

Doktori (PhD) értekezés

A vasanyagcserét szabályozó hormon, a hepcidin interakciói és autoregulációja

Pandur Edina

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

| | |
|--|----|
| Tartalomjegyzék | 2 |
| Rövidítések jegyzéke | 5 |
| 1. Bevezetés | 8 |
| 1.1. A vasanyagcsere | 8 |
| 1.2. A hepcidin, a vasanyagcserét szabályozó hormon | 11 |
| 1.3. A hepcidin expressziójának szabályozása | 16 |
| 2. Célkitűzések | 24 |
| 3. Anyagok és módszerek | 26 |
| 3.1. A hepcidinben lévő diszulfid-hidak szerepe a ferroportinhoz való kötődésében | 26 |
| 3.1.1. A preprohepcidin és az érett hepcidin PCR alapú mutagenézise | 26 |
| 3.1.2. A mutáns hepcidin peptidek szerkezet predikciója | 27 |
| 3.1.3. Bakteriális Two-Hybrid rendszer | 27 |
| 3.1.4. A ferroportin és a mutáns hepcidin fehérjék kötődése | 28 |
| 3.1.5. WRL68 sejtekből szekretált hepcidin és mutáns hepcidin fehérjék mennyiségi meghatározása ELISA teszttel | 28 |
| 3.1.6. Vaskoncentráció meghatározása spektrofotometriával | 29 |
| 3.1.7. A mutációt hordozó hepcidin peptidek mediálta ferroportin internalizáció vizsgálata | 29 |
| 3.2. A preprohepcidin kapcsolata az alfa-1 antitripszinnel | 30 |
| 3.2.1. Humán máj cDNS könyvtár szűrése bakteriális Two-Hybrid rendszerrel | 30 |
| 3.2.2. Fehérje-fehérje kapcsolódás validálása és a fehérjék azonosítása | 30 |
| 3.2.3. Az alfa-1 antitripszin kapcsolata a preprohepcidinnel, prohepcidinnel és az érett hepcidinnel | 31 |
| 3.2.4. <i>In vitro</i> GST fúziós fehérje kötési esszé | 31 |
| 3.2.5. Real-Time PCR | 32 |
| 3.2.6. <i>In vivo</i> kialakult keresztkötések vizsgálata | 33 |
| 3.2.7. Szérum ultrafiltrációs esszé | 34 |
| 3.2.8. Koimmunprecipitáció | 34 |
| 3.2.9. ZipTip C18 affinitástisztítás és tömegspektrometriás analízis | 35 |
| 3.3. A hepcidin expressziójának önregulációja | 35 |
| 3.3.1. A kísérletekben használt expressziós vektorok létrehozása | 35 |

| | |
|---|----|
| 3.3.2. Immuncitokémia és konfokális mikroszkópia | 36 |
| 3.3.3. A prohepcidin DNS kötő képességének meghatározása predikciós algoritmussal | 37 |
| 3.3.4. Luciferáz riporter esszé és β -galaktozidáz enzimaktivitás mérés | 37 |
| 3.3.5. Real-Time PCR analízis | 37 |
| 3.3.6. Immunprecipitáció WRL68 sejtvonalon | 38 |
| 3.3.7. Immunprecipitáció BL21 baktérium törzsben | 38 |
| 3.3.8. PCR alapú fehérje-DNS kötési esszé | 39 |
| 3.3.9. Kromatin immunprecipitáció | 39 |
| 3.4. Statisztika | 40 |
| 4. Eredmények | 41 |
| 4.1. A hepcidin szerkezetének szerepe a receptorához, a ferroportinhoz történő kötődésében és internalizációjának szabályozásában | 41 |
| 4.1.1. Mutáns peptidek háromdimenziós szerkezetbeli eltérései | 41 |
| 4.1.2. Mutációt hordozó hepcidin peptidek interakciója a ferroportinnal | 43 |
| 4.1.3. Szekretált hepcidin és mutációt hordozó hepcidin peptidek kötődése a májsejtek ferroportinjához | 43 |
| 4.1.4. Mutáns hepcidin fehérjék hatása a ferroportin internalizációjára | 45 |
| 4.2. A preprohepcidin és a prohepcidin kapcsolata az alfa-1 antitripszinnel | 49 |
| 4.2.1. Hepatocita fehérjék <i>in vivo</i> kapcsolata a preprohepcidinnel és az érett hepcidinnel | 49 |
| 4.2.2. <i>In vitro</i> GST-fúziós fehérje kötési esszé | 51 |
| 4.2.3. A preprohepcidin és az A1AT mRNS expressziója egymással párhuzamosan változik | 53 |
| 4.2.4. A prohepcidin és az A1AT <i>in vivo</i> keresztbekötése Huh7 sejtvonalon | 54 |
| 4.2.5. Az A1AT a szérumban a prohepcidinhez kötődik | 54 |
| 4.3. A prohepcidin expresszió szabályozásának új módja | 57 |
| 4.3.1. A prohepcidin lokalizációja májsejtekben | 58 |
| 4.3.2. A prohepcidin a <i>HAMP</i> gén promóteréhez kötődik | 59 |
| 4.3.3. A prohepcidin csökkenti a saját génjének (<i>HAMP</i>) expresszióját | 63 |
| 4.3.4. Az A1AT által kötött prohepcidin nem gátolja a <i>HAMP</i> gén expresszióját | 66 |
| 5. Megbeszélés | 68 |
| 6. Összefoglalás | 78 |
| 7. Köszönetnyilvánítás | 81 |

| | |
|--|----|
| 8. Irodalomjegyzék | 82 |
| 9. Tudományos közlemények jegyzéke | 92 |
| 9.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények | 92 |
| 9.2. Témához kapcsolódó egyéb tudományos közlemények | 92 |
| 9.3. Referált folyóiratban megjelent absztraktok | 92 |
| 9.4. Témához kapcsolódó kongresszusi poszterek | 93 |
| 9.5. Előadások | 94 |
| 9.6. Témához nem kapcsolódó kongresszusi poszterek | 95 |

Rövidítések jegyzéke

A1AT: alfa-1 antitripszin

ACD: Anemia of Chronic Disease

AI: Anemia of inflammation

ATCUN: amino terminal Cu(II)-Ni(II)-binding motif

BMP: Bone morphogenetic protein

BMPRE: Bone morphogenetic protein response element

C/EBP α : CCAAT- enhancer binding protein α

CCLR: Cell Culture Lysis Reagent

CD: Cirkuláris Dikroizmus

CDMP1/Gdf5: Cartilage-derived morphogenetic protein 1

CTCK: kloramfenikol-tetraciklin-carbenicillin-kanamicin

CTKXi: kloramfenikol-tetraciklin-kanamicin-X-gal- β -galaktozidáz inhibitor

DCC: deleted in colorectal cancer

DCYTB: duodenális citokróm b

DMT1: divalens metál transzporter 1

DSS: disuccinimidil-szuberát

EMSA: electrophoretic mobility shift assay

EPO: eritropoetin

EPOR: eritropoetin receptor

ESCRT: Endosomal Sorting Complex Required for Transport

FBS: fetal bovine serum

FGF-2: fibroblaszt növekedési faktor 2

FP: ferroportin

GAPDH: gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz

GDF15: erythroid factor growth differentiation factor 15

GPI: glikozil-foszfatidilinozitol

GST: glutation S-transzferáz

HAMP: Hepcidin antimikrobiális peptid

HBD: hepcidin binding domain

HFE: humán hemokromatózis fehérje

HIF1 α : Hypoxia inducible factor 1 α

HJV: hemojuvelin
HNF1: Hepatocyte-enriched trans-activator 1
HRE: Hypoxia response element
IL-6: Interleukin-6
INF γ : Interferon γ
IPTG: isopropyl-thio- β -D-galactoside
IRIDA: Iron-Refractory Iron Deficiency Anemia
IRP: Iron Regulatory Protein
Jak2: Janus Kináz 2
LAR: Luciferase Assay Reagent
LB agar plate: Luria-Bertani agar plate
LEAP-1: liver-expressed antimicrobial peptide
LPS: lipopoliszacharid
MALDI TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight
MIF: macrophage migration inhibitory factor
MRE: Metal Response Element
MTF-1: MRE-binding transcription factor-1
NE: nukleáris extrakt
NF κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLS: Nukleáris lokalizációs szignál
NMR: Nuclear magnetic resonance
NTBI: nem-transzferrin kötött vas
Oct4: Octamer-4, homeodomén transzkripció faktor
ONPG: O-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside
Pax6: Paired Box Gene 6 protein
PBS: Foszfát pufferolt sóoldat
pBT: Bait, „csali” vektor
PSSM: Position-Specific Scoring Matrix
pTRG: Target, „cél” vektor
SDS: nátrium-dodecil-szulfát
sHJV: szolubilis hemojuvelin
SMAD7: Mothers against decapentaplegic homolog 7
STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3
SVM: Support Vector Machine

Tf: Transzferrin

TFA: trifluor-ecetsav

TfR: Transzferrin receptor

TGF- β : Transforming Growth Factor- β

TMPRSS6: Transmembrane protease, serine 6

TNF α : Tumor Nekrózis Faktor α

TWSG1: Twisted Gastrulation cytokine

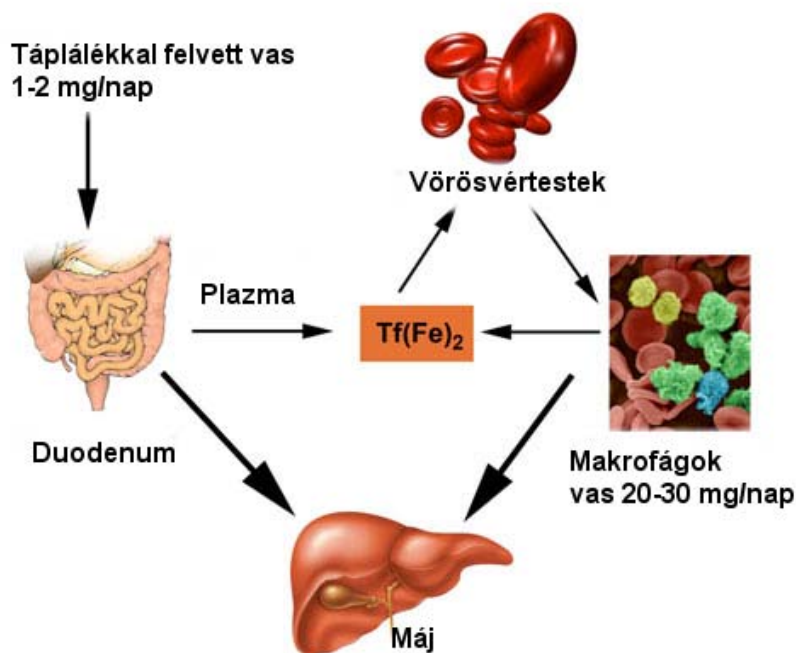
VVT: vörösvértest

X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-galactopyranoside

1. Bevezetés

1.1. A vasanyagcsere

Az emberi szervezet átlagosan 4-5 g vasat tartalmaz. A vas legnagyobb hányada, 2,5 g, hemoglobinhoz asszociálódva fordul elő a keringő vörösvértestekben. A vas felszívódása a duodenumban történik, ahol az enterociták mind a szervetlen vasat, mind pedig a hem vasat képesek felvenni. A napi elfogyasztott táplálékmenyiség átlagosan 10-20 mg vasat tartalmaz, melyből mindössze 1-2 mg szívódik fel. Ez a mennyiség azonban fedezi a napi vas veszteséget, szükség esetén (fokozott hemolízis, vérvesztés) pedig a felszívódás mértéke jelentősen megnövekedhet [1]. (1. ábra).



