

Doktori (PhD) értekezés

**A vasanyagcsere vizsgálata krónikus
gyulladásos bélbetegségben és az
RNáz L Inhibitor funkcionális vizsgálata**

dr. Nagy Judit

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok
Doktori Iskola vezetője: prof. dr. Komoly Sámuel

Program: Anyagcsere és endokrin megbetegedések klinikuma és
pathobiokémiája

Program vezetője: prof. dr. Kovács L. Gábor

Témavezető: dr. Sipos Katalin



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Laboratóriumi Medicina Intézet

Pécs, 2011.

Tartalomjegyzék

Ábrák jegyzéke	5
Táblázatok jegyzéke	6
Rövidítések jegyzéke	7
1. Bevezetés	8
1.1. A vasanyagcsere	8
1.2. A hepcidin, a vasanyagcserét szabályozó hormon . .	11
1.3. Gyulladásos bélbetegségek	17
1.4. Az RNáz L Inhibitor	19
1.5. Az unfolded protein response	20
2. Célkitűzések	24
3. Anyagok és módszerek	25
3.1. Szérum prohepcidin szint meghatározása	25
3.2. Felhasznált sejtvonalak	26
3.2.1. Élesztő sejtvonalak	26
3.2.2. Humán sejtvonalak	27
3.3. Általános molekuláris biológiai módszerek	27
3.3.1. Tranziens transzfekció	28
3.3.2. Western-blot analízis	28
3.3.3. Riboszómális RNS-ek vizsgálata Northern blot analízissel	28
3.3.4. Real time PCR	29
3.4. Az Rli expresszió változtatása humán sejtvonalak- ban	30
3.5. Transzláció vizsgálata HeLa sejtekben	31
3.6. Humán/élesztő kimérák	31

3.7. Tet-Rli sejtek komplementációs vizsgálata	31
3.8. Unfolded protein response aktivációja	32
4. Eredmények	33
4.1. Szérum prohepcidin meghatározása colitis ulcerosa és Crohn betegség szérumából	33
4.2. Az RNáz L Inhibitorral végzett kísérletek	37
4.2.1. A humán és az élesztő Rli fehérje szekvenciájának összehasonlító vizsgálata	37
4.2.2. A TeT-Rli sejtek komplementációs vizsgálata	38
4.2.3. Humán/élesztő kimérák	39
4.2.4. Az Rli kiméra fehérjék hatása a riboszómális RNS-ek mennyiségére Tet-Rli sejtekben	40
4.2.5. Az Rli fehérje mennyiségének csökkentése	41
4.2.6. Az Rli depléció hatása a fehérjeszintézisre	43
4.2.7. Az Rli depléció hatása a riboszómális komponensekre	44
4.2.8. Rli depléció hatása az unfolded protein response-ra	45
4.3. UPR aktiváció hatása a hepcidin szintre	46
5. Megbeszélés	48
5.1. Szérum prohepcidin meghatározás Crohn betegségben és colitis ulcerosában szenvedőknél	48
5.2. RNáz L inhibitorral végzett kísérleteink	51
6. Összefoglalás	55
Köszönetnyilvánítás	57
Hivatkozások	58

Publikációs jegyzék	62
A disszertáció alapját alkotó közlemények	62
Témához kapcsolódó egyéb tudományos közlemények . . .	62
Referált folyóiratban megjelent absztraktok	63
Témához kapcsolódó kongresszusi poszterek	63
Előadások	67

Ábrák jegyzéke

1. A vas útja a szervezetben	9
2. A hepcidin expresszióját befolyásoló szignálok és jelátviteli utak	14
3. A hepcidin hatásai a különböző szervekben	16
4. Az unfolded protein response sematikus ábrája	21
5. Az UPR aktiválódás kimutatása valós idejű PCR-rel	30
6. A prohepcidin és a transferrin közötti korreláció colitis ulcerosás és Crohn betegeknél	35
7. A humán és a pékélesztő RNáz L Inhibitor génszek- venciájának az összehasonlítása	37
8. Élesztő/humán kimérák sematikus aminosav szek- venciája	39
9. Transzformált Tet-Rli sejtek	40
10. Riboszómális RNS-ek mennyisége transzformált Tet- Rli sejtekben	41
11. Rli expresszió vizsgálata HeLa sejtekben	42
12. S ³⁵ -metionin beépülés detektálása RAS és Rli dicer kezelést követően	43
13. Northern blot és real time PCR analízis HeLa sejtek- ben Rli antiszensz kezelést követően	44
14. Real time PCR HeLa sejtekből az UPR aktivációja Rli antiszensz, tapszigargin és együttes kezelését követően	46
15. Real time PCR HeLa sejtekből, ER stressz indukció- ját, Rli deplécióját és együttes kezelésüket követően	47

Táblázatok jegyzéke

1. Crohn betegségben, colitis ulcerosában szenvedők és az egészséges kontroll csoport laboratóriumi paraméterei 34
2. Gyulladásos laborértékek és a prohepcidin szint közötti összefüggés vizsgálata 36
3. Crohn betegségben és colitis ulcerosában szenvedő betegek laboratóriumi paraméterei és a szérumban prohepcidin szint közötti korelláció vizsgálata 36
4. A Tet-Rli sejtek komplementációs vizsgálata 38

Rövidítések jegyzéke

ABC	ATP binding cassette
ATF6	activating transcription factor 6
c/EBP α	CCAAT/enhancer-binding protein alpha
CREBH	ciklikus AMP response element-binding protein H
DCYTB	duodenális citokróm b
DMT1/Nramp2	divalens metál transzporter 1
DTT	dithiothreitol
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMEM	Eagle's minimal essential medium
EOR	endoplasmatic reticulum overload response
ER	endoplazmatikus retikulum
FBS	foetal bovin serum
HAMP	hepcidin antimikrobiális peptid
IL-6	interleukin-6
IRE	iron responsive element
IRP	iron regulatory protein
LPS	lipopoliszacharid
MMD	élesztő minimal medium táptalaj
NBD	nukleotid-kötő domén
NOD2/CARD15	nucleotide-binding oligomerization domain containing 2/caspase recruitment 15
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
Rli	RNáz L inhibitor
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrilamid gel electrophoresis
SERCA	sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TfR	transzferrin receptor
UPR	unfolded protein response
UPRE	unfolded protein response element
XBP1	X box binding factor 1
YNB	yeast nitrogen base
YPD	szénforrásként glükózt tartalmazó gazdag élesztő táptalaj

1. Bevezetés

A hepcidin a ma ismert egyetlen vasanyagcserét szabályozó hormon. Klinikai jelentősége is nagy, hiszen számos kórkép, így többek között a krónikus gyulladásokat kísérő anémia és a vastülkínálat miatt kialakuló hemokromatózis létrejöttében is fontos.

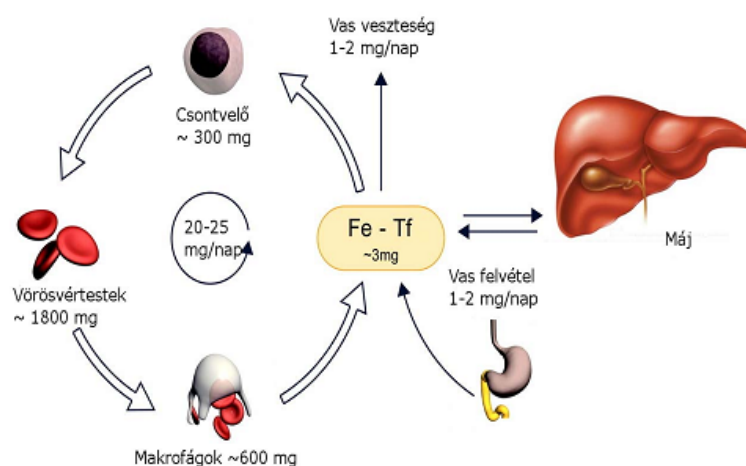
A vas szintje minden szervezetben szigorúan szabályozott. A sejtekben zajló szintetikus folyamatok közül a hem és a vas-kén komplexek szintézisében nélkülözhetetlen. Számos enzimátikus folyamathoz elengedhetetlen és a sejtek redox állapotát is befolyásolja. Kísérleteim két fő témakörben zajlottak: 1/ A hepcidin előalakjának, a prohepcidinnek a szérum szintjét vizsgáltam krónikus bélgyulladásban szenvedő betegeknél. 2/ Egy esszenciális vas-kén fehérje, az RNáz L inhibitor (Rli) humán sejtekben betöltött szerepét és a hepcidinnel való esetleges kapcsolatát kerestem.

1.1. A vasanyagcsere

A vas a legrégebben ismert esszenciális elemek egyike. Központi szerepet tölt be több folyamatban is, így az oxigén szállításában és raktározásában, az elektronok szállításában, az oxidatív anyagcserében, a sejtek növekedésében és osztódásában.

Az emberi szervezet átlagos vastartalma férfiakban 3–4 g, nőkben kis mértékben kevesebb, 2–3 g. Ez a különbség a testméretekkel és a nők lényegesen kisebb vasraktáraival magyarázható. A szervezet vastartalma két nagy részre, aktív metabolikus és raktározott vasra osztható fel. A vaskészlet kb. 70%-a hemoglobinban, 5%-a mio-globinban, 4%-a szöveti enzimekben (hem és nem hem formában) található, 15%-ban a szövetekben ferritinként és 6%-ban hemoszi-

derinként raktározódik. Ezrelékes mennyiségben nem kötött vasat is találhatunk a vérben.



1. ábra. A vas útja a szervezetben.

Az elfogyasztott táplálék vastartalmának csak igen kis hányada, 5–10%-a szívódik fel a duodenumban, kisebb mértékben a jejunumban. Ez az arány vashiány vagy fokozott igény esetén 20–30%-ra növekedhet. Minden olyan körülmény ezt elősegíti, amely a vasat oldott állapotban és ferro (Fe^{2+}) formában tartja. A táplálékkal bejutott Fe^{3+} ionokat a duodenális citokróm b (DCYTB) Fe^{2+} -vé redukálja. Az enterociták a hem vasat is képesek felvenni, a hasítás csak a sejten belül következik be (Anderson és mtsai, 2009). A duodenális enterociták apikális membránjában helyezkedik el egy, a vas felvételért is felelős transzporter, a DMT1/Nramp2 (divalens metál transzporter 1) (Iolascon és De Falco, 2009). Ez a fehérje végzi az eritrociták endoszómáiból a citoplazmába történő vasszállítást is. Hiányában a Fe-transzferrinről leváló vasat az eritrociták az endoszómákból nem képesek a citoszólba juttatni és a vas nem tud a hemoglobinba

beépülni. Az enterocitába jutott vasat a szervezet az igényeknek megfelelően raktározza, vagy a ferroportin vas exporteren keresztül a véráramba juttatja. A ferroportinon keresztül kijutott Fe^{2+} ionokat a hefesztin oxidálja a transferrin számára felvehető Fe^{3+} ionokká (Kemna és mtsai, 2008).

A vas a vérben egy 80000 molekulatömegű β -globulinhoz, a transferrinhez kötve kering, mely molekulánként két Fe^{3+} iont képes megkötni, ezek leadását követően újabb ionokat köt. Ez a fehérje a májban képződik, féléletideje 8–10 nap. Normálisan a kötőkapacitás $\frac{1}{3}$ része telített vassal, de a szérum vasszintek diurnális ingadozását is figyelembe kell vennünk, legmagasabb reggel és legalacsonyabb este. A kötött vas a transferrin receptoron (TfR) keresztül jut be a sejtekbe receptor mediálta endocitózissal (Nemeth és mtsai, 2006). Az így létrejött endoszóma a sejten belül egy savas vezikulummal egyesül, ebben az acidotikus közegben a vas könnyen ledisszociál, majd a DMT1 az endoszóma membránján keresztül a citoplazmába juttatja, ahol felhasználásra kerül vagy raktározódik. Ezután a transferrin receptor ismét a sejt felszínére kerül, a transferrin is ledisszociál és mindkét fehérje ismét képes betölteni a funkcióját (Nemeth és mtsai, 2006).

Szervezetünkben legnagyobb mennyiségű vas a májban raktározódik hemosziderin vagy ferritin formájában, utóbbiból szükség esetén gyorsan mobilizálható. Ezek a raktárak biztosítják, hogy annak ellenére, hogy a vasszükséglet jelentős diurnális ingadozást mutat, a szérum vas szintje relatíve állandó (Theil és Goss, 2009).

Naponta 25–30 mg vasra van szükségünk az eritropoézishez, ennek jelentős része recirkularizáció révén az elhalt és a makrofágokban lebomló vörösvértestekből származik. A makrofágok hemoglobin-haptoglobin komplex, szabad hemoglobin, hem-

hemopexin komplex, vagy szabad hem formájában képesek felvenni a vasat. A felesleget hasonlóan a májsejtekhez, ferritinhez vagy hemosziderinhez kötött formában raktározzák. A csontvelőben zajló eritropoézist a vese által termelt eritropoetin, közvetve a szérum vastartalma szabályozza (Hentze és mtsai, 2004).

Klinikailag jóval ritkább esetben fordul elő vastúltelítettség, mint vashiány. Előbbi esetben a nem hemhez kötött és a nem transzferinhez kötött vas is megjelenik a keringésben. Ez elsősorban a szív és a máj szöveteibe jut, ahol felhalmozódik (Dunn és mtsai, 2007). Máig nem tisztázott, hogy melyek azok a transzporterek, receptorok, amelyek a nem hemhez kötött vas felvételét végzik, szabályozzák. Egy lehetséges jelölt a Zip 14 receptor, mely a cinken kívül ezt a formátumú vasat is képes a májsejtekbe juttatni.

Vashiányos állapot három fő mechanizmussal alakulhat ki: 1. a vas nem jut be a szervezetbe, ezt hívjuk primer vashiányos anémiának. 2. bejut a vas, de hemoglobinnal, vérrel kiürül, ez a szekunder vashiányos anémia. 3. a vas bejut a szervezetbe, de az inflammatorikus válasz miatt blokkolódott, nem jut el az eritropoézishez, így létrejön a funkcionális vashiány. A három etiológia kombinálódhat is, mint azt a gyakorlatban sokszor látjuk.

1.2. A hepcidin, a vasanyagcserét szabályozó hormon

A vasanyagcserét szabályozó faktorok egyike az ezredfordulón azonosított hepcidin. Először mint egy, a máj által termelt, a baktériumok életciklusát gátló peptidet azonosították, ezen antimikrobiális hatása miatt kapta a nevét is: **hepatic bacteriocidal protein** (Park és mtsai, 2001). Mára már ismert, hogy a májon kívül más szervekben, többek között a vesében, szívben, tüdőben, duodenumban, nyirokcsomókban is szintetizálódik ez a fehérje (Krause és mtsai,

2000). A hepcidin génjét felfedezése után Pigeon HEPC-nek nevezte el, de a későbbiek során ez módosult, hivatalosan a HAMP (hepcidin antimikrobiális peptid) nevet kapta. Az is rövid időn belül nyilvánvalóvá vált, hogy a hepcidin fő funkciója a szervezet vas homeosztázisának biztosítása, azaz egy hormonról van szó. A humán hepcidin génje (HAMP; OMIM 606464) a 19-es kromoszómán helyezkedik el (19q13.1), 3 exonból és 2 intronból áll (Pigeon és mtsai, 2001). Más peptid hormonokhoz hasonlóan prepro formában képződik, amely egy 24 aminosav hosszúságú szignálszekvenciát tartalmaz, mely az endoplazmatikus retikulumhoz irányítja a fehérjét. Ennek a lehasadását követően a 60 aminosav nagyságú propeptid további érési folyamatokon megy át a Golgi-apparátusban. Végző, érett formáját egy, a szerin peptidázok közé tartozó furin által végzett hasítás következtében nyeri el. A szérumban mind az érett, funkcióképes 25 aminosav hosszúságú hormon, mind a prohormon forma kimutatható. 20 és 22 aminosav hosszúságú hepcidint mutattak ki a vizeletből, mely az érett forma N terminálisáról 5, ill. 3 aminosav lehasadásával jön létre, ezek antimikrobiális, antifungális hatása nagyobb mértékű, mint a 25 aminosav hosszúságú hepcidiné.

