in Verbindung bringen. Shin *et al.* (2012) zeigten, dass eine Vorbehandlung mit einer CO-freisetzenden Substanz zu einer Hemmung der Zytokin-induzierten Heparin-Expression führt, indem sowohl der STAT3-Signalweg, als auch der ER-Stress-induzierende CREBH-Signalweg gehemmt wird [327]. Antiinflammatorische Effekte von CO und HO-1, der enzymatischen Quelle für CO, wurde *in vitro* und *in vivo* intensiv untersucht, doch beteiligte Signalwege sind bisher noch nicht vollständig aufgeklärt [27, 328].

Eine HO-1-Defizienz resultierte *in vivo* in einer Anämie und einer hepatischen und renalen Hämosiderose und führte zu einer chronischen Entzündung mit erhöhten CRP-, IL-6- und Haptoglobinwerten [329–332]. Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass HO-1 wesentlich ist, um die Zellen gegen oxidativen Stress zu schützen und gleichzeitig die Eisenhomöostase aufrecht zu erhalten [332]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine direkte Modulation der HO-1-Expression oder der HO-1-Aktivität die Heparin-Expression nicht direkt beeinflussen kann [332]. Diese Schlussfolgerung konnte auch im Rahmen dieser Doktorarbeit gezogen werden. In den HO-1 Knockdown-Versuchen dieser Arbeit zeigte ein HO-1-Knockdown keinen Einfluss auf die Heparin-Inhibierung durch die Substanzen DMF und 15d-PGJ₂. HO-1 übte somit keinen direkten Einfluss auf die Hemmung der Zytokin-induzierte Heparin-Expression aus.

Bei welcher mRNA-Regulation HO-1 jedoch beteiligt ist, zeigte der HO-1 Knockdown bei der Expression von Ferroportin und Ferritin. In HO-1-Knockdown-Zellen war die Induktion von Ferroportin und Ferritin

durch die Substanzen DMF und 15d-PGJ₂ signifikant niedriger, als in Kontrollzellen, was damit auf die Beteiligung des Nrf2-Downstreamtargets HO-1 bei der Induktion von Ferroportin und Ferritin hindeutet.

Kartikasari *et al.* (2009) untersuchten in Monozyten den Einfluss von HO-1-Aktivatoren und -Inhibitoren auf die HO-1 und Ferroportin-Expression und stellten eine Korrelation zwischen der Häm-induzierten HO-1- und Ferroportin-Expression fest [332]. Die zusätzliche Inkubation mit dem HO-1-Inhibitor Zinn-Mesoporphyrin führte zu einer Hemmung der Häm-induzierten Ferroportin-Expression, was auf eine modulierenden Funktion von HO-1 auf die Expression des Eisentransporter hinweist.

Chen *et al.* (2015) fanden in Meseangialzellen mit HO-1-Knockdown eine verminderte Ferritin-Expression und sprachen erstmals von einer HO-1-Ferritin-Achse, durch die HO-1 ihrer Meinung nach seinen zellulären Schutz vermittelt [333]. Die Autoren führten die HO-1-induzierte Ferritin-Expression auf die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie JunD zurück [333]. Auch in HepG2-Zellen wurde bereits gezeigt, dass dieser Transkriptionsfaktor der AP1-Familie als ARE Bindeprotein an die ARE-Sequenz binden und Ferritin induzieren kann [326].

JunD wäre somit auch ein Kandidat als Vermittler der im Rahmen dieser Arbeit gezeigten HO-1-induzierten Ferritin- und Ferroportin-Expression. Dessen Beteiligung müsste in weiteren Versuchen untersucht werden.

5.4 Weitere Möglichkeiten der Beeinflussung der Heparin-Expression

Der direkteste Weg, eine ACI zu verhindern, ist der, am Ursprung zu intervenieren, also die Heparin-Wirkung zu verhindern. Neutralisierende Antikörper wurden bereits bei Mäusen und Affen eingesetzt und konnten dort in den Eisenstoffwechsel intervenieren [334, 335]. Auch ein humaner Heparin-Antikörper, LY2787106, wurde in einer Phase 1 Studie intravenös Patienten mit Krebs und Anämie verabreicht (*ClinicalTrials.gov Identifier*: NCT01340976). Die Patienten vertrugen den Antikörper gut und es konnte eine leichte Eisenmobilisation und ein Anstieg der Retikulozyten festgestellt werden [296]. Ein weiterer Heparin-Antikörper, PRS-080, der spezifisch an Heparin bindet und seine Aktivität hemmt [296], wurde bereits in einer Phase 1 Studie an Gesunden getestet (*ClinicalTrials.gov Identifier*: NCT02340572). Seit Mai 2016 läuft inzwischen eine Studie an anämischen chronischen Nierenpatienten (*ClinicalTrials.gov Identifier*: NCT02754167). Dennoch kann der Einsatz von Biologicals mit Nebenwirkungen verbunden sein, weshalb der Einsatz von Antikörpern bei Anämie stark bedacht und nach Abwägen eingesetzt werden sollte.

15d-PGJ₂ kann aufgrund einer elektrophilen ungesättigten Carbonylgruppe im Zyklopentanring als Michael-Akzeptor wirken und dadurch mit kritischen zellulären Nucleophilen, wie Cysteingruppe von

Proteinen reagieren [259]. Viele biologische Effekte von 15d-PGJ₂ werden durch die Modulation der Aktivität von wesentlichen Redox-Transkriptionsfaktoren vermittelt. Zu diesen Faktoren gehören neben Nrf2 auch der Nuklear Faktor-kappaB (NF-κB), der Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF), sowie Aktivator-Protein 1 (AP-1) [259, 336]. Auch für DMF konnte gezeigt werden, dass das Fumarat zu einer Inhibierung des NF-κB-Signalweges führt [337], was ebenfalls für SFN nachgewiesen werden konnte [338]. Da NF-κB eine zentrale Rolle bei der Regulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort spielt und eine Dysregulation mit chronischen Entzündungen zusammenhängt, ist auch eine Beteiligung von NF-κB bei der Zytokin-vermittelten Hepcidin-Induktion denkbar.

Eine wahrscheinliche Beteiligung von NF-κB an der Induktion von Hepcidin liegt bei der LPS-induzierten Hepcidin-Expression vor. Grund dafür ist kein direkter Einfluss von NF-κB auf die Hepcidin-Expression, sondern vielmehr die Induktion der Expression von proinflammatorischen Zytokinen, die wiederum zu einer Induktion der Hepcidin-Expression führen können [289, 339], was durch die Inkubation mit DMF gehemmt werden kann [337].

Auch eine AP-1 Bindestelle im Hepcidin-Promotor wurde publiziert [127], die sich auch in dem hier verwendeten HepLuc-Konstrukt nachweisen lässt. Eine mögliche Rolle von AP-1 in der Hemmung der Zytokin-induzierten Hepcidin-Expression könnte untersucht werden, da die hier verwendeten Nrf2-induzierenden Substanzen wie SFN und 15d-PGJ₂ auch AP-1 inhibieren können [208]. Eine Beteiligung dieser AP-1-Bindestelle im Hepcidin-Promotor an einer Hepcidin-Inhibierung wurde kürzlich durch Kotta-Loizou *et al.* (2013) nachgewiesen [340]. Dabei führte das Hepatitis C-Virus (HCV) Coreprotein zu einer Inhibierung der Hepcidin-Expression, die durch die AP-1 Bindestelle im Hepcidin-Promotor vermittelt wurde [340]. Es konnte in einer anderen Studie außerdem gezeigt werden, dass HCV die Hepcidin-Expression durch eine Induktion von ROS und eine dadurch erhöhte Histondeacetylase (HDAC)-Aktivität hemmt [341]. Die Autoren postulierten, dass die erhöhte Histondeacetylierung zu einer verminderten Bindung der Transkriptionsfaktoren C/EBPα (*CCAAT/enhancer binding protein alpha*) und STAT3 am Hepcidin-Promotor führt, wodurch die Inhibierung der Hepcidin-Expression zustande kommt [341]. Ob diese Wirkmechanismen auf die hier vorliegende Arbeit zutreffen könnte, bleibt jedoch fraglich, da SFN als beschriebener HDAC-Inhibitor bekannt ist und damit vor allem im Bereich der Krebsinhibierung bekannt ist [342]. Auch für DMF konnte eine tendenzielle Inhibierung der HDACs festgestellt werden [343].

Dennoch beschrieben Miura *et al.* (2008) [341] eine inverse Beziehung zwischen der Hepcidin-Expression und der Menge an ROS, die durch den Einsatz der Antioxidantien N-Acetylcystein (NAC) und Pyrrolidone dithiocarbamate (PDTC) gezeigt werden konnte [341].

Auch im Rahmen der hier vorliegenden Doktorarbeit wurde NAC verwendet und es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit diesem Antioxidans ausreichend ist, um die Hepcidin mRNA-

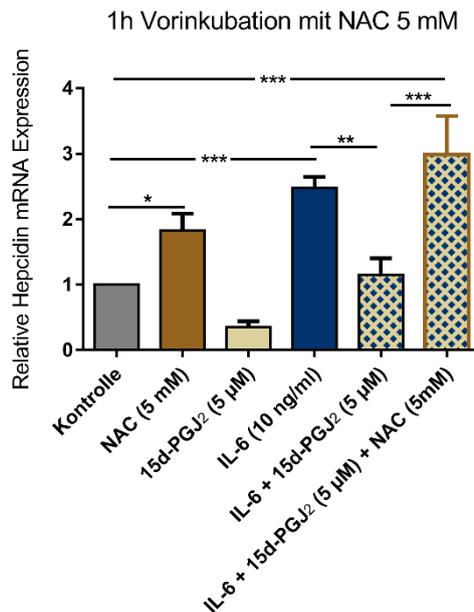


Abbildung 31: NAC hebt die 15d-PGJ₂-induzierte Hepcidin-Hemmung auf

HepG2-Zellen wurden mit IL-6 (10 ng/ml) und 15d-PGJ₂ (5 µM) sowie NAC (5 mM) alleine oder in der Kombination für 16h inkubiert, wobei NAC für 1h vorinkubiert wurde. Anschließend wurde die Hepcidin mRNA-Expression mittels qRT-PCR untersucht. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert+SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten (**p<0,001, **p<0,01, *p<0,05, ^{ns}p>0,05).

Expression signifikant zu induzieren (p<0,05) (Abbildung 31). Zudem konnte eine Vorinkubation von 15d-PGJ₂ mit NAC die Hepcidin-Inhibition des Prostaglandins aufheben. Erklärt werden kann diese Aufhebung zum einen dadurch, dass die Wirkung von 15d-PGJ₂ selbst durch NAC aufgehoben wird, oder zum anderen, dass der 15d-PGJ₂-induzierte oxidative Stress durch NAC abgeschwächt wird. Letzteres würde auf einen ROS-vermittelten Effekt der Hepcidin-Inhibierung durch 15d-PGJ₂ hindeuten und bedarf weiterer Untersuchungen, um den exakten Mechanismus der Hepcidin-Inhibierung aufzuklären.

5.5 Klinische Relevanz

Die Anämie der chronischen Erkrankung stellt die zweithöchste Prävalenz der Anämieformen dar und betrifft u.a. Patienten mit chronischen Entzündungen, was zu einer Verschlechterung der Morbidität und Mortalität und damit zu einer Einschränkung der Lebensqualität dieser Patienten beiträgt [344, 345, 194, 281]. Die zugrundeliegende Hepcidin-Induktion durch proinflammatorische Zytokine stellt dabei die Ursache der ACI dar. Die Therapie der inflammatorischen Grunderkrankungen in Kombination mit einer Korrektur der Anämie ist somit das Therapieziel.

DMF stellt sich gerade hierbei als ein äußerst interessantes Medikament heraus. Als Therapeutikum sind Fumarsäureester (FAEs), zu denen DMF als Hauptbestandteil zählt, bereits seit 1994 für die Behandlung von schwerer und etwas später auch von moderater Plaque Psoriasis als Fumaderm® zugelassen [251]. Die Langzeitbehandlung dieser Patienten mit DMF wurde als sicher eingestuft [346]. Die Wirkungen von DMF wurden in den letzten Jahrzehnten intensiv beforscht und es konnten viele immunmodulatorische und antioxidative Eigenschaften von DMF nachgewiesen werden [255, 347]. Durch diese Eigenschaften wurde DMF auch als effektives Therapeutikum für Multiple Sklerose entdeckt [253, 252] und seit 2014 als Tecfidera® für Patienten mit schubförmig remittierender Multipler Sklerose zugelassen. Daneben wird DMF auch als mögliche Therapie anderer Erkrankungen untersucht. Dazu laufen aktuelle Studien zur Behandlung von Patienten mit obstruktiver Schlafapnoe (*ClinicalTrial.gov Identifier: NCT02438137*) sowie zur Behandlung von Patienten mit refraktärer lymphatischen Leukämie (*ClinicalTrial.gov Identifier: NCT02784834*). Auch die Anwendung von DMF an Patienten mit Rheumatoider Arthritis als Kombination von DMF mit Methotrexat (NCT00810836) wurde bereits untersucht.

Interessanterweise zeigen neue Studien, dass DMF möglicherweise auch für die Behandlung von CED interessant werden könnte. In einem (DSS-) Colitis-Modell an Mäusen führte die orale Verabreichung von DMF zu einer Verbesserung der Colitis durch eine Verminderung des Gewichtsverlustes, der Kolonverkürzung und der pathologischen Schäden des Kolons [348]. Die Autoren führten diese Effekte auf die Induktion von Nrf2 und einer Inhibierung der NLRP3 Inflammasom-Aktivierung zurück [348], wobei letzteres ein zytosolischer Proteinkomplex ist, der maßgeblich an der Vermittlung der Inflammation durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine beteiligt ist [349]. Eine weitere Studie an (DNBS-) Colitis-Mäusen von Casili *et al.* (2016) zeigte ebenfalls die Wirksamkeit von DMF bei Colitis [350]. Die orale Administration von DMF führte auch bei diesem Colitis-Modell zu einer wesentlichen Verbesserung des Ausmaßes der Kolonentzündung und verminderte u.a. die TNF- α -Expression. Die Autoren führten die DMF-induzierte Verbesserung der Colitis durch weiterführende molekulare Studien an humanen Epithelzellen auf eine Hemmung des NF- κ B-Signalweges und eine weniger beeinträchtigte Barrierefunktion zurück [350]. Über diese Tiermodellstudien hinaus konnte in einer kleinen *off-label* Fallstudie an Crohn-Colitis-Patienten mit akut Steroid-refraktären Schüben, durchgeführt von Prof. Dr. Dr. Stein in Frankfurt, gezeigt werden, dass orale FAEs mit DMF als Hauptbestandteil bei drei von fünf Patienten zu einer Remission führte [351]. Darüber hinaus schlussfolgerten Wang *et al.* (2012) aus einer Studie, die die BMP-Hepcidin-Achse als therapeutisches Target bei CED untersuchten, dass eine Verminderung der Hepcidin-Spiegel im Tiermodell auch die intestinale Entzündung leicht vermindern kann [352]. Dabei zeigte sich bei Mäusen mit T-Zell-Transfer-Colitis durch die Verwendung von unterschiedlichen Hepcidin-Inhibitoren eine leichte Verbesserung der Entzündung [352].