1. ábra. Az emlősök vasanyagcsereje [2]. A gerincesek vas homeosztázisához a plazmába vasat exportáló szövetek és vasat felhasználó szövetek és sejtek közötti koordináció szükséges.

A plazmában a vas a transferrinhez kötötten kering. A transferrin két nagy affinitású ferri (FeIII) vas kötőhellyel rendelkezik. Normál körülmények között a transferrin (Tf) szaturáció 30% körül mozog. A transferrin által szállított vasat a sejt a transferrin receptor (TfR) segítségével veszi fel. A transferrin receptornak 2 típusa

ismert (TfR1 és 2), melyeket két különböző gén kódol. A TfR1 általános előfordulása, míg a TfR2 a hepatociták sejtmembránjában helyezkedik el, és vasérzékelőként működik. Vastúltelítettség esetén a transferrin szaturáció emelkedik és a nem-Tf-hez kötött vas (NTBI) is megjelenik a keringésben. A „szabad” vas behatol a szövetekbe (főként a máj és a szív szöveteibe), ahol a felhalmozódása következtében oxidatív stresszt és szöveti károsodást okoz [3].

A máj a szervezetünk legnagyobb vasraktára. A májsejtek a vasat eltérő formákban képesek felvenni: Tf-kötött vas, nem Tf-hez kötött vas, hem és hemoglobin formájában. A hepatocitákon belül a vas a ferritinhez kötődik, és szükség esetén könnyen mobilizálódik. A szénészcsens vörösvértesteket (vvt) lebontó makrofágok (eritrofagocitózis) szintén több formában képesek felvenni a vasat (hemoglobinhaptoglobin komplex, szabad hemoglobin, hem-hemopexin komplex, szabad hem), és ferritinhez, vagy hemosziderinhez kötötten raktározzák. Az eritrofagocitózis során a vvt-kből az eritro-fagolizoszómákban felszabaduló hemoglobin degradálódik, majd a szabaddá váló hemet a hem-oxigenáz lebontja. A keletkező ferro vasat a makrofág vagy elraktározza, vagy a ferroportin (IREG1/MPT1) nevű vasexporteren keresztül a plazmába transzportálja. A vas plazmába történő recirkularizációjához és transferrinhez történő kötődéséhez a ferrovasnak oxidálnia kell ferrivassá, mely folyamatot a cöruoplazmin (Cu-dependens ferroxidáz) katalizál (**2. ábra**). Normál körülmények között a vérplazma vastartalma relatíve állandó, annak ellenére, hogy a vasszükséglet napi ingadozást mutat [4].

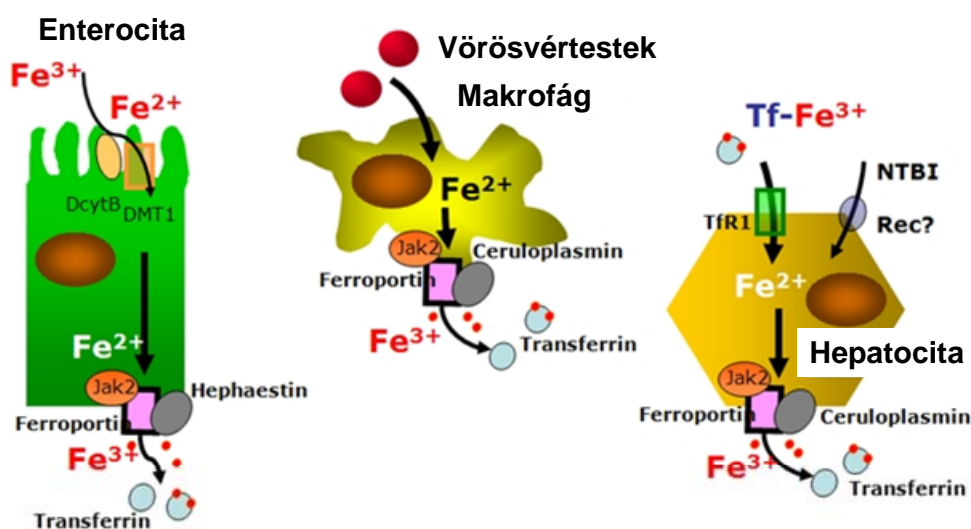
Az eritropoezishoz naponta 25-30 mg vasra van szükség, amelynek nagyobb része az elhalt, és a makrofágokban lebontott vörösvértestekből származik. A csontvelőben folyó eritropoezis szabályozása a vese által termelt eritropoetin mennyiségétől és a plazma vasszintjétől függ. Az eritroid specifikus gének szabályozása transzkripció és poszttranszkripció szinten történik, fenntartva a hem és a globin láncok termelődése közötti egyensúlyt [5].

A TfR1 receptoron keresztül felvett Fe-Tf az endoszómákba kerül (receptor mediálta endocitózis), majd a savas közeg hatására leválik a szállítófehérjéről és ferrovasná redukálódik. A redukción követően az endoszóma membránjában lévő DMT1/Nramp2 (divalens metál transzporter 1) izoformák a citoplazmába juttatják a vasat [6] (**2. ábra**).

A DMT1 a duodenális enterociták apikális membránjában helyezkedik el és a vas felvételért felelős. Mivel a vasat a DMT1 csak FeII formában képes felvenni, ezért a

táplálékkal bejutott FeIII ionokat először a duodenális citokróm b (DCYTB) FeII-vé redukálja. Ezt követően az enterocitába jutott vasat a szervezet az igényeknek megfelelően raktározza, vagy a ferroportin vasexporteren keresztül a véráramba juttatja. A ferroportinon keresztül kijutott FeII ionokat a hephaestin oxidálja a transferrin számára felvehető FeIII ionokká [7] (**2. ábra**). A DMT1 szerepe kettős: az enterociták vasfelvétele mellett ez a fehérje végzi az eritrociták endoszómáiból a citoplazmába történő vasszállítást is. Hiányában a Fe-Tf-ről leváló vasat az eritrociták az endoszómákból nem képesek a citoszólba juttatni és a vas nem tud a hemoglobinba épülni. A DMT1 génben bekövetkező mutációk ritka, recesszív öröklődésű hipokróm, mikrocitás anémiát okoznak [8].

Az eritroid sejtekben a vas túlnyomó többsége a mitokondriumokba vándorol. A vas transzportját a mitokondriális membránokon keresztül a mitokondrium belső membránjában expresszálódó hordozó fehérje, a mitoferrin végzi. A mitokondriumban a vas a protopofirin IX-be épül, vagy a vas-kén komplexek szintézisére fordítódik. A vasraktározás feladatát a mitokondriumban a mitoferritin látja el [9].

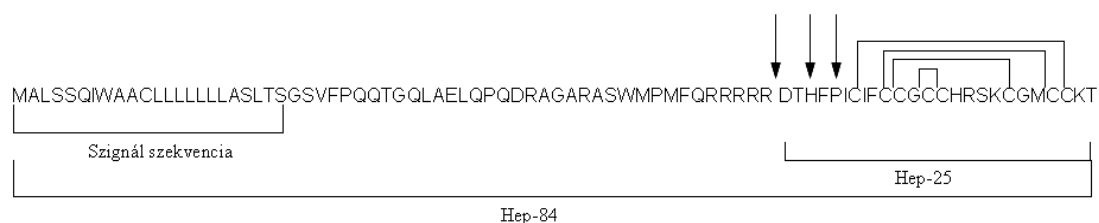


2. ábra. A szervezet vas homeosztázisának fenntartásában részt vevő sejtek [10]. Az enterociták, makrofágok és a májsejtek más-más forrásból jutnak a vashoz. A vas felvétele a különböző sejtípusokban a DMT1 illetve a transferrin receptorokon keresztül történik. A nem-transzferrinhez kötött vas (NTBI) felvétele a sejtekbe eddig még nem tisztázott. Egyik lehetséges útja a Zip14 receptoron keresztüli felvétel, mely receptor a cinket és az NTBI-t is képes a májsejtekbe transzportálni. A vas ionok keringésbe juttatásában minden esetben a ferroportin vasexporter játszik szerepet.

1.2. A hepcidin, a vasanyagcserét szabályozó hormon

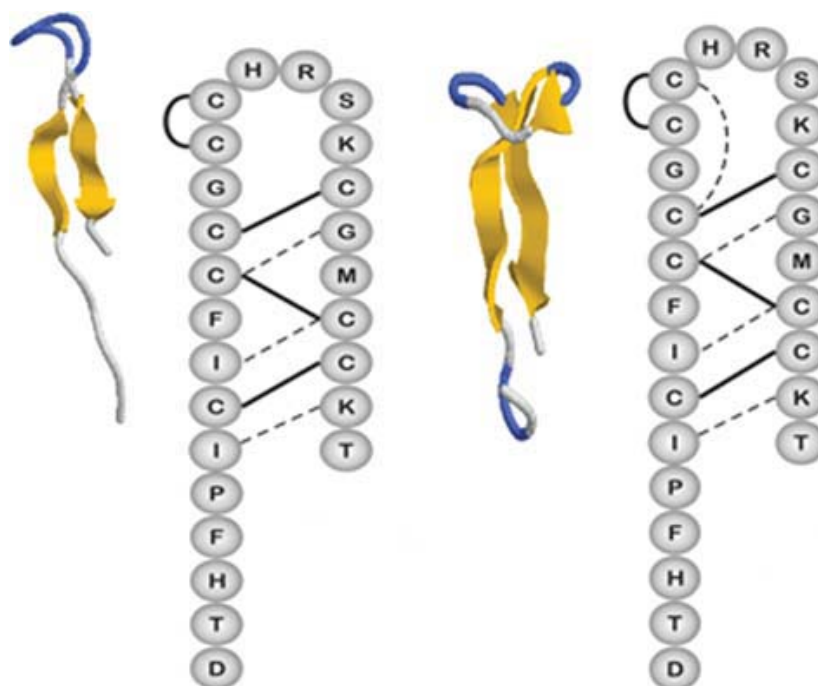
A vas homeosztázist szabályozó hormont, a hepcidint 2000 óta ismerjük [11]. Felfedezését követően a termelődés helye és antimikrobiális hatása miatt LEAP-1 (liver-expressed antimicrobial peptide) elnevezést kapta, melyet később ugyanezen tulajdonságai révén a hepcidin (Hepatic bacteriocidal protein) elnevezésre módosítottak [12]. A humán hepcidin 25 aminosavból álló peptid, mely főként a májban termelődik, de kimutatták a veséből, a szívből, a tüdőből, a duodenumból, nyirokcsomókból, az agyból valamint munkacsoportunk kimutatta nyálmirigyekből is [11]. A hepcidint kódoló gén (*HAMP*-Hepcidin antimicrobial peptide) 3 exonból áll, melyek expressziója során egy 84 aminosav hosszúságú preproprotein képződik. A preproproteinen egy 24 aminosavból álló szignál szekvencia található, mely az endoplazmás retikulumba irányítja a fehérjét [13]. A szignál szekvencia lehasadása után egy 60 aminosavas propeptid képződik, melynek érett formává történő átalakulása a Golgi-komplexben következik be [14]. A funkcionálisan aktív peptid kialakítását egy a prohormon konvertázok családjába tartozó szerin peptidáz enzim, a furin végzi (**3. ábra**), melynek konszenzus cél szekvenciája: R(X/R/K)(X/R/K)R [15-16]. A májsejtekből mind az érett, mind pedig a prohepcidin szekretálódik és kimutatható a szérumból [17].