A hepcidin szekvenciáját vizsgálva elmondható, hogy méretéhez képest magas arányban tartalmaz ciszteineket, melyek között 4 diszulfid híd létrejötte stabilizálja a peptid struktúráját. Hunter és munkatársai a hepcidin szerkezetét két-dimenziós NMR spektroszkópiával elemezték (Schibli és mtsai, 2002). Ennek segítségével megállapították, hogy a diszulfid hidak alapvetően meghatározzák a molekula térszerkezetét. A két egymásra fekvő β -lemez egy hajtúre hasonlít, amelynek két szárát a diszulfid hidak kötik össze, kialakítva ezzel egy létraszerű alakzatot. Az NMR spektroszkópiás eredmények szerint, a hajtú hurok, valamint az ehhez közel elhe-

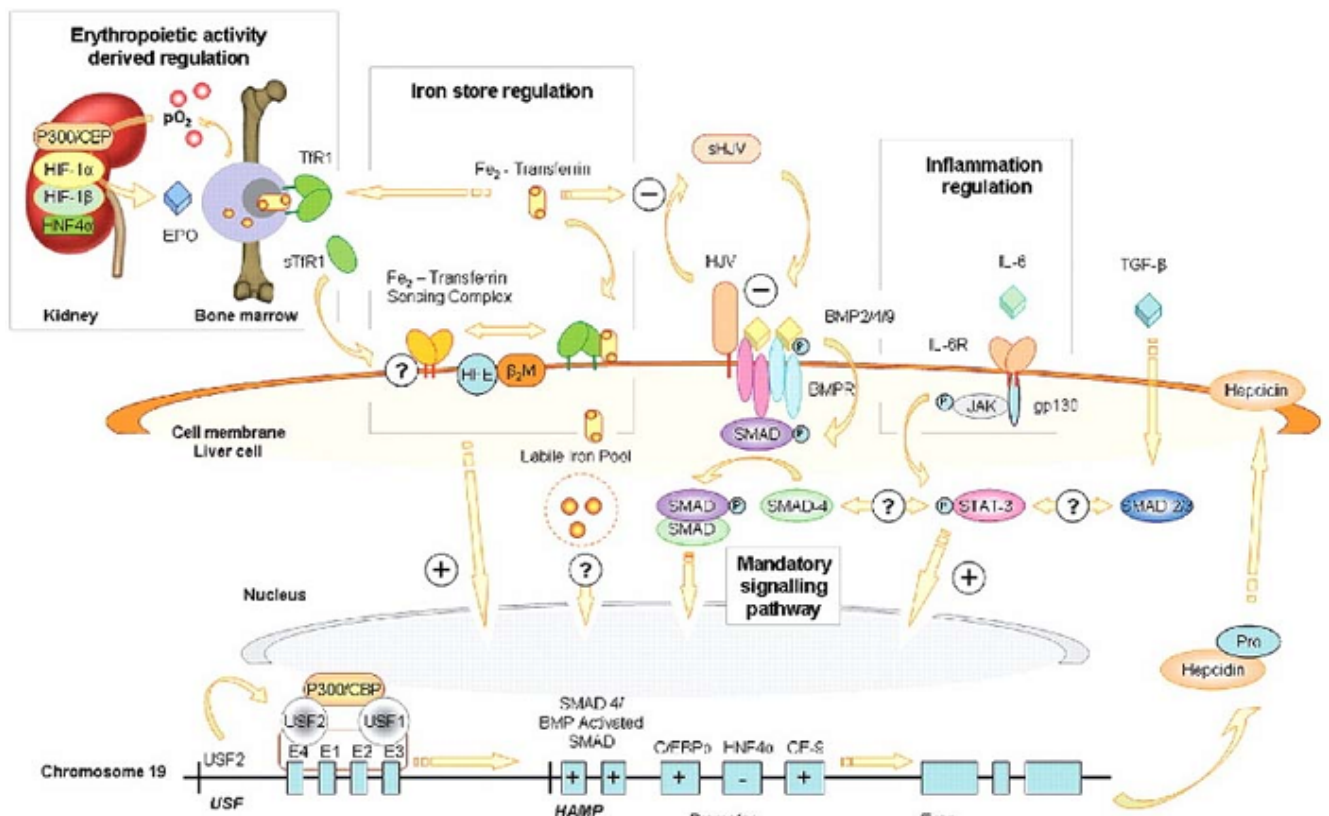
lyezkedő egyik diszulfid híd alakítja ki a molekula (a ferroportin kötődéséhez szükséges) aktivitásáért leginkább felelős domént.

A hepcidin expressziója legnagyobb mennyiségben a májban történik, de májon belül is elkülönülnek a prohepcidin termelő, illetve nem termelő sejtek csoportjai. A prohepcidin termelő májsejtek a portális vénák köré csoportosulnak, és számuk a centrális vénák felé nagymértékben lecsökken. Ennek a zonalitásnak az lehet a magyarázata, hogy a portális vénán keresztül érkezik a gyomor-bélhuzam felől a májba és az itt lévő májsejtekkel érintkezik először a vasban gazdag vénás vér (Kulaksiz és mtsai, 2004).

Már az első hepcidinnel foglalkozó közleményekből ismert, hogy a hepcidin mRNS expressziója növekedését mutat, ha a szervezetet, sejteket gyulladásos noxa éri, vagy vastülterhelés áll fenn. Ezt az eredményt kapták az állatmodelleken és az in vitro körülmények között végzett kísérletekben egyaránt (Roy és Andrews, 2005). Vas kezelés hatására a prohepcidin és az érett hepcidin mennyisége szintén növekedik a szérumban és a vizeletben is. Egerekben már ismert volt a lipopoliszacharid (LPS) kezelés pozitív hatása a hepcidin expressziójára, így Németh és munkacsoportja megvizsgálta az LPS kezelés hatását humán hepatoma sejtvonalakon is, de az ő eredményeik nem mutatták a szignifikáns növekedést a hepcidin expressziójában. Ugyanakkor, ha az emberi sejteket LPS adásával indukált monociták felülúszójával kezelték, látható volt a hepcidin termelésében a jelentős emelkedés. Ezzel a kísérlettel a monociták által termelt egyik anyag, az IL-6, közvetlen, a peptid szintézisére gyakorolt hatását igazolták (Lee és mtsai, 2005, 2004; Németh és mtsai, 2004). Nicolas és munkatársai megfigyelték azt is, hogy egerekben a hepcidin mRNS expressziója a májban nemcsak anémia, hanem oxigén hiány hatására is csökken. Ebből arra következtettek,

hogy ha a szervezetben hipoxia áll fenn, vagy a szervezet anémiás, az eritropoetin termelése fokozódik, valamint ezzel párhuzamosan a hepcidin gén expressziója csökken.

A hepcidin szintézist szabályozó faktorok és molekulák azonosítása érdekében végzett kísérletek eredményeként számos molekulát és jelátviteli utat azonosítottak, de a teljes folyamat még nem ismert. Jelenlegi ismereteink alapján négy szabályozó útvonal vezérli a máj hepcidin termelését: 1. a vasraktár függő, 2. az eritropoetikus aktivástól függő, 3. a gyulladástól függő és 4. a végrehajtó jelátviteli útvonal (2. ábra).



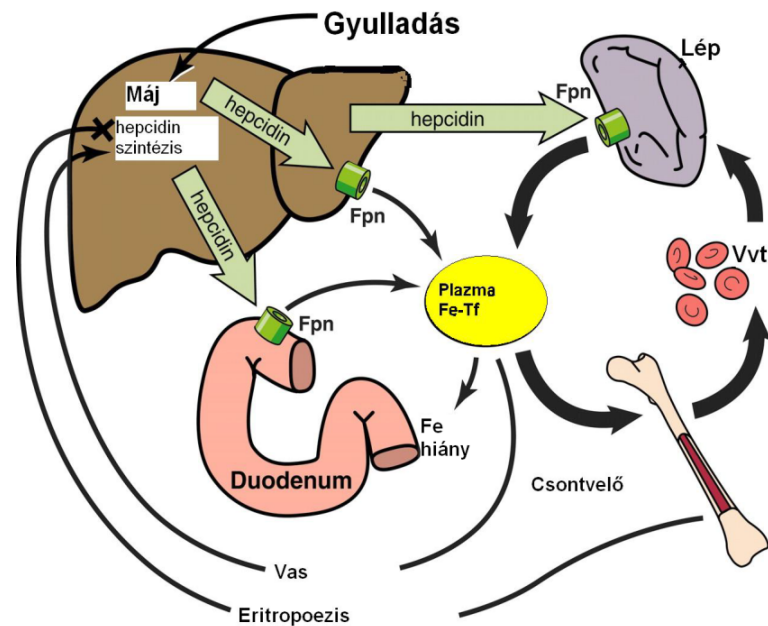
2. ábra. A hepcidin expresszióját befolyásoló szignálok és jelátviteli utak (Kemna és mtsai, 2008).

Vecchi és munkatársai igazolták egereken végzett kísérleteikkel, hogy a hepcidin expressziójára nemcsak az extracelluláris változások vannak hatással, hanem az endoplazmatikus retikulum (ER) stressz is, mely a hormon fokozott expressziójához vezet. Ez a megemelkedett szint vezet vashiányhoz és a vas lépben történő szekvesztációjához. Egy, az ER stressz asszociált, máj specifikus transzkripció faktor, a CREBH (cyclic AMP response element-binding protein H) képes a hepcidin promóteréhez kapcsolódva, annak átíródását befolyásolni (Vecchi és mtsai, 2009). Ezzel is igazolták a hepcidin és az akut gyulladás, valamint a hepcidin és a veleszületett immunitás közötti szoros kapcsolatot, de továbbra sem ismertek pontosan ezek az útvonalak.

A hepcidin receptora a ferroportin, melyet az FPN1 gén kódol. Az 5' végen IRE (Iron Responsive Element) szekvencia található, translációját IRP (Iron Regulatory Protein), vasszabályozó fehérjék befolyásolják (Zhang és Enns, 2009). 12 transzmembrán domént tartalmaz ez a vasexporter, mely a bélhámsejtek bazolaterális membránjában, a makrofágokban, a májsejtekben és a placentát alkotó sejtekben található meg. Legfontosabb szerepe a vas sejtből történő exportja.

A hepcidin N-terminálisán lévő 5 aminosav megléte alapvető a receptor-ligand kapcsolat kialakulásához. A kapcsolat létrejötte a ferroportin internalizációját és degradációját eredményezi. A hepcidin és a ferroportin között létrejövő interakció a Jak2 autofoszforilálódásához vezet, majd ez az aktivált forma foszforilálja a ferroportint, és a komplex multivezikuláris testekbe kerül, melyek a lizoszómákkal fúzionálva a ferroportin lebontását végzik (Kaplan és mtsai, 2011).

A hepcidin ferroportinhoz, az egyetlen eddig ismert vasexporterhez való kötődésével előidézi annak intracelluláris degradációját, így végső soron a hepcidin gátolja a vas duodenumból történő felszívódását és a makrofágokból történő recirkularizációját (3. ábra).



3. ábra. A hepcidin hatásai a különböző szervekben.

Több vizsgálat igazolta, hogy a hepcidin szint változása ellentétes irányú hatással van a bélhámsejtekben más, a vas felszívódását befolyásoló molekulák (DMT1, DcytB és hefesztin) expressziójára is. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy ezen fehérjéken keresztül fejt ki a szérum vasszint csökkenését eredményező hatását (Anderson és mtsai, 2002). A későbbiekben további kísérletek szükségesek azirányban, hogy a hepcidin milyen hatással van a raktárakban felhalmozott vasra, hiszen a szervezet a vas igényének kielégítésére elsősorban az innen származó vasat használja.

1.3. Gyulladásos bélbetegségek

Ahogy az előzőekben is láttuk, a krónikus gyulladásokhoz, fertőzésekhez és egyes daganatokhoz anémia társul, ennek háttérében elsősorban a vas szövetekbe történő szekvesztrációja áll, ezért nem áll rendelkezésre a megfelelő mennyiségben az eritropoézishez (Weiss, 2009).

A gyulladásos bélbetegségeknek a gasztrointesztinális rendszer különböző szakaszainak érintettsége alapján két nagy csoportját különítjük el: Crohn-betegség vagy más néven ileitis terminalis és colitis ulcerosa. Crohn betegségben leggyakrabban az ileum disztális része és a kolon érintett, és a gyulladásos folyamat transzmurális kiterjedésű (Thoreson és Cullen, 2007). Colitis ulcerosában a betegség a rektoszigmoideális területen kezdődik, majd innen terjed a vastagbélén proximális irányban (Hendrickson és mtsai, 2002).

A gyulladásos bélbetegségek okai közt több faktor is felmerült, infekzív, bakteriális és virális tényezőket is vizsgáltak (Neuman, 2007). Mycobacteriumok, Yersinia, Campylobacter, Clostridium, chlamydiák és vírusok, mint például a herpesvírus, rotavírus és a kanyaró vírusa kóroki szerepét kutatták, de egyik sem bizonyult patogóniikusnak. Ugyanakkor az immunológiai háttér bizonyítottan fontos szerepet játszik a betegség manifesztációjában. Az infekciókra genetikailag fogékony egyén gyulladt bélfalában, amelyet ártalmas, antigén jellegű lumináris faktorok járnak át, nem megy végbe szabályos módon a gyulladásos folyamat down-regulációja. Ez autoimmun választ indít el, amely egy önmagát erősítő körbe megy át (Wehkamp és mtsai, 2005). Crohn betegségben ez nem lokalizálódik a mukózásra, hanem a bélfal teljes vastagságát involválja, és a sejtes faktorok

mellett nem sejtes faktorok is részt vesznek az inflammatorikus folyamatban.

Több genetikai vizsgálatot is végeztek a gyulladós bélbetegségekkel kapcsolatban. A családi halmozódás, az ikerkutatások, illetve más, már korábban bizonyított genetikai eltéréssel járó körképekkel való gyakoribb előfordulás miatt merült fel, hogy kromoszómális eltérések is állhatnak a bélbetegségek hátterében. A mai napig nyolc, a krónikus gyulladós bélbetegségek kialakulásáért felelőssé tehető lókuszt azonosítottak. Ezek közül a legjobban ismert a 18-as kromoszóma pericentromer régiójában található NOD2/CARD15 (nucleotide-binding oligomerization domain containing 2/caspase recruitment domain 15) gén mutációja, mely elsősorban Crohn-betegségben van jelen. A NOD2 bakteriális proteoglikánok lebontásából származó muramil-dipeptidet képes felismerni, megkötni, és ezáltal az NF- κ B jelátviteli utat aktiválni. A gén mutációja olyan fehérjét eredményez, amelyről a ligand nem képes ledisszociálni, így folyamatos jelet szolgáltat az apoptózishoz vezető, gyulladós választ közvetítő szignáltranszdukciós utaknak. Egy másik ilyen genetikai eltérés, melyet inkább a colitis ulcerosa esetében írtak le, a NOD1/CARD 2 gén mutációja (Fellermann és Stange, 2001).