Zusammengefasst zeigen diese Studien, dass DMF als potentielles neues Therapeutikum für die Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen infrage kommt. Aktuell steht jedoch die Bestätigung der Wirksamkeit in Humanstudien noch aus. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte die Hemmung der Entzündungs-bedingten Hecpidin-Expression sowie eine leichte Induktion des Eisentransporters Ferroportin durch DMF gezeigt werden. Damit bleibt festzuhalten: DMF könnte als Therapeutikum bei CED-Patienten nicht nur zu einer Induktion der Remission führen, sondern gleichzeitig zu einer Verbesserung der Anämie der chronischen Inflammation, die bei diesen Patienten mit einer hohen Prävalenz vorliegt, beitragen.

15d-PGJ₂ ist ein intrazellulär gebildetes cyclopentanisches Prostaglandin, das ein terminales Produkt des Cyclooxygenase-2 (COX-2) -Signalweges mit dem Anfangsprodukt Arachidonsäure ist [259]. Arachidonsäure selbst wird in tierischen Organismen aus der Omega-6-Fettsäure Linolsäure synthetisiert oder über die Nahrung aufgenommen. Durch den Metabolismus der Arachidonsäure entsteht eine Vielzahl an Lipidfaktoren. Davon wirken einige als proinflammatorische Lipidmediatoren und die Hochregulation dieser Faktoren wird mit einer Reihe an Krankheiten in Verbindung gebracht [353, 354]. Eine gezielte Beeinflussung des Metabolismus der Arachidonsäure hin zu der Bildung des als antiinflammatorisch beschriebenen cyclopentanischen Prostaglandins 15d-PGJ₂ ist fraglich. Deshalb ist die klinische Relevanz der im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Effekte offen.

Die vielfältigen Effekte, die von Sulforaphan ausgehen, haben auch diese Substanz ins Licht der klinischen Forschung gerückt. Eine Anzahl von 47 Studien ist bei *ClinicalTrial.gov* aufgeführt, die Sulforaphan als klinische Intervention bei einer Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen eingesetzt haben, angefangen bei unterschiedlichen Karzinomen, über gastrointestinale Erkrankungen, bis hin zu psychischen Erkrankungen wie Schizophrenie (Stand Dezember 2016). Viele Studien haben dabei Extrakt aus Brokkolisprossen als Nahrungsergänzung verwendet, weshalb bei diesen Interventionsarten geprüft werden muss, ob die Bioverfügbarkeit hoch genug ist, um Sulforaphan auch im Plasmaspiegel nachweisen zu können. In der Tat konnte in Studien an Gesunden nach dem Konsum von Brokkoliextrakt bereits nach weniger als einer Stunde eine Isothiozyanat-Konzentration im Plasma von etwa 1-2 µM festgestellt werden [355, 356]. Allerdings hängt die Bioverfügbarkeit auch von der Verarbeitung des Lebensmittels ab. So war die Bioverfügbarkeit von Sulforaphan bei frischem Brokkoli höher verglichen mit Tiefkühlbrokkoli [356].

Ob allerdings die Konzentrationen im Plasma ausreichend sind, um beobachtete *in vitro* Effekte auch *in vivo* zu induzieren, ist kontrovers. Ein systematischer Review veranschaulichte, dass Interventionsstudien mit SFN konsistente Ergebnisse bezüglich einer Verbesserung der klinischen Blutparameter für Glukose und Lipidprofil sowie für molekulare Parameter für oxidativen Stress zeigten, aber weniger gute Evidenz für eine Verbesserung von inflammatorischen Zuständen gezeigt

werden konnte [357]. Jedoch brachte die Intervention mit SFN an Tiermodellen mit Karzinomen vielversprechende Ergebnisse hervor, weshalb klinische Studien an Krebspatienten laufen und deren Ergebnisse abzuwarten sind [358].

Auf Grundlage dieser Daten bleibt ungewiss, ob eine Intervention mit SFN auch *in vivo* zu der im Rahmen dieser Doktorarbeit beobachteten Hemmung der Hepcidin-Expression und damit zu einer Verbesserung der Anämie beitragen kann. Dies müsste, nach Feststellen der richtigen Dosierung, in einer klinischen Studie an anämischen Patienten mit chronischer Inflammation untersucht werden. Da die Nebenwirkungen der Konsumierung von Brokkolisprossen oder Brokkoli generell überschaubar und hauptsächlich von Flatulenz gekennzeichnet sind [358], sollte im Falle eines Nicht-Ansprechens bezüglich der Korrektur der Anämie durch SFN-Einnahme zumindest keine negativen Effekte zu erwarten sein.

6. Zusammenfassung

Nach der Eisenmangelanämie stellt die Anämie der chronischen Entzündung, kurz ACE, die Anämieform mit der zweit höchsten Prävalenz dar. Anämie gehört bei Patienten mit chronischen Entzündungen, wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder Adipositas, zu einer der häufigsten extraintestinalen Manifestationen und führt zu einer beeinträchtigten Lebensqualität und erhöhten Hospitalisierungsrate dieser Patienten. Die Pathogenese der ACE wird durch erhöhte Serumspiegel von proinflammatorischen Zytokinen ausgelöst, zu denen vor allem das Interleukin-6 (IL-6), aber auch Oncostatin M (OSM) zählen. Diese induzieren in Leberzellen und zu einem geringeren Teil auch in Makrophagen, die Expression von Hecpidin, das heute als systemischer Eisenregulator bekannt ist. Hecpidin vermittelt seine Wirkung durch die Bindung an den bislang einzig bekannten Eisenregulator Ferroportin. Dadurch wird dieser internalisiert und degradiert, wodurch das Eisen in den Zellen verbleibt und dem Körper nicht mehr zur Verfügung steht. Dies führt somit zu einem funktionellen Eisenmangel und letztlich zu einer Anämie. Die Beeinflussung der Hecpidin-Ferroportin-Achse spielt deshalb bei der Therapie der ACE bei Patienten mit chronischen Entzündungen eine wesentliche Rolle.

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Substanzen zu finden, die in der Lage sind, durch eine verminderte Zytokin-induzierte Hecpidin-Expression und/oder eine erhöhte Ferroportin-Expression die Hecpidin-Ferroportin-Achse zu beeinflussen. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf den Transkriptionsfaktor Nrf2 gelegt. Die Aktivierung dieses Faktors stellt durch die nachfolgende Genaktivierung von Phase II-Proteinen den wohl wichtigsten Signalweg für die Abwehr von oxidativem Stress sowie Giftstoffen dar und trägt damit zum Zellschutz bei.

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Nrf2-Aktivatoren Dimethylfumarat (DMF), Sulforaphan und 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ Prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) in der Lage sind in HepG2-Leberkarzinomzellen der IL-6- bzw. OSM-induzierten Hecpidin-Expression auf Promotor- und mRNA-Ebene entgegenzuwirken. Dieser Effekt konnte für IL-6 auch auf Proteinebene gezeigt werden. Auch in Typ1 Makrophagen führte 15d-PGJ₂ auf mRNA-Ebene zu einer Hemmung der Hecpidin-Expression. Die Untersuchung dieses beobachteten Effekts zeigte, dass die Nrf2-Aktivatoren nicht zu einer veränderten Phosphorylierung des IL-6- und OSM-induzierten Transkriptionsfaktors STAT3 führten, der durch die Bindung an das STAT3 responsive Element im Hecpidin-Promotor die Hecpidin-Expression induziert. Somit wurde eine Hemmung des IL-6-STAT3-Signalweges durch DMF, SFN und 15d-PGJ₂ ausgeschlossen. Um zu überprüfen, inwiefern Nrf2 an der Vermittlung der Hecpidin-Hemmung durch die verwendeten Substanzen beteiligt ist, wurde Nrf2 überexprimiert sowie ein Nrf2-Knockdown durchgeführt. Es konnte dabei jedoch kein Einfluss von Nrf2 auf die Hemmung der Zytokin-induzierten Hecpidin-Expression durch die Nrf2-Aktivatoren festgestellt werden. Auch die Mutation der im Hecpidin-Promotor identifizierten möglichen Nrf2-Bindestelle, der sogenannten ARE-Sequenz,

führte nicht zu einer veränderten Heparin-Hemmung durch DMF, SFN und 15d-PGJ₂, weshalb der beobachtete Hemmeffekt unabhängig von Nrf2 auftritt.

Neben dem Einfluss auf die Heparin-Expression konnte auch eine Beeinflussung der Ferroportin-Expression durch die verwendeten Substanzen aufgezeigt werden. Alle drei Substanzen induzierten die Ferroportin-Expression auf mRNA-Ebene. Dieser Effekt war nicht nur abhängig von Nrf2, sondern auch von dessen Zielgen Hämoxigenase-1 (HO-1). Auch die mRNA-Expression des Eisenspeicherproteins Ferritin wurde durch DMF, SFN und 15d-PGJ₂ induziert und konnte durch den Knockdown von Nrf2 und HO-1 inhibiert werden.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die Substanzen DMF, SFN und 15d-PGJ₂ die Heparin-Ferroportin-Achse beeinflussen können, indem die Heparin-Expression Nrf2-unabhängig runter reguliert und die Ferroportin-Expression Nrf2/HO-1-abhängig induziert wird. Vor allem das für Psoriasis und Multiple Sklerose zugelassene Arzneimittel DMF könnte damit ein vielversprechendes Medikament zur Behandlung einer ACI darstellen. Darüber hinaus zeigen neue Studien an Mäusen, dass DMF effektiv bei der Behandlung von Colitis bei Mäusen ist, weshalb der Einsatz von DMF bei Patienten mit CED und Anämie durch weitere Studien untersucht werden sollte.

7. Summary

Anemia is one of the most common extraintestinal manifestations of chronic inflammatory conditions including inflammatory bowel disease and obesity. The detrimental effects of anemia on patient quality of life and hospitalization rates are well documented. After iron deficiency, chronic inflammation is the second most prevalent etiology of anemia in these patients (anemia of chronic inflammation, ACI). The pathogenesis of ACI is triggered by raised serum levels of proinflammatory cytokines, particularly interleukin-6 (IL-6) and oncostatin M (OSM), which induce the expression of hepcidin in the liver cells and, to a lesser extent, in the macrophages. Hepcidin is known to play a role in systemic iron regulation by binding to the only currently known iron transporter, ferroportin. As a result, ferroportin is internalized and degraded, trapping iron in the cells and reducing its availability in the body, and thus causing functional iron deficiency and, ultimately, anemia. Manipulation of the hepcidin-ferroportin axis is therefore a promising therapeutic target for the treatment of ACI in patients with chronic inflammatory disease.

The aim of this research was to identify substances capable of influencing the hepcidin-ferroportin axis, either by diminishing cytokine-induced hepcidin expression, or by upregulating the expression of ferroportin. The transcription factor Nrf2 was hereby a particular focus of attention: The genetic transcription of phase-II proteins via Nrf2 activation probably represents the most important signaling pathway for the body's immune response to oxidative stress and toxins. Nrf2 thus plays an essential role in cell protection.

In this research project, three Nrf2 activators, dimethyl fumarate (DMF), sulforaphane (SFN) and 15-Deoxy- Δ 12,14 Prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) were shown to counteract IL-6 or OSM-induced hepcidin expression at promoter and mRNA level in HepG2 liver carcinoma cells. This effect was also shown for IL-6 on protein level. In addition, 15d-PGJ₂ had a suppressive effect on hepcidin expression in type 1 macrophages at mRNA level. Further experiments showed the phosphorylation of the IL-6 and OSM-induced transcription factor STAT3, which stimulates hepcidin expression by binding to the STAT3 responsive element of the hepcidin promoter, to be unaffected by DMF, SFN and 15d-PGJ₂, thus ruling out a possible inhibition of the IL-6-STAT3 signaling pathway by the Nrf2 promoters.

Nrf2 hyperexpression and Nrf2 knockdown were used to investigate possible effects of Nrf2 on cytokine-induced hepcidin downregulation triggered by the tested substances. However, hepcidin expression was found to be independent of Nrf2 in these models. Similarly, hepcidin downregulation by DMF, SFN und 15d-PGJ₂ was shown to be unaffected by a mutation brought about in the Nrf2 binding site in the hepcidin promoter, the so-called ARE sequence.

Besides affecting hepcidin levels, the tested substances were demonstrated to influence the expression of the iron transporter ferroportin, with all three substances causing the induction of

ferroportin on mRNA level. This effect was dependent not only on Nrf2, but also on its target gene, hemoxygenase-1 (HO-1). Furthermore, mRNA expression of the iron storage protein, ferritin, was induced by DMF, SFN and 15d.PGJ₂ and, conversely, inhibited in Nrf2 and HO-1 knockdown models.

Taken together, these data show that DMF, SFN and 15d-PGJ₂ are capable of influencing the hepcidin-ferroportin axis via Nrf2-independent downregulation of hepcidin and concurrent Nrf2/HO-1-dependent induction of ferroportin. In particular, DMF, which has already gained approval for the treatment of psoriasis and multiple sclerosis, seems a promising therapeutic option in patients with ACI. Moreover, DMF has been shown to be an effective treatment for colitis in mouse models, suggesting the need for further studies to investigate its therapeutic potential in patients with inflammatory bowel disease and anemia.

8. Literaturverzeichnis

1. Roche B, Aussel L, Ezraty B, Mandin P, Py B, Barras F (2013) Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: formation, regulation and diversity. *Biochimica et biophysica acta* 1827(3): 455–469. DOI:10.1016/j.bbabi.2012.12.010
2. Gunsalus IC, Sligar SG, Nordlund T, Frauenfelder H (1977) Oxygen Sensing Heme Proteins: Monooxygenases, Myoglobin and Hemoglobin. In: Reivich M, Coburn R, Lahiri S, Chance B (eds) *Tissue Hypoxia and Ischemia*, vol 78. Springer US, Boston, MA, pp 37–50
3. White MF, Dillingham MS (2012) Iron-sulphur clusters in nucleic acid processing enzymes. *Current opinion in structural biology* 22(1): 94–100. DOI:10.1016/j.sbi.2011.11.004
4. Ganz T, Nemeth E (2006) Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. *Biochimica et biophysica acta* 1763(7): 690–699. DOI:10.1016/j.bbamcr.2006.03.014
5. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*(219): 1–14
6. Gammella E, Recalcati S, Cairo G (2016) Dual Role of ROS as Signal and Stress Agents: Iron Tips the Balance in favor of Toxic Effects. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016: 8629024. DOI:10.1155/2016/8629024
7. Valko M, Morris H, Cronin M (2005) Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *CMC* 12(10): 1161–1208. DOI:10.2174/0929867053764635
8. Moura IC, Hermine O, Lacombe C, Mayeux P (2015) Erythropoiesis and transferrin receptors. *Current opinion in hematology* 22(3): 193–198. DOI:10.1097/MOH.0000000000000133
9. Hurrell R, Egli I (2010) Iron bioavailability and dietary reference values. *The American journal of clinical nutrition* 91(5): 1461S. DOI:10.3945/ajcn.2010.28674F
10. Ganz T, Nemeth E (2015) Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nature reviews. Immunology* 15(8): 500–510. DOI:10.1038/nri3863
11. Evstatiev R, Gasche C (2012) Iron sensing and signalling. *Gut* 61(6): 933–952. DOI:10.1136/gut.2010.214312
12. Bogdan AR, Miyazawa M, Hashimoto K, Tsuji Y (2016) Regulators of Iron Homeostasis: New Players in Metabolism, Cell Death, and Disease. *Trends in biochemical sciences* 41(3): 274–286. DOI:10.1016/j.tibs.2015.11.012
13. Andrews NC (2000) Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nature reviews. Genetics* 1(3): 208–217. DOI:10.1038/35042073
14. Yun S, Vincelette ND (2015) Update on iron metabolism and molecular perspective of common genetic and acquired disorder, hemochromatosis. *Critical reviews in oncology/hematology* 95(1): 12–25. DOI:10.1016/j.critrevonc.2015.02.006
15. Stein J, Hartmann F, Dignass AU (2010) Diagnosis and management of iron deficiency anemia in patients with IBD. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 7(11): 599–610. DOI:10.1038/nrgastro.2010.151
16. Zhang A, Enns CA (2009) Iron homeostasis: recently identified proteins provide insight into novel control mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 284(2): 711–715. DOI:10.1074/jbc.R800017200
17. Tandara L. SI (2012) Iron metabolism- current facts and future directions. *Biochimica Medica*(22(3)): 311–328
18. Frazer DM, Anderson GJ (2005) Iron imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 289(4): G631-5. DOI:10.1152/ajpgi.00220.2005
19. Carpenter CE, Mahoney AW (1992) Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. *Critical reviews in food science and nutrition* 31(4): 333–367. DOI:10.1080/10408399209527576
20. Hunt JR (2002) Moving toward a Plant-based Diet. Are Iron and Zinc at Risk? *Nutrition Reviews* 60(5): 127–134. DOI:10.1301/00296640260093788

21. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, Mudaly M, Richardson C, Barlow D, Bomford A et al. (2001) An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science (New York, N.Y.)* 291(5509): 1755–1759. DOI:10.1126/science.1057206
22. Schade SG, Cohen RJ, Conrad ME (1968) Effect of hydrochloric acid on iron absorption. *The New England journal of medicine* 279(13): 672–674. DOI:10.1056/NEJM196809262791302
23. McColl KEL (2009) Effect of proton pump inhibitors on vitamins and iron. *The American journal of gastroenterology* 104 Suppl 2: S5-9. DOI:10.1038/ajg.2009.45
24. Banonne-Hergaux F., Gruenheid S., Ponka PI, and Gros P. (1999) Cellular and Subcellular Localization of the Nramp2 Iron Transporter in the Intestinal Brush Border and Regulation by Dietary Iron. *Blood*(93(12)): 4406–4417
25. Latunde-Dada GO, Takeuchi K, Simpson RJ, McKie AT (2006) Haem carrier protein 1 (HCP1): Expression and functional studies in cultured cells. *FEBS letters* 580(30): 6865–6870. DOI:10.1016/j.febslet.2006.11.048
26. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC et al. (2005) Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 122(5): 789–801. DOI:10.1016/j.cell.2005.06.025
27. Ryter SW, Choi AMK (2016) Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 167(1): 7–34. DOI:10.1016/j.trsl.2015.06.011
28. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J (2004) Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science (New York, N.Y.)* 306(5704): 2090–2093. DOI:10.1126/science.1104742
29. McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F et al. (2000) A Novel Duodenal Iron-Regulated Transporter, IREG1, Implicated in the Basolateral Transfer of Iron to the Circulation. *Molecular Cell* 5(2): 299–309. DOI:10.1016/S1097-2765(00)80425-6
30. Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, Andrews NC (2005) The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell metabolism* 1(3): 191–200. DOI:10.1016/j.cmet.2005.01.003
31. Tandara L, Salamunic I. (2012) Iron metabolism- current facts and future directions. *Biochemia Medica*(22(3)): 311–328
32. Gomme PT, McCann KB, Bertolini J (2005) Transferrin. Structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discovery Today* 10(4): 267–273. DOI:10.1016/S1359-6446(04)03333-1
33. Wally J, Halbrooks PJ, Vonrhein C, Rould MA, Everse SJ, Mason AB, Buchanan SK (2006) The crystal structure of iron-free human serum transferrin provides insight into inter-lobe communication and receptor binding. *The Journal of biological chemistry* 281(34): 24934–24944. DOI:10.1074/jbc.M604592200
34. Cheng Y, Zak O, Aisen P, Harrison SC, Walz T (2004) Structure of the Human Transferrin Receptor-Transferrin Complex. *Cell* 116(4): 565–576. DOI:10.1016/S0092-8674(04)00130-8
35. Cheng Y, Zak O, Aisen P, Harrison SC, Walz T (2005) Single particle reconstruction of the human apo-transferrin-transferrin receptor complex. *Journal of structural biology* 152(3): 204–210. DOI:10.1016/j.jsb.2005.10.006
36. Graversen JH, Madsen M, Moestrup SK (2002) CD163. A signal receptor scavenging haptoglobin–hemoglobin complexes from plasma. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34(4): 309–314. DOI:10.1016/S1357-2725(01)00144-3
37. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK (2001) Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409(6817): 198–201. DOI:10.1038/35051594
38. Gottlieb Y, Topaz O, Cohen LA, Yakov LD, Haber T, Morgenstern A, Weiss A, Chait Berman K, Fibach E, Meyron-Holtz EG (2012) Physiologically aged red blood cells undergo

- erythrophagocytosis in vivo but not in vitro. *Haematologica* 97(7): 994–1002.
DOI:10.3324/haematol.2011.057620
39. Bratosin D, Mazurier J, Tissier JP, Estaquier J, Huart JJ, Ameisen JC, Aminoff D, Montreuil J (1998) Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie* 80(2): 173–195. DOI:10.1016/S0300-9084(98)80024-2
 40. Ma Y, Yeh M, Yeh K, Glass J (2006) Iron Imports. V. Transport of iron through the intestinal epithelium. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 290(3): G417–22. DOI:10.1152/ajpgi.00489.2005
 41. Shi H, Bencze KZ, Stemmler TL, Philpott CC (2008) A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science (New York, N.Y.)* 320(5880): 1207–1210. DOI:10.1126/science.1157643
 42. Sheftel AD, Zhang A, Brown C, Shirihi OS, Ponka P (2007) Direct interorganellar transfer of iron from endosome to mitochondrion. *Blood* 110(1): 125–132. DOI:10.1182/blood-2007-01-068148
 43. Shaw GC, Cope JJ, Li L, Corson K, Hersey C, Ackermann GE, Gwynn B, Lambert AJ, Wingert RA, Traver D et al. (2006) Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature* 440(7080): 96–100. DOI:10.1038/nature04512
 44. Torti FM (2002) Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 99(10): 3505–3516. DOI:10.1182/blood.V99.10.3505
 45. Lawson DM, Treffry A, Artymiuk PJ, Harrison PM, Yewdall SJ, Luzzago A, Cesareni G, Levi S, Arosio P (1989) Identification of the ferroxidase centre in ferritin. *FEBS letters* 254(1-2): 207–210. DOI:10.1016/0014-5793(89)81040-3
 46. Theil EC, Matzapetakis M, Liu X (2006) Ferritins: iron/oxygen biominerals in protein nanocages. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 11(7): 803–810. DOI:10.1007/s00775-006-0125-6
 47. Hintze KJ, Theil EC (2006) Cellular regulation and molecular interactions of the ferritins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63(5): 591–600. DOI:10.1007/s00018-005-5285-y
 48. Wang W, Knovich MA, Coffman LG, Torti FM, Torti SV (2010) Serum ferritin: Past, present and future. *Biochimica et biophysica acta* 1800(8): 760–769. DOI:10.1016/j.bbagen.2010.03.011
 49. Sibille J, Kondo H, Aisen P (1988) Interactions between isolated hepatocytes and kupffer cells in iron metabolism. A possible role for ferritin as an iron carrier protein. *Hepatology* 8(2): 296–301. DOI:10.1002/hep.1840080218
 50. Fisher J, Devraj K, Ingram J, Slagle-Webb B, Madhankumar AB, Liu X, Klinger M, Simpson IA, Connor JR (2007) Ferritin: a novel mechanism for delivery of iron to the brain and other organs. *American journal of physiology. Cell physiology* 293(2): C641-9. DOI:10.1152/ajpcell.00599.2006
 51. Knovich MA, Storey JA, Coffman LG, Torti SV, Torti FM (2009) Ferritin for the clinician. *Blood reviews* 23(3): 95–104. DOI:10.1016/j.blre.2008.08.001
 52. Bartels U, Pedersen NS, Jarnum S (1978) Iron Absorption and Serum Ferritin in Chronic Inflammatory Bowel Disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 13(13): 649–656. DOI:10.3109/00365527809181777
 53. Hansen TM, Hansen NE, Birgens HS, Helund B, Lorenzen I (1983) Serum Ferritin and the Assessment of Iron Deficiency in Rheumatoid Arthritis. *Scand. J. of Rheumatology* 12(4): 353–359. DOI:10.3109/03009748309099740
 54. Ward RJ, Legssyer R, Henry C, Crichton RR (2000) Does the haemosiderin iron core determine its potential for chelation and the development of iron-induced tissue damage? *Journal of Inorganic Biochemistry* 79(1-4): 311–317. DOI:10.1016/S0162-0134(99)00237-8
 55. Drakesmith H, Nemeth E, Ganz T (2015) Ironing out Ferroportin. *Cell metabolism* 22(5): 777–787. DOI:10.1016/j.cmet.2015.09.006
 56. Harada N, Kanayama M, Maruyama A, Yoshida A, Tazumi K, Hosoya T, Mimura J, Toki T, Maher JM, Yamamoto M et al. (2011) Nrf2 regulates ferroportin 1-mediated iron efflux and counteracts lipopolysaccharide-induced ferroportin 1 mRNA suppression in macrophages. *Archives of biochemistry and biophysics* 508(1): 101–109. DOI:10.1016/j.abb.2011.02.001

57. Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J, Anderson GJ (1999) Hephhaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nature genetics* 21(2): 195–199. DOI:10.1038/5979
58. Roeser HP, Lee GR, Nacht S, Cartwright GE (1970) The role of ceruloplasmin in iron metabolism. *The Journal of clinical investigation* 49(12): 2408–2417. DOI:10.1172/JCI106460
59. Neale F.C. (1955) THE DEMONSTRATION OF THE IRON-BINDING GLOBULIN (TRANSFERRIN) IN SERUM AND URINE PROTEINS BY USE OF 59FE COMBINED WITH PAPER ELECTROPHORESIS. *J. Clin. Path.*(8): 334–337
60. Aisen P., Leibman A., and Zweier J (1978) Stoichiometric and Site Characteristics of the Binding of Iron to Human Transferrin. *The Journal of biological chemistry*(253(6)): 1930–1937
61. Young S, Bomford A (1984) Transferrin and Cellular Iron Exchange. *Clin. Sci.* 67(3): 273–278. DOI:10.1042/cs0670273
62. Luck AN, Mason AB (2012) Transferrin-mediated cellular iron delivery. *Current topics in membranes* 69: 3–35. DOI:10.1016/B978-0-12-394390-3.00001-X
63. Hentze M.W., Muckenthaler M.U., and Andrews N.C. (2004) Balancing Acts: Molecular Control of Mammalian Iron Metabolism. *Cell*(117): 285–297. DOI:10.1016/S0968-0004(05)00043-5
64. Muckenthaler MU, Galy B, Hentze MW (2008) Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annual review of nutrition* 28: 197–213. DOI:10.1146/annurev.nutr.28.061807.155521
65. Casey J, Hentze M, Koeller D, Caughman S, Rouault T, Klausner R, Harford J (1988) Iron-responsive elements. Regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. *Science* 240(4854): 924–928. DOI:10.1126/science.2452485
66. Leibold E. and Munro N. (1988) Iron-Responsive Elements- Regulatory RNA sequences that control mRNA levels and Translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(85): 2171–2175
67. Müllner EW, Kühn LC (1988) A stem-loop in the 3' untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm. *Cell* 53(5): 815–825. DOI:10.1016/0092-8674(88)90098-0
68. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T (2001) Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *The Journal of biological chemistry* 276(11): 7806–7810. DOI:10.1074/jbc.M008922200
69. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loreal O (2001) A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *The Journal of biological chemistry* 276(11): 7811–7819. DOI:10.1074/jbc.M008923200
70. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, Vaulont S (2001) Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(15): 8780–8785. DOI:10.1073/pnas.151179498
71. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, Sirito M, Sawadogo M, Kahn A, Vaulont S (2002) Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(7): 4596–4601. DOI:10.1073/pnas.072632499
72. Rivera S, Nemeth E, Gabayan V, Lopez MA, Farshidi D, Ganz T (2005) Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferrremia and is concentrated in ferroportin-containing organs. *Blood* 106(6): 2196–2199. DOI:10.1182/blood-2005-04-1766
73. Valore EV, Ganz T (2008) Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood cells, molecules & diseases* 40(1): 132–138. DOI:10.1016/j.bcmd.2007.07.009
74. Hunter HN, Fulton DB, Ganz T, Vogel HJ (2002) The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *The Journal of biological chemistry* 277(40): 37597–37603. DOI:10.1074/jbc.M205305200

75. Campostrini N, Traglia M, Martinelli N, Corbella M, Cocca M, Manna D, Castagna A, Masciullo C, Silvestri L, Olivieri O et al. (2012) Serum levels of the hepcidin-20 isoform in a large general population: the Val Borbera study. *Journal of proteomics* 76 Spec No: 28–35. DOI:10.1016/j.jprot.2012.08.006
76. Laarakkers CMM, Wiegerinck ET, Klaver S, Kolodziejczyk M, Gille H, Hohlbaum AM, Tjalsma H, Swinkels DW (2013) Improved mass spectrometry assay for plasma hepcidin: detection and characterization of a novel hepcidin isoform. *PLoS one* 8(10): e75518. DOI:10.1371/journal.pone.0075518
77. Moe MK, Hardang IM, Hagve T (2013) Novel circulating isoforms of hepcidin. *Clinical chemistry* 59(9): 1412–1414. DOI:10.1373/clinchem.2013.208371
78. Peslova G, Petrak J, Kuzelova K, Hrdy I, Halada P, Kuchel PW, Soe-Lin S, Ponka P, Sutak R, Becker E et al. (2009) Hepcidin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to alpha-2-macroglobulin in blood. *Blood* 113(24): 6225–6236. DOI:10.1182/blood-2009-01-201590
79. Itkonen O, Stenman U, Parkkinen J, Soliymani R, Baumann M, Hamalainen E (2012) Binding of hepcidin to plasma proteins. *Clinical chemistry* 58(7): 1158–1160. DOI:10.1373/clinchem.2012.186916
80. Kemna EHJM, Tjalsma H, Podust VN, Swinkels DW (2007) Mass spectrometry-based hepcidin measurements in serum and urine: analytical aspects and clinical implications. *Clinical chemistry* 53(4): 620–628. DOI:10.1373/clinchem.2006.079186
81. Peters HPE, Laarakkers CMM, Pickkers P, Masereeuw R, Boerman OC, Eek A, Cornelissen EAM, Swinkels DW, Wetzels JFM (2013) Tubular reabsorption and local production of urine hepcidin-25. *BMC nephrology* 14: 70. DOI:10.1186/1471-2369-14-70
82. Qiao B, Sugianto P, Fung E, Del-Castillo-Rueda A, Moran-Jimenez M, Ganz T, Nemeth E (2012) Hepcidin-induced endocytosis of ferroportin is dependent on ferroportin ubiquitination. *Cell metabolism* 15(6): 918–924. DOI:10.1016/j.cmet.2012.03.018
83. Kemna, Erwin H J M, Tjalsma H, Willems HL, Swinkels DW (2008) Hepcidin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica* 93(1): 90–97. DOI:10.3324/haematol.11705
84. Lin L, Valore EV, Nemeth E, Goodnough JB, Gabayan V, Ganz T (2007) Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. *Blood* 110(6): 2182–2189. DOI:10.1182/blood-2007-04-087593
85. Schmidt PJ, Toran PT, Giannetti AM, Bjorkman PJ, Andrews NC (2008) The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell metabolism* 7(3): 205–214. DOI:10.1016/j.cmet.2007.11.016
86. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T (2004) IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *The Journal of clinical investigation* 113(9): 1271–1276. DOI:10.1172/JCI20945
87. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S (2002) The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *The Journal of clinical investigation* 110(7): 1037–1044. DOI:10.1172/JCI15686
88. Vokurka M., Krijt J., Sulc K., Necas E. (2006) Hepcidin mRNA Levels in Mouse Liver Respond to Inhibition of Erythropoiesis. *Physiol. Res.*(55): 667–674
89. Silva B, Faustino P (2015) An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochimica et biophysica acta* 1852(7): 1347–1359. DOI:10.1016/j.bbadis.2015.03.011
90. Xia Y, Babitt JL, Sidis Y, Chung RT, Lin HY (2008) Hemojuvelin regulates hepcidin expression via a selective subset of BMP ligands and receptors independently of neogenin. *Blood* 111(10): 5195–5204. DOI:10.1182/blood-2007-09-111567
91. Camaschella C (2009) BMP6 orchestrates iron metabolism. *Nat Genet* 41(4): 386–388. DOI:10.1038/ng0409-386

92. Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, Campagna JA, Chung RT, Schneyer AL, Woolf CJ et al. (2006) Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nature genetics* 38(5): 531–539. DOI:10.1038/ng1777
93. Zhang A, Gao J, Koeberl DD, Enns CA (2010) The role of hepatocyte hemojuvelin in the regulation of bone morphogenetic protein-6 and hepcidin expression in vivo. *The Journal of biological chemistry* 285(22): 16416–16423. DOI:10.1074/jbc.M110.109488
94. Truksa J, Lee P, Beutler E (2009) Two BMP responsive elements, STAT, and bZIP/HNF4/COUP motifs of the hepcidin promoter are critical for BMP, SMAD1, and HJV responsiveness. *Blood* 113(3): 688–695. DOI:10.1182/blood-2008-05-160184
95. Casanovas G, Mleczko-Sanecka K, Altamura S, Hentze MW, Muckenthaler MU (2009) Bone morphogenetic protein (BMP)-responsive elements located in the proximal and distal hepcidin promoter are critical for its response to HJV/BMP/SMAD. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 87(5): 471–480. DOI:10.1007/s00109-009-0447-2
96. Core AB, Canali S, Babitt JL (2014) Hemojuvelin and bone morphogenetic protein (BMP) signaling in iron homeostasis. *Frontiers in pharmacology* 5: 104. DOI:10.3389/fphar.2014.00104
97. Ramos E, Kautz L, Rodriguez R, Hansen M, Gabayan V, Ginzburg Y, Roth M, Nemeth E, Ganz T (2011) Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 53(4): 1333–1341. DOI:10.1002/hep.24178
98. Corradini E, Meynard D, Wu Q, Chen S, Ventura P, Pietrangelo A, Babitt JL (2011) Serum and liver iron differently regulate the bone morphogenetic protein 6 (BMP6)-SMAD signaling pathway in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 54(1): 273–284. DOI:10.1002/hep.24359
99. Kautz L, Meynard D, Monnier A, Darnaud V, Bouvet R, Wang R, Deng C, Vulont S, Mosser J, Coppin H et al. (2008) Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood* 112(4): 1503–1509. DOI:10.1182/blood-2008-03-143354
100. Canali S, Zumbrennen-Bullough KB, Core AB, Wang C, Nairz M, Bouley R, Swirski FK, Babitt JL (2016) Endothelial cells produce bone morphogenetic protein 6 required for iron homeostasis in mice. *Blood*. DOI:10.1182/blood-2016-06-721571
101. Wallace DF, Summerville L, Subramaniam VN (2007) Targeted disruption of the hepatic transferrin receptor 2 gene in mice leads to iron overload. *Gastroenterology* 132(1): 301–310. DOI:10.1053/j.gastro.2006.11.028
102. Vujic Spasic M, Kiss J, Herrmann T, Galy B, Martinache S, Stolte J, Grone H, Stremmel W, Hentze MW, Muckenthaler MU (2008) Hfe acts in hepatocytes to prevent hemochromatosis. *Cell metabolism* 7(2): 173–178. DOI:10.1016/j.cmet.2007.11.014
103. Gao J, Chen J, Kramer M, Tsukamoto H, Zhang A, Enns CA (2009) Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell metabolism* 9(3): 217–227. DOI:10.1016/j.cmet.2009.01.010
104. Poli M, Lusciati S, Gandini V, Maccarinelli F, Finazzi D, Silvestri L, Roetto A, Arosio P (2010) Transferrin receptor 2 and HFE regulate furin expression via mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/Erk) signaling. Implications for transferrin-dependent hepcidin regulation. *Haematologica* 95(11): 1832–1840. DOI:10.3324/haematol.2010.027003
105. Ramey G, Deschemin J, Vulont S (2009) 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(6): 765–772. DOI:10.3324/haematol.2008.003541
106. Silvestri L, Pagani A, Camaschella C (2008) Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. *Blood* 111(2): 924–931. DOI:10.1182/blood-2007-07-100677

107. Mleczko-Sanecka K, Casanovas G, Ragab A, Bretkopf K, Muller A, Boutros M, Dooley S, Hentze MW, Muckenthaler MU (2010) SMAD7 controls iron metabolism as a potent inhibitor of hepcidin expression. *Blood* 115(13): 2657–2665. DOI:10.1182/blood-2009-09-238105
108. Silvestri L, Pagani A, Nai A, Domenico I de, Kaplan J, Camaschella C (2008) The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell metabolism* 8(6): 502–511. DOI:10.1016/j.cmet.2008.09.012
109. Du X, She E, Gelbart T, Truksa J, Lee P, Xia Y, Khovananth K, Mudd S, Mann N, Moresco EMY et al. (2008) The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. *Science (New York, N.Y.)* 320(5879): 1088–1092. DOI:10.1126/science.1157121
110. Beutler E, van Geet C, te Loo DMWM, Gelbart T, Crain K, Truksa J, Lee PL (2010) Polymorphisms and mutations of human TMPRSS6 in iron deficiency anemia. *Blood cells, molecules & diseases* 44(1): 16–21. DOI:10.1016/j.bcmd.2009.09.001
111. Finberg KE, Heeney MM, Campagna DR, Aydinok Y, Pearson HA, Hartman KR, Mayo MM, Samuel SM, Strouse JJ, Markianos K et al. (2008) Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nature genetics* 40(5): 569–571. DOI:10.1038/ng.130
112. Silvestri L, Guillem F, Pagani A, Nai A, Oudin C, Silva M, Toutain F, Kannengiesser C, Beaumont C, Camaschella C et al. (2009) Molecular mechanisms of the defective hepcidin inhibition in TMPRSS6 mutations associated with iron-refractory iron deficiency anemia. *Blood* 113(22): 5605–5608. DOI:10.1182/blood-2008-12-195594
113. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T (2003) Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 101(7): 2461–2463. DOI:10.1182/blood-2002-10-3235
114. Schmidt PJ (2015) Regulation of Iron Metabolism by Hepcidin under Conditions of Inflammation. *The Journal of biological chemistry* 290(31): 18975–18983. DOI:10.1074/jbc.R115.650150
115. Ganz T., Olbina G., Girelli D., Nemeth E., and Westerman M. (2008) Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood*(112): 4292–4297
116. Ganz T (2006) Molecular pathogenesis of anemia of chronic disease. *Pediatric blood & cancer* 46(5): 554–557. DOI:10.1002/pbc.20656
117. Semrin G, Fishman DS, Bousvaros A, Zholudev A, Saunders AC, Correia CE, Nemeth E, Grand RJ, Weinstein DA (2006) Impaired intestinal iron absorption in Crohn's disease correlates with disease activity and markers of inflammation. *Inflammatory bowel diseases* 12(12): 1101–1106. DOI:10.1097/01.mib.0000235097.86360.04
118. Sharma S, Nemeth E, Chen Y, Goodnough J, Huston A, Roodman GD, Ganz T, Lichtenstein A (2008) Involvement of hepcidin in the anemia of multiple myeloma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14(11): 3262–3267. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-4153
119. D'Angelo G (2013) Role of hepcidin in the pathophysiology and diagnosis of anemia. *Blood research* 48(1): 10–15. DOI:10.5045/br.2013.48.1.10
120. Lee P, Peng H, Gelbart T, Beutler E (2004) The IL-6- and lipopolysaccharide-induced transcription of hepcidin in HFE-, transferrin receptor 2-, and beta 2-microglobulin-deficient hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(25): 9263–9265. DOI:10.1073/pnas.0403108101
121. Kemna E, Pickkers P, Nemeth E, van der Hoeven H, Swinkels D (2005) Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. *Blood* 106(5): 1864–1866. DOI:10.1182/blood-2005-03-1159
122. Stahl N, Farruggella T, Boulton T, Zhong Z, Darnell J, Yancopoulos G (1995) Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 267(5202): 1349–1353. DOI:10.1126/science.7871433
123. Nakajima K., Yamanaka Y., Nakae K., Kojima H., Ichiba M., Kiuchi N., Kitaoka T., Fukada T., Hibi M., and Hirano T. (1996) A central role for Stat3 in IL-6-induced regulation of growth and differentiation in M1 leukemia cells. *The EMBO Journal*(15 (14)): 3651–3658

124. Fukada T, Hibi M, Yamanaka Y, Takahashi-Tezuka M, Fujitani Y, Yamaguchi T, Nakajima K, Hirano T (1996) Two Signals Are Necessary for Cell Proliferation Induced by a Cytokine Receptor gp130. Involvement of STAT3 in Anti-Apoptosis. *Immunity* 5(5): 449–460. DOI:10.1016/S1074-7613(00)80501-4
125. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal* 374(Pt 1): 1–20. DOI:10.1042/BJ20030407
126. Pietrangelo A, Dierssen U, Valli L, Garuti C, Rump A, Corradini E, Ernst M, Klein C, Trautwein C (2007) STAT3 is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepcidin in vivo. *Gastroenterology* 132(1): 294–300. DOI:10.1053/j.gastro.2006.10.018
127. Verga Falzacappa MV, Vujic Spasic M, Kessler R, Stolte J, Hentze MW, Muckenthaler MU (2007) STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood* 109(1): 353–358. DOI:10.1182/blood-2006-07-033969
128. Wrighting DM, Andrews NC (2006) Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* 108(9): 3204–3209. DOI:10.1182/blood-2006-06-027631
129. Sakamori R, Takehara T, Tatsumi T, Shigekawa M, Hikita H, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N (2010) STAT3 signaling within hepatocytes is required for anemia of inflammation in vivo. *Journal of gastroenterology* 45(2): 244–248. DOI:10.1007/s00535-009-0159-y
130. Lee P, Peng H, Gelbart T, Wang L, Beutler E (2005) Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(6): 1906–1910. DOI:10.1073/pnas.0409808102
131. Armitage AE, Eddowes LA, Gileadi U, Cole S, Spottiswoode N, Selvakumar TA, Ho L, Townsend ARM, Drakesmith H (2011) Hepcidin regulation by innate immune and infectious stimuli. *Blood* 118(15): 4129–4139. DOI:10.1182/blood-2011-04-351957
132. Chung B, Verdier F, Matak P, Deschemin J, Mayeux P, Vaulont S (2010) Oncostatin M is a potent inducer of hepcidin, the iron regulatory hormone. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24(6): 2093–2103. DOI:10.1096/fj.09-152561
133. Ryan JD, Altamura S, Devitt E, Mullins S, Lawless MW, Muckenthaler MU, Crowe J (2012) Pegylated interferon-alpha induced hypoferrremia is associated with the immediate response to treatment in hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 56(2): 492–500. DOI:10.1002/hep.25666
134. Chen S, Feng T, Vujic Spasic M, Altamura S, Breitkopf-Heinlein K, Altenoder J, Weiss TS, Dooley S, Muckenthaler MU (2016) Transforming Growth Factor beta1 (TGF-beta1) Activates Hepcidin mRNA Expression in Hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* 291(25): 13160–13174. DOI:10.1074/jbc.M115.691543
135. Qian Z, He X, Liang T, Wu K, Yan Y, Lu L, Yang G, Luo QQ, Yung W, Ke Y (2014) Lipopolysaccharides upregulate hepcidin in neuron via microglia and the IL-6/STAT3 signaling pathway. *Molecular neurobiology* 50(3): 811–820. DOI:10.1007/s12035-014-8671-3
136. Rodriguez R, Jung C, Gabayan V, Deng JC, Ganz T, Nemeth E, Bulut Y (2014) Hepcidin induction by pathogens and pathogen-derived molecules is strongly dependent on interleukin-6. *Infection and immunity* 82(2): 745–752. DOI:10.1128/IAI.00983-13
137. Wang R, Li C, Xu X, Zheng Y, Xiao C, Zerfas P, Cooperman S, Eckhaus M, Rouault T, Mishra L et al. (2005) A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell metabolism* 2(6): 399–409. DOI:10.1016/j.cmet.2005.10.010
138. Babitt JL, Huang FW, Xia Y, Sidis Y, Andrews NC, Lin HY (2007) Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *The Journal of clinical investigation* 117(7): 1933–1939. DOI:10.1172/JCI31342
139. Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, Babitt JL, Deng DY, Hoyng SA, Lin HY, Bloch KD, Peterson RT (2008) Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nature chemical biology* 4(1): 33–41. DOI:10.1038/nchembio.2007.54

140. Babitt JL, Lin HY (2010) Molecular mechanisms of hepcidin regulation: implications for the anemia of CKD. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 55(4): 726–741. DOI:10.1053/j.ajkd.2009.12.030
141. Verga Falzacappa MV, Casanovas G, Hentze MW, Muckenthaler MU (2008) A bone morphogenetic protein (BMP)-responsive element in the hepcidin promoter controls HFE2-mediated hepatic hepcidin expression and its response to IL-6 in cultured cells. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 86(5): 531–540. DOI:10.1007/s00109-008-0313-7
142. Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, Back SH, Kaufman RJ (2006) Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* 124(3): 587–599. DOI:10.1016/j.cell.2005.11.040
143. Vecchi C, Montosi G, Zhang K, Lamberti I, Duncan SA, Kaufman RJ, Pietrangelo A (2009) ER stress controls iron metabolism through induction of hepcidin. *Science (New York, N.Y.)* 325(5942): 877–880. DOI:10.1126/science.1176639
144. Ganz T, Nemeth E (2011) Hepcidin and disorders of iron metabolism. *Annual review of medicine* 62: 347–360. DOI:10.1146/annurev-med-050109-142444
145. Pak M, Lopez MA, Gabayan V, Ganz T, Rivera S (2006) Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood* 108(12): 3730–3735. DOI:10.1182/blood-2006-06-028787
146. Kim A, Nemeth E (2015) New insights into iron regulation and erythropoiesis. *Current opinion in hematology* 22(3): 199–205. DOI:10.1097/MOH.0000000000000132
147. Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh S, Staker P, Lee YT, Moroney JW, Reed CH, Luban NLC, Wang R et al. (2007) High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nature medicine* 13(9): 1096–1101. DOI:10.1038/nm1629
148. Tanno T, Porayette P, Sripichai O, Noh S, Byrnes C, Bhupatiraju A, Lee YT, Goodnough JB, Harandi O, Ganz T et al. (2009) Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood* 114(1): 181–186. DOI:10.1182/blood-2008-12-195503
149. Oelgeschlager M, Larrain J, Geissert D, Robertis EM de (2000) The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling. *Nature* 405(6788): 757–763. DOI:10.1038/35015500
150. Ross JJ, Shimmi O, Vilmos P, Petryk A, Kim H, Gaudenz K, Hermanson S, Ekker SC, O'Connor MB, Marsh JL (2001) Twisted gastrulation is a conserved extracellular BMP antagonist. *Nature* 410(6827): 479–483. DOI:10.1038/35068578
151. Chang C, Holtzman DA, Chau S, Chickering T, Woolf EA, Holmgren LM, Bodorova J, Gearing DP, Holmes WE, Brivanlou AH (2001) Twisted gastrulation can function as a BMP antagonist. *Nature* 410(6827): 483–487. DOI:10.1038/35068583
152. Xu J, Kimball TR, Lorenz JN, Brown DA, Bauskin AR, Klevitsky R, Hewett TE, Breit SN, Molkentin JD (2006) GDF15/MIC-1 functions as a protective and antihypertrophic factor released from the myocardium in association with SMAD protein activation. *Circulation research* 98(3): 342–350. DOI:10.1161/01.RES.0000202804.84885.d0
153. Tanno T, Rabel A, Lee YT, Yau YY, Leitman SF, Miller JL (2010) Expression of growth differentiation factor 15 is not elevated in individuals with iron deficiency secondary to volunteer blood donation. *Transfusion* 50(7): 1532–1535. DOI:10.1111/j.1537-2995.2010.02601.x
154. Theurl I, Finkenstedt A, Schroll A, Nairz M, Sonnweber T, Bellmann-Weiler R, Theurl M, Seifert M, Wroblewski VJ, Murphy AT et al. (2010) Growth differentiation factor 15 in anaemia of chronic disease, iron deficiency anaemia and mixed type anaemia. *British journal of haematology* 148(3): 449–455. DOI:10.1111/j.1365-2141.2009.07961.x
155. Casanovas G, Vujic Spasic M, Casu C, Rivella S, Strelau J, Unsicker K, Muckenthaler MU (2013) The murine growth differentiation factor 15 is not essential for systemic iron homeostasis in phlebotomized mice. *Haematologica* 98(3): 444–447. DOI:10.3324/haematol.2012.069807

156. Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E, Ganz T (2014) Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nature genetics* 46(7): 678–684. DOI:10.1038/ng.2996
157. Frazer DM, Wilkins SJ, Darshan D, Badrick AC, McLaren GD, Anderson GJ (2012) Stimulated erythropoiesis with secondary iron loading leads to a decrease in hepcidin despite an increase in bone morphogenetic protein 6 expression. *British journal of haematology* 157(5): 615–626. DOI:10.1111/j.1365-2141.2012.09104.x
158. Sonnweber T, Nachbaur D, Schroll A, Nairz M, Seifert M, Demetz E, Haschka D, Mitterstiller A, Kleinsasser A, Burtscher M et al. (2014) Hypoxia induced downregulation of hepcidin is mediated by platelet derived growth factor BB. *Gut* 63(12): 1951–1959. DOI:10.1136/gutjnl-2013-305317
159. Rishi G, Wallace DF, Subramaniam VN (2015) Hepcidin: regulation of the master iron regulator. *Bioscience reports* 35(3). DOI:10.1042/BSR20150014
160. Semenza GL (2007) Life with oxygen. *Science (New York, N.Y.)* 318(5847): 62–64. DOI:10.1126/science.1147949
161. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vulont S, Haase VH, Nizet V, Johnson RS (2007) Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *The Journal of clinical investigation* 117(7): 1926–1932. DOI:10.1172/JCI31370
162. Semenza G. (2001) HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Current Opinion in Cell Biology*(13): 167–171
163. Volke M, Gale DP, Maegdefrau U, Schley G, Klanke B, Bosserhoff A, Maxwell PH, Eckardt K, Warnecke C (2009) Evidence for a lack of a direct transcriptional suppression of the iron regulatory peptide hepcidin by hypoxia-inducible factors. *PloS one* 4(11): e7875. DOI:10.1371/journal.pone.0007875
164. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R, JR, Ellis MC, Fullan A et al. (1996) A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature genetics* 13(4): 399–408. DOI:10.1038/ng0896-399
165. Babitt JL, Lin HY (2011) The molecular pathogenesis of hereditary hemochromatosis. *Seminars in liver disease* 31(3): 280–292. DOI:10.1055/s-0031-1286059
166. Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald MLE, Franchini PL, Dube M, Andres L, MacFarlane J, Sakellaropoulos N, Politou M et al. (2004) Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nature genetics* 36(1): 77–82. DOI:10.1038/ng1274
167. Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Girelli D, Christakis J, Loukopoulos D, Camaschella C (2003) Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nature genetics* 33(1): 21–22. DOI:10.1038/ng1053
168. Camaschella C, Roetto A, Cali A, Gobbi M de, Garozzo G, Carella M, Majorano N, Totaro A, Gasparini P (2000) The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nature genetics* 25(1): 14–15. DOI:10.1038/75534
169. Montosi G, Donovan A, Totaro A, Garuti C, Pignatti E, Cassanelli S, Trenor CC, Gasparini P, Andrews NC, Pietrangelo A (2001) Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *The Journal of clinical investigation* 108(4): 619–623. DOI:10.1172/JCI13468
170. Folgueras A.R., Martin de Lara F., Pendas A.M., Garabaya C., Rodriguez F., Astudillo A., Bernal T., Cabanillas R., Lopez-Otin C., and Velasco G. (2008) Membrane-bound serine protease matriptase-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis. *Blood*(112(6)): 2539–2545
171. WHO, UNICEF, UNU (1998) Iron Deficiency Anemia: Assessment,, Prevention and Control. Report of a joint WHO/UNICEF/UNU consultation. Geneva: World Health Organization
172. Hiller E (2014) Iron deficiency anemia and anemia of chronic disease (ACD) (Die Eisenmangelanämie und funktioneller Eisenmangel bei chronischen Erkrankungen). Deutsche

- medizinische Wochenschrift (1946) 139(22): 1163-70; quiz 1171-4. DOI:10.1055/s-0034-1369868
173. Kaitha S, Bashir M, Ali T (2015) Iron deficiency anemia in inflammatory bowel disease. *World journal of gastrointestinal pathophysiology* 6(3): 62–72. DOI:10.4291/wjgp.v6.i3.62
174. Patterson RN (2003) Iron deficiency anaemia. Are the British Society of Gastroenterology guidelines being adhered to? *Postgraduate Medical Journal* 79(930): 226–228. DOI:10.1136/pmj.79.930.226
175. Niv E, Elis A, Zissin R, Naftali T, Novis B, Lishner M (2005) Iron deficiency anemia in patients without gastrointestinal symptoms--a prospective study. *Family practice* 22(1): 58–61. DOI:10.1093/fampra/cmh705
176. Stein J, Connor S, Virgin G, Ong DEH, Pereyra L (2016) Anemia and iron deficiency in gastrointestinal and liver conditions. *World journal of gastroenterology* 22(35): 7908–7925. DOI:10.3748/wjg.v22.i35.7908
177. Jimenez K., Kulnigg-Dabsch S., and Gasche C. (2015) Management of Iron Deficiency Anemia. *Gastroenterology and Hepatology*(11(4)): 241–250
178. Love AL, Billett HH (2008) Obesity, bariatric surgery, and iron deficiency: true, true, true and related. *American journal of hematology* 83(5): 403–409. DOI:10.1002/ajh.21106
179. Stein J., Dignass A.U. (2012) Management of iron deficiency anemia in inflammatory bowel disease - a practical approach. *Ann Gastroenterol*(26(2)): 104–113
180. Mast AE., Blinder MA., Gronowski AN., Chumley C. and Scott MG. (1998) Clinical utility of the soluble transferrin receptor and comparison with serum ferritin in several populations. *Clinical chemistry*(44(1)): 45–51
181. Beguin Y (2003) Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clinica Chimica Acta* 329(1-2): 9–22. DOI:10.1016/S0009-8981(03)00005-6
182. Skikne BS, Punnonen K, Caldron PH, Bennett MT, Rehu M, Gasior GH, Chamberlin JS, Sullivan LA, Bray KR, Southwick PC (2011) Improved differential diagnosis of anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: a prospective multicenter evaluation of soluble transferrin receptor and the sTfR/log ferritin index. *American journal of hematology* 86(11): 923–927. DOI:10.1002/ajh.22108
183. Infusino I, Braga F, Dolci A, Panteghini M (2012) Soluble transferrin receptor (sTfR) and sTfR/log ferritin index for the diagnosis of iron-deficiency anemia. A meta-analysis. *American journal of clinical pathology* 138(5): 642–649. DOI:10.1309/AJCP16NTXZLZFAIB
184. Oustamanolakis P, Koutroubakis IE (2011) Soluble transferrin receptor-ferritin index is the most efficient marker for the diagnosis of iron deficiency anemia in patients with IBD. *Inflammatory bowel diseases* 17(12): E158-9. DOI:10.1002/ibd.21881
185. Aigner E, Feldman A, Datz C (2014) Obesity as an emerging risk factor for iron deficiency. *Nutrients* 6(9): 3587–3600. DOI:10.3390/nu6093587
186. Vazquez-Vela MEF, Torres N, Tovar AR (2008) White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Archives of medical research* 39(8): 715–728. DOI:10.1016/j.arcmed.2008.09.005
187. Fain JN (2006) Release of Interleukins and Other Inflammatory Cytokines by Human Adipose Tissue Is Enhanced in Obesity and Primarily due to the Nonfat Cells. In: Litwack G (ed) *Interleukins. Vitamins and hormones, advances in research and applications*, vol 74. Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, pp 443–477
188. Tussing-Humphreys LM, Nemeth E, Fantuzzi G, Freels S, Guzman G, Holterman AL, Braunschweig C (2010) Elevated systemic hepcidin and iron depletion in obese premenopausal females. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 18(7): 1449–1456. DOI:10.1038/oby.2009.319
189. Tussing-Humphreys LM, Nemeth E, Fantuzzi G, Freels S, Holterman AL, Galvani C, Ayloo S, Vitello J, Braunschweig C (2010) Decreased serum hepcidin and improved functional iron status 6 months after restrictive bariatric surgery. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 18(10): 2010–2016. DOI:10.1038/oby.2009.490

190. Theurl I, Mattle V, Seifert M, Mariani M, Marth C, Weiss G (2006) Dysregulated monocyte iron homeostasis and erythropoietin formation in patients with anemia of chronic disease. *Blood* 107(10): 4142–4148. DOI:10.1182/blood-2005-08-3364
191. Gisbert JP, Gomollon F (2008) Common misconceptions in the diagnosis and management of anemia in inflammatory bowel disease. *The American journal of gastroenterology* 103(5): 1299–1307. DOI:10.1111/j.1572-0241.2008.01846.x
192. Weiss G, Goodnough LT (2005) Anemia of chronic disease. *The New England journal of medicine* 352(10): 1011–1023. DOI:10.1056/NEJMra041809
193. Weiss G (2009) Iron metabolism in the anemia of chronic disease. *Biochimica et biophysica acta* 1790(7): 682–693. DOI:10.1016/j.bbagen.2008.08.006
194. Dignass AU, Gasche C, Bettenworth D, Birgegard G, Danese S, Gisbert JP, Gomollon F, Iqbal T, Katsanos K, Koutroubakis I et al. (2015) European consensus on the diagnosis and management of iron deficiency and anaemia in inflammatory bowel diseases. *Journal of Crohn's & colitis* 9(3): 211–222. DOI:10.1093/ecco-jcc/jju009
195. Balci YI, Akpınar FO, Polat A, Uzun U, Ergin A (2013) ORIGINAL ARTICLE Evaluation of Reticulocyte Parameters in Iron Deficiency, Vitamin B12 Deficiency and Mixed Anemia. *Clin. Lab.* 59(01+02/2013). DOI:10.7754/Clin.Lab.2015.150616
196. Ceylan C, Miskioglu M, Colak H, Kiliccioglu B, Ozdemir E (2007) Evaluation of reticulocyte parameters in iron deficiency, vitamin B(12) deficiency and beta-thalassemia minor patients. *International journal of laboratory hematology* 29(5): 327–334. DOI:10.1111/j.1365-2257.2006.00872.x
197. Remacha AF, Sarda MP, Canals C, Queralto JM, Zapico E, Remacha J, Carrascosa C (2013) Combined cobalamin and iron deficiency anemia: a diagnostic approach using a model based on age and homocysteine assessment. *Annals of hematology* 92(4): 527–531. DOI:10.1007/s00277-012-1634-8
198. Odewole OA, Williamson RS, Zakai NA, Berry RJ, Judd SE, Qi YP, Adedinsowo DA, Oakley GP, JR (2013) Near-elimination of folate-deficiency anemia by mandatory folic acid fortification in older US adults: Reasons for Geographic and Racial Differences in Stroke study 2003–2007. *The American journal of clinical nutrition* 98(4): 1042–1047. DOI:10.3945/ajcn.113.059683
199. Gasche C, Berstad A, Befrits R, Beglinger C, Dignass A, Erichsen K, Gomollon F, Hjortswang H, Koutroubakis I, Kulnigg S et al. (2007) Guidelines on the diagnosis and management of iron deficiency and anemia in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases* 13(12): 1545–1553. DOI:10.1002/ibd.20285
200. Zhu A, Kaneshiro M, Kaunitz JD (2010) Evaluation and treatment of iron deficiency anemia: a gastroenterological perspective. *Digestive diseases and sciences* 55(3): 548–559. DOI:10.1007/s10620-009-1108-6
201. Lomer MCE, Cook WB, Jan-Mohamed HJB, Hutchinson C, Liu DY, Hider RC, Powell JJ (2012) Iron requirements based upon iron absorption tests are poorly predicted by haematological indices in patients with inactive inflammatory bowel disease. *The British journal of nutrition* 107(12): 1806–1811. DOI:10.1017/S0007114511004971
202. Gereklioglu C, Asma S, Korur A, Erdogan F, Kut A (2016) Medication adherence to oral iron therapy in patients with iron deficiency anemia. *Pakistan journal of medical sciences* 32(3): 604–607. DOI:10.12669/pjms.323.9799
203. Carrier J., Aghdassi E., Cullen J., and Allard JP. (2002) Iron Supplementation Increases Disease Activity and Vitamin E Ameliorates the effect in rats with dextran sulfate sodium-induced colitis. *J. Nutr.*(132): 3146–3150
204. Carrier J, Aghdassi E, Platt I, Cullen J, Allard JP (2001) Effect of oral iron supplementation on oxidative stress and colonic inflammation in rats with induced colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 15(12): 1989–1999. DOI:10.1046/j.1365-2036.2001.01113.x
205. Erichsen K, Hausken T, Ulvik RJ, Svoldal A, Berstad A, Berge RK (2009) Ferrous Fumarate Deteriorated Plasma Antioxidant Status in Patients with Crohn Disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 38(5): 543–548. DOI:10.1080/00365520310000771