A máj által termelt hepcidint humán vizeletből valamint vérből izolálták és először antimikrobiális hatását írták le. A vizeletből az érett hepcidin N-terminálisáról 5 illetve 3 aminosav lehasadása után 20 és 22 aminosav hosszúságú hepcidin mutatható ki [12], melyek antimikrobiális hatása ismert [11, 18].



3. ábra. A preprohepcidin érési folyamatának és szerkezetének sematikus ábrája. Az első 24 aminosav szignál szekvenciaként működik, melynek lehasadása után hepcidin prohormon keletkezik. A peptidet a furin hasítja végleges, érett formává. Ez utóbbi tovább hasadhat 22 ill 20 AA hosszúságúra. A nyilak a hasítási helyeket jelzik, melynek során a 25, 22 illetve 20 aminosavas hepcidin alakul ki.

A humán érett hepcidin szekvencia analízise során kiderült, hogy nagy százalékban tartalmaz cisztein aminosavakat. MALDI TOF tömegspektrometriás vizsgálattal és kémiai analízissel kimutatták, hogy a fehérjében található 8 cisztein négy diszulfid-hidat alkot [11]. A hepcidin szerkezetét először standard kétdimenziós H-NMR spektroszkópiával határozták meg. A molekulában a négy diszulfid-híd stabilizálja az antiparallel lefutású β -lemezt tartalmazó hajtúszerű szerkezetet (**4. ábra**). A peptidben található egy szokatlan vicinális diszulfid-híd, mely a 13. és 14. cisztein között a hajtúkanyarban helyezkedik el. Ennek a diszulfid-hídnek nagy jelentőséget tulajdonítanak a hepcidin szerkezetének kialakításában és funkciójának betöltésében. Az amfipatikus (asszimmetrikusan poláris) struktúra összetartásában a nyolc ciszteinből hat vesz részt, intramolekuláris diszulfid-hidakat képezve [19]. Háromdimenziós NMR spektroszkópiával és cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiával szintén kimutatták a β -lemez és a hajtúkanyar jelenlétét a molekulában [20-21]. A hepcidin stabil szerkezetének fenntartásában a diszulfid-kötéseken kívül hidrogén-hidak is részt vesznek [22].

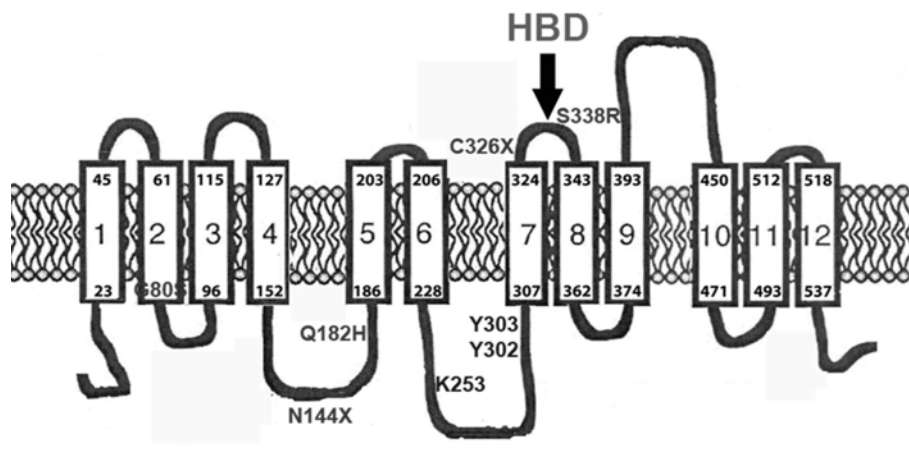


4. ábra. A hepcidin két legvalószínűbb konformációja [22]. A folytonos vonalak a négy diszulfid-hidat jelölik, a szaggatott vonalak a hidrogén-hidakat elhelyezkedését mutatják.

A hepcidin nagyfokú szerkezeti hasonlóságot mutat egyes antimikrobiális peptidekkel - a defenzinokkal -, melyek szintén ciszteinben gazdag, 3- 4 intramolekuláris diszulfid-hidat tartalmazó és hajtúszerű a szerkezetet mutató molekulák [23]. Míg az antimikrobiális peptidek nagymértékű fajok közötti variációt mutatnak, a hepcidin szekvenciája erősen konzervált: a zebrahal (*Danio rerio*) hepcidinje például 60%-os hasonlóságot mutat a humán hepcidinnel [24].

A hepcidin fokozott expressziója a vér vasszintjének csökkenését idézi elő azáltal, hogy gátolja a vas duodenumból történő felszívódását és a makrofágokból történő recirkularizációját [25]. A hepcidin a különböző sejttípusokon kifejtett hatását azonos mechanizmussal hozza létre. A hepcidin a receptorához, a ferroportinhoz kötődik, melyhez a hepcidin N-terminálisán található öt aminosav (DTHFP) megléte alapvető fontosságú [20]. A ferroportint a *FPN1* gén kódolja, melynek 5' végén IRE (Iron Responsive Element) szekvencia található, így translációját vasszabályozó fehérjék (IRP-Iron Regulatory Protein) kontrollálják [26]. A ferroportin egy 12 transzmembrán doménnel rendelkező vasexporter fehérje [27], megtalálható az enterociták, a makrofágok, a hepatociták és a placenta sejtek felszínén (**5. ábra**). Szerepe a vas vérplazmába történő exportjában van [28].

Ismert, hogy a ferroportin internalizációját és degradációját a hepcidin regulálja [29]. A duodenális enterociták bazolaterális membránján a hepcidin, a ferroportinon keresztül szabályozza a sejt felszívott vastartalmának a vérbe jutását, valamint a lép makrofágjainak lizoszómáiban regulálja a vörösvértestek lebontásából származó vas recirkularizációját [30]. Auriac és munkatársai kimutatták, hogy a ferroportin a makrofágok membránjában lipid tutajokban (raftokban) helyezkedik el. A lipid tutajokban lévő ferroportin mennyisége vastúltelítettség esetén megnövekszik, a lipid tutajok degradálásakor pedig a hepcidin internalizáló hatása kevésbé érvényesül a makrofág ferroportinon. Tehát a lipid tutajok jelenléte a makrofágok membránjában befolyásolja a hepcidin aktivitását [31].

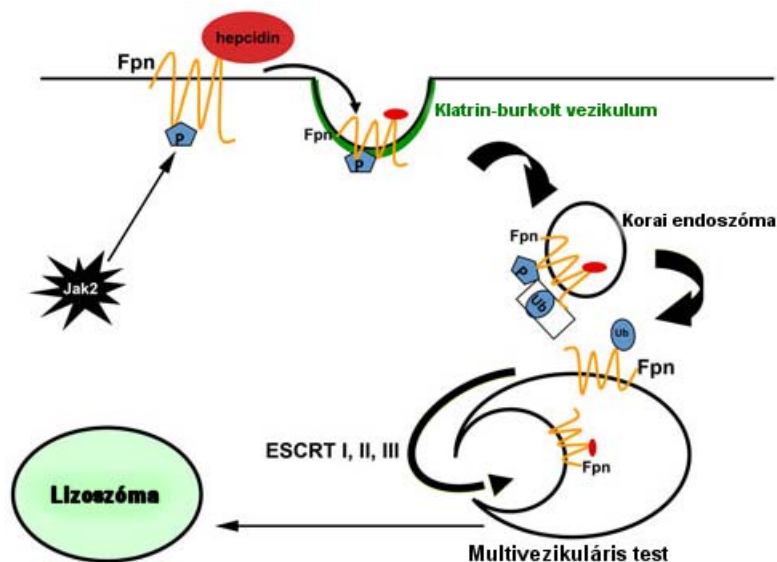


5. ábra. A ferroportin szerkezeti diagramja a 12 transzmembrán doménnel [27]. A HBD (hepcidin binding domain) a hepcidin kötődési helyét mutatja a vasexporter fehérje 324 és 343. aminosava közötti extracelluláris hurkán. A G80S, N144X, Q182H, C326X és S338R helyek a ferroportin ismert hepcidin rezisztenciával járó mutációit jelölik. A Y302, Y303 valamint a K253 számmal jelölt aminosavak cseréje a ferroportin internalizációját, illetve degradációját befolyásolják.

A hepcidin a ferroportinhoz a 324-343 aminosavak közötti extracelluláris hurokhoz kötődik [27]. Ezt követően a receptor a Janus kináz 2-höz (Jak2) kapcsolódik, mely autofoszforilációt követően foszforilálja a ferroportint a VI. és VII. transzmembrán domén között elhelyezkedő citoszolikus hurok két egymás mellett elhelyezkedő tirozin aminosaván (302-303 AA) [32]. A két tirozin a membránhoz közel helyezkedik el, a hepcidin kötőhelyétől a VII. transzmembrán domén választja el. A ferroportinban a tirozin aminosavaknál bekövetkező egyes mutációk esetén (Y302, Y303), illetve az evolúciósan konzervált hepcidin kötőhelynél bekövetkező mutációknál (C326X, S338R), a hepcidin nem tud a receptorához kötődni, illetve a kötődést követően a ferroportin foszforilációja nem következik be, ami mindkét esetben a ferroportin internalizációjának elmaradását okozza [33] (**6. ábra**).

A ferroportin állandó jelenléte a sejtfelszínen alacsony hepcidin szintet okoz, mely a klasszikus öröklött hemokromatózis egyik tünete [34]. A ferroportinban bekövetkező más típusú mutációk defektív vasexportot okoznak, többnyire azért, mert a mutáns ferroportin megváltozott szerkezete miatt nem tud megfelelően a membránba ágyazódni [35], ezáltal nem képes funkcióját ellátni. Tehát egyes hemokromatózisos esetekben a

ferroportin mutációja következtében nem tudja a hepcidin a hatását kifejteni (IV-es típusú hemokromatózis) [36].



6. ábra. A hepcidin-mediálta ferroportin internalizáció [2]. A hepcidin ferroportinhoz való kötődése következtében a Jak2 autofoszfórállódik, majd foszfórállja a ferroportint a 302. és 303. tirozin aminosavaknál. Ezt követően a ferroportin a hozzá kötött hepcidinnel együtt klatrin-burkolt vezikulumba kerül. Az ubiquitináció a korai endoszómában következik be. Ezt követően a ferroportin multivezikuláris testekbe kerül, mely lizozómával fúzionálódik, ahol a fehérje degradálódik.

