

Ph. D. értekezés tézisei

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

dr. Nagy Judit

Programvezető: Prof. Dr. Kovács L. Gábor
Témavezető: Dr. Sipos Katalin

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Laboratóriumi Medicina Intézet



Pécs, 2012.

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 electro- phoresis, **SERCA** sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, **STAT3** signal transducer and activator of transcription 3, **TfR** transferrin 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.

Bevezetés

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 mioglobinban, 4 %-a szöveti enzimekben (hem és nem hem formában) található, 15%-ban a szövetekben ferritinként és 6%-ban hemosziderinként raktározódik. Ezrelékes mennyiségben nem kötött vasat is találhatunk a vérben. 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 (Fe²⁺) formában tartja. A táplálékkal bejutott Fe³⁺ ionokat a duodenális citokróm b (DCYTB) Fe²⁺-vé redukálja. Az enterociták a hem vasat is képesek felvenni, a hasítás csak a sejten belül következik be. A duodenális enterociták apikális membránjában helyezkedik el egy, a vas felvételért is felelős transzporter, a DMT1/Nramp2. 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 Fe²⁺ ionokat a hefesztin oxidálja a transferrin számára felvehető Fe³⁺ ionokká.

A vas a vérben egy 80000 molekulatömegű β -globulinhoz, a transferrinhez kötve kering, mely molekulánként két Fe³⁺ iont képes megkötni, ezek leadását követően újabb ionokat köt. Ez a fehérje a májban képződik, féléletideje 8-10 nap. Normálisan a

kötőkapacitás 1/3 része telített vassal, de a szérumban 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. Az így létrejött endoszóma a sejten belül egy savas vezikulával 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.

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 szérumban vasszintje relatíve állandó.

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 szérumban vastartalma szabályozza.

Klinikailag jóval ritkább esetben fordul elő vastúltelítettség, mint vashiány. Előbbi esetben a nem hemhez kötött és a nem transferrinhez kötött vas is megjelenik a keringésben. Ez elsősorban a szív és a máj szöveteibe jut, ahol felhalmozódik. Májig 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.

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**. Mára már ismert, hogy a májon kívül más szervekben, többek között a vesében, szívben, tüdőben, duodenumban, nyirokcsomókban is szintetizálódik ez a fehérje. 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 hormonnál van szó. A humán hepcidin génje a 19-es kromoszómán helyezkedik el (19q13.1), 3 exonból és 2 intronból áll. 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. Végül, 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 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.

Már az első hepcidinnel foglalkozó közleményekből ismert, hogy a hepcidin mRNS expressziója növekedését mutat, ha a szervezetet, sejteket gyulladással noxa éri, vagy vastúlterhelés áll fenn. 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. vasraktár függő, 2. az eritropoetikus aktivitástól függő, 3. gyulladástól függő és 4. végrehajtó jelátviteli útvonal.

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 szekvesztrációjához. Egy, az ER stressz asszociált, máj specifikus transzkripciós faktor, a CREBH (cyclic AMP response element-binding protein H) képes a hepcidin promoteréhez kapcsolódva, annak átíródását befolyásolni. 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 a FPN1 gén kódol. Az 5' végén IRE (Iron Responsive Element) szekvencia található, translációját IRP (Iron Regulatory Protein), vasszabályozó fehérjék befolyásolják. 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 sejtéből 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 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 fuzionálva a ferroportin lebontását végzik.

Már a hepcidin megismerése előtt is ismert volt, hogy az inflammatorikus folyamatok erősen befolyásolják a vas homeosztázisát. Klinikai vizsgálatokkal igazolták, hogy a hepcidin

expresszióját a hipoxián, és a plazma vas szint változásán túl a gyulladásos folyamatok is befolyásolják. A hepcidin akut fázis fehérje voltával magyarázhatjuk a krónikus betegségekhez társult anémia fogalmát. A hepcidin génjének expressziója többek között az IL-6, STAT3, c/EBP α tengelyen keresztül szabályozódik. A fokozott hepcidin termelés meggátolja a vasexportot, még telített vasraktárak mellett sem képes a szervezet az eritropoézis által támasztott igényeket kielégíteni. Ezt az állapotot funkcionális vashiánynak nevezzük. Ha az inflammatorikus reakció tartósan fennáll (autoimmun betegségek, krónikus dialízis, tumoros megbetegedés), akkor mikrocitózis, hipokrómia, azaz vashiányos anémia alakul ki. A gyulladásos citokinek és tumor ellenes immunválasz apoptotikus és anti-eritropoetikus hatásúak, emiatt az eritropoézis nem expandál a csontvelőben és az egyéb eredetű vashiányban észlelt szolúbilis transferrin receptor emelkedést nem, vagy nem a hiánynak megfelelő arányban észleljük. Ehhez járul még hozzá az a tény is, hogy a transferrin anti-akut fázis fehérjeként kisebb mennyiségben termelődik

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. Colitis ulcerosában a betegség a rekto- szigmoideális területen kezdődik, majd innen terjed a vastagbélén proximális irányban.