A 2000-es évek elején több munkacsoport is igazolta, hogy a gyulladós bélbetegségek kialakulásában fontos szerepet játszanak a defenzinek. A mucosalis sejtek egy nem specifikus antimikrobiális rendszeréhez tartoznak ezek a peptidek. A defenzinek és a hepcidin egyaránt prepropeptidként termelődik, konvertáz enzimek hatásán keresztül aktiválódik. Az érett defenzin 21, a hepcidin 25 aminosav hosszúságú, szerkezetüket a bennük található ciszteinek között létrejövő diszulfidhidak határozzák meg, magasabb rendű szerkezetük is igen hasonló. Emiatt merült fel az általunk vizsgált

peptid kóroki szerepe is több munkacsoportban, de eddig ezt nem sikerült igazolni.

A két krónikus gyulladással járó bélbetegségnek igen hasonló tünetei vannak, hasi görcsös fájdalommal járó krónikus hasmenés, mely colitis ulcerosában véres jellegű lehet. Crohn betegek esetében gyakran fordul elő az anamnézisben perianális fissura, fistula is. Azonban főleg gyermekkorban az extraintesztinális tünetek lehetnek a vezetőek, úgymint az állandó és ismeretlen eredetű láz, növekedés elmaradása és a vérszegénység, ízületi panaszok, gyakori afták a szájüregben, bőrtünetek. A diagnózis endoszkópos és szövettani vizsgálatok eredménye alapján állítható fel. Mindkét betegcsoportban a tünetmentes periódusokat aktív szakaszok követik, teljes gyógyulás csak sebészi kezelést követően jön létre. Specifikus kezelés nincs, a görcsök és a hasmenés orálisan adott antikolinerg szerekkel enyhíthetőek, aktív fázisban kortikoszteroid adása indokolt, ennek hatástalansága esetén más, immunmoduláló kezelés is elfogadott. A remisszió eléréséhez és fenntartásához szulfosalazint vagy mezalaminint kell a betegeknek szedniük.

1.4. Az RNáz L Inhibitor

Az RNáz L Inhibitor (Rli) egy konzervált, a prokariótákat kivéve valamennyi élőlényben megtalálható citoszolikus vas-kén fehérje. A humán Rli szerkezetét és szerepét régebb óta ismerjük. Két nukleotid kötő és hasító ABC doménnel, valamint egy 4 ciszteint tartalmazó ferredoxin-szerű szekvenciával rendelkezik, az utóbbi 4Fe-4S komplex kötésére alkalmas (Bisbal és mtsai, 1995). Az élesztő és a humán Rli között 68%-os aminosav azonosság van. Az RNáz L az interferon által indukált fehérjék közé tartozik, az Rli első leírása is ennek a folyamatnak a szabályozása kapcsán történt (Dong és mtsai, 2004).

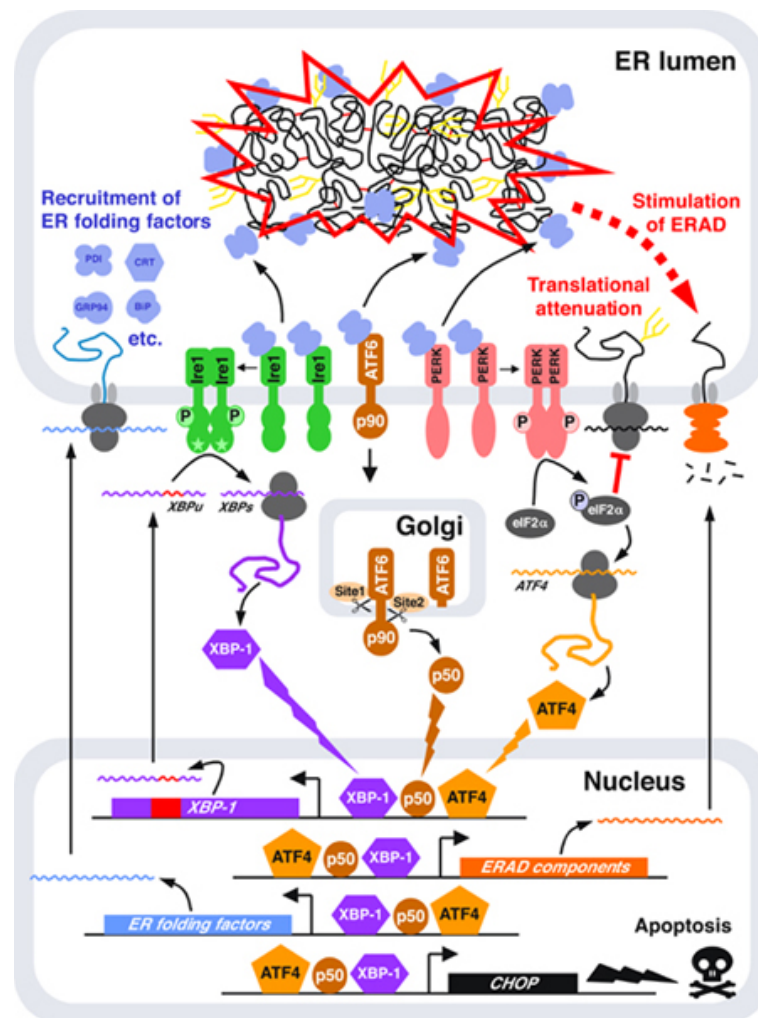
Az RNáz L 2'-5' oligoadenilát (2-5A) kötése révén aktiválódik, ez a molekula kettős szálú RNS molekulák jelenlétében képződik ATP-ből 2'-5' oligoadenilát-szintetáz enzim segítségével. Az RNáz L-nek egyes virális fertőzések elleni védekezésben is szerepe van. Ennek a válasznak a kioltásában, az RNáz L inaktiválásában van szerepe az Rli fehérjének. Ez a fehérje élesztőkben esszenciális, hiányában az élesztők elvesztik életképességüket. Mivel az élesztőkben nincs RNáz L, ezért már korábban vizsgálta munkacsoportunk, hogy mi lehet ezekben a sejtekben az Rli1p szerepe. Korábbi kísérleteink során igazolódott funkciója a riboszómák érésében. Az Rli depletált sejtekben a kontroll sejtekkel összehasonlítva a transzláció nagyfokú csökkenését láttuk, azaz a legtöbb fehérje szintézise csökkent. Ez a változás a riboszómális fehérjék mennyiségére csak kis mértékben vonatkozik, tehát a transzláció csökkenésének más oka is kell legyen, mint a riboszómák mennyiségi változása. Saját és más laboratóriumok kísérletei alapján bebizonyosodott, hogy az Rli depletált sejtekben károsodott mind a riboszómális alegységek sejtmagból a citoszólba történő transzportja, mind az rRNS-ek érése. Ahhoz, hogy az Rli a transzlációban lévő szerepét be tudja tölteni szükséges a fehérjében lévő vas-kén komplex megléte (Kispal és mtsai, 2005; Yarunin és mtsai, 2005).

1.5. Az unfolded protein response

Az endoplazmás retikulum (ER) feladatai közé tartozik a fehérjék, lipoproteinek szintézise, foldingja, poszttranszlációs módosítása, a makromolekuláris fehérje komplexek összeszerelése. A fehérjék vezikuláris transzporttal jutnak ki az ER lumenéből a citoszólba, de ezt megelőzően egy ellenőrzésen mennek át. Ha nem megfelelő a szerkezetük, akkor a lumenben maradván további foldingon esnek át, vagy

a citoszólba kijutva a proteozómában proteolízissel degradálódnak. Az első esetben jön létre az ER túltöltődése. Ha a foldingot gátló hatás éri az ER-ot, akkor specifikus jelátviteli utak aktiválódnak, melyek közül a legfontosabbak a selejtfehérje-válasz (unfolded protein response, UPR), az ER túltöltés válasz (endoplasmatic overload response, EOR) és a szterol-válasz (Bernaies és mtsai, 2006).

A UPR jelpálya részleteit élesztőben írták le először, de legtöbb elemét már humán sejtekben is azonosították (4. ábra).



4. ábra. Az unfolded protein response sematikus ábrája.
(forrás: <http://www.bijvoet-center.nl/cpc/research/ERstress/UPR>)

Három fő útvonal aktiválódik a folyamat során:

1. Az élesztőben az UPR egyik szenzormolekulája az Ire1p nevű transzmembrán fehérje. Ez a fehérje több doménnel rendelkezik, amelyek közül egynek kináz aktivitása van, citoszól felé néző doménje pedig az RNáz L ribonukleázzal homológ (Welihinda és Kaufman, 1996). A molekula luminális doménje a Kar2p proteinhoz, egy a hősokk fehérjék Hsp70 családjába tartozó chaperon fehérjéhez, a Bip analógjához kapcsolódik. A hibás fehérjéket megköti a Kar2p, így ezeknek az Ire1p-hez kapcsolódó mennyisége jelentősen lecsökken, jelzést adva, hogy több chaperon fehérjére van szükség. Kar2p nélkül két Ire1p molekula homodimerizálódik, transz-autofoszforilálódik és ezáltal aktiválódik. Az aktív Ire1p kihat egy darabot a HAC1 elsődleges mRNS-ből, majd egy tRNS ligáz újra összekapcsolja az exonokat. Az átalakított mRNS kijut a citoszólba, átíródik fehérjévé, s az így képződött Hac1p transzkripciósfaktorként működve fokozza az UPR cél-gének átíródását.

Ugyanez játszódik le humán sejtekben, ebben az esetben az Ire1p RNáz aktivitásának hatására az XBP1 (X box binding factor 1) mRNS hasítódik el, az így létrejött „spliced XBP1” (sXBP1) expressziójának eredménye egy kulcs transzkripciósfaktor, amely anti-apoptotikus fehérjék expresszióját képes indukálni (Calton és mtsai, 2002). Az UPR célpontjai közé tartozó gének promótere tartalmaz egy 22 bázispárból álló UPR elemet (UPRE), melyet minden, UPR során indukálódó fehérje génjében megtaláltak. Többek között luminális chaperonok, glikoziltranszferázok és olyan fehérjék mennyisége nő meg a sejtben belül, amelyek a foszfolipid szintézishez szükségesek. Az élesztőben leírt, közel négyszáz gén közül, amelyik az UPR által aktiválódók közé tartozik, körülbelül csak a felének ismert a funkciója.

Az ER lokalizált receptorok közül aktiválódik még többek között az activating transcription factor 6 (ATF6), mely chaperonok és más transzkripciós faktorok (pl. XBP1) expresszióját is szabályozza.

2. Egy másik ismert útvonal a fehérjék transzlációját gátolja. Az Ire1p intraluminális doménjével analóg transzmembrán kináz, a PERK érzékeli a hibás fehérjék felhalmozódását, a citoszólikus domén köti az eukarióta iniciációs faktor 2α -t (eIF2 α), és az 51. pozícióban lévő szerinen foszforilálja. Ez a változás gátolja a transzláció folyamatát.

3. A harmadik lehetséges útvonal humán sejtekben: az Ire1p humán homológja nem vesz részt az UPR cél-gének aktiválásában, hanem a fehérjeszintézist gátolja a 28S rRNS specifikus hasításával (4. ábra).

Amennyiben ezek a folyamatok nem képesek a hibásan feltekeredett fehérjék által kiváltott stressz feloldására, akkor a mitokondriális apoptotikus útvonal beindul és a sejt apoptózissal elpusztul.

Az Ire1p és az RNáz L fehérjék közötti hasonlóság alapján joggal feltételezhető, hogy az Rli-nek szerepe lehet az UPR aktiválásának folyamatában, nemcsak élesztő, hanem emlős sejtekben is. Mivel az Rli humán sejtekben is esszenciális, funkciójához pedig vas-kén komplex jelenléte szükséges, felmerül a lehetősége, hogy az Rli, ezen keresztül az UPR folyamata a sejt vasanyagcseréjével is kapcsolatban van, végső soron akár a hepcidin szintézis szabályozásának is részese.

2. Célkitűzések

1. Szérum prohepcidin szint vizsgálata krónikus bélgyulladásos betegek esetében. Az eredmények felhasználása a betegség aktivitásának megítélésére.
2. Az Rli szerkezeti vizsgálata, a humán és élesztő szekvenciák közötti különbség funkcionális vizsgálata.
3. Az Rli élesztőkben megismert funkcióinak vizsgálata humán sejtekben a transzlációban, riboszóma érésben és az unfolded protein response folyamatában.
4. A hepcidin expressziójának és az unfolded protein response aktivitásának kapcsolata.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Szérum prohepcidin szint meghatározása

A szombathelyi Vas megyei Markusovszky Kórház Gasztroenterológiai Osztályán és járó betegként kezelt krónikus gyulladós bélbetegségben szenvedő betegektől előzetes tájékoztatást és beleegyezést követően vérmintát vettünk. A vizsgálatokhoz a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Etikai Bizottsága által kiállított etikai engedéllyel rendelkezünk. A pácienseknél a gyulladós bélbetegség diagnózisához a korábban elvégzett endoszkópos mintavétel alapján jutottunk. Nem tettünk különbséget a vizsgált egyének között nem, kor és az alkalmazott kezelés alapján. Vizsgálatainkba összesen 102 beteget vontunk be és 14 egészséges egyén esetében elemeztük a szérum prohepcidin szint és más paraméterek közötti összefüggést. 72 személy (42 nő, 30 férfi) colitis ulcerosa, 30 (15 nő és 15 férfi) Crohn-betegség miatt állt kezelés alatt. A betegek kora 19 és 84 év között volt, az átlagéletkor 41,375 év. A betegség aktivitását nemzetközileg elfogadott aktivitási indexsel jellemeztük, melyhez a betegek megfelelő kérdőíveket töltöttek ki (Gürel és Kiyici, 2005; Best, 2006; Langhorst és mtsai, 2008). A vizsgálatra kerülő vérminták levétele a reggeli órákban (7–9 óra között) történt, éhgyomorral. Ezt követően a szérumokból megtörtént a szervezet vasháztartását jellemző (vörösvérsejtszám, hemoglobin, szérum vas, teljes vaskötő kapacitás, transferrin, transferrin saturáció) és gyulladós paraméterek (fehérvérsejtszám, C-reaktív fehérje, vörösvértest süllyedés) meghatározása. A mérések automatizált, validált módszerekkel, a Roche, a Cobas és a Dade Behrin cégek által forgalmazott reagensekkel és gépekkel történtek. A szérum

prohepcidin meghatározáshoz a mintákat a vizsgálat elvégzéséig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra lefagyasztottuk. A méréshez a Hepcidin Prohormon ELISA Kit-et (DRG International Deutschland) használtuk, a gyártó által ajánlott protokoll alapján.

Az eredmények statisztikai elemzését <http://www.wessa.net> internetes szoftver segítségével végeztük. Meghatároztuk az átlagokat, \pm standard deviációt. Student-féle t-próbát használtunk a betegcsoportok egymás közti és az egészséges kontroll csoporttal való összefüggések elemzésére, mivel a változók nem normális eloszlást mutatnak. A változók közötti kapcsolatot Spearman-féle rank korrelációval vizsgáltuk. Abban az esetben mondtuk ki a statisztikailag szignifikáns összefüggést, ha a szignifikancia szintje, a p értéke 0,05 vagy annál kisebb.