A sejten belüli vas a vasanyagcserében részt vevő összes sejtben (makrofágok, hepatociták, duodenális enterociták) kifejeződő ferroportin molekulák részvételével kerül a plazmába. A vaskiáramlás a sejt felszínen expresszált ferroportin koncentrációjával arányos, amelyet nagy részben a ferroportin keringő ligandja, az érett hepcidin szintje határoz meg. A ferroportin eltűnése a sejtekről csökkenti a sejtekből a plazmába történő vaskiáramlást [37]. A plazmába és a csontvelőbe irányuló vasáramlás központi szabályozó molekulája a hepcidin, amely biztosítja, hogy elegendő mennyiségű vas álljon rendelkezésre a vérvérvételhez, tehát a hepcidin szint felelős a plazma vaskoncentrációjának kialakításáért [38].

A hepcidin szintézis a plazma emelkedett vaskoncentrációja, illetve a telített szöveti vasraktárak hatására fokozódik, ennek következtében a hepcidin, mind a makrofágokból, mind a duodenum bélhámsejtjeiből csökkenti a vaskiáramlást a plazmába [39]. Ez a feedback mechanizmus a plazma vasszintjét viszonylag állandó szinten tartja és megakadályozza a túlzott vasszintnövekedést és szöveti lerakódást. A folyamat pontos hatásmechanizmusa még nem ismert [40].

Az érett hepcidin N-terminálisán található ATCUN (amino terminal Cu(II)-Ni(II)-binding Motif) motívum lehetővé teszi a CuII, NiII és ZnII ionok megkötését, ugyanakkor sem ferri(FeIII)- sem pedig ferro(FeII)-vas nem képes komplexet képezni a hepcidinnel [41-42]. További kísérletek azonban kimutatták, hogy a hepcidin a ciszteinek kén atomján keresztül ugyan képes ferrivassal komplexet képezni [43], azonban ennek pontos funkciója még nem tisztázott. Szakirodalmi adatok alapján elképzelhető, hogy a komplexképződés a hepcidin érésének folyamatában játszik szerepet. A hipotézis szerint a furin csak akkor képes a hasítási helyet felismerni a prohepcidinen, ha a peptid ferrivasat köt. A ferrivas kötődésének következtében a prohepcidin konformációs változáson esik át, és a furin hasítási hely hozzáférhetővé válik a konvertáz enzim számára [44].

Habár a hepcidin-vas komplex kialakulása vitatott kérdés, Truksa és munkatársai kimutatták, hogy a hepcidin promóterének a transzlációs iniciációs ponttól számolva az 1,6 kbp és 1,8 kbp közötti szakasza esszenciális a vasszint változásaira adott válaszhoz [45], ugyanakkor a -260 bp-tól az 1,6 kbp-ig tartó promóter szakasz nem vesz részt ebben a folyamatban. A hepcidin promóterén egy olyan MRE (Metal Response Element) régió jelenlétét is leírták [46], mely nem közvetlenül érzékeli a fém ionok mennyiségét, hanem az MTF-1 (MRE-binding transcription factor-1) transzkripció faktor által szabályozza a hepcidin expresszióját, ezáltal a szervezet vas homeosztázisát.

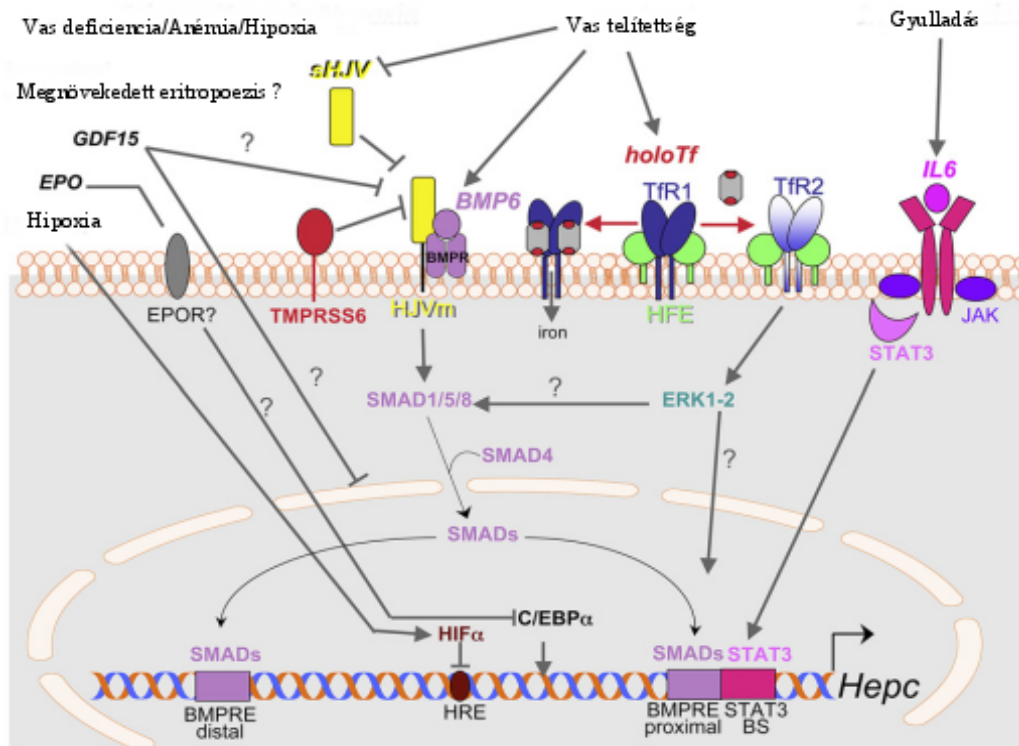
1.3. A hepcidin expressziójának szabályozása

A hepcidin szabályozása alapvetően négy útvonalon történik (**7. ábra**): ez a vastelítettség, hipoxia, gyulladás és az eritropoézis [47]. A folyamatok egyes szabályozó faktorai még nem ismertek, vagy pontos szerepük még nem tisztázott. A vas- transzferrin (Fe-Tf) szerepe alapvető jelentőségű a hepcidin anyagcsere szabályozásában [48]. A vas- transzferrinre adott hepcidin válasz a hemojuvelin (HJV) és a csont morfogén fehérje 2/4 (Bone morphogenetic protein-BMP) mechanizmuson alapul [49].

A vas érzékelése a transferrin receptor 2-n (TfR2) és a humán hemokromatózis fehérje (HFE)/transzferrin receptor 1 (TfR1) rendszeren keresztül történik [50]. A két vasérzékelő, a TfR1/HFE és a TfR2 együttműködnek, ugyanakkor a TfR2 a TfR1-gyel verseng a HFE kötéséért. A HFE-ről kimutatták, hogy kapcsolatba lép a TfR1-gyel, de kilép a komplexből, amikor az Fe-Tf a TfR1-hez kapcsolódik [51]. Így a felszabaduló HFE mennyisége a Fe-Tf koncentrációval arányos. A TfR2 a HFE megkötése után az Erk1/2-t aktiválja, majd valószínűleg a HJV/BMP/SMAD jelátviteli útvonalra hatva pozitívan szabályozza a hepcidin expresszióját. A TfR2 túlzott expressziója megakadályozza a sHJV elválasztását, ezáltal növeli a hepcidin expressziót. A HFE fehérje a TfR2, valamint a HJV fehérjekomplexet képeznek, melyben a TfR2 elősegítheti a HFE fehérje kapcsolódását. A megnövekedett vasszint hatására több Fe-Tf keletkezik, melynek következtében több HFE-TfR2-HJV-BMP komplex jön létre, mely végső soron aktiválja a BMP jelátvitelt, ezáltal nő a hepcidin szintje [52].

A furin a prohepcidin posztranszlációs hasítását végzi, és ez által alakítja ki a funkcionálisan aktív, érett hepcidint. A furin expressziójának szabályozásában a HFE fehérje és a TfR2 alapvető szerepet játszik. A HFE és a TfR2 mennyiségének csökkenésére a furin expressziója és az Erk1/2 foszforiláció csökken, míg overexpressziójuk hatására a holotranszferrinen keresztül indukálódik mind a furin átíródása, mind az Erk1/2 foszforilációja. Tehát a HFE és a TfR2 a furin szabályozásán keresztül is befolyásolja a hepcidin szintjét [53].

Forejtniková és munkatársai kimutatták, hogy a TfR2 és az EPOR együtt expresszálódik az eritroid progenitor sejtek differenciálódása során. UT-7 eritroid leukémia sejtekben a TfR2 és az EPOR az endoplazmás retikulumban asszociálódik és ez a kapcsolat elengedhetetlen a receptor sejt felszínre történő transzportjához. A TfR2-t az eritropoetin receptor komplex részeként írták le, mely szükséges a megfelelő eritropoézishez [54].



7. ábra. A hepcidin szabályozásának lehetséges útvonalai [55]. A hepcidin expresszióját egymással ellentétes folyamatok befolyásolják, ezek együttes hatása alakítja ki a hepcidin szintet. Vasdeficiencia esetén a szolubilis hemojuvelin (sHJV) mennyisége megnő, a BMP6 szintje alacsony, ugyanakkor a membránhoz kötött hemojuvelint degradálja a Tmprss6 transzmembrán szerin proteáz. Mindezek következménye a hepcidin repressziója. A megnövekedett eritropoezis is hozzájárulhat a hepcidin szintjének csökkenéséhez. Ennek szabályozásban számos faktor még nem ismert, feltételezhetően a GDF15 negatív regulátora a hepcidin expressziójának. Az eritropoetin (EPO) a receptorán (EPOR) keresztül csökkenti a C/EBPα aktivitást, ugyanakkor a STAT3 és SMAD útvonalak gátlása révén csökkenti a gyulladással és vasszinttel összefüggő érzékelést. Hipoxia esetén a HRE-hez (Hypoxia response element) kötődő HIF1α, vasdeficiencia esetén pedig a HFE-hez kapcsolódó TfR1 képes gátolni a hepcidin expresszióját. Ha a szérumban a vasszintje növekszik, a HFE elengedi a TfR1-et és a TfR2-höz kapcsolódik, ezáltal aktiválja az Erk1/2 útvonalat, melynek következtében a hepcidin up-regulálódik. A megnövekedett holotranszferrin szint mellett a megemelkedő BMP6 és a csökkenő sHJV mennyisége, a HJV/SMAD útvonal aktiválódásához és a hepcidin expresszió növekedéséhez vezet. Gyulladásos folyamatokban az IL-6 mennyisége megnő, ezáltal a JAK/STAT3 útvonalon keresztül aktiválja a hepcidin átíródását.

A transferrin receptor mellett a csont morfogén fehérje (BMP) is alapvető jelentőségű a hepcidin expresszió szabályozásában. A BMP fehérjék a TGF-β

(Transforming Growth Factor- β) szupercsaládhoz tartoznak, amelyek a proliferáció, a differenciálódás, és az apoptózis szabályozásában vesznek részt [56]. A BMP fehérjék közül a BMP2, 4, 5, 6, 7 és 9 molekulákról igazolták, hogy *in vitro* növelik a májsejtek hepcidin expresszióját [57]-[58]. A BMP fehérjékre adott sejtválaszt különböző koreceptorok is szabályozzák [59]. Az egyik ilyen vasspecifikus BMP koreceptor a hemojuvelin (HJV), mely a BMP2/4/6 rendszert stimulálja. A BMP fehérjék közül a BMP6 *in vivo* növeli a hepcidin expresszióját, illetve csökkenti a szérum vasszintjét. Tehát a BMP6 a HJV ligandjaként, a hepcidin expresszió és a vasmetabolizmus kulcsfontosságú endogén regulátora [60].