206. Goddard AF, James MW, McIntyre AS, Scott BB (2011) Guidelines for the management of iron deficiency anaemia. *Gut* 60(10): 1309–1316. DOI:10.1136/gut.2010.228874
207. Qunibi WY (2010) The efficacy and safety of current intravenous iron preparations for the management of iron-deficiency anaemia: a review. *Arzneimittel-Forschung* 60(6a): 399–412. DOI:10.1055/s-0031-1296304
208. Kim J, Cha Y, Surh Y (2010) A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutation research* 690(1-2): 12–23. DOI:10.1016/j.mrfmmm.2009.09.007
209. Lee J, Johnson JA (2004) An Important Role of Nrf2-ARE Pathway in the Cellular Defense Mechanism. *Journal of Biochemistry and molecular biology* 37(2): 139–143. DOI:10.5483/BMBRep.2004.37.2.139
210. Jaramillo MC, Zhang DD (2013) The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes & development* 27(20): 2179–2191. DOI:10.1101/gad.225680.113
211. Lee J, Surh Y (2005) Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer letters* 224(2): 171–184. DOI:10.1016/j.canlet.2004.09.042
212. Kobayashi A, Kang M, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K, Yamamoto M (2004) Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Molecular and cellular biology* 24(16): 7130–7139. DOI:10.1128/MCB.24.16.7130-7139.2004
213. Cullinan SB, Gordan JD, Jin J, Harper JW, Diehl JA (2004) The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Molecular and cellular biology* 24(19): 8477–8486. DOI:10.1128/MCB.24.19.8477-8486.2004
214. McMahan M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD (2003) Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *The Journal of biological chemistry* 278(24): 21592–21600. DOI:10.1074/jbc.M300931200
215. Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Yamamoto M, Talalay P (2002) Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(18): 11908–11913. DOI:10.1073/pnas.172398899
216. Zhang DD, Hannink M (2003) Distinct Cysteine Residues in Keap1 Are Required for Keap1-Dependent Ubiquitination of Nrf2 and for Stabilization of Nrf2 by Chemopreventive Agents and Oxidative Stress. *Molecular and cellular biology* 23(22): 8137–8151. DOI:10.1128/MCB.23.22.8137-8151.2003
217. McMahan M, Lamont DJ, Beattie KA, Hayes JD (2010) Keap1 perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(44): 18838–18843. DOI:10.1073/pnas.1007387107
218. Magesh S, Chen Y, Hu L (2012) Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents. *Medicinal research reviews* 32(4): 687–726. DOI:10.1002/med.21257
219. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I et al. (1997) An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 236(2): 313–322. DOI:10.1006/bbrc.1997.6943
220. Nguyen T, Huang HC, Pickett CB (2000) Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by Nrf2 and repression by MafK. *The Journal of biological chemistry* 275(20): 15466–15473. DOI:10.1074/jbc.M000361200
221. Motohashi H, Yamamoto M (2004) Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends in molecular medicine* 10(11): 549–557. DOI:10.1016/j.molmed.2004.09.003

222. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT (2014) The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in biochemical sciences* 39(4): 199–218. DOI:10.1016/j.tibs.2014.02.002
223. Huang Y, Li W, Su Z, Kong AT (2015) The complexity of the Nrf2 pathway: beyond the antioxidant response. *The Journal of nutritional biochemistry* 26(12): 1401–1413. DOI:10.1016/j.jnutbio.2015.08.001
224. Sporn MB, Liby KT (2005) Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. *Nature clinical practice. Oncology* 2(10): 518–525. DOI:10.1038/ncononc0319
225. Chen P, Vargas MR, Pani AK, Smeyne RJ, Johnson DA, Kan YW, Johnson JA (2009) Nrf2-mediated neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: Critical role for the astrocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(8): 2933–2938. DOI:10.1073/pnas.0813361106
226. Li J, Zhang C, Xing Y, Janicki JS, Yamamoto M, Wang XL, Tang D, Cui T (2011) Up-regulation of p27(kip1) contributes to Nrf2-mediated protection against angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Cardiovascular research* 90(2): 315–324. DOI:10.1093/cvr/cvr010
227. Biswal S, Thimmulappa RK, Harvey CJ (2012) Experimental therapeutics of Nrf2 as a target for prevention of bacterial exacerbations in COPD. *Proceedings of the American Thoracic Society* 9(2): 47–51. DOI:10.1513/pats.201201-009MS
228. Chen X, Dodd G, Thomas S, Zhang X, Wasserman MA, Rovin BH, Kunsch C (2006) Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 290(5): H1862-70. DOI:10.1152/ajpheart.00651.2005
229. Ma Q, Battelli L, Hubbs AF (2006) Multiorgan autoimmune inflammation, enhanced lymphoproliferation, and impaired homeostasis of reactive oxygen species in mice lacking the antioxidant-activated transcription factor Nrf2. *The American journal of pathology* 168(6): 1960–1974. DOI:10.2353/ajpath.2006.051113
230. Yanagawa T, Itoh K, Uwayama J, Shibata Y, Yamaguchi A, Sano T, Ishii T, Yoshida H, Yamamoto M (2004) Nrf2 deficiency causes tooth decolorization due to iron transport disorder in enamel organ. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 9(7): 641–651. DOI:10.1111/j.1356-9597.2004.00753.x
231. Silva-Gomes S, Santos AG, Caldas C, Silva CM, Neves JV, Lopes J, Carneiro F, Rodrigues PN, Duarte TL (2014) Transcription factor NRF2 protects mice against dietary iron-induced liver injury by preventing hepatocytic cell death. *Journal of Hepatology* 60(2): 354–361. DOI:10.1016/j.jhep.2013.09.004
232. Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK, Zhang DD (2008) Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacological research* 58(5-6): 262–270. DOI:10.1016/j.phrs.2008.09.003
233. Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AMK, Cook JL (1999) Nrf2, a Cap'n'Collar Transcription Factor, Regulates Induction of the Heme Oxygenase-1 Gene. *Journal of Biological Chemistry* 274(37): 26071–26078. DOI:10.1074/jbc.274.37.26071
234. Srisook K, Kim C, Cha Y (2005) Molecular mechanisms involved in enhancing HO-1 expression: de-repression by heme and activation by Nrf2, the "one-two" punch. *Antioxidants & redox signaling* 7(11-12): 1674–1687. DOI:10.1089/ars.2005.7.1674
235. Rushworth SA, O'Connell MA (2004) Haem oxygenase-1 in inflammation. *Biochemical Society transactions* 32(Pt 6): 1093–1094. DOI:10.1042/BST0321093
236. Tenhunen R., Marver H.S., Schmid R. (1968) The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *microsomal heme oxygenase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*(61): 748–755
237. Ryter SW, Alam J, Choi AMK (2006) Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiological reviews* 86(2): 583–650. DOI:10.1152/physrev.00011.2005
238. Trakshel G.M., Kutty R.K., Maines M.D. (1986) Purification and Characterization of the Major Constitutive Form of ho. *Journal of Biological Chemistry*(261): 11131–11137

239. Paine A, Eiz-Vesper B, Blasczyk R, Immenschuh S (2010) Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochemical pharmacology* 80(12): 1895–1903. DOI:10.1016/j.bcp.2010.07.014
240. Bauer I, Wanner GA, Rensing H, Alte C, Miescher EA, Wolf B, Pannen BH, Clemens MG, Bauer M (1998) Expression pattern of heme oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and stress-exposed rat liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 27(3): 829–838. DOI:10.1002/hep.510270327
241. Alam J., Shibahara S., Smith A. (1989) Transcriptional Activation of the Heme Oxygenase Gene by Heme and cadmium in mouse hepatoma cells. *The Journal of biological chemistry*(11): 6371–6375
242. Keyse S.M., Tyrrell R.M. (1989) Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*(86): 99–103
243. Kaczorowski D, Zuckerbraun B (2007) Carbon Monoxide. *Medicinal Chemistry and Biological Effects*. *CMC* 14(25): 2720–2725. DOI:10.2174/092986707782023181
244. Ryter SW, Choi AMK (2013) Carbon monoxide: present and future indications for a medical gas. *The Korean journal of internal medicine* 28(2): 123–140. DOI:10.3904/kjim.2013.28.2.123
245. Salomone F, Li Volti G, Rosso C, Grosso G, Bugianesi E (2013) Unconjugated bilirubin, a potent endogenous antioxidant, is decreased in patients with non-alcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis. *Journal of gastroenterology and hepatology* 28(7): 1202–1208. DOI:10.1111/jgh.12155
246. Stocker R (2004) Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxidants & redox signaling* 6(5): 841–849. DOI:10.1089/ars.2004.6.841
247. Lin Q, Weis S, Yang G, Weng Y, Helston R, Rish K, Smith A, Bordner J, Polte T, Gaunitz F et al. (2007) Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* 282(28): 20621–20633. DOI:10.1074/jbc.M607954200
248. Vanella L, Barbagallo I, Tibullo D, Forte S, Zappala A, Li Volti G (2016) The non-canonical functions of the heme oxygenases. *Oncotarget*. DOI:10.18632/oncotarget.11923
249. Ghoreschi K, Bruck J, Kellerer C, Deng C, Peng H, Rothfuss O, Hussain RZ, Gocke AR, Respa A, Glocova I et al. (2011) Fumarates improve psoriasis and multiple sclerosis by inducing type II dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 208(11): 2291–2303. DOI:10.1084/jem.20100977
250. Fox RJ, Kita M, Cohan SL, Henson LJ, Zambrano J, Scannevin RH, O’Gorman J, Novas M, Dawson KT, Phillips JT (2014) BG-12 (dimethyl fumarate): a review of mechanism of action, efficacy, and safety. *Current medical research and opinion* 30(2): 251–262. DOI:10.1185/03007995.2013.849236
251. Meissner M, Valesky EM, Kippenberger S, Kaufmann R (2012) Dimethyl fumarate - only an anti-psoriatic medication? *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 10(11): 793–801. DOI:10.1111/j.1610-0387.2012.07996.x
252. Fox RJ, Miller DH, Phillips JT, Hutchinson M, Havrdova E, Kita M, Yang M, Raghupathi K, Novas M, Sweetser MT et al. (2012) Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 367(12): 1087–1097. DOI:10.1056/NEJMoa1206328
253. Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Giovannoni G, Selmaj K, Tornatore C, Sweetser MT, Yang M, Sheikh SI et al. (2012) Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 367(12): 1098–1107. DOI:10.1056/NEJMoa1114287
254. Bompreszi R (2015) Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: an overview. *Therapeutic advances in neurological disorders* 8(1): 20–30. DOI:10.1177/1756285614564152

255. Linker RA, Lee D, Ryan S, van Dam AM, Conrad R, Bista P, Zeng W, Hronowsky X, Buko A, Chollate S et al. (2011) Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain : a journal of neurology* 134(Pt 3): 678–692. DOI:10.1093/brain/awq386
256. Suzuki T, Motohashi H, Yamamoto M (2013) Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway. *Trends in pharmacological sciences* 34(6): 340–346. DOI:10.1016/j.tips.2013.04.005
257. Brennan MS, Matos MF, Li B, Hronowski X, Gao B, Juhasz P, Rhodes KJ, Scannevin RH (2015) Dimethyl fumarate and monoethyl fumarate exhibit differential effects on KEAP1, NRF2 activation, and glutathione depletion in vitro. *PLoS one* 10(3): e0120254. DOI:10.1371/journal.pone.0120254
258. Scher JU, Pillinger MH (2005) 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 114(2): 100–109. DOI:10.1016/j.clim.2004.09.008
259. Surh Y, Na H, Park J, Lee H, Kim W, Yoon I, Kim D (2011) 15-Deoxy-Delta(1)(2),(1)(4)-prostaglandin J(2), an electrophilic lipid mediator of anti-inflammatory and pro-resolving signaling. *Biochemical pharmacology* 82(10): 1335–1351. DOI:10.1016/j.bcp.2011.07.100
260. Bai Y, Wang X, Zhao S, Ma C, Cui J, Zheng Y (2015) Sulforaphane Protects against Cardiovascular Disease via Nrf2 Activation. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2015: 407580. DOI:10.1155/2015/407580
261. Hong F, Freeman ML, Liebler DC (2005) Identification of sensor cysteines in human Keap1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane. *Chemical research in toxicology* 18(12): 1917–1926. DOI:10.1021/tx0502138
262. Tortorella SM, Royce SG, Licciardi PV, Karagiannis TC (2015) Dietary Sulforaphane in Cancer Chemoprevention: The Role of Epigenetic Regulation and HDAC Inhibition. *Antioxidants & redox signaling* 22(16): 1382–1424. DOI:10.1089/ars.2014.6097
263. Shankar (2009) Sulforaphane inhibits angiogenesis through activation of FOXO transcription factors. *Oncol Rep* 22(06). DOI:10.3892/or_00000589
264. Gali-Muhtasib H, Hmadi R, Kareh M, Tohme R, Darwiche N (2015) Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 20(12): 1531–1562. DOI:10.1007/s10495-015-1169-2
265. Kishimoto T (2010) IL-6: from its discovery to clinical applications. *International immunology* 22(5): 347–352. DOI:10.1093/intimm/dxq030
266. O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD (2002) Cytokine Signaling in 2002. *Cell* 109(2): S121-S131. DOI:10.1016/S0092-8674(02)00701-8
267. Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H et al. (1997) A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387(6636): 921–924. DOI:10.1038/43213
268. Vanden Berghe W, Vermeulen L, Wilde G de, Bosscher K de, Boone E, Haegeman G (2000) Signal transduction by tumor necrosis factor and gene regulation of the inflammatory cytokine interleukin-6. *Biochemical pharmacology* 60(8): 1185–1195. DOI:10.1016/S0006-2952(00)00412-3
269. Pritts T, Hungness E, Wang Q, Robb B, Hershko D, Hasselgren P (2002) Mucosal and enterocyte IL-6 production during sepsis and endotoxemia - role of transcription factors and regulation by the stress response. *The American Journal of Surgery* 183(4): 372–383. DOI:10.1016/S0002-9610(02)00812-7
270. Suganuma M, Okabe S, Kurusu M, Iida N, Ohshima S, Saeki Y, Kishimoto T, Fujiki H (2002) Discrete roles of cytokines, TNF- α , IL-1, IL-6 in tumor promotion and cell transformation. *Int J Oncol*. DOI:10.3892/ijco.20.1.131
271. Atreya R, Neurath MF (2005) Involvement of IL-6 in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Colon Cancer. *CRIAI* 28(3): 187–196. DOI:10.1385/CRIAI:28:3:187
272. Richards CD (2013) The enigmatic cytokine oncostatin m and roles in disease. *ISRN inflammation* 2013: 512103. DOI:10.1155/2013/512103

273. Zarling J.M., Shoyab M., Marquardt H., Hanson M.B., Lioubin M.N., Todaro G.J. (1986) Oncostatin M- A growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*(83): 9739–9745
274. Esashi E, Ito H, Minehata K, Saito S, Morikawa Y, Miyajima A (2009) Oncostatin M deficiency leads to thymic hypoplasia, accumulation of apoptotic thymocytes and glomerulonephritis. *European journal of immunology* 39(6): 1664–1670. DOI:10.1002/eji.200839149
275. Island M, Fatih N, Leroyer P, Brissot P, Loreal O (2011) GATA-4 transcription factor regulates hepatic hepcidin expression. *The Biochemical journal* 437(3): 477–482. DOI:10.1042/BJ20110225
276. Kunkel T.A. (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(82): 488–492
277. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25(4): 402–408. DOI:10.1006/meth.2001.1262
278. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2): 248–254. DOI:10.1016/0003-2697(76)90527-3
279. Towbin H., Staehlin T. and Gordon J (1979) Polyacrylamid gel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(76(9)): 4350–4354
280. Bayele HK, Balesaria S, Srari SKS (2015) Phytoestrogens modulate hepcidin expression by Nrf2: Implications for dietary control of iron absorption. *Free radical biology & medicine* 89: 1192–1202. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.001
281. Basseri RJ, Nemeth E, Vassilaki ME, Basseri B, Enayati P, Shaye O, Bourikas LA, Ganz T, Papadakis KA (2013) Hepcidin is a key mediator of anemia of inflammation in Crohn's disease. *Journal of Crohn's & colitis* 7(8): e286-91. DOI:10.1016/j.crohns.2012.10.013
282. Auerbach M, Adamson JW (2016) How we diagnose and treat iron deficiency anemia. *American journal of hematology* 91(1): 31–38. DOI:10.1002/ajh.24201
283. Jimenez K., Kulnigg-Dabsch S., and Gasche C. (2015) Management of Iron Deficiency Anemia (2). *Gastroenterology and Hepatology*(11(4)): 241–250
284. Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL (2005) The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 41(16): 2502–2512. DOI:10.1016/j.ejca.2005.08.016
285. Neurath MF, Finotto S (2011) IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine & growth factor reviews* 22(2): 83–89. DOI:10.1016/j.cytogfr.2011.02.003
286. Mitsuyama K., Sata M., and Tanikawa K. (1991) Significance of interleukin-6 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterologia Japonica*(26 (1)): 20–28
287. Aleksandra Nielsen A, Norderby Nielsen J, Schmedes A, Brandslund I, Hey H (2005) Saliva Interleukin-6 in patients with inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 40(12): 1444–1448. DOI:10.1080/00365520510023774
288. Beigel F, Friedrich M, Probst C, Sotlar K, Goke B, Diegelmann J, Brand S (2014) Oncostatin M mediates STAT3-dependent intestinal epithelial restitution via increased cell proliferation, decreased apoptosis and upregulation of SERPIN family members. *PLoS one* 9(4): e93498. DOI:10.1371/journal.pone.0093498
289. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T (2004) IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *The Journal of clinical investigation* 113(9): 1271–1276. DOI:10.1172/JCI20945
290. Pini M, Rhodes DH, Fantuzzi G (2011) Hematological and acute-phase responses to diet-induced obesity in IL-6 KO mice. *Cytokine* 56(3): 708–716. DOI:10.1016/j.cyto.2011.09.015