A gyulladásos bélbetegségek okai közt több faktor is felmerült, infektív, bakteriális és virális tényezőket is vizsgáltak. Mycobacteriumok, Yersinia, Campylobacter, Clostridium, chlamydiák és vírusok, mint például a herpeszvírus, rotavírus és a kanyaró vírusa kóroki szerepét kutatták, de egyik sem bizonyult patognomikusnak. Ugyanakkor az immunológiai háttér bizonyítottan fontos szerepet játszik a betegség manifesztációjában. Crohn betegségben ez nem lokalizálódik a mukózára, hanem a bélfal teljes vastagságát involválja, és a sejtes faktorok mellett nem sejtes faktorok is részt vesznek az inflammatorikus folyamatban. A családi halmozódás, az ikerkutatások, illetve más, már korábban bizonyított genetikai eltéréssel járó kórképekkel való gyakoribb előfordulás miatt merült fel, hogy kromoszómális eltérések is állhatnak a bélbetegségek hátterében. A mai napig nyolc, a krónikus gyulladásos bélbetegségek kialakulásáért felelőssé tehető lókuszt azonosítottak. Ezek közül a legjobban ismert a 18-as kromoszóma pericentomer régiójában található NOD2/CARD15 (nucleotide-binding oligomerization domain containing 2/caspase recruitment domain15) gén mutációja, mely elsősorban Crohn-betegségben van jelen. Egy másik ilyen genetikai eltérés, melyet inkább a colitis ulcerosa esetében írtak le a NOD1/CARD 2 gén mutációja.

A 2000-es évek elején több munkacsoport is igazolta, hogy a gyulladásos bélbetegségek kialakulásában fontos szerepet játszanak a defenzinek. A mukózális sejtek egy nem specifikus antimikrobiális rendszeréhez tartoznak ezek a peptidek. A defenzinek és a hepcidin egyaránt prepeptidként 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 gyulladásos 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, úgy, mint az állandó és ismeretlen eredetű láz, növekedés elmaradása és a vérszegénység, izületi 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 szulfoszalazint vagy mezalaminat kell a betegeknek szedniük.

Az RNáz L Inhibitor (Rli) egy konzervált, a prokariótákat kivéve valamennyi élőlényben megtalálható citoszólikus 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. Az élesztő és a humán Rli között 68%-os aminosav azonosság van, a homológia is magas. Az RNáz L az interferon által indukált fehérjék közé tartozik, az Rli első leírása is ennek a folyamatnak a szabályozása kapcsán történt. 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. Érdekes, hogy az élesztőkben nincs RNáz L, így már korábban vizsgálta munkacsoportunk, hogy mi lehet ezekben a sejtekben az Rli szerepe. Korábbi kísérleteink során igazolódott funkciója a riboszómák érésében. Az Rli depletált sejtekben a kontrol 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, hogy 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.

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 maradva további foldingon esnek át vagy a citoszólba kijutva proteoszómban proteolízissel degradálódnak. Az első esetben jön létre az ER túltöltődése (ER overload). Ha a foldingot gátló hatás éri az ER-ot, akkor specifikus jelátviteli utak aktiválódnak, ezek közül a legfontosabbak a sejtfehérje-válasz (unfolded protein response, UPR), az ER túltöltés válasz (EOR) és a szterol-válasz.

A UPR jelpálya részleteit élesztőben írták le először, de legtöbb elemét már humán sejtekben is azonosították. 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 egyiknek kináz aktivitása van, citoszól felé néző doménje pedig az RNáz L ribonukleázval homológ. A molekula luminalis doménje a Kar2p fehérjéhez (élesztőben), egy a hősokk fehérjék Hsp70 családjába tartozó chaperon fehérjéhez, a Bip analógiájához 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-autofoszforylálódik és így aktiválódik. Az aktív Ire1p kihalás 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 transzkripciós faktorként működve fokozza az UPR cél-gének átíródását.

Ugyanez játszódik le humán sejtekben, ebben az esetben az Ire1p RNáz aktivitásának hatására az XBP mRNS hasítódik el, az így létrejött "spliced XBP1" (sXBP1) expressziójának eredménye egy kulcs transzkripciós faktor, amely anti-apoptotikus fehérjék expresszióját képes indukálni. 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 olyan fehérjék mennyisége nő meg a sejten belül, amelyek a foszfolipid szintézishez szükségesek, lumináris chaperonok, glikoziltranszferázok. Az élesztőben leírt, majd négyszáz gén közül, amelyik az UPR által aktiválódók közé tartozik, körülbelül csak a felének ismert a funkciója.