A HJV két formája ismert: a glikozil-foszfatidilinozitol (GPI)- horgonyzott membránforma, amely segíti a BMP jelátvitelt és a hepcidin expressziót, valamint a keringő, szolubilis forma, mely a BMP jelátvitel antagonistájaként viselkedik [61]. A szolubilis hemojuvelin a furin enzim általi hasítás révén jön létre, de keletkezhet a membránforma furin mediált leválása útján vagy a furin által hasított forma közvetlen szekréciójával is [62]. A szolubilis HJV hatására szelektíven csökken a hepcidin expresszió *in vitro* [63] és *in vivo* [58] egyaránt. A membránhoz kötött és a szolubilis HJV tehát ellenkező hatást fejt ki a hepcidin vasszint általi szabályozására. A HJV molekula szerkezetét alapvetően károsító mutációk jelenlétében csaknem teljesen hiányzik a hepcidin expresszió [64]. A mutáció klinikai következménye a juvenilis hemokromatózis, egy súlyos vas túlterheléssel járó betegség, mely fenotípusában nem különbözik a hepcidin gén hiányából származó kórformától [65].

Egy nemrégiben megjelent tanulmány szerint a hepcidin expressziójának HJV-en keresztül történő szabályozásában a neogenin, a DCC (deleted in colorectal cancer) fehérje családba tartozó szabályozó fehérje, is részt vesz [66]. A májsejtekben expresszálódó neogenin feltehetőleg a szolubilis HJV szekrécióját szabályozza, ezáltal a BMP/SMAD útvonalon keresztül befolyásolja a hepcidin expresszióját [67]. Neogenin deficiens egerekben a szolubilis HJV mennyisége megnő, ezáltal a hepcidin expressziója csökken.

A BMP jelátviteli út másik szabályozója a *TMPRSS6* gén által kódolt matriptáz-2, mely egy szerin proteáz [68]. A matriptáz-2 a membránhoz asszociált HJV-t elhasítva gátolja a BMP6/SMAD jelátvitelt, ezáltal gátolja a hepcidin expresszióját [69]. A *TMPRSS6* represszor hatása alapvető jelentőségű a vasháztartás fenntartásában [70]. A vaspótló szerekek ellenálló vashiányos anémia (IRIDA- Iron-Refractory Iron Deficiency Anemia) hátterében a *TMPRSS6* gén mutációi állnak [71]. A mutációk egy része

tönkreteszi a szerin proteáz domént, melynek következtében az enzim nem képes funkcióját ellátni, vagy a strukturális doménekben változást okozva a fehérje-fehérje interakciók kialakulását akadályozza meg. A matriptáz-2 funkcióvesztése következtében megemelkedik a hepcidin szintje, ami a ferroportin degradációjához vezet [72]. Ennek következtében nemcsak csökken a vas felszívódása a vékonybélben, de a makrofágok ferroportin hiányában vissza is tartják a vasat, ezáltal csökkentve az eritropoezist. Normális esetben a hepcidin a túlzott vasfelvételtől védi a szervezetet, az IRIDA-betegek szervezete azonban, annak ellenére, hogy vashiánytól szenved, túl sokat termel ebből a hormonból, így nem képes a vasfelvételre. Mindez magyarázza, hogy az IRIDA-ban szenvedő betegek miért nem reagálnak a vaspótlásra [73].

A hepcidin eritropoetikus szabályozó molekulája pontosan nem ismert, eddig két eritroid regulátor fehérje szerepét sikerült valószínűsíteni: a GDF15 (erythroid factor growth differentiation factor 15) és a TWSG1 (Twisted Gastrulation cytokine). Mindkét fehérje a BMP2/4/SMAD jelátviteli útvonalat gátolva fejt ki hatását [74-75]. A GDF15 regulátor közvetlenül érzékeli a szervezet vasellátottságát [76]. Vashiány hatására a GDF15 szintje jelentősen megemelkedik, melynek következtében a hepcidin expressziója csökken.

Mleczo-Sanecka és munkatársai szerint a GDF15 és TWSG1 eritropoetikus szabályozó fehérjék mellett a hepcidin negatív szabályozásában a SMAD7 transzkripciós faktornak is alapvető jelentősége van. Korábban kimutatták, hogy a SMAD7 a SMAD4 transzkripciós faktoral együtt szabályozódik és negatív feedback mechanizmussal gátolja a TGF- β és a BMP jelátvitelt [77-78]. Mindezek mellett a hepcidin aktivátor SMAD4 és a hepcidin szupresszor SMAD7 a hepcidin mRNS szintézisét egymás antagonistájaként ugyanazon a promóter szakaszon keresztül szabályozza, valamint a SMAD7 a BMP/HJV útvonalat gátolva csökkenti a hepcidin expressziót [79].

Vashiányos anémiában, nem megfelelő vérképzéssel járó örökletes anémiákban [80], valamint a vérzéshez vagy hemodialízishez társuló vérszegénység esetén csökkent hepcidin szint mérhető [38]. A kialakult vérszegénység számos mechanizmussal okozhatja a csökkent hepcidin termelést, így az anémia hatásain keresztül, a máj hipoxia, a fokozott eritropoetin termelés (C/EBP α gátlásán keresztül) [81] és a fokozott csontvelői eritropoetikus aktivitás útján, vagy a megnövekedett vasfelhasználás révén is.

Az eritropoetikus aktivitásnak különlegesen nagy jelentősége van a hepcidin szabályozásában olyan vastúlterheléssel járó anémiákban, mint a β -talasszémiák [82]. Talasszémiában szenvedő betegek vizeletében a magas szérum és szöveti vaskoncentráció

ellenére is igen alacsony hepcidin szinteket mértek [83]. Ebben az esetben a megnövekedett eritropoetikus aktivitás erősebb jelzést jelent a szervezet számára, mint az emelkedett vaskoncentráció. Így nagymértékű hepcidin szupresszió fokozott vasfelszívódást és halálos vastúlterhelést eredményezhet. A hepcidin szupressziójáért a GDF15 citokin megnövekedett mennyisége felelős, mely az EPO és a TfR2 mennyiségének függvényében csökkenti a hepcidin expresszióját [54]. Huang és munkatársai leírták, hogy a fokozott eritropoezis a C/EBP α gátlása mellett az inflammatorikus és a vasérzékelő jelátviteli útvonalakat, a STAT3 és SMAD4 útvonalakat is gátolja *in vivo* [84].

Ramos és munkatársai kimutatták, hogy HFE-KO egerekben a hepcidin szintje drasztikusan csökken, miközben fokozott eritropoezis tapasztalható. Ez a tendencia megfigyelhető az örökletes hemokromatózisban szenvedő betegek esetében is. A HFE két módon szabályozza az eritropoezist: kontrollálja a hepcidin expressziót, illetve csökkenti a transferrin által kötött vas felvételét az eritroid sejtekbe [85].

Az oxigén által szabályozott génexpresszió legfontosabb mediátora a HIF (hypoxia-inducible factor) transzkripció komplex. A HIF mechanizmusról kimutatták, hogy *in vivo* a hepcidin expresszió szabályozásában is részt vesz [86]. Hipoxiás körülmények között inkubált májsejtekben a hepcidin expresszió csökkent mértékű [38]. A HIF1- α a *HAMP* promóteren elhelyezkedő HRE-hez (hypoxia response element) kötődve közvetlenül szabályozza a hepcidin expressziót [86]. Volke és munkatársai ugyanakkor kimutatták, hogy a hipoxiában bekövetkező hepcidin szupressziót nem közvetlenül a HIF1 α -*HAMP* promóter kötődés okozza, ugyanis a hepcidin szint sokkal inkább érzékeny a szérumfaktorok és a TfR2 szintjére [87]. HepG2 sejteken végzett kísérletekben, ellentmondásos eredményeket kaptak: sem a HIF1 α fokozott expressziója sem a gén expressziójának célzott csökkentése nem befolyásolta a hepcidin átíródását. A vizsgálat szerint a hepcidin szupresszió inkább a reaktív oxigéngyökökkel (ROS) mutatott összefüggést. A reaktív oxigén gyökök a C/EBP α és a STAT3 transzkripció faktorok *HAMP* promóterhez történő kötődését akadályozva gátolták a hepcidin expressziót [88]. Chaston és munkatársai ugyanakkor Huh7 hepatoma sejtekkel végzett kísérleteik során bebizonyították, hogy hipoxiás körülmények között a hepcidin expressziója csökken a BMP/SMAD4 jelátviteli út gátlása révén [89].

Legújabb kutatások kimutatták, hogy a TMPRSS6 transzmembrán szerin proteáz *HIF* gén által szabályozott. Hipoxia esetén, illetve HIF-kaszád aktivátorok hatására a *TMRSS6* gén expresszió fokozódása figyelhető meg. A *TMRSS6* gén által kódolt

fehérje, a matriptáz-2 kifejeződésének növekedésével csökken a membránhoz kötött HVJ mennyisége, ennek hatására a *HAMP* promóteren elhelyezkedő BMPRE (Bone morphogenetic protein response elements) aktivitásának csökkenése figyelhető meg. Tehát a HIF1 α és a HIF2 α a *TMPRSS6* gén up-regulációján keresztül csökkenti a hepcidin szintjét [90].

A gyulladás és a fertőzés által kiváltott hepcidin termelésfokozódás vashiányt és vérszegénységet (AI-Anemia of inflammation) eredményez [91]. A hepcidint korábban, mint II-es típusú akut fázis fehérjét írták le, mivel az mRNS-ének expressziója primer májsejtkultúrában IL-6 kezelés hatására *in vitro* drasztikusan növekedett [92]. Ma már tudjuk, hogy a hepcidin indukció egyik legfontosabb mediátora az IL-6 citokin, melynek szintje a gyulladás következtében jelentősen megnövekszik [93]. Az IL-6 a receptorához kötődve aktiválja a Janus kinázt, mely foszforilálja a STAT3 transzkripciós faktort. A p-STAT3 dimerizálódik, majd a *HAMP* promóter STAT3 kötőhelyéhez asszociál és elindítja a hepcidin átíródását. Tehát az IL-6 a STAT3 transzkripciós faktoron keresztül fejti ki hatását a hepcidin expresszióra [94-95]. Ugyanakkor gyulladás során az LPS/INF γ hatására aktiválódó NF κ B út vonal a HIF1 α révén növeli a TfR1 expresszióját, ami fokozott vasfelvételhez vezet [96]. Ennek következtében növekszik a hepcidin szintje, melynek következményeként a ferroportin degradálódik és a makrofágokban a vas felhalmozódik, miközben a szérum vasszintje csökken. Májsejtekben kimutatták, hogy az IL-1 a másik citokin, amely közvetlenül hatást gyakorol a hepcidin szabályozásra [97]. A TNF α citokinen keresztül érvényesülő hatások csökkentik a HVJ mRNS-expressziót, amellyel a gyulladást kísérő anémiában talán megvédi a vasszabályozó anyagcsere rendszert a hepcidin gátló hatásától [98-99].