3.2. Felhasznált sejtvonalak

3.2.1. Élesztő sejtvonalak

Az Rli1p-vel kapcsolatos kutatásaink során a W303-as törzset (MAT α /a, ura3-1, ade2-1, trp1-1, his3-11,15, leu2-3,112) használtuk. A Tet-Rli1p törzset pCM225 plazmid felhasználásával, egylépéses promóter-kicserélés technikájával állítottuk elő. Ennek során a plazmidról PCR technikával, 5' végükön az RLI1 promóter szekvenciájának 40-40 bp hosszúságú szekvenciáját is hordozó primerrel felerősítettük a KanMX4 szelekciós markert, tTA aktivátort és tetO7 promótert tartalmazó kazettát. Ezt, az RLI1 gén promóter szakaszának részletét is hordozó kazettát transzformáltuk W303 haploid élesztőtörzsbe, ahol a kazetta homológ rekombinációval beépült a kromoszómális RLI1 gén elé. Az így kapott, általunk TetRli-nek nevezett törzsnél 2 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban alkalmazva a tetrán

derivátum Doxicyklint elértük az RliI p mennyiségének csökkenését. Az élesztőtörzseket YP gazdag (1% élesztőkivonat, 2% pepton) vagy minimál médiumban (0,17% YNB, 0,5% ammónium szulfát és szükséges aminosavak), 2% glükóz hozzáadásával növesztettük (YPD illetve MMD). Ugyanezen táptalajokat használtuk 2% agar hozzáadásával szilárd táptalajokként.

3.2.2. Humán sejtvonalak

Humán WRL-68 májsejt vonalat, HepG2 hepatoma sejteket és HeLa cervix carcinoma sejt vonalat (European Collection of Cell Cultures) EMEM-ben (Eagle's Minimum Essential Medium with glutamin, Gibco, Invitrogen) növesztettünk, melyet 10% FBS-sel (Lonza) és 2mM végkoncentrációban glutaminnal (Gibco, Invitrogen) egészítettünk ki. A sejteket megfelelő 5% CO₂ tartalmú, párásított környezetben, 37 °C-on tenyésztettük hatlyukú plateket használva.

3.3. Általános molekuláris biológiai módszerek

Molekuláris biológiai kísérleteink során (PCR, plazmid izolálás, DNS emésztés restrikciós enzimekkel, DNS ligálás, baktérium transzformálás, Western blot és Northern blot analízis) az irodalomból jól ismert, bevált módszereket alkalmaztuk (Sambrook és Russel, 2001). Az élesztő expressziós vektorokat lítium-acetát felhasználásával transzformáltuk. A vizsgált sejtekből származó RNS mennyiségét és minőségét NanoDrop spektrofotométer által mért OD 260/280 nm-en határoztuk meg. A minták fehérjetartalmát BCA (Pierce) vagy Bradford módszerrel (Bradford, 1976) állapítottuk meg.

3.3.1. Tranziens transzfekció

Az alább ismertetett humán sejtvonalak transzfekciójára Lipofectamine (Invitrogen) reagenst használtunk, követve a használati útmutató leírását. 75 cm²-es petricsészékre a transzfekciót megelőző napon 10⁶ sejtet ültettünk. A DNS plazmidok 10 µg-jához 50 µl Lipofectamine-t adtunk 200 µl szérum és antibiotikum mentes médiumba, majd a két elegyet összekevertük és szobahőmérsékleten 30 percig állni hagytuk. Ezt követően a sejtekről a médiumot eltávolítottuk és helyére 5 ml antibiotikummentes tápoldatot tettünk, majd rácsepegtettük a DNS-Lipofectamine keveréket is.

3.3.2. Western-blot analízis

HeLa, WRL-68 és HepG2 sejtvonalakat a már leírt módon transzfektáltuk antiszensz Rli/pCDNA 3.1 és kontrollként pCDNA 3.1 plazmiddal, 12 és 24 órát követően a sejteket összegyűjtöttük, lizáltuk, és a mintákból azonos összfehérje mennyiséget szeparáltunk 10%-os SDS-PAGE-sel. A fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk. Első ellenanyagként anti-humán Rli-t (Davids Biotechnology, Regensburg, Germany) használtunk 1:5000 hígításban, második ellenanyagként peroxidáz konjugált anti-nyúl IgG-t (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) alkalmaztunk. Az Rli-t ECL Western detekciós kittel (BioRad Laboratories, Hercules, California, USA) vizualizáltuk. Az azonos fehérjemennyiségek igazolásához a gliceraldehid-foszfát dehidrogenáz kimutatását végeztük.

3.3.3. Riboszómális RNS-ek vizsgálata Northern blot analízissel

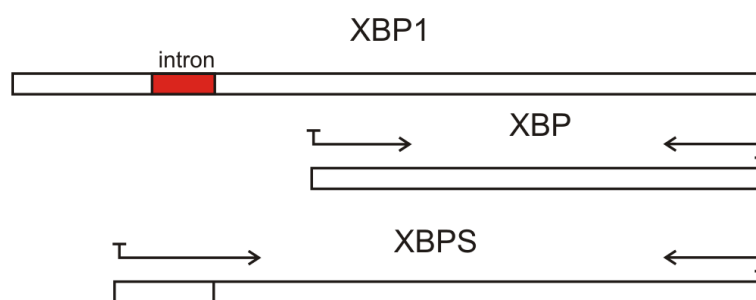
Élesztő sejtekből forró savas fenol extrakcióval izoláltunk totál RNS-t, amit 1,6%-os agaróz gélben szeparáltunk és Hybond-N

membránra vittünk át. A membránt 30 percig 50 °C-on 10 ml DIG Easy Hyb prehibridizáló oldatban előhibridizáltuk (Roche Applied Science, Basel, Switzerland). A próbákat digoxigeninnel jelöltük PCR során, majd 45 °C-on 4 órán át hibridizáltuk a membránt. Ezt követék a mosási lépések. Az rRNS-ek mennyiségét alkalikus foszfatáz konjugált anti-digoxigenin antitest és kemilumineszcens szubsztrát (Roche) segítségével mutattuk ki.

3.3.4. Real time PCR

A korábban már részletezett módon kezelt, transzfektált humán sejt kultúrákból sejtekből totál RNS-t izoláltunk RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Németország) felhasználásával. Az RNS koncentrációját Nanodrop spektrofotométerrel határoztuk meg UV abszorpció alapján 260 nm-en. Egy µg totál RNS-t felhasználva végeztünk reverz transzkripciót az iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad) segítségével. A real time PCR-hoz használt génspecifikus primer párokat a PRIMER3 software-rel (<http://frodo.wi.mit.edu>) terveztük meg. LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics) készüléket használtunk a méréseinkhez. A reakcióelegyet Fast Start DNA MasterPLUS SYBR Green I Master Mix-el készítettük 20 µl össztérfogatban, 200 nM primer végkoncentrációval. Referencia génnek a β-aktint használtuk. A relatív gén expresszió számításához a $2^{\Delta\Delta C_t}$ (Livak) módszert alkalmaztuk, az efficiencia közel 100%-os volt, az eltérés nem haladta meg az 5%-ot.

Az XBP és spliced XBP mRNS-ének mennyiségét, ezzel az unfolded protein response aktivitását, közös reverz primer és két különböző forward primer segítségével határoztuk meg. Az előrehaladó primer a hasításon már átesett formához, csak az intron mentes cDNS-hez képes hibridizálni (5. ábra).



5. ábra. Az UPR aktiválódás kimutatása. A nyilak a primerpárokat jelölik. XBPS a splicingon átesett, intron kivágódását követően létrejött formát, XBP az összes expresszáldott molekula mennyiségét reprezentálja valós idejű PCR során.

3.4. Az Rli expresszió változtatása humán sejtvonalakban

Az Rli antiszensz (RAS) pCDNA3.1 plazmidot, mely transzfekciójával az Rli mennyiségét tudtuk csökkenteni, Catherina Bisbaltól kaptuk (IGH UPR CNRS, France).

Az RNS-interferenciát használtuk másik módszerként az Rli humán sejtekben való mennyiségének kontrolálására. Ez egy olyan technika, mely során poszttranszkripció gécscsökkentés jön létre rövid, specifikus RNS-molekulák segítségével, amelyek elnyomják a gének kifejeződésében kulcsszerepet játszó hírvívő RNS-ek működését. A sejtbe juttattunk dupla szálú interferáló 21–23 nukleotid hosszúságú RNS-molekulákat, melyeket az Rli első 300 bázispárjáról amplifikáltuk fel. Ezek a rövid dsRNS-ek aktiválják az RNS-indukált elcsendesítő komplexet, amely a célgén hírvívő RNS-ét lebontja.

Ehhez a technikához a BLOCK-iT Dicer RNA Kit-et (Invitrogen) használtuk, a gyártó által megadott protokollnak megfelelően. A tisztított d-siRNS-t HeLa, HepG2 és WRL-68 sejtvonalakba is transzfektáltuk; Lipofectamine segítségével 125 ng d-siRNS-t vittünk be 5×10^5 sejtenként. A kezelt sejteket 16 óra elteltével gyűjtöttük össze, majd dolgoztuk fel.

3.5. Transzláció vizsgálata HeLa sejtekben

A sejteket megfelelő tápoldatban 60%-os denzitásig növesztettük, majd transzfektáltuk antiszensz Rli/pCDNA 3.1 és kontrollként pCDNA 3.1 plazmiddal. 14 órával a kezelést követően 5 µl (2 MBq) radioaktívan jelölt S³⁵-metioninnal (Izinta Kft, Budapest) inkubáltuk 4 órán keresztül, 37 °C-on. A sejteket több alkalommal mostuk hideg PBS-sel, majd feltártuk lízis pufferben (10mM Tris-HCl, pH 7,5, 150nM NaCl, 10% glicerin, 0,1% Triton X-100, PMSF). Centrifugálást követően azonos fehérjemennyiséget 12%-os SDS gélen megfutattunk, nitrocellulóz membránra blottoltuk. A radioaktívan jelölt fehérjéket röntgenfilmen tettük láthatóvá.

3.6. Humán/élesztő kimérák

Az Rli kimérákat PCR technikát felhasználva hoztuk létre humán máj cDNS-t és élesztő kromoszomális DNS-t használva templátként. 1–3 kimérák esetében az N-terminális vég különböző hosszúságban (173, 221, 321 aminosav) élesztő szekvenciát tartalmaz, míg a C-terminális vég humán eredetű. Ezzel szemben a 4–6 kiméráknál az N-terminális humán, a C-terminális élesztő eredetű. A PCR termékeket pRS426 magas kópiaszámú, élesztő expressziós vektorba klónoztuk (8. ábra).

3.7. Tet-Rli sejtek komplementációs vizsgálata

Tet-Rli sejteket a kimérákat és kontrollként az élesztő illetve humán Rli szekvenciát tartalmazó pRS426 plazmidokkal transzformáltuk. A sejtvonalat uracil mentes MMD táptalajon növesztettük Doxycylin jelenlétében. A komplementáció meglétét és mértékét a transzformált sejtek növekedésével jellemeztük.

3.8. Unfolded protein response aktivációja

A humán sejtekben két anyag felhasználásával idéztük elő az unfolded protein response aktivációját. Tapszigargint adtunk a He-La sejtekhez 100 mM végkoncentrációban, majd 60 perc múlva gyűjtöttük össze és dolgoztuk fel a mintákat. Ez a vegyület a szarko- és endoplazmatikus retikulum kalcium ATPáz enzimeinek (SERCA) kompetitív gátlója, ezáltal csökkenti az endoplazmatikus retikulum kalciumtartalmát, ami az UPR aktivációjához vezet. A másik vegyület a ditiotreitól (DTT), mely egy erős redox anyag, a diszulfidhidak kialakulását meggátolva okoz UPR aktivációt. A DTT kezelést szintén 60 percig végeztük, 6 mM végkoncentrációban.

4. Eredmények

4.1. Szérum prohepcidin meghatározása colitis ulcerosás és Crohn betegek szérumból

A korábbiakban már leírt módon válogatott betegek mintáinak feldolgozása után a két betegcsoportnál kapott laboratóriumi eredményeket az 1. táblázatban foglaltuk össze. Elmondhatjuk, hogy a gyulladással járó bélbetegségben szenvedőknél szignifikánsan magasabb ($p < 0,01$) C-reaktív protein és vörösvértest-süllyedés értékek voltak mérhetőek, mint az egészséges kontroll csoportban. A colitis ulcerosás és a Crohn betegek vasháztartását vizsgálva a szérum vas szintjében ($p < 0,001$) és a transferrin szaturációban ($p < 0,01$) találtunk szignifikáns különbséget, alacsonyabb szintet az egészségesekhez képest.

A colitises betegek 44,4%-nak, a Crohnos betegek 61,5%-nak volt a szérum vas szintje a normális $14 \mu\text{mol/l}$ alatti. Ezt, az anémiás betegpopulációt külön vizsgálva sem kaptunk az előbb leírtakhoz képest eltérő eredményeket a statisztikai elemzések során.

A többi vizsgált paraméter (fehérvérsejt szám, szérum albumin, teljes vaskötő kapacitás, hemoglobin és transferrin) a betegek nagy többségénél normál tartományban mozgott. A két csoportban az egyes paraméterek átlaga eltérő volt, a különbség azonban nem volt szignifikáns. Megjegyzendő még, hogy szinte valamennyi érték jelentős szórást mutatott. A kompetitív ELISA módszerrel meghatározott szérum prohepcidin szint nem mutatott statisztikailag jelentősnek mondható különbséget sem a betegcsoportok között, sem a betegek és egészségesek viszonylatában. Csökkent, 240 ng/ml alatti értéket

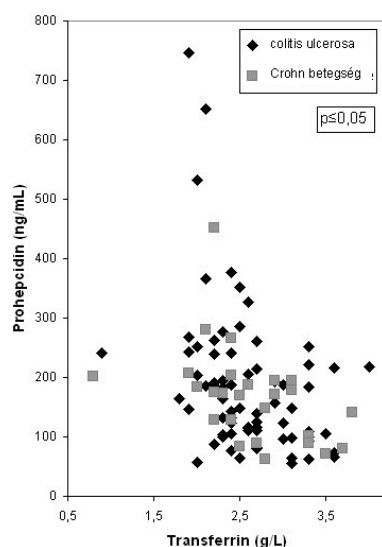
csak a vizsgált személyek 19,38%-ban, alacsony, 80 ng/ml alatti értéket pedig csak 9,8%-ban mértünk.

Az aktivitási indexet nemzetközileg elfogadott kérdőívek, és a klinikai paraméterek alapján számoltuk, rutinszerűen nem végez-

	Crohn betegek n=30	Colitis ulcerosa n=72	Egészséges kontroll n=12
Prohepcidin (ng/ml)	167,87 (81,39)	186,42 (124,26)	179,89 (53,8)
Aktivitási index	96,30 (44,49)	141,09 (86,91)	
Fehérvérsejt szám (G/l)	7,47 (2,67)	6,44 (1,71)	7,125 (1,25)
C-reaktív protein (mg/l)	17,35* (1,25)	8,21* (16,88)	3,5 (1)
Szérum albumin (g/l)	43,73 (9)	44,62 (4,23)	44,5 (2,15)
Szérum vas (µmol/l)	13,27** (7,5)	14,86** (6)	22,6 (4,38)
Teljes vaskötő kapacitás (µmol/l)	61,34 (16,15)	57,23 (9,72)	59,53 (6,54)
Hemoglobin (mol/l)	8,15 (1,28)	8,23 (0,89)	8,47 (0,57)
Vörösvértest süllyedés (mm/h)	21,58* (24,42)	22,11* (21,12)	6,08 (1,44)
Transzferrin (g/l)	2,63 (0,64)	2,59 (0,54)	2,38 (0,14)
Transzferrin telítettség (%)	22,53* (12,79)	27,12* (12,5)	38,98 (11,85)

1. táblázat. Crohn betegségben, colitis ulcerosában szenvedők és az egészséges kontroll csoport laboratóriumi paraméterei. Az értékek számtani átlagát adjuk meg, a standard deviáció zárójelben van feltüntetve. *:P<0,01 kontroll csoporthoz viszonyítva; **:P<0,001 kontroll csoporthoz viszonyítva.

tünk minden alkalommal endoszkópos vizsgálatot. Ha ez a mutató Crohn-betegség esetén 150 feletti, akkor mondhatjuk, hogy a betegség aktív, ez alatt remisszióról beszélünk. Colitis ulcerosa esetén szintén 150 alatt inaktív a betegség, 150–220 között enyhe, 220 felett közép-súlyos, súlyos stádiumról beszélhetünk. Mivel a vérmintákat betegeink nagy részétől ambuláns kontrollvizsgálat során nyertük, így csak a betegek kis részénél, 19,38%-nál volt a betegség aktív stádiumban. A szérum transferrin és a transferrin szaturáció szignifikáns korrelációt mutat a prohepcidin szinttel ($p=0,04$) Crohnos betegeknél, míg colitis ulcerosában ez a kapcsolat gyengébb ($p=0,05$) (6. ábra).



