

Nikolai Benedikt Schmeer
Dr. med.

Iron-sensing in hepatocytes - establishing adeno-associated virus-mediated transgene delivery into primary murine hepatocytes to study the molecular interactions controlling systemic iron homeostasis.

Fach: Kinderheilkunde

Doktormutter: Prof. Dr. phil. nat. Martina Muckenthaler

Das in der Leber synthetisierte Peptidhormon Heparin ist der zentrale Regulator der systemischen Eisenhomöostase. Um die Balance zwischen ausreichender Eisenzufuhr für lebensnotwendige Prozesse und den toxischen Auswirkungen überschießender Eisenakkumulation zu halten, kontrolliert es die Bereitstellung von Eisen in Abhängigkeit von diversen internen und externen Faktoren, wie beispielsweise der Verfügbarkeit von Eisen in den Nährstoffen, dem Eisenbedarf für die Erythropoese oder dem Vorhandensein entzündlicher Prozesse im Organismus. Eine Dysregulation der Heparin-Expression kann zu schwerer Eisenüberladung oder zu schwerem Eisenmangel führen. Die Proteine HFE (high Fe), Transferrin-Rezeptor 2 (TfR2) und Hämajuvelin (HJV) bilden einen Proteinkomplex in der Zellmembran von Hepatozyten, der die systemische Verfügbarkeit von Eisen erfasst. Die hereditäre Hämochromatose ist eine Erbkrankheit, bei der es zu Organschädigungen in Folge fortschreitender Eisenakkumulation kommt. Ihr liegen Mutationen in den Genen für HFE, TfR2 und HJV zugrunde. Sie sind Aktivatoren der Heparin-mRNA-Expression und entsprechend verringern Mutationen dieser Hämochromatose-assoziierten Proteine die Aktivität des BMP/SMAD-Signalwegs, welcher hauptverantwortlich ist für die Kontrolle der Heparin- mRNA-Expression in Reaktion auf die systemische Verfügbarkeit des Elementes Eisen. Obwohl das Proteinnetzwerk in der hepatozytischen Zellmembran, welches die Heparin-Expression steuert, Gegenstand intensiver Forschung ist, bleiben die genauen molekularen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen HFE, TfR2 und HJV und dem nachgeschalteten Signalweg unklar.

Um zur Entschlüsselung dieses an der Heparin-Aktivierung beteiligten molekularen Netzwerkes beizutragen, waren in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Martina Muckenthaler im Rahmen eines Protein-Screeningverfahrens die durch einen Pulldown-Assay gewonnenen Co- Präzipitate von HFE in Lysaten von Huh7-Zellen analysiert worden, in welchen zuvor mit Epitop-Tags markierte Versionen von HFE, TfR2 und HJV durch transiente Transfektion überexprimiert worden waren. Im ersten Teil meines Promotionsprojektes wurden die aus diesem Screening als potentielle Interaktionspartner von HFE, TfR2 und HJV hervorgegangenen Kandidaten auf ihre tatsächliche Interaktion mit dem Proteinkomplex hin überprüft. In den hierzu durchgeführten Immunpräzipitationsstudien konnte diese jedoch für keines der untersuchten Proteine nachgewiesen werden.

Da primäre Hepatozyten im Vergleich zu immortalisierten Zelllinien ein deutlich physiologischeres Modell darstellen, jedoch nur sehr ineffektiv transient transfiziert werden können, beschäftigte ich mich im zweiten Teil meines Projektes mit der Etablierung eines experimentellen Systems zur Transgen-Expression in primären murinen Hepatozyten zum Zwecke der Durchführung neuerlicher Pulldown-Assays. Hierzu klonierte ich Expressionsvektoren, welche mit Epitop-Tags versehene Versionen von murinem HFE, TfR2 und HJV enthalten und zum Gentransfer mittels Transduktion durch Adeno-assoziierte Viren (AAVs) geeignet sind. Diese AAV-Vektoren wurde erfolgreich angewandt um rekombinantes HFE und TfR2 in primäre murine

Hepatozyten zu transduzieren. Um die Expression der Transgene in den Wirtszellen zu verbessern wurden verschiedene AAV-Serotypen und Inkubationszeiten angewandt und deren Effekte auf die Transduktionseffizienz verglichen. Diese Experimente dienen als Basis für weitere Optimierungen, die eine effiziente Transduktion von HFE, TfR2 und HJV in primäre murine Hepatozyten zum Ziel haben.

Zusammenfassend beabsichtigte ich mit meiner Arbeit zur Identifikation neuer Interaktionspartner der Proteine HFE, TfR2 und HJV beizutragen, welche als Teil eines Proteinkomplexes in der hepatozytischen Zellmembran die Genexpression des Peptidhormons Heparin in Abhängigkeit von der systemischen Verfügbarkeit von Eisen kontrollieren. Ich konnte mit meiner Arbeit einen bedeutenden Beitrag zur Optimierung einer Methode der Transgen-Expression in primären murinen Hepatozyten via Transduktion durch Adeno- assoziierte Viren leisten. Jedoch konnten trotz der erfolgreichen Expression von Transgenen durch AAVs in primären murinen Hepatozyten nur niedrige Transduktionseffizienzen erreicht werden. Die in vivo Anwendung von AAVs an Wildtyp-Mäusen hat das Potential, die Transduktionseffizienz in murinen Hepatozyten drastisch zu verbessern und ist ein vielversprechender Ansatz, durch den die Einschränkungen der vorliegenden Studie in der Zukunft überwunden werden könnten.