A krónikus betegségekben létrejövő anémia (ACD-Anemia of Chronic Disease) esetén a vasat a szervezet nem tudja felhasználni [100]. A gyulladással járó folyamatokban a gyulladással járó citokinek termelése növekszik, melynek következtében megemelkedik a hepcidin expressziója. Az emelkedett hepcidin szint miatt csökken a vasfelvétel és a makrofágokból történő vas-recirkularizáció. Ennek következtében a szervezet nem tudja a vasraktárakat mobilizálni, a szérum vasszintje alacsony lesz, és az eritropoézis csökken [101].

Hemokromatózisban szenvedő betegeknél tartósan növekszik az enterális vasfelszívódás, és fokozódik a vas lerakódása a különböző szervekben, aminek kiváltó oka a hepcidin tényleges vagy funkcionális hiánya. Általában a hepcidin expresszió csökkenése, a molekulát funkcionálisan károsító mutációk és a hepcidin receptorának, a

ferroportinnak a mutációja vezet a betegség kialakulásához. A hemokromatózist ezek alapján négy típusát különböztetjük el. Az I-es típusú hemokromatózist (*HFE*-Hemokromatózis) a hemokromatózis fehérje génmutációja okozza. Leggyakoribb pontmutáció a *HFE* génben a C282Y cisztein-tirozin csere, melynek következtében a fehérje elveszíti a TfR1 blokkoló funkcióját. A betegség csak homozigóta esetben fordul elő, heterozigótákban csakis akkor alakul ki, ha a mutáció mellé más *HFE*-mutáció, hepcidin termelődési zavar vagy ferroportin mutáció társul [102]. A II-es típusú hemokromatózist (Juvenilis hemokromatózis) a hemojuvelin gén (*HJV*, 2A típus) vagy a hepcidin gén (*HAMP*, 2B típus) mutációja okozza [103-104]. A *HJV* génben eddig hat mutációt írtak le, közülük a leggyakoribb a G320V aminosavcsere. A *HAMP* génben bekövetkező mutációk viszonylag ritka okai a juvenilis hemokromatózist [105]. A szabályozó szerepű érett hepcidinben eddig öt mutációt találtak, melyek közül kettő a harmadik diszulfid-híd ciszteinjeit (C70R, C78T) egy pedig az első diszulfid-híd egyik ciszteinjét (C82Y) érinti. A III-as típusú hemokromatózist a 2-es típusú transferrin receptorban bekövetkező mutációk okozzák [106]. A IV-es típusú hemokromatózist (Ferroportin betegség) a ferroportin génjében (*SLC40A1*) génben bekövetkező mutációk okozzák. A mutációk egy részében a ferroportin nem képes a hepcidin megkötésére, a másik részében pedig a hepcidin megkötése után nem következik be a receptor internalizációja. Ennek következtében a makrofágokban durva vaslerakódás figyelhető meg [34].

2. Célkitűzések

Munkánk első részében a hepcidin egy már ismert fehérjével, a ferroportinnal és eddig ismeretlen fehérjékkel történő interakcióit térképeztük fel. Az érett hepcidin szerkezetét kialakító diszulfid-hidak szerepét vizsgáltuk a receptorával, a ferroportinnal való kapcsolat kialakításában. Ezt követően a preprohepcidin, a prohepcidin és az érett hepcidin sejten belüli interakcióit vizsgáltuk más májban termelődő fehérjékkel.

A hepcidin egy évtizede felfedezett peptid, melynek először antimikrobiális hatását írták le, majd nem sokkal később fény derült a vasanyagcsere szabályozásában betöltött fontos szerepére. A receptorának, a ferroportinnak a leírását követően a kutatók figyelme a hormon szabályozó mechanizmusai fele irányult, a hepcidin további fehérjékkel történő interakciói kevésbé ismertek. A hepcidin más fehérjékkel történő kapcsolatának feltérképezésével mélyebb ismereteket nyerhetünk a hormon működéséről a sejteken belül. Munkánk során célul tűztük ki:

- diszulfid-hidakat létrehozó cisztein aminosavak szubsztitúciójával hepcidin mutánsok létrehozását,
- mutáns hepcidin peptidek ferroportinnal való kötődésének vizsgálatát,
- mutáns hepcidin peptidek receptort internalizáló hatásának vizsgálatát,
- a preprohepcidin és az érett hepcidin potenciális kötőpartnereinek feltérképezését BacterioMatch Two-Hybrid rendszerrel,
- a fehérje-fehérje interakciók megerősítését különböző *in vitro* és *in vivo* metodikákkal,
- a preprohepcidinnel a bakteriális rendszerben kapcsolatot mutató fehérjék májsejtvonalon történő vizsgálatát,
- a kimutatott kapcsolatok humán szérumban történő vizsgálatát.

Továbbiakban a hepcidin expressziójának szabályozását vizsgáltuk. Mivel a prohepcidint felfedezésekor, mint nukleáris fehérjét mutatták ki, ennek megerősítése és esetleges funkciójának felderítése segítheti a vasanyagcsere szabályozás összetett és bonyolult folyamatának mélyebb megértését. Munkánk során célul tűztük ki:

- a prohepcidin intracelluláris elhelyezkedésének kimutatását,
- a prohepcidin DNS-kötő régió meglétének kimutatását,
- a prohepcidin sejtmagban betöltött szerepének vizsgálatát,

- a prohepcidin *HAMP* promóterhez való kötődésének igazolását,
- a prohepcidin szint változásának hatását a *HAMP* promóter aktivitására,
- az alfa-1 antitripszin hepcidin expresszióra gyakorolt hatását.

3. Anyagok és módszerek

3.1. A hepcidinben lévő diszulfid-hidak szerepe a ferroportinhoz való kötődésében

3.1.1. A preprohepcidin és az érett hepcidin PCR alapú mutagenézise

A hepcidinben egy ciszteint kódoló nukleotid tripletet (TGC) szerint kódoló nukleotid tripletre (TCC) cseréltünk PCR segítségével. Az érett hepcidinnel azonos módon a teljes hosszúságú, preprohepcidin mutagenézisét is elvégeztük. A polimeráz láncreakciót iProof High-Fidelity DNA Polymerase (BioRad, Hercules CA, USA) enzimmel végeztük el, 20 µl ösztérfogatban. Az első rekombináns PCR reakcióban a megfelelő nukleotid cserét tartalmazó előremenő primert (M1-M4) és a Hep25 visszafelé menő primert használtuk. A kapott PCR termékeket tisztítottuk, majd hibridizáltuk a hepcidint vagy a preprohepcidint kódoló cDNS szakaszhoz. Ezt követően elvégeztük a második PCR reakciót a hepcidin, illetve a preprohepcidin elejét és végét kijelölő úgynevezett külső primerekkel (Hep25 forward, Hep25 reverse és Hep84 forward, Hep84 reverse). A primerek listáját az **1. Táblázat** tartalmazza. A kapott hepcidin szekvenciákat pBT plazmidba, a preprohepcidin szekvenciákat pedig pTriex3-Neo plazmidba klónoztuk EcoRI-XhoI illetve EcoRI-BamHI restrikciós enzimekkel. A mutáció jelenlétét CEQ 8000 Dye Terminator Cycle Sequencing Chemistry protokoll szerint (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) szekvenálással ellenőriztük a következő szekvenáló primerek segítségével (**1. Táblázat**).

1. Táblázat. A hepcidin és preprohepcidin mutagenéziséhez használt primerek.

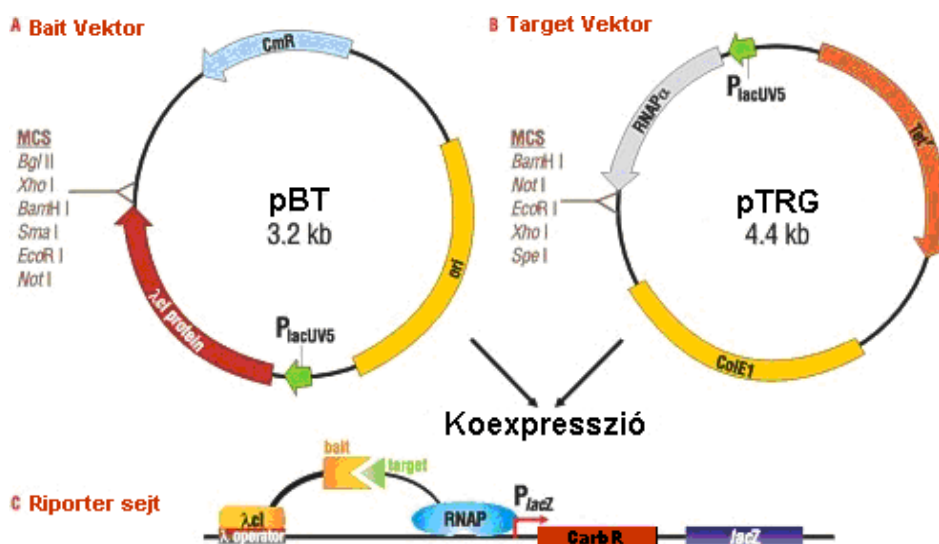
| Primerek | Szekvencia |
|-----------------|---|
| Hep25 forward | 5'-AAAGAATTCGACACCCACTTCCCCATCTGC-3' |
| Hep84 forward | 5'-AAAGGATCCGGCACTGAGCTCC CAGAT-3' |
| M1 | 5'-CCACTTCCCCATCT CC ATTTTCTGCTGCG-3' |
| M2 | 5'-CATCTGCATTTTCT TC CTGCGGCTGCTGTC-3' |
| M3 | 5'-CTGCATTTTCTGCT TC CGGCTGCTGTCATC-3' |
| M4 | 5'-TTTCTGCTGCGGCT TC CTGTCATCGATCAA-3' |
| Hep25 reverse | 5'-AAACTCGAGCGTCTTGCAGCACATCCCACA-3' |
| Hep84 reverse | 5'-AAACTCGAGCGTCTTGCAGCACATCCCACA-3' |
| pBT seq | 5'-GGGTAGCCAGCAGCATCC-3' |
| pTriex seq | 5'-CCCGGAGTTAATCCGGGACCT-3' |

3.1.2. A mutáns hepcidin peptidek 3D szerkezet predikciója

A háromdimenziós fehérje szerkezet meghatározást I-TASSER server segítségével végeztük el (Yang Zhang Research Group, University of Kansas, Department of Molecular Biosciences, <http://zhang.bioinformatics.ku.edu>). A szerkezeti modellek LOMETS illesztések és iteratív TASSER szimulációk alapján készültek. A modelleket Accelrys DS Visualizer program segítségével vizualizáltuk (<http://accelrys.com>).

3.1.3. Bakteriális Two-Hybrid rendszer

A fehérje-fehérje interakciók vizsgálatára a BacterioMatch™ Two-Hybrid rendszert (Stratagene, La Jolla, CA, USA) alkalmaztuk (**8. ábra**). A módszer kifejlesztése Dove, Joung és Hochschild nevéhez fűződik [107-108].