6. ábra. A prohepcidin és a transferrin közötti korreláció colitis ulcerosás (sötét pontok) és Crohn betegeknél (szürke pontok) Mindkét csoportban a P érték alacsony (Crohn esetén 0,04, colitis esetén 0,05).

A gyulladásos paraméterek közül a CRP és a süllyedés a colitis ulcerosában szenvedő betegeknél jelentősen magasabb, mint az egészségeseknél, de nem mutat kapcsolatot a prohepcidin szinttel, épp úgy, mint az aktivitási index vagy a fehérvérsejt szám. A Crohn

betegeknél az aktivitási indexszel kismértékben, de szignifikánsan korrelál a prohormon szérumszintje (2. táblázat).

	Crohn betegség		Colitis ulcerosa	
	r érték	P érték	r érték	P érték
Aktivitási index	0,258	0,05*	0,122	0,07
Albumin	0,195	0,05*	0,004	1
C-reactive protein (CRP)	0,13	0,06	0,199	0,06
Fehérvérsejt szám	0,28	0,07	0,14	0,07
Vörösvérsejt süllyedés	0,134	0,07	0,012	0,08

*: $P \leq 0,05$

2. táblázat. A két betegpopulációban az egyes gyulladásos laborértékek és a prohepcidin szint közötti összefüggés vizsgálata Spearman féle rank korrelációval. Összefüggés van, ha P értéke 0,05 vagy annál kisebb.

A teljes vaskötő kapacitás alacsony korrelációt mutat a Crohn-os betegeknél a prohepcidin szinttel. A hemoglobin és a szérum vas egyik betegcsoportban sem mutat összefüggést a prohepcidin szinttel (3. táblázat).

	Crohn betegség		Colitis ulcerosa	
	r value	P value	r value	P value
Szérum vas	0,05	0,06	0,053	0,08
Hemoglobin	0,153	0,07	0,21	0,07
Transzferrin	0,573	0,04*	0,4	0,05*
Teljes vaskötő kapacitás (TVK)	0,2	0,05*	0,076	0,09
Transzferrin telítettség	0,086	0,04*	0,031	0,05*

*: $P \leq 0,05$

3. táblázat. Crohn betegségben és colitis ulcerosában szenvedő betegek vas-háztartását jellemző laboratóriumi paraméterek és a szérum prohepcidin szint közötti korelláció vizsgálata. Összefüggés van, ha P értéke 0,05 vagy annál kisebb, vastagon kiemelve.

4.2. Az RNáz L Inhibitorral végzett kísérletek

4.2.1. A humán és az élesztő Rli fehérje szekvenciájának összehasonlító vizsgálata

A két fehérje szerkezetében lévő hasonlóságokat vizsgáltuk a ClustalW szoftver segítségével, az eredményeket a GenDoc programmal analizáltuk. A statisztikai számítások alapján elmondhatjuk, hogy a két fehérje 67%-os hasonlóságot, 82%-os azonosságot és 18%-os különbséget mutat. A fehérjék méretében 1%-os a különbség, ami 9 aminosavnak felel meg. Az N-terminálisnál két hosszabb szakaszt találtunk, amelyek nagyobb divergenciát mutatnak, és egy kevésbé eltérő szekvenciájú régiót a C-terminálisnál, a többi szekvencia erősen konzervált (7. ábra).

```

      *           *           *           *           *
H_sapiens_ : MADRTTRIAIVNNDKCKPKKCRQECKKSCPVVVWEGKLCIEVTPDQSKIAWISBLCIGCGGICIKKCPFDALSHVNLPSNLEKRTTHRYRANAFKLN : 95
S_cerevisi : MDRNSRIAIVSDKCKPKKCRQECKRSCPVVVWEGKLCIEVTPDQSKIAFISEBLCIGCGGICVKKCPFDALSHVNLPSNLEKRTTHRYRANAFKLN : 95
      M DK 3RIAIV  DKCKPKKCRQECK48CPVV4  GKLCIEVTP  SKIASISE  LCIGCGGIC6KKCP  A6  I6NLP3NLE  THRY  AN  FKLH

      *           *           *           *           *
H_sapiens_ : RLPFRPGEVGLVGTNGIGKSAALKILAGKQKPNLGRDDPPWQBIIRYFRGSELQNYFTKLEDDDLKAIKPOYVARELRLAKGVGSELDR : 190
S_cerevisi : RLPFRPGQVGLVGTNGIGKSAALKILAGKQKPNLGRDDPPWQBIIRYFRGSELQNYFTKLEDDDLKAIKPOYVARELRLAKGVGSELDR : 190
      RLP  FRPG2VLGLVGTNGIGKS  ALKILAGRQKPNL45DDPP  WQBI6  YFRGSELQNYFTK6LEDD6KAIKPOYV  R  KG  V  6

      *           *           *           *           *
H_sapiens_ : KDE----TRTQALVCOCLTTHLKERNVDELGGGELORFASAVYCIKADIFMFDEPSSYLDVKQRLAAAITIRSLINPFRYTIWVHDLVLD : 280
S_cerevisi : LKLRMERSPEEDVKRYIKIQLDENLKRDIENLGGGELORFATGSCVQADVYMFDEPSSYLDVKQRLAAAITIRSLINPFRYTIWVHDLVLD : 285
      L  L  6  R16E  LSGGELORFA  6  C6Q  AD65MFDEPSSYLDVKQRL  AA  IRSL6  P  4Y6I  VEHDLVLD

      *           *           *           *           *
H_sapiens_ : YLSDPFCILYGVPSYGVVTFPSVREGINIFLDGHIENLNRPRDASLVKVAETANEESVKKKCMRYVPMKKKMSSEPLAVAGEPTDSEI : 374
S_cerevisi : YLSDPFCILYGVPSYGVVTFPSVREGINIFLDGHIENLNRPRTEALGRIADATEDLNDSSASRAESYSLKKTQDSEVYVMSSEPTDSEI : 380
      YLSDP6C  6YGVPS  YGVVT6P  SVREGINIFLDG  6P  ENLRPR  L  F46A  2  5  YP  6KK  G  F  L  6  GEP3DSEI

      *           *           *           *           *
H_sapiens_ : GVMGNGTGRKTTIRMLAGRLKPDDEG6PVLNVSYPKPKIAPRSTGSRVROLVHRTIRDAITRPOFVTDVVKPLIITIIDQEVQLSGGELOR : 469
S_cerevisi : GVMGNGTGRKTTIKLLAGALKPDDEG6PVLNVSYPKPKIAPRSTGSRVROLVHRTIRDAITRPOFVTDVVKPLIITIIDQEVQLSGGELOR : 475
      GVM6GNGTGRKTT  I46LAG  LKPDEG  6P  LNVS  KPQKI  PK  G3VRQL  KIR  5  POP  TDV6KPL  I  IIIDQEVQ  LSGGELOR

      *           *           *           *           *
H_sapiens_ : VAVVLAALGIPADYVLIDEPSAYLDSBORLMAARVVKRFILHAKKTAPEVHDFIMATYLADRVIVFEGVPSKNTVANSBPOTLLANPKFLDQDSEI : 564
S_cerevisi : VAVVLAALGIPADYVLIDEPSAYLDSBQRILCQKVIIRRFILHAKKTAPEVHDFIMATYLADRVIVFEGVPSKNTVANSBPOTLLANPKFLDQDSEI : 570
      V  6  L  LG  PAD6YLIDEPSAYLDSBQR66  4V64RFILH  KRTAP6VEHDFIMATYLAD4VIVF  G6P6KN  A  P23LL  G  N4FL  L  6

      *           *           *           *           *
H_sapiens_ : TFRRDPNVRRPRINKLNSIRIVSQRNSGNYFFLD--- : 599
S_cerevisi : TFRRDPNVRRPRINKLNSIQMREQRNSGNYFFLDNRGE : 608
      TFRRDPN  5RPRINKLIS  D  EQK  SGNYFFLD1
  
```

7. ábra. A humán és a péklesztő RNáz L Inhibitor génszekvenciájának összehasonlítása.

4.2.2. A Tet-Rli sejtek komplementációs vizsgálata

Az RLI1 gén esszenciális élesztőben, kiütése haploid sejtekben letális, ezért deléciós mutáns sejtvonalat nem lehet létrehozni. Annak vizsgálatához, hogy a humán Rli képes-e betölteni az élesztő Rli1p szerepét, előállítottunk egy olyan törzset, a Tet-Rli –t, melyben az RLI1 gén egy Tetraciklin által represszálható promóter szabályozása alatt áll. A Tetraciklin derivátum Doxyciklin antibiotikum hozzáadásával ezekben a sejtekben RLI1 gén átírása gátlódik, így az Rli1p fehérje mennyisége lecsökken. Az élesztő és a humán Rli fehérje magas homológiát mutat. Ez inspirált bennünket arra, hogy megvizsgáljuk, hogy a humán fehérje képes-e kompenzálni az Rli1p csökkent szintjét az élesztősejtekben. A Tet-Rli sejteket Doxyciklin-kezelést követően transzformáltuk élesztő Rli1p/pRS426 vagy humán Rli/pRS426 expressziós vektorral. A Tet-Rli sejtek közül Doxyciklin jelenlétében csak azok növekedtek, amelyekbe az élesztő Rli1p-t kódoló génszakaszt juttattuk be. Ez az eredmény azt igazolja, hogy a humán fehérje nem képes az élesztő fehérje hiányzó funkcióját betölteni (4. táblázat).

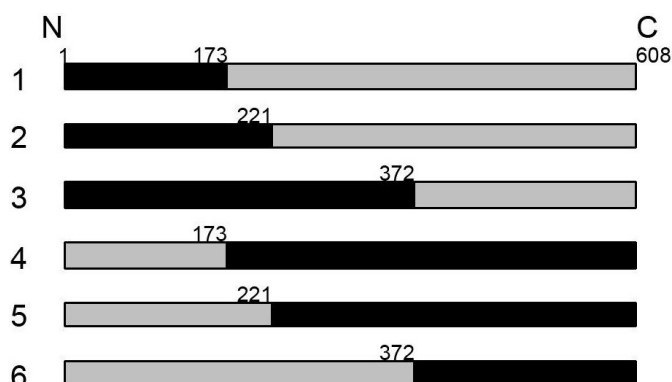
Tet-Rli sejtek	– dox	+ dox
+ élesztő Rli1p	+++	+++
+ humán Rli	+++	—

4. táblázat. A Tet-Rli sejtek komplementációs vizsgálata, növekedés Doxyciklin jelenlétében az élesztő vagy a humán szekvenciát expressziós vektorban a sejtekbe visszajuttatva. A + jelek a növekedés mértékét jelzik.

4.2.3. Humán/élesztő kimérák

Az Rli négy fő doménből épül fel, két ABC típusú nukleotid kötő domén (NBD) és két ciszteinben gazdag régió található az N-terminálison, amelyek a két vas-kén klasztert kapcsolják össze. Az élesztő és a humán fehérje közötti funkcionális különbség vizsgálatához humán-élesztő kimérákat hoztunk létre. Az 1-es, 2-es és 3-as kimérák esetében az N-terminálison lévő 173, 221, illetve 372 aminosav élesztőből származik, és ehhez kapcsolódik a humán fehérje C-terminálisából származó 435, 378, illetve 236 aminosav. A 4-es, 5-ös és 6-os kimérák esetében az N-terminálison található a humán szekvencia, és ennek megfelelően a C-terminális tartalmazza az élesztőből származó aminosavakat (8. ábra).

Ezeket az újonnan létrehozott kimérákat használtuk a kompletenciós vizsgálatainkhoz, mellyekkel bizonyítani akartuk, hogy mely aminosavak megléte szükséges a funkció betöltéséhez. Mind a hat kiméra szekvenciát pRS426 élesztő expressziós vektorba klónoztuk és Tet-Rli sejtekbe transzformáltuk, majd Doxicyclin tartalmú táptalajon növesztettük (9. ábra).



8. ábra. Élesztő/humán kimérák sematikus aminosav szekvenciája. Sötéttel jelölt rész az élesztő, világosabb rész a humán szekvencia.



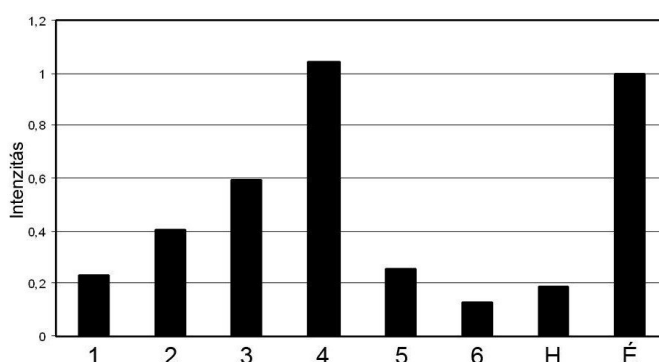
9. ábra. Doxycylin tartalmú MMD táptalajon növesztett 1-6-kiméra/pRS426 és élesztő (É) Rli1p ill humán (H) Rli/ pRS426 plazmiddal transzformált Tet-Rli sejtek.

Eredményeink azt mutatják, hogy az első 173 aminosavat tartalmazó régió nem felelős a funkcionális különbségekért, hiszen ha kicseréljük ezt a szakaszt humán szekvenciára, nem jár fatális következményekkel. Ezzel ellentétben, ha az élesztő fehérje 173–221. aminosavig tartó szakaszát, amely régió az első eltérő részt tartalmazza, kicseréljük a humán szekvenciára, vagy, ha az élesztő C-terminálison lévő 236 aminosavát cseréljük le, akkor a sejtek nem képesek növekedni, azaz az N-terminális első 173 aminosavat leszámítva a humán Rli többi szakasza nem komplementálja élesztőben az Rli1p hiányát.

4.2.4. Az Rli kiméra fehérjék hatása a riboszómális RNS-ek mennyiségére Tet-Rli sejtekben

A kimérákat tartalmazó plazmidokkal transzformált Tet-Rli sejtekben a Doxycylin kezelés hatását vizsgáltuk a riboszómális RNS-ek expressziójára. Total RNS-t izoláltunk, majd a mintákat agaróz gélben szeparáltuk, a 18S és 28S rRNS-eket etidium-bromiddal tettük láthatóvá. Az előző kísérlethez hasonlóan csak két esetben láttunk a kontroll sejtekéhez hasonló rRNS mennyiséget, az egyik, amelyiket élesztő Rli1p/pRS426 plazmiddal, a másik, amelyiket a 4-

es kimérát tartalmazó expressziós vektorral transzformáltunk, tehát ebben a két esetben beszélhetünk a hiányzó Rli1p komplementációjáról (10. ábra). Ezekből a mintákból elvégzett valós idejű PCR során is hasonló eredményt kaptunk. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a két fehérje magasabb rendű szerkezetében lévő különbségek az Rli riboszóma érésben betöltött funkciójában is szerepet játszanak.