291. Kanda J, Uchiyama T, Tomosugi N, Higuchi M, Uchiyama T, Kawabata H (2009) Oncostatin M and leukemia inhibitory factor increase hepcidin expression in hepatoma cell lines. *International journal of hematology* 90(5): 545–552. DOI:10.1007/s12185-009-0443-x
292. Song SJ, Tomosugi N, Kawabata H, Ishikawa T, Nishikawa T, Yoshizaki K (2010) Down-regulation of hepcidin resulting from long-term treatment with an anti-IL-6 receptor antibody (tocilizumab) improves anemia of inflammation in multicentric Castleman disease. *Blood* 116(18): 3627–3634. DOI:10.1182/blood-2010-03-271791
293. Casper C, Chaturvedi S, Munshi N, Wong R, Qi M, Schaffer M, Bandekar R, Hall B, van de Velde H, Vermeulen J et al. (2015) Analysis of Inflammatory and Anemia-Related Biomarkers in a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Siltuximab (Anti-IL6 Monoclonal Antibody) in Patients With Multicentric Castleman Disease. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21(19): 4294–4304. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-15-0134
294. Isaacs JD, Harari O, Kobold U, Lee JS, Bernasconi C (2013) Effect of tocilizumab on haematological markers implicates interleukin-6 signalling in the anaemia of rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 15(6): R204. DOI:10.1186/ar4397
295. Hashizume M, Uchiyama Y, Horai N, Tomosugi N, Mihara M (2010) Tocilizumab, a humanized anti-interleukin-6 receptor antibody, improved anemia in monkey arthritis by suppressing IL-6-induced hepcidin production. *Rheumatology international* 30(7): 917–923. DOI:10.1007/s00296-009-1075-4
296. Sebastiani G, Wilkinson N, Pantopoulos K (2016) Pharmacological Targeting of the Hepcidin/Ferroportin Axis. *Frontiers in pharmacology* 7: 160. DOI:10.3389/fphar.2016.00160
297. Jiao Y, Wilkinson J, 4th., Di X, Wang W, Hatcher H, Kock ND, D'Agostino R, JR, Knovich MA, Torti FM, Torti SV (2009) Curcumin, a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent, is a biologically active iron chelator. *Blood* 113(2): 462–469. DOI:10.1182/blood-2008-05-155952
298. Fatih N, Camberlein E, Island ML, Corlu A, Abgueguen E, Detivaud L, Leroyer P, Brissot P, Loreal O (2010) Natural and synthetic STAT3 inhibitors reduce hepcidin expression in differentiated mouse hepatocytes expressing the active phosphorylated STAT3 form. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 88(5): 477–486. DOI:10.1007/s00109-009-0588-3
299. Zhang S, Wang Z, Wang L, Liu S (2011) AG490: an inhibitor of hepcidin expression in vivo. *World journal of gastroenterology* 17(45): 5032–5034. DOI:10.3748/wjg.v17.i45.5032
300. Rajasingh J, Bright JJ (2006) 15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 regulates leukemia inhibitory factor signaling through JAK-STAT pathway in mouse embryonic stem cells. *Experimental cell research* 312(13): 2538–2546. DOI:10.1016/j.yexcr.2006.04.010
301. Hosoi T, Matsuzaki S, Miyahara T, Shimizu K, Hasegawa Y, Ozawa K (2015) Possible involvement of 15-deoxy-Delta(12,14) -prostaglandin J2 in the development of leptin resistance. *Journal of neurochemistry* 133(3): 343–351. DOI:10.1111/jnc.13057
302. Li Y, Tang J, Hu Y (2014) Dimethyl fumarate protection against collagen II degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 454(2): 257–261. DOI:10.1016/j.bbrc.2014.10.005
303. Kang H, Seo H, Go Y, Oh CJ, Jeoung NH, Park K, Lee I (2013) Dimethylfumarate suppresses adipogenic differentiation in 3T3-L1 preadipocytes through inhibition of STAT3 activity. *PloS one* 8(4): e61411. DOI:10.1371/journal.pone.0061411
304. Theurl I, Schroll A, Sonnweber T, Nairz M, Theurl M, Willenbacher W, Eller K, Wolf D, Seifert M, Sun CC et al. (2011) Pharmacologic inhibition of hepcidin expression reverses anemia of chronic inflammation in rats. *Blood* 118(18): 4977–4984. DOI:10.1182/blood-2011-03-345066
305. Casanovas G, Mleczko-Sanecka K, Altamura S, Hentze MW, Muckenthaler MU (2009) Bone morphogenetic protein (BMP)-responsive elements located in the proximal and distal hepcidin promoter are critical for its response to HJV/BMP/SMAD. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 87(5): 471–480. DOI:10.1007/s00109-009-0447-2
306. Wang C, Babitt JL (2016) Hepcidin regulation in the anemia of inflammation. *Current opinion in hematology* 23(3): 189–197. DOI:10.1097/MOH.0000000000000236

307. Casanovas G, Banerji A, d'Alessio F, Muckenthaler MU, Legewie S (2014) A multi-scale model of hepcidin promoter regulation reveals factors controlling systemic iron homeostasis. *PLoS computational biology* 10(1): e1003421. DOI:10.1371/journal.pcbi.1003421
308. Besson-Fournier C, Latour C, Kautz L, Bertrand J, Ganz T, Roth M, Coppin H (2012) Induction of activin B by inflammatory stimuli up-regulates expression of the iron-regulatory peptide hepcidin through Smad1/5/8 signaling. *Blood* 120(2): 431–439. DOI:10.1182/blood-2012-02-411470
309. Poli M, Girelli D, Campostrini N, Maccarinelli F, Finazzi D, Lusciati S, Nai A, Arosio P (2011) Heparin: a potent inhibitor of hepcidin expression in vitro and in vivo. *Blood* 117(3): 997–1004. DOI:10.1182/blood-2010-06-289082
310. Asperti M, Naggi A, Esposito E, Ruzzenenti P, Di Somma M, Gryzik M, Arosio P, Poli M (2015) High Sulfation and a High Molecular Weight Are Important for Anti-hepcidin Activity of Heparin. *Frontiers in pharmacology* 6: 316. DOI:10.3389/fphar.2015.00316
311. Boser P, Seemann D, Liguori MJ, Fan L, Huang L, Hafner M, Popp A, Mueller BK (2015) Anti-repulsive Guidance Molecule C (RGMc) Antibodies Increases Serum Iron in Rats and Cynomolgus Monkeys by Hepcidin Downregulation. *The AAPS journal* 17(4): 930–938. DOI:10.1208/s12248-015-9770-4
312. Kovac S, Boser P, Cui Y, Ferring-Appel D, Casarrubea D, Huang L, Fung E, Popp A, Mueller BK, Hentze MW (2016) Anti-hemojuvelin antibody corrects anemia caused by inappropriately high hepcidin levels. *Haematologica* 101(5): e173-6. DOI:10.3324/haematol.2015.140772
313. Boergermann JH, Kopf J, Yu PB, Knaus P (2010) Dorsomorphin and LDN-193189 inhibit BMP-mediated Smad, p38 and Akt signalling in C2C12 cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42(11): 1802–1807. DOI:10.1016/j.biocel.2010.07.018
314. Mu M, An P, Wu Q, Shen X, Shao D, Wang H, Zhang Y, Zhang S, Yao H, Min J et al. (2016) The dietary flavonoid myricetin regulates iron homeostasis by suppressing hepcidin expression. *The Journal of nutritional biochemistry* 30: 53–61. DOI:10.1016/j.jnutbio.2015.10.015
315. Mu M, Wu A, An P, Du X, Wu Q, Shen X, Wang F (2014) Black soyabean seed coat extract regulates iron metabolism by inhibiting the expression of hepcidin. *The British journal of nutrition* 111(7): 1181–1189. DOI:10.1017/S0007114513004005
316. Barnham KJ, Masters CL, Bush AI (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature reviews. Drug discovery* 3(3): 205–214. DOI:10.1038/nrd1330
317. Benz CC, Yau C (2008) Ageing, oxidative stress and cancer: paradigms in parallax. *Nature reviews. Cancer* 8(11): 875–879. DOI:10.1038/nrc2522
318. Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J (2016) Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73(17): 3221–3247. DOI:10.1007/s00018-016-2223-0
319. Lu M, Ji J, Jiang Z, You Q (2016) The Keap1-Nrf2-ARE Pathway As a Potential Preventive and Therapeutic Target: An Update. *Medicinal research reviews* 36(5): 924–963. DOI:10.1002/med.21396
320. Tanaka Y, Ikeda T, Yamamoto K, Ogawa H, Kamisako T (2012) Dysregulated expression of fatty acid oxidation enzymes and iron-regulatory genes in livers of Nrf2-null mice. *Journal of gastroenterology and hepatology* 27(11): 1711–1717. DOI:10.1111/j.1440-1746.2012.07180.x
321. Boettler U, Sommerfeld K, Volz N, Pahlke G, Teller N, Somoza V, Lang R, Hofmann T, Marko D (2011) Coffee constituents as modulators of Nrf2 nuclear translocation and ARE (EpRE)-dependent gene expression. *The Journal of nutritional biochemistry* 22(5): 426–440. DOI:10.1016/j.jnutbio.2010.03.011
322. Liao JC, Lee KT, You BJ, Lee CL, Chang WT, Wu YC, Lee H (2015) Raf/ERK/Nrf2 signaling pathway and MMP-7 expression involvement in the trigonelline-mediated inhibition of hepatocarcinoma cell migration. *Food & nutrition research* 59: 29884. DOI:10.3402/fnr.v59.29884

323. Arlt A, Sebens S, Krebs S, Geismann C, Grossmann M, Kruse M, Schreiber S, Schafer H (2013) Inhibition of the Nrf2 transcription factor by the alkaloid trigonelline renders pancreatic cancer cells more susceptible to apoptosis through decreased proteasomal gene expression and proteasome activity. *Oncogene* 32(40): 4825–4835. DOI:10.1038/onc.2012.493
324. Fung E, Sugianto P, Hsu J, Damoiseaux R, Ganz T, Nemeth E (2013) High-throughput screening of small molecules identifies hepcidin antagonists. *Molecular pharmacology* 83(3): 681–690. DOI:10.1124/mol.112.083428
325. Marro S, Chiabrando D, Messina E, Stolte J, Turco E, Tolosano E, Muckenthaler MU (2010) Heme controls ferroportin1 (FPN1) transcription involving Bach1, Nrf2 and a MARE/ARE sequence motif at position -7007 of the FPN1 promoter. *Haematologica* 95(8): 1261–1268. DOI:10.3324/haematol.2009.020123
326. Tsuji Y (2005) JunD activates transcription of the human ferritin H gene through an antioxidant response element during oxidative stress. *Oncogene* 24(51): 7567–7578. DOI:10.1038/sj.onc.1208901
327. Shin D, Chung J, Joe Y, Pae H, Chang KC, Cho GJ, Ryter SW, Chung H (2012) Pretreatment with CO-releasing molecules suppresses hepcidin expression during inflammation and endoplasmic reticulum stress through inhibition of the STAT3 and CREBH pathways. *Blood* 119(11): 2523–2532. DOI:10.1182/blood-2011-07-366690
328. Ryter SW, Choi AMK (2009) Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from metabolism to molecular therapy. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 41(3): 251–260. DOI:10.1165/rcmb.2009-0170TR
329. Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, Ohta K, Kasahara Y, Koizumi S (1999) Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *The Journal of clinical investigation* 103(1): 129–135. DOI:10.1172/JCI4165
330. Wagener FADTG (2001) Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood* 98(6): 1802–1811. DOI:10.1182/blood.V98.6.1802
331. Koizumi S (2007) Human heme oxygenase-1 deficiency: a lesson on serendipity in the discovery of the novel disease. *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society* 49(2): 125–132. DOI:10.1111/j.1442-200X.2007.02353.x
332. Kartikasari AER, Wagener FADTG, Yachie A, Wiegerinck ETG, Kemna EHJM, Swinkels DW (2009) Hepcidin suppression and defective iron recycling account for dysregulation of iron homeostasis in heme oxygenase-1 deficiency. *Journal of cellular and molecular medicine* 13(9B): 3091–3102. DOI:10.1111/j.1582-4934.2008.00494.x
333. Cheng H, Yen C, Chang C, Huang K, Chen K, Zhang R, Lee P, Miaw S, Huang J, Chiang C et al. (2015) Ferritin heavy chain mediates the protective effect of heme oxygenase-1 against oxidative stress. *Biochimica et biophysica acta* 1850(12): 2506–2517. DOI:10.1016/j.bbagen.2015.09.018
334. Cooke KS, Hinkle B, Salimi-Moosavi H, Foltz I, King C, Rathanaswami P, Winters A, Steavenson S, Begley CG, Molineux G et al. (2013) A fully human anti-hepcidin antibody modulates iron metabolism in both mice and nonhuman primates. *Blood* 122(17): 3054–3061. DOI:10.1182/blood-2013-06-505792
335. Sasu BJ, Cooke KS, Arvedson TL, Plewa C, Ellison AR, Sheng J, Winters A, Juan T, Li H, Begley CG et al. (2010) Antihepcidin antibody treatment modulates iron metabolism and is effective in a mouse model of inflammation-induced anemia. *Blood* 115(17): 3616–3624. DOI:10.1182/blood-2009-09-245977
336. Kim E, Surh Y (2006) 15-deoxy-Delta^{12,14}-prostaglandin J₂ as a potential endogenous regulator of redox-sensitive transcription factors. *Biochemical pharmacology* 72(11): 1516–1528. DOI:10.1016/j.bcp.2006.07.030
337. Gillard GO, Collette B, Anderson J, Chao J, Scannevin RH, Huss DJ, Fontenot JD (2015) DMF, but not other fumarates, inhibits NF-kappaB activity in vitro in an Nrf2-independent manner. *Journal of neuroimmunology* 283: 74–85. DOI:10.1016/j.jneuroim.2015.04.006