8. ábra. BacterioMatch Two-Hybrid Rendszer sematikus ábrája (Stratagene)

A rendszer transzkripciós aktiváción alapszik. A pBT (bait-„csali”) plazmidban kódolt „csali” fehérje a teljes hosszúságú bakteriofág λ cl fehérjéhez fuzionált. A pTRG (target-„cél”) plazmidban expresszált „cél” fehérje pedig az RNS-polimeráz α -alegységének N-terminális végével alkot fúziós fehérjét. A bait fehérje a λ -operátor szekvenciához kapcsolódik a λ cl fehérje DNS kötő doménjén keresztül. Amikor a „csali” és a „cél” fehérje kapcsolatba lép egymással, az RNS polimeráz a promóter szekvenciához köt, és elindul a riporter gének (carbenicillin rezisztencia gén és a *lacZ*

gén) transzkripciója. Ezáltal a fehérje-fehérje interakciót mutató baktérium kolóniák carbenicillin tartalmú táptalajon képesek nőni. β -galaktozidáz aktivitásuk révén az X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-galactopyranoside) tartalmú táptalajon, az X-gal hasítása következtében kék színű kolóniák jelennek meg.

3.1.4. A ferroportin és a mutáns hepcidin fehérjék kötődése

A ferroportin és a mutáns hepcidin peptidek interakcióinak vizsgálatát BacterioMatch Two-Hybrid System Vector Kit felhasználásával végeztük el. Az érett hepcidint és mutált hepcidin peptideket kódoló cDNS szakaszokat a kit pBT plazmidjába, a teljes hosszúságú ferroportint pedig a pTRG plazmidba klónoztuk EcoRI és XhoI restriktív enzimek segítségével. A rekombináns hepcidin és ferroportin vektorokat elektroporációval (Gene Pulser Xcell Electroporation System, Bio-Rad) kotranszformáltuk BacterioMatch elektrokompetens sejtbe. A baktériumokat hideg LB tápoldatba vettük fel, majd 2 órát 30 °C-on rázatva növesztettük. A sejteket ülepitettük, reszuszpendáltuk 200 μ l LB tápoldatban, majd LB-CTKXi indikátor agar plate-re szélesztettük. Az indikátor LB lemezeket 34 μ g/ml kloramfenikollal, 15 μ g/ml tetraciklinnel, 50 μ g/ml kanamicinnel, 80 μ g/ml X-gal-al és 0,2 mM β -galaktozidáz inhibitorral egészítettük ki. A two-hybrid kitben található pozitív plazmidok (pBT+ és pTRG+) pozitív kontrollként, a rekombináns pBT valamint a pTRG+ plazmidokkal kotranszformált baktériumsejtek negatív kontrollként szolgáltak a kísérletben. Az indikátor plate-en kékülő kolóniákat a fehérje-fehérje kapcsolat igazolásához LB-CTCK agar lemezekre kentük át, mely kloramfenikol-tetraciklin-kanamicin antibiotikumokon kívül 500 μ g/ml carbenicillint is tartalmaztak. A kolóniák növekedését a carbenicillin tartalmú lemezen, a pozitív és negatív kontrollokhoz viszonyítottuk.

3.1.5. WRL68 sejtekből szekretált hepcidin és mutáns hepcidin fehérjék mennyiségi meghatározása ELISA teszttel

WRL68 humán májsejteket (ATCC-CL48, Germany) a gyártó cég által glutaminnal kiegészített EMEM (Minimum Essential Medium Eagle with Glutamine, LONZA, Verviers, Belgium) tápoldatban tartottuk, 10% FBS jelenlétében. A sejteket hatlyukú lemezen növesztettük, majd tranziens transzfekciót végeztünk 1 μ g/lyuk preprohepcidin/pTriex3-Neo vagy M1-M4 preprohepcidin/pTriex3-Neo plazmid DNS-

sel, Transfectin reagens felhasználásával (BioRad). 24 óra elteltével a tenyésztő médiumokból 20 µl mintát vettünk, majd a maradék médiummal 6 órás kezelést végeztünk friss WRL68 sejteken. Az érett hepcidin mennyiségét a 24 órás transzfekció után, illetve a hat órás kezelés után Hecpidin ELISA Kit (DRG International Mountainside, NJ, USA) segítségével határoztuk meg a sejtenyésztő folyadékból, a gyártó által leírt protokoll alapján.

3.1.6. Vaskoncentráció meghatározása spektrofotometriával

WRL68 sejteket a 3.1.5. pontban leírt módon transzfektáltuk, majd kezeltük. A kezelést követően a sejteket kétszer PBS-sel mostuk, majd összegyűjtöttük. A sejteket 150 µl TNETG (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 2,5 mM EDTA, 0,1% Triton-X 100, 10% glicerin) pufferben vettük fel, majd ultrahanggal feltártuk. Centrifugálást követően a felülúszóból fehérje- majd vasmérést végeztünk. Az utóbbi esetben a mintákhoz 450 µl 20 mM-os Hepes (pH 7,4) puffert, majd 10 µl telített Na-ditionit oldatot, valamint 10 µl 1,5%-os Batofenantrolin oldatot adtunk. Az OD-t 540 nm-en olvastuk le. A pontos értékeket a fehérjekoncentrációk ismeretében ng/ml sejtlizátum formájában adtuk meg.

3.1.7. A mutációt hordozó hepcidin peptidek mediálta ferroportin internalizáció vizsgálata

WRL68 sejteket hat-lyukú lemezen növesztettük, majd transzfektáltuk preprohepcidin/pTriex3-Neo vagy mutáns preprohepcidin fehérjét kódoló pTriex3-Neo plazmiddal 24 órán keresztül. Ezt követően a médiumot új WRL68 sejteket tartalmazó hat-lyukú lemezre vittük át. Hat óra kezelést követően a sejteket összegyűjtöttük, majd frakcionáltuk Qproteome Cell Compartment Kit (Qiagen, Hilden, Germany) felhasználásával. A citoszól és a membrán frakciókban lévő fehérjéket acetonnal kicsaptuk, majd reszuszpendáltuk 100 µl mintapufferben (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF). A minták fehérjetartalmát DC Protein Assay Kit (BioRad) felhasználásával határoztuk meg. A mintákból egyenlő mennyiségű fehérjét 10%-os SDS-poliakrilamid gélen futattuk, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk. Az előhívást poliklonális anti-humán ferroportin ellenanyaggal (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) végeztük el.

3.2. A preprohepcidin kapcsolata az alfa-1 antitripszinnel

3.2.1. Humán máj cDNS könyvtár szűrése

A preprohepcidin ismeretlen fehérjékkel történő interakcióinak vizsgálatát BacterioMatch Two-Hybrid Assay Vector Kit segítségével végeztük el. A 84 aminosav hosszúságú preprohepcidint kódoló cDNS szakaszt a vektor kit pBT plazmidjába klónoztuk BamHI és XhoI restrikciós endonukleázok felhasználásával (**2. Táblázat**). A rekombináns plazmidot JM109 baktérium sejtekbe transzformáltuk, majd a vektort QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) segítségével izoláltuk. A target plazmidba humán máj cDNS könyvtárat klónoztunk a cég által leírt protokoll szerint. A szűréshez speciális, fehérje-fehérje interakciók vizsgálatára alkalmas XL1-Blue MRF' Kan riporter baktérium törzset használtunk. 0,5 µg rekombináns pBT plazmidot és 1 µl 1:10 hígítású amplifikált plazmid cDNS könyvtárat elektroporálással a baktérium sejtekbe juttattuk. A sejtekkel ezt követően a 3.1.4-es pontban leírtakkal azonos módon jártunk el. Az indikátor lemezen kékülő kolóniákat a fehérje-fehérje kapcsolat igazolásához LB-CTCK agar plate-ekre kentük át, melyek 250 illetve 500 µg/ml carbenicillint is tartalmaztak. A kolóniák növekedését a carbenicillin tartalmú plate-en, a 3.1.4. pontban leírt pozitív és negatív kontrollokhöz viszonyítottuk

3.2.2. Fehérje-fehérje kapcsolódás validálása és a fehérjék azonosítása

Az LB-CTCK agar lemezen kinőtt egyes kolóniákat 10 ml kloramfenikol-tetraciklin-kanamicin tartalmú LB tápoldatba oltottuk. A baktérium kultúrákat éjszakán át 30 °C-on 140 rpm-el rázatva növesztettük. A rekombináns pBT plazmidot és a cDNS-t tartalmazó pTRG plazmidot izoláltuk QIAprep Spin Miniprep Kit felhasználásával. Az izolált plazmidokat újra riporter baktérium törzsbe kotranszformáltuk, majd vizsgáltuk a kolóniák kékülését LB-CTCKXi indikátor plate-en, illetve növekedésüket 250 µg/ml carbenicillin tartalmú LB-CTCK lemezen a korábbiakban leírtak szerint. A pozitív kolóniákból izoláltuk a cDNS-t tartalmazó pTRG plazmidokat, majd a plazmidban lévő cDNS-t PCR technikával amplifikáltuk a következő primerpár segítségével: 5'-CAGCCT GAAGTGAAAGAA 3' és 5'-ATTCGTCGCCCGCCATAA-3'. A PCR termékeket agaróz gélből tisztítottuk QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen) felhasználásával, majd

szekvenáltuk. A szekvenálás során kapott nukleinsav szekvenciákból BLASTN program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) segítségével azonosítottuk a preprohepcidinhez kapcsolódó fehérjét.

3.2.3. Az alfa-1 antitripszin kapcsolata a preprohepcidinnel, prohepcidinnel és az érett hepcidinnel

Az alfa-1 antitripszint (A1AT) kódoló cDNS szakaszt a pTRG plazmidba klónoztuk az EcoRI és XhoI restriktív endonukleázok segítségével, a prepro-, pro-, és érett hepcidint kódoló cDNS szakaszokat pedig a pBT plazmidba klónoztuk BamHI és XhoI enzimek felhasználásával (**2. Táblázat**). A rekombináns plazmidokat QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) felhasználásával izoláltuk, majd a riporter baktérium törzsbe kotranszfectáltuk elektroporálással. A sejteket növesztés után LB-CTKXi indikátor platera, majd pedig 500 µg/ml-es koncentrációjú carbenicillint tartalmazó LB-CTCK lemezre szélesztettük, majd éjszakán át 30 °C-on növesztettük. A növekedés mértékét pozitív illetve negatív kontroll növekedéséhez viszonyítottuk.

