

Ingo Ganzleben
Dr. med.

Regulation von Hepcidin durch extrazelluläres und intrazelluläres H₂O₂

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktormutter: Frau Priv.-Doz. Dr. med. G. Millonig

Hepcidin ist das zentrale Eisen regulierende Hormon. Es wird in der Leber gebildet und führt durch Bindung an den Eisentransporter Ferroportin zu dessen Abbau. Deshalb werden mit Ausschüttung von Hepcidin die Eisenresorption im Dünndarm und die Eisensfreisetzung aus Makrophagen verhindert und der Serumeisenspiegel sinkt in der Folge.

Neben gefüllten Eisenspeichern führen auch andere Signale zur Hepcidinausschüttung: BMP-6 ist relevant für die Hepcidinbasierte Sekretion und inflammatorische Zytokine wie zum Beispiel IL-6 führen zur Hepcidininduktion während entzündlicher Vorgänge.

Im Rahmen von Entzündungsprozessen wird des Weiteren vermehrt H₂O₂ freigesetzt, wobei die Kombination von Eisen und H₂O₂ zur toxischen Fenton-Reaktion führt. Daher erscheint eine Verbindung beider Substanzen wahrscheinlich und es sollte in der vorliegenden Arbeit ein wichtiger Interaktionspunkt, nämlich die Rolle von H₂O₂ in der Regulation von Hepcidin, untersucht werden.

Um den Einfluss von extrazellulärem H₂O₂ auf Hepcidin zu untersuchen, wurden HuH-7 Hepatomzellen mit H₂O₂ in niedriger, konstanter Konzentration (0,3 bis 6 µM) behandelt. Diese niedrige und konstante Konzentration (Steady State H₂O₂, [H₂O₂]_{ss}) wurde durch eine Kombination der zwei Enzyme Glucose-Oxidase und Katalase im Zellkulturmedium erreicht, wobei die Kombination es ermöglicht über 24 Stunden pathophysiologisch relevante H₂O₂-Konzentrationen zu erzeugen.

Mittels quantitativer Real-Time PCR und Luciferase-Assays konnte gezeigt werden, dass [H₂O₂]_{ss} Hepcidin induziert. Beachtlich ist dabei insbesondere die hohe Sensitivität des Hepcidinpromoters mit einer Ansprechbarkeit bereits ab einer Konzentration von 1,5 µM [H₂O₂]_{ss}.

Mit N-Acetylcystein konnte der [H₂O₂]_{ss}-Effekt auf Hepcidin komplett neutralisiert werden. Eine Kombination von klassischen Induktoren des Hepcidins (IL-6 und BMP-6) mit [H₂O₂]_{ss} führte jeweils zu superadditiven Effekten in der Hepcidininduktion.

Nachdem gezeigt wurde, dass extrazelluläres H₂O₂ zu einer Induktion von Hepcidin führt, wurde als Nächstes die Rolle von intrazellulärem H₂O₂ in der Hepcidinregulation untersucht. Hierfür wurde der intrazelluläre H₂O₂-Spiegel durch Blockade der mitochondrialen Atmungskette mit Antimycin A erhöht, beziehungsweise der intrazelluläre Glutathionpool mit N-Acetylcystein erhöht respektive mit Buthionine-sulfoximine (BSO) erniedrigt, was zu einer jeweils gegenläufigen Veränderung des intrazellulären H₂O₂-Spiegels führte.

Dabei zeigte sich stets eine gleichsinnige Veränderung von intrazellulärem H₂O₂-Spiegel und Hepcidin: Erhöhte H₂O₂-Konzentrationen führten jeweils zu erhöhten Hepcidinspiegeln.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sowohl extrazelluläres als auch intrazelluläres H₂O₂ zu einem Hepcidinanstieg führen.

Insbesondere konnte dabei belegt werden, dass extrazelluläres H₂O₂ sowohl allein als auch in Kombination mit Zytokinen, einer Konstellation die unter entzündlichen Konditionen auftritt, zu einer Hepcidininduktion führen kann.

Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass die Veränderungen des intrazellulären H_2O_2 -Spiegels ebenfalls eine Wirkung auf Hepcidin haben, was wiederum eine Rolle von intrazellulären, metabolischen Vorgängen in der Eisenregulation nahelegt.