338. Jang M, Cho I (2016) Sulforaphane Ameliorates 3-Nitropropionic Acid-Induced Striatal Toxicity by Activating the Keap1-Nrf2-ARE Pathway and Inhibiting the MAPKs and NF-kappaB Pathways. *Molecular neurobiology* 53(4): 2619–2635. DOI:10.1007/s12035-015-9230-2
339. Wallace DF, Subramaniam VN (2015) Analysis of IL-22 contribution to hepcidin induction and hypoferrremia during the response to LPS in vivo. *International immunology* 27(6): 281–287. DOI:10.1093/intimm/dxu144
340. Kotta-Loizou I, Vassilaki N, Pissas G, Kakkanas A, Bakiri L, Bartenschlager R, Mavromara P (2013) Hepatitis C virus core+1/ARF protein decreases hepcidin transcription through an AP1 binding site. *The Journal of general virology* 94(Pt 7): 1528–1534. DOI:10.1099/vir.0.050328-0
341. Miura K, Taura K, Kodama Y, Schnabl B, Brenner DA (2008) Hepatitis C virus-induced oxidative stress suppresses hepcidin expression through increased histone deacetylase activity. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 48(5): 1420–1429. DOI:10.1002/hep.22486
342. Ho E, Clarke JD, Dashwood RH (2009) Dietary sulforaphane, a histone deacetylase inhibitor for cancer prevention. *The Journal of nutrition* 139(12): 2393–2396. DOI:10.3945/jn.109.113332
343. Kalinin S, Polak PE, Lin SX, Braun D, Guizzetti M, Zhang X, Rubinstein I, Feinstein DL (2013) Dimethyl fumarate regulates histone deacetylase expression in astrocytes. *Journal of neuroimmunology* 263(1-2): 13–19. DOI:10.1016/j.jneuroim.2013.07.007
344. Poggiali E, Migone De Amicis M, Motta I (2014) Anemia of chronic disease: a unique defect of iron recycling for many different chronic diseases. *European journal of internal medicine* 25(1): 12–17. DOI:10.1016/j.ejim.2013.07.011
345. Martin J, Radeke HH, Dignass A, Stein J (2016) Current evaluation and management of anemia in patients with inflammatory bowel disease. *Expert review of gastroenterology & hepatology*: 1–14. DOI:10.1080/17474124.2017.1263566
346. Hoefnagel JJ, Thio HB, Willemze R, Bouwes Bavinck JN (2003) Long-term safety aspects of systemic therapy with fumaric acid esters in severe psoriasis. *Br J Dermatol* 149(2): 363–369. DOI:10.1046/j.1365-2133.2003.05433.x
347. Peng H, Guerau-de-Arellano M, Mehta VB, Yang Y, Huss DJ, Papenfuss TL, Lovett-Racke AE, Racke MK (2012) Dimethyl fumarate inhibits dendritic cell maturation via nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) and mitogen stress-activated kinase 1 (MSK1) signaling. *The Journal of biological chemistry* 287(33): 28017–28026. DOI:10.1074/jbc.M112.383380
348. Liu X, Zhou W, Zhang X, Lu P, Du Q, Tao L, Ding Y, Wang Y, Hu R (2016) Dimethyl fumarate ameliorates dextran sulfate sodium-induced murine experimental colitis by activating Nrf2 and suppressing NLRP3 inflammasome activation. *Biochemical pharmacology* 112: 37–49. DOI:10.1016/j.bcp.2016.05.002
349. Latz E, Xiao TS, Stutz A (2013) Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature reviews. Immunology* 13(6): 397–411. DOI:10.1038/nri3452
350. Casili G, Cordaro M, Impellizzeri D, Bruschetta G, Paterniti I, Cuzzocrea S, Esposito E (2016) Dimethyl Fumarate Reduces Inflammatory Responses in Experimental Colitis. *Journal of Crohn's & colitis* 10(4): 472–483. DOI:10.1093/ecco-jcc/jjv231
351. Stein J., Dienethal A., Maresch C., Radeke H. (2013) Safety And Efficacy of Fumaric Acid Esters (FAES) in Steroid Dependent Crohn`s Disease. UEG Week 2013 Poster Presentation. *United European Gastroenterology Jorunal* 1: A135-A587
352. Wang L, Trebicka E, Fu Y, Ellenbogen S, Hong CC, Babitt JL, Lin HY, Cherayil BJ (2012) The bone morphogenetic protein-hepcidin axis as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 18(1): 112–119. DOI:10.1002/ibd.21675
353. Chandrasekharan JA, Marginean A, Sharma-Walia N (2016) An insight into the role of arachidonic acid derived lipid mediators in virus associated pathogenesis and malignancies. *Prostaglandins & other lipid mediators* 126: 46–54. DOI:10.1016/j.prostaglandins.2016.07.009
354. Bennett M, Gilroy DW (2016) Lipid Mediators in Inflammation. *Microbiology spectrum* 4(6). DOI:10.1128/microbiolspec.MCHD-0035-2016

355. Ye L, Dinkova-Kostova AT, Wade KL, Zhang Y, Shapiro TA, Talalay P (2002) Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine. Pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans. *Clinica Chimica Acta* 316(1-2): 43–53. DOI:10.1016/S0009-8981(01)00727-6
356. Saha S, Hollands W, Teucher B, Needs PW, Narbad A, Ortori CA, Barrett DA, Rossiter JT, Mithen RF, Kroon PA (2012) Isothiocyanate concentrations and interconversion of sulforaphane to erucin in human subjects after consumption of commercial frozen broccoli compared to fresh broccoli. *Molecular nutrition & food research* 56(12): 1906–1916. DOI:10.1002/mnfr.201200225
357. Conzatti A, Froes FCTdS, Schweigert Perry ID, Souza CGd (2014) Clinical and molecular evidence of the consumption of broccoli, glucoraphanin and sulforaphane in humans. *Nutricion hospitalaria* 31(2): 559–569. DOI:10.3305/nh.2015.31.2.7685
358. Herr I, Lozanovski V, Houben P, Schemmer P, Buchler MW (2013) Sulforaphane and related mustard oils in focus of cancer prevention and therapy. *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)* 163(3-4): 80–88. DOI:10.1007/s10354-012-0163-3

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle Prof. Dr. Dr. Jürgen Stein für die Aufnahme als Doktorandin, die Überlassung des interessanten Themas und die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit. Vielen Dank für die stetige Diskussionsbereitschaft und anregenden Ideen, aber auch für den Freiraum eigene Ideen entwickeln und umsetzen zu können. Außerdem danke ich für die großzügige Unterstützung, die es mir ermöglichte an vielen nationalen sowie internationalen Kongressen teilnehmen zu können und somit Teile dieser Arbeit präsentieren und diskutieren zu können.

Ich danke Prof. Dr. Uwe Wenzel für die Betreuung meiner Arbeit im Fachbereich Ernährungswissenschaften der Justus-Liebig-Universität Giessen.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. Sandra Ulrich-Rückert. Vielen Dank für die Einführung in die Laborarbeit und die Geduld mit mir, die Überlegungen zur Weiterentwicklung des Projektes und die stetige Unterstützung. Danke für die ernährungswissenschaftlich fundierten Tipps zur Frühstücksauswahl, um für den Laboralltag bestens vorbereitet zu sein und für die vielen persönlichen Gespräche. Danke für den mentalen Zuspruch bei allen Hochs und Tiefs, die ich durchlebt habe. Es war immer schön zu wissen, dass jemand den gleichen Weg vorher schon einmal gegangen ist.

Dankeschön an Prof. Dr. Dieter Steinhilber für die Möglichkeit im Labor der pharmazeutischen Chemie arbeiten zu dürfen.

Vielen Dank an die gesamte Arbeitsgruppe Steinhilber für die tolle Arbeitsatmosphäre und den Zusammenhalt. Vor allem danke ich Dr. Kim Beilstein, Dr. Bianca Gilbert und Dr. Saskia Busch-Liles dafür, dass Sie mir zu Beginn sämtliche Methodik in der Zellkultur und der Laborarbeit mit Geduld beigebracht haben.

Vielen Dank an Jasmin Fettel und Ilona Schweighöfer für das wissenschaftliche Korrekturlesen dieser Arbeit und auch für das Ausleihen von Kaffeepads, falls keine eigenen mehr vorhanden waren. Ich werde unsere Kaffeepäuschen sehr vermissen inklusive aller anderen, die daran teilgenommen haben. Danke für die schöne Zeit bei Kaffee und Kuchen sowie in den Mittagspausen an Jasmin, Benni, Ilona, Isabelle, Ann-Katrin, Simon und Jessica. Danke auch für die schönen Stunden außerhalb des Labors. Danke an meine 2. Laborpartnerin Isabelle Maucher für die gemeinsamen Zeit im Labor, die geteilte Frustration und die fröhliche Art.

Ich danke allen Bachelor- und Masterstudenten sowie Praktikanten für die experimentelle Unterstützung.

Vielen Dank auch an Janet Collins, die mit viel Mühe jeden englischen Satz für Kongressbeiträge oder Paper geprüft und noch schöner formuliert hat. Danke auch für die Hilfe bei der Abstract-Einreichung und dafür, dass ich bei Problemen immer Hilfe bekommen habe.

„Das Einmalige an einer Freundschaft ist weder die Hand, die sich einem entgegenstreckt, noch das freundliche Lächeln, oder die angenehme Gesellschaft. Das Einmalige an ihr ist die geistige Inspiration, die man erhält, wenn man merkt, dass jemand an einen glaubt.“ (Ralph Waldo Emerson)

Vielen Dank an alle meine lieben Freunde im und außerhalb des Labors, die mich immer bestärkt haben und für mich da waren.

Am allermeisten danke ich meiner großartigen Familie Mama, Papa, Michael, Tanja, meiner Oma sowie Adrian. Ihr habt mich in Allem uneingeschränkt unterstützt, meine Launen ertragen, mich aufgebaut und mich an so manchen Wochenenden im Taubertal abgelenkt. Ich bin so unendlich dankbar und ein Glückskind euch zu haben.

Auch den letzten Ratschlag meines Opas „nicht abzuschreiben“ habe ich natürlich beim Zusammenschreiben dieser Arbeit beherzigt.

10. Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Julia Martin

M.Sc. Ernährungswissenschaften

Vorträge und Posterpräsentationen

Martin J, Ulrich-Rückert S, Stein J: 15d-PGJ₂ as a new regulator of hepcidin expression and its involvement in iron metabolism. Final ID: P0250; United European Gastroenterology Week (UEGW), 15.-19. Oktober 2016, Wien, Österreich. „**UEG Travel Grant**“ im Wert von 1000€ als Basic Scientist.

Martin J, Ulrich-Rückert S, Stein J: 15-d-PGJ₂ – a possible regulator of iron metabolism. Final ID: Su1774; Digestive Disease Week (DDW), San Diego, 21.-24. Mai 2016

Martin J, Ulrich-Rückert S, Stein J: 15-d-PGJ₂ – a possible regulator of iron metabolism. 11th congress of ECCO-Inflammatory Bowel Diseases, Amsterdam, 16.-19. März 2016

Martin J, Ulrich-Rückert S, Stein J: Activators of the transcription factor Nrf2 as new regulators of hepcidin expression. Final ID: P1222. United European Gastroenterology Week (UEGW), 24.-28. Oktober 2015, Barcelona, Spanien. „**UEG Travel Grant**“ im Wert von 1000€ als Basic Scientist. Auswahl zur Spezial-Session „**Posters in the Spotlight**“; **Preis für den besten Vortrag**.

Martin J, Ulrich-Rückert S, Stein J; Viszeralmedizin, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten mit Sektion Endoskopie (DGVS), 16.-19. September 2015, Leipzig

- ID (freier Kurzvortrag 1): FV 25; Titel: Aktivatoren des Transkriptionsfaktors Nrf2 als neue Regulatoren der Hepcidin Expression
- Vortrag 2: Programm der Arbeitsgruppe „Epitheliale Transport- und Barrierefunktionen in Darm und Leber“; Titel: Regulation der intestinalen Eisenresorption: Nrf2-abhängige Regulation von Hepcidin

Martin J, Ulrich-Rückert S, Stein J: New insights in iron homeostasis and inflammatory diseases: Oncostatin M as a new player. Digestive Disease Week (DDW), Washington D.C., 16-19. Mai 2015
Reisestipendium des Instituts Danone Ernährung für Gesundheit e.V. im Wert von 500€

Martin J: Vortrag auf der „Winter School 2015“ mit dem Else Kröner-Fresenius-Graduiertenkolleg Frankfurt, 23.-27. Februar 2015, Obergurgl, Österreich

Titel: New aspects of molecular mechanism of anemia of chronic inflammation

Martin J, Fischer B, Steinhilber D, Stein J, Ulrich-Rückert S: Isothiocyanate Sulforaphane inhibits expression of the central iron regulator hepcidin in an inflammatory cell model. Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutische Gesellschaft e.V. (DPHG), Frankfurt a.M., 24.-26. September 2014

- Martin J**, Stein J: Oncostatin M ein neuer/alter Regulator der Eisenhomöostase. Vortrag bei der Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Viszeralmedizin (DGVS), Leipzig, 17.-20. September 2014
- Fischer B, **Martin J**, Steinhilber D, Ulrich-Rückert S, Stein J: Adiponectin antagonises leptin-induced hepcidin expression in human liver cells: new insights into obesity-associated iron deficiency. Posterpräsentation auf der Digestive Disease Week (DDW) in Chicago, 3.-6. Mai 2014
- Martin J**, Müller A, Waechtershaeuser A, Blumenstein I, Brenner M, Stein J.: Long-term effects of an interdisciplinary 52-week weight loss program on adipokines and nonalcoholic fatty liver disease in obese patients – a prospective evaluation. Vortrag bei der United European Gastroenterology Congress Week (UEGW) in Berlin, 12.-16. Oktober 2013
- Martin J**, Müller A, Waechtershaeuser A, Blumenstein I, Brenner M, Stein J.: Langzeiteffekt eines interdisziplinären 52-wöchigen Gewichtsreduktionsprogramms auf Adipokine und die nichtalkoholische Fettlebererkrankung in adipösen Patienten - eine prospektive Auswertung. Posterpräsentation bei Nutrition in Zürich, 6.-8. Juni 2013
- Martin J**, Müller A, Waechtershaeuser A, Blumenstein I, Brenner M, Stein J.: Long-term effects of an interdisciplinary 52-week weight loss program on adipokines and nonalcoholic fatty liver disease in obese patients – a prospective evaluation. Posterpräsentation bei der Digestive Disease Week, Orlando, 18.-21. Mai 2013
- Martin J**, Geisel T, Maresch C, Krieger K, Stein J. Vortrag bei der United European Gastroenterology Congress Week (UEGW), Amsterdam, 20.-24. Oktober 2012
- Martin J**, Geisel T, Maresch C, Krieger K, Stein J. Vortrag bei der Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Viszeralmedizin, Hamburg, 19.-22. September 2012
- Martin J**, Geisel T, Maresch C, Krieger K, Stein J. Vortrag bei der gemeinsamen Tagung von DGEM, AKE, GESKES und VDO_E, Ernährung 2012 in Nürnberg, 14.-16. Juni 2012

Publikationen

- Martin J**, Radeke HH, Dignass AU, Stein J. *Current evaluation and management of anemia in patients with inflammatory bowel disease*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2016 (In Press).
- Bach M, Geisel T, **Martin J**, Schulze B, Schaefer R, Virgin G, Stein J. *Efficacy and Safety of Intravenous Ferric Carboxymaltose in Geriatric Inpatients at a German Tertiary University Teaching Hospital: A Retrospective Observational Cohort Study of Clinical Practice*. Anemia, 2015.
- Geisel T, **Martin J**, Schulze B, Schaefer R, Bach M, Virgin G and Stein J. *An Etiologic Profile of Anemia in 405 Geriatric Patients*. Anemia, 2014.
- Martin J**, Geisel T, Maresch C, Krieger K, Stein J. *Inadequate nutrient intake in patients with celiac disease: results from a german dietary survey*. Digestion, 2013. **87**(4): p. 240-6.