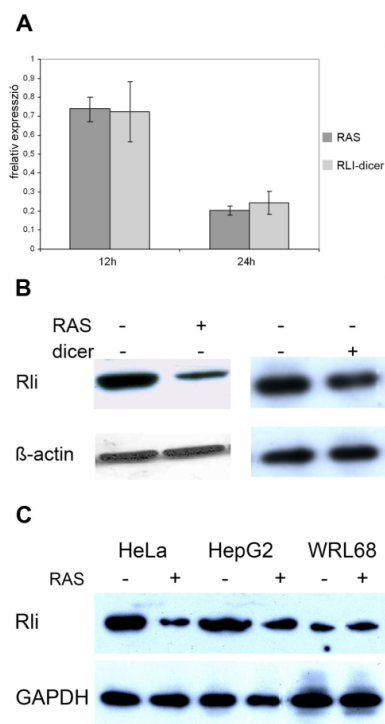
10. ábra. Riboszómális RNS-ek mennyisége 1-6-kiméra/pRS426 és élesztő (É) Rli1p ill. humán (H) Rli/pRS426 plazmiddal transzformált Tet-Rli sejtekben intenzitásmérés alapján. Az ábrán egy reprezentatív kísérlet eredményeit tüntettem fel.

4.2.5. Az Rli fehérje mennyiségének csökkentése

Kísérleteink során humán sejtvonalakat vizsgálva a két, leggyakrabban használt gén-csendesítési technikát alkalmaztuk az Rli mennyiségének csökkentésére: az antiszensz módszert és az siRNS technikát. A HeLa sejteket antiszensz Rli-t tartalmazó plazmiddal (RAS/pCDNA 3.1) transzfektáltuk. Az siRNS technikánál 20-25 bázispár hosszúságú kettős szálú RNS molekulák keverékét humán sejtekbe jutattva az Rli expresszióját csökkenteni tudtuk (Rli dicer). Mindkét módon Rli depletált sejteknél azt figyeltük meg, hogy az Rli szint nagyfokú csökkenése idővel a sejt halálához vezetett. A

sejteket 12, 24 órás kezelés után gyűjtöttük össze, az Rli mennyiségi változását mRNS szinten real time PCR-ral, fehérje szinten Western blot analízissel bizonyítottuk.

Az Rli expressziója csökkenést mutatott mindkét módszerrel a hosszabb és rövidebb kezelést követően is. Három sejtvonalat vizsgáltunk: a HeLa-t és két májsejtvonalat, a WRL-68-at, és a HepG2-t. A három sejtvonal közti különbséget Western blot analízissel vizsgáltuk, mely során azonos fehérjemennyiséget SDS-PAGE-sel szeparáltunk és nitrocellulóz membránra blottoltunk. Anti-humán Rli szérumot használva legerősebb reakció a HeLa sejtekben mutatkozott. A kezelés időfüggését és a sejtvonalakat összehasonlító kísérletek alapján további munkánk során 24 órás kezelést alkalmaztunk HeLa sejtvonalon (11. ábra).



11. ábra. A: real time PCR vizsgálat, RAS és Rli dicer technikával végzett depléció HeLa sejtekben, 12 és 24 órás kezelést követően. B: HeLa sejtekben a két génelcsendesítési módszer összehasonlítása 24 órás kezelést követően Western blottal. C: A három sejtvonal közötti különbség 24 órás RAS kezelést követően, Western blottal.

4.2.6. Az Rli depléció hatása a fehérjeszintézisre

Az élesztő Rli1p fehérjeszintézisre gyakorolt hatását, szerepét munkacsoportunk már korábban igazolta. A fehérjék transzlációjában és a riboszómák érésében betöltött szerepe miatt esszenciális ez a fehérje. A humán analóg ABCE-1 interakciói az eukarióta iniciációs faktorokkal is már ismertek az irodalomból. A humán sejtekben azonban még nem vizsgálták az Rli mennyiségi csökkenésének hatását. HeLa sejteknél mindkét, a már ismertetett módszerrel Rli depléciót értünk el. Ezeket a sejteket S^{35} izotóppal jelölt metioninnal inkubáltuk 4 órán át. A kezelt sejtekből lizátumot készítettünk, az extraktumokat SDS poliakrilamid gélelektroforézist követően autoradiográfiával elemeztük. Az Rli depléciója a sejtek fehérjeszintézisének általános csökkenését okozta, mivel az újonnan termelődött egyes fehérjék egymáshoz viszonyított aránya nem változott, de össz mennyiségük jelentősen csökkent (12. ábra).

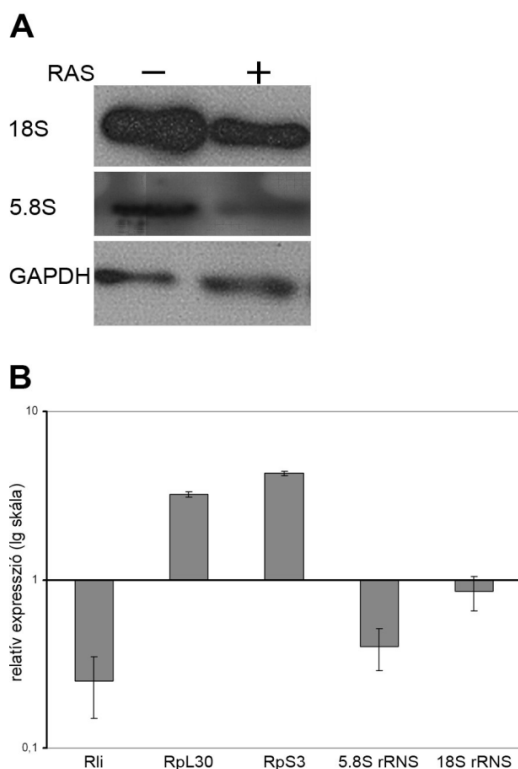


12. ábra. Autoradiográfia, S^{35} -metionin beépülés detektálása Rli depléció, RAS és Rli dicer kezelést követően HeLa sejtekben.

4.2.7. Az Rli depléció hatása a riboszómális komponensekre

A humán sejtvonalakban az Rli hiány fehérjeszintézisre gyakorolt hatását vizsgáló kísérleteink hasonló eredményt hoztak, mint a már korábban közölt élesztőben végzettek. Élesztőben Hinnebusch és munkatársai (Sonenberg és Hinnebusch, 2009) igazolták, hogy az Rli1p a 40S riboszómális alegységhez és több eukarióta iniciációs faktorhoz (eIF2, eIF3, eIF5) kapcsolódik. Munkacsoportunk ezzel egyidőben igazolta az Rli1p riboszóma érésben, nukleocitoplazmatikus transzportban betöltött fontos szerepét.

HeLa sejtekben az Rli mennyiségét géncsendesítéssel csökkentettük, majd a sejtekből totál RNS-t izoláltunk, a riboszómális RNS-ek mennyiségét Northern blot analízissel és valós idejű PCR-rel határoztuk meg. A kezelt és a kontroll sejtekben vizsgáltuk a riboszóma alegységekben megtalálható két fehérje, RpL30 és RpS3, mRNS-ének expressziós változását (13. ábra).



13. ábra. A: Northern blot analízis, digoxigeninnel jelölt 18S és 5.8S rRNS és glicerinaldehid-foszfát dehidrogenáz próbákkal HeLa sejtekből Rli antiszensz kezelést követően. B: Real time PCR ugyanezekből a sejtekből. A: Northern blot analízis, digoxigeninnel jelölt 18S és 5.8S rRNS és glicerinaldehid-foszfát dehidrogenáz próbákkal HeLa sejtekből Rli antiszensz kezelést követően. B: Real time PCR ugyanezekből a sejtekből.

Kísérleteink mindkét módszerrel azt igazolták, hogy az Rli mennyiségének csökkenése az 5,8S és 18S rRNS-ek expressziójának csökkenéséhez vezet. A riboszómális fehérjék mennyiségében növekedést tapasztaltunk az Rli depléció hatására.

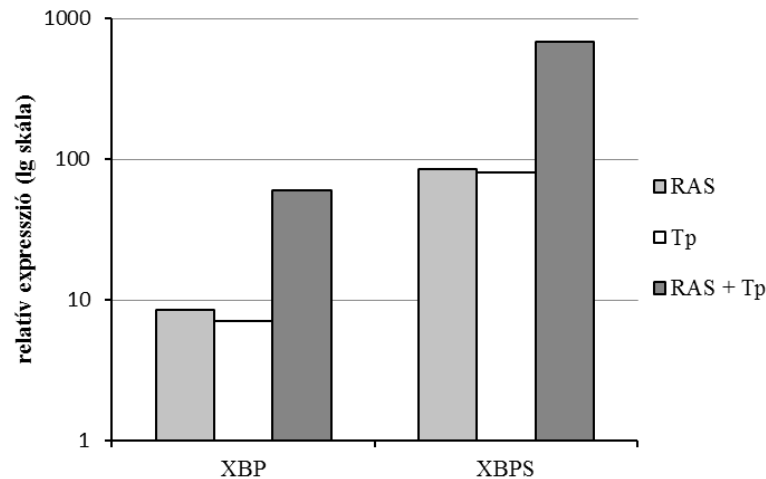
4.2.8. Rli depléció hatása az unfolded protein response-ra

Korábbi *Saccharomyces cerevisiae* sejteken végzett kísérleteink során, melyekben kerestük az Rli1p eddig nem ismert, de esszenciális voltát magyarázó szerepét, már bizonyítottuk, hogy részt vesz az unfolded protein response-ban is. Az RNáz L és az Ire1p C-terminálisain lévő kináz és endonukleáz domének magas fokú hasonlóságot mutatnak humán sejtekben is. Kíváncsiak voltunk, vajon ez a szerkezeti hasonlóság elegendő-e ahhoz, hogy a humán Rli, hasonlóan az élesztő Rli1p-hez, az Ire1 fehérjéhez is kapcsolódva részt vegyen humán sejtekben az UPR folyamatában

Az UPR előidézéséhez HeLa sejteket kétféle anyaggal kezeltük: tapszigarginnal, amely az endoplazmatikus retikulum kalciumion koncentrációját lecsökkentve, vagy DTT-vel, amely a diszulfid hidak redukálása révén idézi elő az UPR aktivációját. A fokozott UPR-t a totál és a hasított XBP1 (sXBP1) mRNS meghatározásával végeztük real time PCR segítségével. A tapszigargin kezelés hatására hétszeres növekedés volt megfigyelhető a total XBP és nyolcvanszoros a sXBP mRNS mennyiségében. DTT kezelés hatására közel hasonló eredményeket kaptunk HeLa sejtekben. Ennek alapján elmondhatjuk, hogy mindkét alkalmazott módszerrel sikerült sejt kultúrában az UPR folyamatát aktiválnunk. Későbbiek során a tapszigargin kezelést alkalmaztuk.

Következő lépésben Rli antiszensz pCDNA 3.1 plazmiddal transzfektált sejtkenél és a transzfekciót követően tapszigarginnal kezelt

sejtekben vizsgáltuk az UPR indukciót, real time PCR segítségével mértük az XBP (totál és splicingon átesett) mRNS mennyiségét (14. ábra). Mind magában az Rli depléción, mind a tapszigarginnal tör-



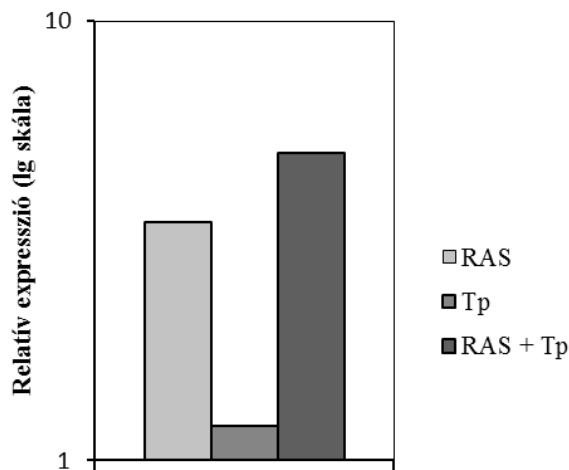
14. ábra. Real time PCR HeLa sejtekből az UPR aktivációja Rli antiszensz, tapszigargin és együttes kezelését követően. Logaritmus skálán ábrázolva a relatív expressziós változást. Az ábrán egy reprezentatív kísérlet eredményei láthatóak.

tént kezelés hatására a sejtekben növekedett az XBP és sXBP mRNS mennyisége. Az Rli depléción is UPR aktivációt idézett elő. A két kezelés hatása kumulálódva még látványosabb változást eredményezett. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a csökkent Rli fehérjeszint emlős sejtekben is az UPR aktivációjához vezet.

4.3. UPR aktiváció hatása a hepcidin szintre

Az utóbbi években az irodalomban megjelent közlemények alapján az emlős sejtek vasanyagcseréjét befolyásoló hormon, a hepcidin expressziója többek között az endoplazmatikus retikulum stressz szabályozása alatt is áll (Gardner és Walter, 2011; Oliveira és mtsai,

2011). Úgy tűnik, hogy az UPR aktivációhoz vezető folyamatok különböző sejten belüli jelátviteli utakon keresztül hatással lehetnek a hepcidin transzkripciójára is. Kíváncsiak voltunk, hogy az Rli depléciójával kiváltott UPR is indukál-e a hepcidin szintézisében változást. Ahhoz, hogy ezt az összefüggést bizonyítsuk Rli antiszensz transzfektált sejtekből és tapszigarginnal kezelt HeLa sejtekből is totál RNS-t izoláltunk, majd hepcidin mRNS mennyiségét határoztunk meg real time PCR-al. Érdekes eredmény volt, hogy a tapszigargin kezelés önmagában nem eredményezett változást a hepcidin expressziójában (15. ábra), addig az Rli depléciónak több, mint négyszeres növekedést okozott.



15. ábra. Real time PCR HeLa sejtekből, tapszigarginnal előidézett ER stressz indukció, Rli depléciónak és együttes hatásuk a hepcidin mRNS-ének mennyiségére. Egy reprezentatív mérés eredményei.

Ezekből az eredményekből azt a következtetést vonhattuk le, mely szerint az Rli depléciónak az egyike azon faktoroknak, amelyek a hepcidin expresszióját befolyásolhatják, de a tapszigarginnal létrehozott UPR aktivációnak nincs ilyen jellegű hatása.

5. Megbeszélés

5.1. Szérum prohepcidin meghatározás Crohn betegségben és colitis ulcerosában szenvedőknél

A munkánk célja volt, hogy a gyulladós bélbetegségben szenvedő betegek vasháztartása, gyulladós paraméterei és a szérum prohepcidin szintje közötti kapcsolatokat vizsgáljuk. Kerestük az esetleges hasonlóságokat és különbségeket a két betegcsoport között, amiket magyarázhat az eltérő patofiziológia és etiológia. Mivel más, krónikus gyulladós betegségekben már korábban leírták az anaemia kialakulása és a hepcidin szint közötti kapcsolatot, így célunk volt ennek felderítése Crohn és colitis ulcerosás betegek esetében is.