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

2. Az előbbieken ismertetett túl ismert egy útvonal, amely a fehérjék transzlációját gátolja. Az Ire1p intraluminalis doménjével analóg transzmembrán kináz, a PERK érzékeli a hibás fehérjék felhalmozódását, a citoszólikus domén az eukarióta iniciációs faktor eIF2 α -t, az 51 pozícióban lévő szerinen, foszforylálja. Ez a változás gátolja a transzláció folyamatát

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

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 aktiválódásának folyamatában, nemcsak élesztő, hanem emlős sejtekben is. Mivel az Rli humán sejtekben is esszenciális, funkciójához pedig vas-kén komplex jelenléte szükséges, felmerül a lehetőség, hogy az Rli, ezen keresztül az UPR folyamata a sejt vasanyagcseréjével is kapcsolatban van, végső soron akár a hepcidin szintézis szabályozásának is részese.

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.

Eredmények

1. Szérum prohepcidin meghatározása colitis ulcerosás és Crohn betegek szérumból

A szombathelyi Vas megyei Markusovszky Kórház Gasztroenterológiai Osztályán és járó betegként kezelt krónikus gyulladásos bélbetegségben szenvedő betegektől előzetes tájékoztatást és beleegyezést követően vérmintát vettünk. A pácienseknél a gyulladásos 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 indexszel jellemeztük, melyhez a betegek megfelelő kérdőíveket töltöttek ki. A vizsgálatra kerülő vérminták levétele a reggeli órákban (7-9 óra között) történtek, éhgyomorral. Ezt követően a szérumból megtörtént a szervezet vasháztartását jellemző (vörösvérsejtszám, hemoglobin, szérum vas, teljes vaskötő kapacitás, transferrin, transferrin szaturáció) és gyulladásos paraméterek (fehérvérsejtszám, C-reaktív fehérje, vörösvértest süllyedés) meghatározása. A szérum prohepcidin meghatározáshoz a mintákat a vizsgálat elvégzéséig -80°C -ra lefagyasztottuk. A méréshez a Hpcidin 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 kisebb vagy egyenlő 0,05. Vizsgálataink alapján elmondhatjuk, hogy a gyulladásos 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 szérumban 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.

Ha az aktivitási index 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 szérumban transzferrin és a transzferin szaturáció szignifikáns korrelációt mutat a prohepcidin szinttel ($p=0,04$) Crohnos betegeknél, míg colitis ulcerosában ez a kapcsolat gyengébb ($p=0,05$).

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 index-szel kismértékben, de szignifikánsan korrelál a prohormon szérumszintje.

A teljes vaskötő kapacitás alacsony korrelációt mutat a Crohnos betegeknél a prohepcidin szinttel. A hemoglobin és a szérumban vas egyik betegcsoportban sem mutat összefüggést a prohepcidin szinttel.

2. Az RNáz L Inhibitorral végzett kísérletek

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, mely 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.

2.2 A TeT-Rli sejtek komplementációs vizsgálata

Az RLII gén esszenciális élesztőben, kiütése haploid sejtekben letális, ezért deléciós mutáns sejt vonalat 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 RLII gén egy Tetraciklin által represszálható promóter szabályozása alatt áll. A Tetraciklin derivátum Doxiciklin antibiotikum hozzáadásával ezekben a sejtekben RLII 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 Doxiciklin-kezelést követően transzformáltuk élesztő Rli1p/pRS426 vagy humán Rli/pRS426 expressziós vektorral. A Tet-Rli sejtek közül Doxiciklin 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.

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 humán fehérje közötti funkcionális különbség vizsgálatához humán-élesztő kimérékat hoztunk létre. 1-es, 2-es, 3-as kimérék 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. 4-es, 5-ös, 6-os kimérék esetében az N-terminálison található meg a humán szekvencia és ennek megfelelően a C-terminális tartalmazza az élesztőből származó aminosavakat.

Ezeket az újonnan létrehozott kimérékat használtuk a komplementációs vizsgálatainkhoz, mellyel 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 Doxiciklin tartalmú táptalajon növesztettük.

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 aminosavat, amely régió tartalmazza az első különböző szakaszt, kicseréljük a humán szekvenciára, vagy, ha az élesztő C-terminálison lévő 236 aminosavat cseréljük le, akkor ezekben az esetekben a sejtek nem képesek növekedni, azaz az N-terminális 1-173 aminosavat leszámítva a human Rli többi szakasza nem komplementálja élesztőben az élesztő Rli hiányát.

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

A kimérékat tartalmazó plazmidokkal transzformált Tet-Rli sejtekben a Doxiciklin 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. 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.

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 juttatva 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.