A gyulladós bélbetegségben szenvedők az akut fázis reakciónak megfelelő laboratóriumi eltérésekkel, és szövettanilag a fehérsejtek bélfalba történő migrációjával jellemezhetőek. Normális állapotban a mucosalis immunitás fontos feladata, hogy a patogénnel szemben megfelelő immunválaszt indítson el és felismerje a saját antigéneket. Ennek a folyamatnak az ellenőrzése károsodott a gyulladós bébetegségek esetén.

Az inflammatorikus állapotokban a szervezet vasháztartása károsodott és vérszegénység alakul ki. Az immunválasz egyik elsődleges közvetítője az IL-6 citokin, melyet a makrofágok és a T-sejtek termelnek. IL-6 hatására az akut fázis fehérjék, köztük a hepcidin expressziója jelentősen fokozódik a klasszikus JAK/STAT útvonalon keresztül. Ez vezet először a funkcionális vashiányhoz, mely esetében még telítettek a vasraktárak, de az eritropoézis számára hozzáférhetetlenek, mivel a vas exportja a magas hepcidin szint

miatt gátolt. Ha a gyulladásszerű stimulusok hosszabb ideig fennállnak, mint a két gyulladásszerű bélbetegség esetében, microcitozis és hipokromia alakul ki.

Az irodalomban számos közleményt találhatunk, melyekben krónikus betegségekhez társult másodlagos vérszegénységről, a vasanyagcsere károsodásáról olvashatunk. Cirrózisban, krónikus veseelégtelenségben, rosszindulatú daganatos megbetegedésekben, autoimmun kórképekben (reumatoid arthritis, szisztémás lupusz eritematosus) vizsgálták a szérumban hepcidin, prohepcidin szintek és más laborparaméterek kapcsolatát (Koca és mtsai, 2008).

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a májat érintő betegségek esetében a szérumban prohepcidin szint és a hepcidin mRNS-ének expressziója egyaránt csökkenést mutat. Krónikus veseelégtelenségben a prohormon és az érett hepcidin szintje is emelkedett a kontrollcsoportéhoz képest. A hepatocelluláris karcinoma kivételével a többi tumoros megbetegedésben a hepcidin expressziója fokozott mértékű, ez vezet a vashiány kialakulásához és az anémiához.

Két autoimmun betegség esetében, a reumatoid arthritisnél és a szisztémás lupusz eritematosusnál leírták, hogy a betegség aktivitása, a szérumban vas, hemoglobin, citokin szintek nem mutatnak szignifikáns korrelációt a prohepcidin szinttel, de kapcsolat van a ferritin, IL-6 és a reumafaktor titerével.

Méréseink célja az volt, hogy megvizsgáljuk a szérumban prohepcidin szintjét mint lehetséges diagnosztikus vagy prognosztikus faktort a két krónikus autoimmun gyulladásszerű bélbetegségben, a colitis ulcerosában és a Crohn betegségben. Ezek a betegségek a fent említett krónikus gyulladásszerű betegségekkel szemben még annyival összetettebb klinikai képet mutatnak a vasanyagcsere szempontjából, hogy esetenként sérülhet a vas felszívódása is, illetve ami

még jelentősebb, gyakran vérzés lép fel. Számos, a szervezet vasháztartását jellemző faktorról (szérum vas, teljes vaskötő kapacitás, hemoglobin, transferrin és transferrin szaturáció), gyulladásos paraméterekkel (C-reaktív fehérje, fehérvérsejt szám, süllyedés) és a betegségek súlyosságával (aktivitási index) kerestünk korrelációt.

Elmondhatjuk, hogy mindkét betegcsoportban a C-reaktív protein, a vörösvértest-süllyedés szignifikánsan magasabb, mint az egészséges csoportban, függetlenül attól, hogy a betegség aktív vagy remisszió fázisában volt-e. Nem vizsgáltuk a betegeknél a szérum ferritin szintet, ami napjainkban a legelfogadottabb markere a vashiányos állapotnak, mert ez a fehérje egy akut fázis fehérje, szérum szintje gyulladásban megemelkedik, ezáltal megtévesztő lehet a szervezet vasháztartásának megítélésében.

Mindkét betegcsoportban a szérum vas szintje és a transferrin szaturáció alacsonyabb volt a kontrollcsoporthoz viszonyítva. A transferrin szintje, még ha nem is szignifikánsan, de szintén alacsonyabb volt, mint az egészséges kontroloké. Ez azzal magyarázható, hogy a transferrin az anti akut fázis fehérjék csoportjába tartozik, tehát az IL-6-STAT3-cEBP α útvonal aktiválódásával expressziója lecsökken. A transferrin szaturáció csökkenése a vashiányos állapot megbízhatóbb mutatója, mint a szérum vas csökkenése. A Crohn-betegekben korrelációt találtunk a szérum prohepcidin és a transferrin, transferrin szaturáció, a teljes vaskötő kapacitás és az aktivitási index között. Colitis ulcerosában szenvedőknél csak a transferrin szaturáció és a transferrin között lehetett kapcsolatot kimutatni. Ez azért érdekes, mert a colitis ulcerosás betegek esetében gyakran jön létre okkult vérzés a gasztrointesztinális csatornában, mely szekunder vashiányhoz vezethet, a vas direkt vesztésén keresztül. Tehát a betegség relapszusa esetén sem a vérzés miatt

kialakuló anémia volt a meghatározó, hiszen ebben az esetben a hepcidin mennyiségének emelkedni kellett volna.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a prohepcidin szint meghatározása nem ad önmagában a mindennapi klinikai gyakorlatban elegendő információt a gyulladásos bélbetegségek esetében a betegség aktivitásáról, azonban alkalmas a kialakuló vérszegénység követésére. További céljaink között szerepel ezeknél a betegeknél az érett hepcidin szintjének a meghatározása. Feltételezésünk szerint ez utóbbi jobb paraméter lehet prognosztikai célokra.

Az már mindenki által elfogadott alapelv, hogy a vas homeosztázisában fontos fehérjéknek immunológiai szerepe is van. Az emberi genom megismerésével vált egyértelművé, hogy kevesebb fehérje képződik, mint amennyi feladat van, így egy proteinmolekulának igen eltérő szerepeket is be kell töltenie. A hepcidinnek antimikrobás hatása van, direkt bakteriosztatikus a vasanyagcsere regulálása mellett. Emiatt és a defenzinokkal való mind strukturális, mind érési hasonlóság miatt a jövőben érdemes lehet a hepcidinnek nem csak mint diagnosztikus faktornak, hanem mint a betegség előidézésében szerepet játszó peptidnek a vizsgálatával foglalkozni.

5.2. RNáz L inhibitorral végzett kísérleteink

A munkánk során elvégzett kísérletekkel sikerült az RNáz L Inhibitornak egy eddig nem ismert funkcióját, az unfolded protein response-ban betöltött szerepét bizonyítani emlős sejtkultúrákban. Ezen kívül megállapíthatjuk az eredményeink alapján, hogy az Rli hiány által indukált UPR HeLa sejtekben hatással van a HAMP gén expressziójára, így a vas anyagcsere szabályozó hepcidin hormon mennyiségére.

Három különböző sejtvonalban vizsgáltuk az Rli mRNS-ének mennyiségét, ezek közül kettő karcinóma eredetű sejtvonal volt. A tumoros sejtvonalakban, a HeLa-ban és a HepG2-ben a WRL-68 májsejtvonalhoz képest jelentősen magasabb volt az Rli fehérje expressziója. Ez magyarázható egyrészt azzal, hogy a magas proliferációs aktivitást mutató és/vagy malignus transzformáción átesett sejtekben fokozott az anyagcsere, több fehérje termelődik és fokozott mértékű a transzláció is, amelyben az Rli-nek fontos szerepe van. Ennek a folyamatnak a pontos tisztázásához azonban további kísérletek szükségesek.

Az Rli esszenciális funkcióját, a transzlációban betöltött szerepét, elsőként élesztő sejtekben írta le részben munkacsoportunk, részben Yaurin, Dong és munkatársaik. Ismert tény, az is, hogy az emlős sejtekben szintén szerepe van a fehérjeszintézisben. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy HeLa sejtekben, az élesztő sejtekhez hasonlóan, az Rli fehérje szintjének csökkenése csökkentette az újonnan szintetizálódó fehérjékbe történő metionin beépülést. Ez egy általános hatás, mely minden fehérje szintézisét károsan érintette az Rli depletált sejtekben. Érdekes eredmény, hogy a humán RNáz L Inhibitor a magas fokú szerkezeti és funkcionális hasonlóság ellenére sem képes komplementálni az élesztőben az Rli 1p hiányát. Tet-Rli sejteken végzett kísérleteinkkel igazoltuk, hogy az N-terminálison az első 173 aminosavat tartalmazó régió lecserélése nem jár letális következményekkel, és csak ezek, az általunk 4-esnek jelzett kiméra sejtek képesek Doxycyclin jelenlétében növekedni, az élesztő Rli 1p-t komplementálni. Ezzel ellentétben, ha az N-terminális közelében lévő első, a két fajban eltérő régiót a humán szekvenciával helyettesítjük (5-ös, 6-os kiméra), olyan változás jön létre, mely a sejtek számára letális hatású. Hasonló következményekkel jár, ha

a C-terminális közelében lévő eltérő szekvenciát cseréljük humán eredetűre. Összegezve elmondhatjuk, hogy a két szekvencia nagyfokú hasonlósága ellenére csak egy rövid szakasz helyettesíthető humán szekvenciával az élesztő sejtekben, anélkül, hogy funkció kiesés alakulna ki. Ez valószínűleg a magasabb rendű struktúrát befolyásoló változásokkal magyarázható.

Az Rli unfolded protein response-ban betöltött szerepét korábban már igazoltuk élesztő sejtekben. Tet-Rli sejtekben Doxycylin kezelést követően a Kar2p fehérje szint az Rli1p mennyiségének csökkenésével párhuzamosan növekedést mutatott és a Hac1 intront már nem tartalmazó, processzált mRNS-e volt kimutatható, azaz az UPR aktivációját láttuk. Ezek alapján megvizsgáltuk humán sejtvonalakban is az Rli ilyen irányú funkcióját. Eredményeink azt mutatják, hogy Rli depléciónál az XBP mRNS-ének fokozott hasítódását figyelhetjük meg, tehát az UPR fokozott aktivitással működik. Ha az Rli depletált sejteket az endoplazmatikus retikulum stresszét kiváltó anyagokkal (tapszigargin, DTT) kezeljük, ez a változás még jelentősebb lesz.

Irodalomból ismert adat, hogy az UPR aktiválódása a hepcidin expresszió fokozódásához vezet. Mivel nem minden mechanizmussal kiváltott unfolded protein response idézi elő a fenti hatást, megvizsgáltuk, hogy vajon az Rli expresszió csökkenése által kiváltott UPR aktiváció jár-e következményes hepcidin mRNS szint növekedéssel. Az a megfigyelésünk, hogy ez a kapcsolat valóban fennáll, azaz az Rli szint csökkenése a hepcidin expresszió fokozódását idézi elő, felveti a kérdést, hogy esetleg a vas-kén komplex szintézis és a hepcidin szintézis között van szoros összefüggés. Erre a lehetőségre utal az is, hogy az Rli mennyiségének csökkenése a mitokondriális vasanyagcserét befolyásoló komponensek változását is előidézi.

Feltételezzük, hogy a mitokondriális vasanyagcsere (ahol a hem és a vas-kén komplex is szintetizálódik) szabályozásának változása a hepcidin szintézis legfőbb sejten belüli befolyásoló tényezője. A hepcidin szint emelkedésének következménye a vas sejten belüli szekvesztrációja. Feltételezésünk, hogy az Rli mennyiségének csökkenését a sejt a mitokondriális bioszintetizáló folyamatok, köztük a vas-kén komplex szintézis károsodásaként érzékeli, ezért a hepcidin szintézis fokozásával a vas sejten belül tartására törekszik. Elméletünk bizonyítására további kísérletek elvégzése szükséges.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az RNáz L inhibitor fehérjével kapcsolatban új megfigyeléseink az alábbiak: tumoros eredetű sejt-kultúrákban az Rli expressziója fokozott az embrionális sejtekhez képest; az Rli expressziójának csökkentése humán sejtekben nemcsak a fehérjeszintézis általános csökkenéséhez, hanem az unfolded protein response aktiválásához is vezetett; az Rli mennyiségének csökkenése a humán sejtekben mindamellet a hepcidin expresszióját is befolyásolta.

6. Összefoglalás

1. A két, gyulladásos bélbetegségben szenvedő betegcsoport laboratóriumi eredményeit megvizsgálva elmondhatjuk, hogy a gyulladásos paraméterek (C-reaktív protein, süllyedés) szignifikánsan magasabbak, mint a kontroll csoportban, attól függetlenül, hogy a nemzetközileg elfogadott kérdőívek alapján számított, a terápiát is befolyásoló aktivitási index alapján remisszióban voltak-e a betegek vagy sem. Mind a colitis ulcerosás, mind a Crohn-betegek esetében alacsonyabb volt a szérum vas szintje a transferrin és a transferrin szaturáció, mint az egészségesek esetében.
2. A Crohn-betegekben korrelációt találtunk a szérum prohepcidin és a transferrin, transferrin szaturáció, a teljes vaskötő kapacitás és az aktivitási index között. Ezzel szemben colitis ulcerosában szenvedőknél csak a transferrin szaturáció és a transferrin mutatott kapcsolatot a szérum prohepcidin szinttel. Ezek alapján elmondható, hogy a prohepcidin szint meghatározása alkalmas a vérszegénység nyomon követésére ebben a betegcsoportban is.
3. Tumoros eredetű sejtkultúrákban az RNáz L Inhibitor expressziója az embrionális sejtvonalakhoz képest fokozott.
4. A humán és élesztő Rli szekvenciájának nagyfokú a hasonlósága ellenére egy rövid szakasz helyettesíthető humán szekvenciával az élesztő sejtekben, anélkül, hogy funkció kiesés alakulna ki, mely letális hatással jár. Ez valószínűleg a magasabb rendű struktúrát befolyásoló változásokkal magyarázható

5. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy HeLa sejtekben, az élesztő sejtekhez hasonlóan, az Rli fehérje szintjének csökkenése csökkentette az újonnan szintetizálódó fehérjék mennyiségét.
6. Vizsgáltuk az RNáz L Inhibitor szerepét az unfolded protein response folyamatában. A fehérje hiányában az UPR fokozott aktivitással működik. Abban az esetben, ha az Rli depletált sejteket UPR-t aktiváló anyagokkal kezeljük a változás még jelentősebb mértékű.
7. Elmondhatjuk, hogy a vasanyagcserét szabályozó hormon, a hepcidin expressziójára hatással van az RNáz L Inhibitor hiánya által indukált UPR.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Sipos Katalinnak munkám során nyújtott szakmai és emberi támogatását, segítségét. Köszönetet szeretnék mondani Dr. Kovács L. Gábornak és Dr. Miseta Attilának a munkánk tudományos és anyagi támogatásáért. Köszönöm a közvetlen munkatársaim, dr. Pandur Edina, Poór Viktor Soma, Hajnikné Gábor Ilona türelmét és segítőkészségét. Ezen felül köszönettel tartozom munkához nyújtott közreműködésükért PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, Laboratóriumi Medicina Intézet valamennyi dolgozójának és jelenlegi kollégáimnak a PTE Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézetben.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni családomnak, barátaimnak azt a türelmet, melyet irántam tanúsítottak az elmúlt években.

Hivatkozások

- Anderson GJ, Frazer DM, McLaren GD. Iron absorption and metabolism. *Curr Opin Gastroenterol* **25**:129–135, 2009.
- Anderson GJ, Frazer DM, Wilkins SJ, és mtsai. Relationship between intestinal iron-transporter expression, hepatic hepcidin levels and the control of iron absorption. *Biochem Soc Trans* **30**:724–726, 2002.
- Bernales S, Papa FR, Walter P. Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**:487–508, 2006.
- Best WR. Predicting the Crohn's disease activity index from the Harvey-Bradshaw Index. *Inflamm Bowel Dis* **12**:304–310, 2006.
- Bisbal C, Martinand C, Silhol M, Lebleu B, Salehzada T. Cloning and characterization of a RNase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2-5A pathway. *J Biol Chem* **270**:13308–13317, 1995.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248–254, 1976.
- Calfon M, Zeng H, Urano F, és mtsai. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**:92–96, 2002.
- Dong J, Lai R, Nielsen K, Fekete CA, Qiu H, Hinnebusch AG. The essential ATP-binding cassette protein RLI1 functions in translation by promoting preinitiation complex assembly. *J Biol Chem* **279**:42157–42168, 2004.
- Dunn LL, Suryo Rahmanto Y, Richardson DR. Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol* **17**:93–100, 2007.
- Fellermann K, Stange EF. Defensins – innate immunity at the epithelial frontier. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **13**:771–776, 2001.
- Gardner BM, Walter P. Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* **333**:1891–1894, 2011.
- Gürel S, Kiyici M. Ulcerative colitis activity index: a useful prognostic factor for predicting ulcerative colitis outcome. *J Int Med Res* **33**:103–110, 2005.
- Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev* **15**:79–94, 2002.

- Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* **117**:285–297, 2004.
- Iolascon A, De Falco L. Mutations in the gene encoding DMT1: clinical presentation and treatment. *Semin Hematol* **46**:358–370, 2009.
- Kaplan J, Ward DM, De Domenico I. The molecular basis of iron overload disorders and iron-linked anemias. *Int J Hematol* **93**:14–20, 2011.
- Kemna EHJM, Tjalsma H, Willems HL, Swinkels DW. Hepcidin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica* **93**:90–97, 2008.
- Kispal G, Sipos K, Lange H, és mtsai. Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *EMBO J* **24**:589–598, 2005.
- Koca SS, Isik A, Ustundag B, Metin K, Aksoy K. Serum pro-hepcidin levels in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Inflammation* **31**:146–153, 2008.
- Krause A, Neitz S, Mägert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, Adermann K. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* **480**:147–150, 2000.
- Kulaksiz H, Gehrke SG, Janetzko A, Rost D, Bruckner T, Kallinowski B, Stremmel W. Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. *Gut* **53**:735–743, 2004.
- Langhorst J, Elsenbruch S, Koelzer J, Rueffer A, Michalsen A, Dobos GJ. Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP, and clinical indices. *Am J Gastroenterol* **103**:162–169, 2008.
- Lee P, Peng H, Gelbart T, Beutler E. The IL-6- and lipopolysaccharide-induced transcription of hepcidin in HFE-, transferrin receptor 2-, and beta 2-microglobulin-deficient hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:9263–9265, 2004.
- Lee P, Peng H, Gelbart T, Wang L, Beutler E. Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:1906–1910, 2005.
- Nemeth E, Preza GC, Jung CL, Kaplan J, Waring AJ, Ganz T. The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood* **107**:328–333, 2006.

- Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* **113**:1271–1276, 2004.
- Neuman MG. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl Res* **149**:173–186, 2007.
- Oliveira SJ, de Sousa M, Pinto JP. ER Stress and Iron Homeostasis: A New Frontier for the UPR. *Biochem Res Int* **2011**:896474, 2011.
- Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* **276**:7806–7810, 2001.
- Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, LorĀsal O. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is over-expressed during iron overload. *J Biol Chem* **276**:7811–7819, 2001.
- Roy CN, Andrews NC. Anemia of inflammation: the hepcidin link. *Curr Opin Hematol* **12**:107–111, 2005.
- Sambrook J, Russel D. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Schibli DJ, Hunter HN, Aseyev V, és mtsai. The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **277**:8279–8289, 2002.
- Sonenberg N, Hinnebusch AG. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* **136**:731–745, 2009.
- Theil EC, Goss DJ. Living with iron (and oxygen): questions and answers about iron homeostasis. *Chem Rev* **109**:4568–4579, 2009.
- Thoreson R, Cullen JJ. Pathophysiology of inflammatory bowel disease: an overview. *Surg Clin North Am* **87**:575–585, 2007.
- Vecchi C, Montosi G, Zhang K, Lamberti I, Duncan SA, Kaufman RJ, Pietrangelo A. ER stress controls iron metabolism through induction of hepcidin. *Science* **325**:877–880, 2009.
- Wehkamp J, Fellermann K, Stange EF. Human defensins in Crohn's disease. *Chem Immunol Allergy* **86**:42–54, 2005.
- Weiss G. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. *Biochim Biophys Acta* **1790**:682–693, 2009.
- Welihinda AA, Kaufman RJ. The unfolded protein response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Oligomerization and trans-

phosphorylation of Ire1p (Ern1p) are required for kinase activation. *J Biol Chem* **271**:18181–18187, 1996.

Yarunin A, Panse VG, Petfalski E, Dez C, Tollervey D, Hurt EC. Functional link between ribosome formation and biogenesis of iron-sulfur proteins. *EMBO J* **24**:580–588, 2005.

Zhang AS, Enns CA. Molecular mechanisms of normal iron homeostasis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 207–214, 2009.

Publikációs jegyzék

A disszertáció alapját alkotó közlemények

J. Nagy, L. Lakner, V. S. Poór, E. Pandur, Gy. Mózsik, A. Miseta, K. Sipos: Serum prohepcidin levels in chronic inflammatory bowel diseases. *Journal of Crohn's and Colitis* 2010; 4:649–653, IF 2,628

J. Nagy, V. S. Poór, E. Pandur, B. Debreceni, Zs. Fekete, A. Miseta, K. Sipos: Connection of Rli expression to UPR activation in HeLa cells. 2011

Témához kapcsolódó egyéb tudományos közlemények

E. Pandur, **J. Nagy**, V. S. Poór, Á. Sarnyai, A. Huszár, A. Miseta, K. Sipos: Alpha-1 antitrypsin binds preprohepcidin intracellularly and prohepcidin in the serum. *FEBS Journal* 2009; 276:2012–2021, IF 3,042

E. Pandur, K. Sipos, **J. Nagy**, V.S. Poór, L. Grama, A. Miseta and Zs. Fekete: Prohepcidin binds to HAMP promoter and regulates its own gene expression in hepatocytes. 2011

E. Pandur, **J. Nagy**, V.S. Poór, Zs. Fekete, A. M. Peti, A. Miseta, K. Sipos: The higher structure of hepcidin is essential for binding to ferroportin. 2011

Referált folyóiratban megjelent absztraktok

J. Nagy; E. Pandur; V. S. Poór; B. Debreceni; K. Sipos: The function of human RNase L Inhibitor in translation.

33. FEBS Congress Athens, Greece, June 28–July 3 2008; *FEBS Journal* 2008; 275 S1:127, IF 3,14

E. Pandur; **J. Nagy**; V. S. Poór; A. Miseta; K. Sipos: In vivo interactions of preprohepcidin and mature hepcidin with ferroportin.

33. FEBS Congress Athens, Greece, June 28–July 3 2008; *FEBS Journal* 2008; 275 S1:316, IF 3,14

V. S. Poór; E. Pandur; **J. Nagy**; K. Sipos; A. Miseta: Protein-protein interaction screening with BacterioMatch system

33. FEBS Congress, Athens, Greece, June 28–July 3 2008; *FEBS Journal* 2008; 275 S1:42, IF 3,14

Z. Fekete; K. Sipos; H. Lange; **J. Nagy**; R. Lill; G. Kispál: The iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria play an essential role in the biogenesis of cytosolic ribosomes.

30. FEBS Congress—9. IUBMB Conference, Budapest, Hungary July 2–7 2005, IF:3,14

Témához kapcsolódó kongresszusi poszterek

Antus Zs., Sipos K., Fekete Zs., **Nagy J.**, Mártonfalvi Zs., Kispál Gy. Az Rli1p szerepe az unfolded protein response-ban. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 8. Munka-értekezlete, Tihany, 2003. május 12–15.

Fekete Zs., Sipos K., Antus Zs., **Nagy J.**, Mártonfalvi Zs., Kispál Gy. A cisztein deszulfuráz (Nfs1p) szerepe a tio-tRNS modifikációban eukarióta sejtben (p). A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 8. Munkaértekezlete, Tihany, 2003. máj. 12–15.

Sipos K., Fekete Zs., **Nagy J.**, Bedekovics T., Debreceni B. Az RNáz L inhibitor szerepe a riboszómák érésében XII. Sejt- és fejlődésbiológiai napok, Pécs, 2004. ápr. 16–18.

Sipos K., Fekete Zs., Debreceni B., **Nagy J.** Az RNáz L inhibitor szerepe a riboszóma biogenezisben. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 9. Munkaértekezlete, Sopron, 2004. máj. 10–13.

Nagy J., Pandur E., Szabó A., Montskó G., Bognár Z., Sipos K. A humán RNáz L inhibitor szerepe a transzlációban. V. Magyar sejtanalitikai konferencia, Budapest, 2006. máj. 4–6.

Pandur E.; **Nagy J.**; Szabó A.; Montskó G.; Radnai B.; Sipos K.: A hepcidin expressziójának intracelluláris szabályozása V. Magyar sejtanalitikai konferencia Budapest máj. 4-6. 2006.

Nagy J.; Pandur E.; Szabó A.; Montskó G.; Peti M. A.; Sipos K.: Ferroportin egy hepcidin hormon által szabályozott vas transzporter 36. Membrán-Transzport konferencia Sümeg máj. 23-26. 2006.

Pandur E.; **Nagy J.**; Szabó A.; Montskó G.; Sipos K.: A mitokondrium jelentősége a transzláció szabályozásában humán sejtekben 36. Membrán-Transzport konferencia Sümeg máj. 23-26. 2006.

Nagy J.; Pandur E.; Debreceni B.; Montskó G.; Sipos K.: Egy közös molekula szerepe a riboszómális RNS érésben élesztő és emlős sejtekben A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése aug. 30–szept. 2. 2006.

Pandur E.; **Nagy J.**; Montskó G.; Peti M. A.; Sipos K.: A hepcidin, egy vasanyagcserét szabályozó hormon vizsgálata A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése aug. 30–szept. 2. 2006.

Nagy J.; Pandur E.; Debreceni B.; Poór V. S.; Sipos K.: Humán-élesztő hibrid RNáz inhibitor funkcionális vizsgálata 37. Membrán-Transzport konferencia Sümeg máj. 22-25. 2007.

Pandur E.; **Nagy J.**; Poór V. S.; Peti M. A.; Sipos K.: Hecpidin interakciója más fehérjékkel 37. Membrán-Transzport konferencia Sümeg máj. 22-25. 2007.

Poór V. S.; Pandur E.; **Nagy J.**; Peti M. A.; Sipos K.; Miseta A.: A hepcidin antimikrobiális hatásmechanizmusának vizsgálata 37. Membrán-Transzport konferencia Sümeg máj. 22-25. 2007.

Sipos K.; Pandur E.; **Nagy J.**; Poór V. S.: A hepcidin, egy vasanyagcserét szabályozó hormon jellemzése 37. Membrántranszport Konferencia Sümeg máj. 22-25. 2007.

Pandur E.; **Nagy J.**; Poór V. S.; Sipos K.: C/EBP alfa és Smad4 transzkripciós faktorok szerepe a vasanyagcsere szabályozásában WRL68 sejttenyészetben XVI. Nemzetközi Semmelweis Szimpózium és VI. Magyar Sejtanalitikai Konferencia Budapest nov. 15-17. 2007.

Poór V. S.; Pandur E.; **Nagy J.**; Sipos K.: A hepcidin és ferroportin expressziójának változása CaCo, WRL és HepG2 sejtekben XVI. Nemzetközi Semmelweis Szimpózium és VI. Magyar Sejtanalitikai Konferencia Budapest nov. 15-17. 2007.

Nagy J.; Lakner L.; Pandur E.; Poór V. S.; Mózsik Gy.; Sipos K.; Miseta A.: Prohepcidinszint meghatározása gyulladásoos bélbetegségekben XVI. Nemzetközi Semmelweis Szimpózium és VI. Magyar Sejtanalitikai Konferencia Budapest nov. 15-17. 2007.

Pandur E.; **Nagy J.**; Poór V. S.; Miseta A.; Sipos K.: A hepcidin és a ferroportin kapcsolatának vizsgálata BacterioMatch Two-Hybrid rendszerrel 38. Membrán-Transzport konferencia Sümeg máj. 20-23. 2008.

Nagy J.; Pandur E.; Poór V. S.; Rab A.; Sipos K.; Miseta A.: C/EBP alfa és SMAD4 transzkripcióos faktorok hatása a hepcidin expressziójára 38. Membrán-Transzport konferencia Sümeg máj. 20-23. 2008.

Poór V. S.; Pandur E.; **Nagy J.**; Rideg O.; Miseta A.; Sipos K.: Protein-protein kapcsolatok vizsgálata BacterioMatch rendszerrel 38. Membrán-Transzport konferencia Sümeg máj. 20-23. 2008.

Pandur E., **Nagy J.**, Poór V.S., Rapp J., Miseta A., Sipos K., Fekete Zs.: A hepcidin gén (HAMP) expresszió szabályozásának új mechanizmusa hepatocitákban. 40. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg máj. 18-21. 2010.

Poór V.S., Pandur E., **Nagy J.**, Rácz E., Miseta A., Sipos K.: A hepcidin és az alfa-1 savas glikoprotein interakciója 40. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg máj. 18-21. 2010.

Pandur E., **Nagy J.**, Poór V. S., Rapp J., Mayer M., Miseta A., Sipos K.: A diszulfid-hidak szerepe a hepcidin-mediálta ferroportin internalizációban 41. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg máj. 17-20. 2011.

Poór V. S., **Nagy J.**, Pandur E., Debreceni B., Rácz E., Mayer M., Sipos K.: Az RNáz L inhibitor szerepe az Unfolded Protein Response-ban 41. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg máj. 17-20. 2011.

Poór V. S. Pandur E., **Nagy J.**, Rácz E., Miseta A., Sipos K.: A hepcidin és az alfa-1 savas glikoprotein kapcsolata A Magyar Biokémiai Egyesület 2011. évi Vándorgyűlése Pécs aug. 28-31. 2011.

Előadások

Sipos K.; Pandur E.; **Nagy J.**; Poór V. S.: A hepcidin, egy vas-anyagcserét szabályozó hormon jellemzése 37. Membrántranszport Konferencia Sümeg máj. 22-25. 2007.

V.S. Poór, E. Pandur, **J. Nagy**, A. Miseta, K. Sipos: New protein-protein interactions of the human hepcidin The 5th International Conference of Postgraduate Medical Students Hradec Králové Czech Republic nov. 27-29. 2008.

Miseta A.; Pandur E.; **Nagy J.**; Huszár A.; Sipos K.: Az alfa-1 antitripszin szerepe a hepcidin éréseben Erdélyi Múzeum Egyesület, Orvos és Gyógyszerésztudományi Szakosztály, XIX. Tudományos Ülésszak Marosvásárhely Románia ápr. 23-25. 2009.

Miseta A.; Pandur E.; **Nagy J.**; Poór V.S.; Huszár A.; Sipos K.: Az alfa-1 antitripszin szerepe a hepcidin éréseben XI. Pécsi Hepatológiai Nap Pécs máj. 23. 2009.