2.6. Az Rli depléció hatása a fehérjeszintézisre

Az élesztő Rli1p fehérjeszintézisre gyakorolt hatását, szerepét munkacsoportunk már korábban igazolta. A fehérjék translációjában 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.

2.7. Az Rli depléció hatása a riboszómális komponensekre

A humán sejt vonalakban az Rli hiány fehérjeszintézisre gyakorolt hatását vizsgáló kísérleteink hasonló eredményt hoztak, mint a már korábban közölt élesztőben végzettek. Élesztőben Hinnebusch és munkatársai 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. 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.

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 sejteknél és a transzfekciót követően tapszigarginnal kezelt sejtekben vizsgáltuk az UPR indukciót, real time PCR segítségével mértük az XBP (totál és splicingon átesett) mRNS mennyiségét. Mind magában az Rli depléció, mind a tapszigarginnal történt kezelés hatására a sejtekben növekedett az XBP és sXBP mRNS mennyisége. Az Rli depléciója 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.

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. 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-ral. Érdekes eredmény volt, hogy a tapszigargin kezelés önmagában nem eredményezett változást a hepcidin expressziójában, addig az Rli depléción több mint négyszeres növekedést okozott.

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

Megbeszélés

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 fehérvérsejtek bélfalba történő migrációjával jellemezhetőek. Normális állapotban a mukózális immunitás fontos feladata, hogy a patogénnel szemben megfelelő immunválaszt indítson el és felismerje a saját antigéneket. Ennek a folyamatnak az ellenőrzése károsodott a gyulladós bélbetegségek 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 gyulladós stimulusk hosszabb ideig fennállnak, mint a két gyulladós bélbetegség esetében, mikrocitozis és hipokromia alakul ki.

Az irodalomban számos közleményt találhatunk, melyekben krónikus betegségekhez társult másodlagos vérszegénységről, a vasanyagcsere károsodásáról olvashatunk. Círrózisban, krónikus veseelégtelenségben, rosszindulatú daganatos megbetegedésekben, autoimmun kórképekben (reumatoid arthritis, szisztémás lupusz eritematosus) vizsgálták a szérum hepcidin, prohepcidin szintek és más laborparaméterek kapcsolatát. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a májat érintő betegségek esetében a szérum prohepcidin szint és a hepcidin mRNS-ének expressziója egyaránt csökkenést mutat. Krónikus veseelégtelenségben

a prohormon és az érett hepcidin szintje is emelkedett a kontroll csoporthoz 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 artritisznél és a szisztémás lupusz eritematosusnál leírták, hogy a betegség aktivitása, a szérum 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 szérum prohepcidin szintjét mint lehetséges diagnosztikus vagy prognosztikus faktort a két krónikus autoimmun gyulladással járó bélbetegségben, a colitis ulcerosában és a Crohn betegségben. Ezek a betegségek a fent említett krónikus gyulladással járó 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 faktort (szérum vas, teljes vaskötő kapacitás, hemoglobin, transferrin és transferrin szaturáció), gyulladással járó 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 betegekénél a szérum ferritin szintet, ami napjainkban a legelfogadottabb markere a vashiányos állapotnak, mert ez a fehérje egy akut fázis fehérje, szérumszintje gyulladással járó megbetegedésekben megemelkedik, ezáltal megtevesztő 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 kontrolloké. Ez azzal magyarázható, hogy a transferrin az anti akut fázis fehérjék csoportjába tartozik, tehát az IL-6-STAT3-cEBPa útvonal aktiválásával 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 vesztesége miatt keresztül. Tehát a betegség relapsusa 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 gyulladással járó bélbetegségek esetében a betegség aktivitásáról, azonban alkalmas a kialakuló vérszegénység követésére. További céljaink között szerepel ezeknél a betegekénél az érett hepcidin szintjének a meghatározása. Feltételezésünk szerint ez utóbbi jobb paraméter lehet prognosztikai célokra.

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 sejt kultúrákban. 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 transláció is, amelyben az Rli-nek fontos szerepe van. Ennek a folyamatnak a pontos tisztázásához azonban további kísérletek szükségesek.

Az Rli esszenciális funkcióját, a translációban 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 Rli1p 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 Rli1p-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 Doxycyclin 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 depléción esetén 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 aktiválódásához is vezetett; az Rli mennyiségének csökkenése a humán sejtekben mindamelllett a hepcidin expresszióját is befolyásolta.

Összefoglalás

- 1.** A két, gyulladós bélbetegségben szenvedő betegcsoport laboratóriumi eredményeit megvizsgálva elmondhatjuk, hogy a gyulladós 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 sejt kultúrákban az RNáz L Inhibitor expressziója az embrionális sejt vonalakhoz 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 vasanyagcsere 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 a rengeteg biztatást és azt a türelmet, melyet irántam tanúsítottak az elmúlt években.