2. Táblázat. A BacterioMatch rendszerben elvégzett klónozásokhoz alkalmazott primerek.

| Konstrukt | Primerek |
|--------------------|--|
| Preprohepcidin/pBT | 5' AAAGGATTCGGCACTGAGCTCCAGAT 3' 5' AAAC TCGAGCTACGTCTTGCAGCACATCC 3' |
| Prohepcidin/pBT | 5' AAAGAATTCTCTGTTTTCCACAACAG 3' 5' AAAC TCGAGCTACGTCTTGCAGCACATCC 3' |
| Hepcidin/pBT | 5' AAAGAATTTCGACACCCACTTCCCATCTGC 3' 5' AAAC TCGAGCTACGTCTTGCAGCACATCC 3' |
| A1AT/pTRG | 5' AAAGGATTCTATGCCGTCTTCTGTCTCG 3' 5' AAAC TCGAGTTTTGGGTGGATTAC 3' |

3.2.4. In vitro GST fúziós fehérje kötési esszé

A preprohepcidint kódoló cDNS szakaszt a pGex4T-1 prokarióta expressziós vektorba, az A1AT-t kódoló cDNS szakaszt pedig a pET51b(+) expressziós vektorba klónoztuk (**3. Táblázat**). A GST illetve a preprohepcidin-GST fúziós proteint BL21(DE3) *E. coli* törzsben termeltettük. Az indukciót 0,5 mM IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) hozzáadásával 2 órán át végeztük 30 °C-on, 140 rpm-en történő

rázatással. A baktérium sejteket hideg STE pufferben (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) reszuszpendáltuk, majd ultrahanggal feltártuk 1,5% sarcosyl jelenlétében. A lizátumokat centrifugáltuk, majd a felülúszókhöz előzetesen STE pufferben mosott Gluthation-Sepharose 4B gyöngyöket (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) adtunk azonos mennyiségben. Az elegyeket 1 órán át 4 °C-on billegítettük, centrifugálást követően háromszor mostuk STE pufferrel.

Az *in vitro* kötési esszéhez A1AT-t BL21 baktériumtörzsben termeltettünk, 0,5 mM IPTG-vel indukálva, 3 órán keresztül 30 °C-on. A sejteket összegyűjtöttük, majd 1 ml kötőpufferben (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 10% glicerin, 0,1% Triton X-100) ultrahanggal feltártuk. Centrifugálást követően a felülúszót ketté osztottuk és 5 ml kötőpufferben 30 µl GST illetve GST-preprohepcidin gyöngyöt adtunk hozzájuk. Egy óra, 4 °C-on történő inkubáció után, a gyöngyöket centrifugáltuk, háromszor mostuk kötőpufferrel, majd eluáltuk a gyöngyök felületén kötött fehérjéket 30 µl 4X Laemmli pufferrel. Az eluátumokat 8%-os SDS-poliakrilamid gélen futtattuk, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk. A fehérje-fehérje interakciókat anti-A1AT IgG-vel (Dako, Glostrup, Denmark) detektáltuk. A kötési esszét humán szérummal is megismételtük a bakteriális kísérlettel azonos módon.

3. Táblázat. Az *in vitro* kötéshez használt vektorok és primerek.

| Konstrukt | Primerek |
|-------------------------|---|
| Preprohepcidin/pGex4T-1 | 5'-AAAGGATCCATGGCACTGAGCTCCCAGAT-3' 5'-AAACTCGAGCTACGTCTTGACGACATCC-3' |
| A1AT/pET51b(+) | 5'-AAAAAGCTTATGCCGTCTTCTGTC-3' 5'-AAAGAGCTCCTATTTTTGGGTGGG-3' |

3.2.5. Real-Time PCR

A preprohepcidint kódoló cDNS szakaszt pTriex3-Neo eukarióta expressziós vektorba, illetve a preprohepcidin antiszensz DNS-t pcDNA3.1 vektorba klónoztuk. WRL68 sejteket hat-lyukú lemezen növesztettük, majd tranziens transzfekciót végeztünk 1 µg preprohepcidin/pTriex3-Neo vagy preprohepcidin antiszensz/pcDNA3.1 plazmid DNS-sel. 24 óra elteltével a sejteket összegyűjtöttük, majd totál RNS-t izoláltunk RNeasy Mini Kit (Qiagen) felhasználásával. Ezt követően a mintákból 1 µg totál RNS-t használva

cDNS-t szinjetizáltunk Transcriptor High Fidelity cDNS Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Meylan, France) segítségével.

A Real-Time PCR során használt génspecifikus primer párokat a PRIMER3 software-el (<http://frodo.wi.mit.edu>) terveztük meg. A kísérletben használt primereket a **4. Táblázat** tartalmazza. A Real-Time PCR reakciót LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics) készülékben végeztük. A reakcióelegyet Fast Start DNA MasterPLUS SYBR Green I Master Mix-el készítettük 20 µl össztérfogatban, 200 nM primer végkoncentrációval. A PCR reakciók után olvadási görbe analízist végeztünk a reakció specifikusságának vizsgálatára. A referencia gén (β -aktin), és a cél gének (preprohepcidin, A1AT) közel 100%-os efficienciával amplifikálódtak, a gének közötti eltérés nem haladta meg az 5%-ot. A relatív génexpresszió számításához a $2^{\Delta\Delta Ct}$ (Livak) módszert alkalmaztuk. A cél gének expresszióját a β -aktin, referencia gén expressziójához viszonyítottuk, majd ezt követően a transzfektált sejtek génexpresszióját összevetettük a kezeletlen sejtek génexpressziójával.

4. Táblázat. A Real-Time PCR során alkalmazott primer párok.

| Vizsgált gén | Primer |
|---------------------|---|
| β -aktin | 5'-AGAAAATCTGGCACCCACACC-3' 5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAAAA-3' |
| Preprohepcidin | 5'-CAGCTGGATGCCCCATGTT-3' 5'-TGCAGCACATCCCACACT-3' |
| A1AT | 5'-CCTATGATGAAGCGTTTAGG-3' 5'-TATCGTGGGTGAAGCGTTAGG-3' |

3.2.6. *In vivo* kialakult keresztkötések vizsgálata („Crosslinking”)

Huh7 humán hepatóma sejteket (HPACC, Porton Down, UK) MEM (Minimal Essential Media, Gibco) médiumban tartottuk, kiegészítve 10% FBS-el, majd tranziens transzfekciót végeztünk 30 µg preprohepcidin/pTriex3-Neo plazmid DNS-sel. 24 óra elteltével a médiumot leöntöttük, majd 4 ml friss médiumban oldott 0,2 mM végkoncentrációjú keresztbe kötő anyaggal, DSS-el (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) kezeltük a sejteket, szobahőmérsékleten 30 percig. A kötési reakciót 50 mM Tris-HCl-el (pH 7,4) leállítottuk, majd a sejteket összegyűjtöttük. A sejteket 150 µl lízis pufferben (50 mM Hepes, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10% glicerin, 0,5% Triton X-100) 1 órát, 4 °C-on inkubáltuk. Centrifugálást követően a His-tag-es

preprohepcidint és a hozzá kötődő fehérjéket affinitás tisztítottuk NiNTA agaróz gyöngyökkel (Qiagen) a gyártó cég protokollja alapján. A kitisztított fehérje komplexeket 30 µl 4X Laemmli pufferrel eluáltuk a gyöngyökről. Az eluátumot 8%-os SDS-poliakrilamid gélen futtattuk, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk. Az előhívást anti-A1AT IgG-vel végeztük el. A kísérlethez negatív kontrollként az üres pTriex3-Neo plazmidot Huh7 sejtekbe transzfektáltuk, majd ugyanúgy jártunk el, mint a preprohepcidin esetében.

3.2.7. Szérum ultrafiltrációs esszé

Egészséges humán szérum minták A1AT koncentrációját turbidimetriával meghatároztuk (Cobas Integra 800 Analyzer; Roche Diagnostics). 200 µl szérumot Microcon YM-30 oszlopon (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) centrifugáltuk. 100µl szérum ultrafiltrátumhoz (első ultrafiltrátum), mely már nem tartalmaz A1AT-t, 150 µg gyári A1AT-t adtunk, és 30 percig 30 °C-on inkubáltuk. Ezt követően újra centrifugáltuk Microcon YM-30 oszlopon (második ultrafiltrátum). Az eredeti szérum, az első és a második ultrafiltrátum prohepcidin koncentrációját Hepcidin Prohormone ELISA Kit-tel (DRG International) határoztuk meg.

3.2.8. Koimmunprecipitáció

Anti-A1AT IgG-t CNBr-aktivált Sepharose 4B (Amersham Biosciences) gyöngyökhöz kötöttük a gyártó cég által megadott protokoll szerint. Humán szérumot Microcon YM-30 oszlopon ultrafiltráltunk, majd a koncentrált szérumból 20 µl-t, 25 µl anti-A1AT szefaróz gyönggyel inkubáltuk 1 ml kötőpufferben (100 mM Tris-HCl, pH 7,4, 100 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 10% glicerol), 30 percig, szobahőmérsékleten. A gyöngyöket az inkubációs idő letelte után kötőpufferrel mostuk, majd eluáltuk 20 µl 4X Laemmli pufferrel. Az eluátumot nitrocellulóz membránra cseppentettük, a dot blottot anti-hepcidin IgG-vel (Alpha Diagnostic, San Antonio, TX, USA) detektáltuk. Szintetikus hepcidin peptid pozitív kontrollként, szabad prohepcidint tartalmazó szérum ultrafiltrátum pedig negatív kontrollként szolgált a dot blot során.

3.2.9. ZipTip C18 affinitástisztítás és tömegspektrometriás analízis

A ZipTip-et 50% acetonitril/0,1% trifluor-ecetsav (TFA) elegyével tízszer átmostuk, majd 20 µl anti-A1AT IgG-vel inkubáltuk. Ezt követően az oszlopot háromszor PBS-el (pH 7,4) átmostuk, majd 20 µl, 20 mg/ml-es koncentrációjú BSA-val blokkoltuk. Az oszlop PBS-el történő mosása után, humán szérumból Microcon YM-30 oszlopon koncentrátumot készítettünk, ebből 15 µl-t 5 percig pipetázással kevertünk. A nem kötődött fehérjéket PBS-el majd Milli-Q (Milli-Q Element Ultrapure Water System; Millipore Corp.) vízzel mostuk ki az oszlopból. Az elúciót 3 µl, 1%-os TFA-val végeztük el. A mintát azonos mennyiségű α -ciano-4-hidroxi-fahéjsav mátrixszal kevertük össze és a keverékből 1 µl-t vittünk fel Bruker 384 plate-re.

A tömegspektrometriás analízist egy Bruker Autoflex II MALDI TOF-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight) készüléken (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) végeztük. A készülék MNL-205MC típusú (LTB Lasertechnik Berlin GmbH, Berlin, Germany) 337 nm hullámhosszúságú pulzáló nitrogén lézert használ. Az ionok kilövése időbeli késleltetéssel (90 ns) 22 kV gyorsító feszültséggel történt pozitív ionizációval. Az adatgyűjtést lineár detektor módban végeztük. A tömegspektrométer vezérlése Bruker FlexControl 2.4 software-rel, az adatok értékelése pedig Bruker FlexAnalysis 2.4 software-rel történt.

3.3. A hepcidin expressziójának önregulációja

3.3.1. A kísérletekben használt expressziós vektorok létrehozása

A *HAMP* promóter 942 bp hosszúságú darabját PCR technikával amplifikáltuk, majd a szentjánosbogár (*Lampyrus noctiluca*) luciferáz riportert gént (*luc*) tartalmazó pGL3 basic vektorba (Promega Corporation, Madison, WI, USA) klónoztuk XhoI és HindIII restrikciós endonukleázok segítségével. A teljes hosszúságú, humán preprohepcidint kódoló cDNS szakaszt és a preprohepcidin antiszensz DNS-ét a pcDNA3.1 vektorba klónoztuk EcoRI-XhoI illetve EcoRI-HindIII restrikciós endonukleázok felhasználásával. A prohepcidint, az érett hepcidint valamint az A1AT-t kódoló cDNS szakaszokat amplifikációt követően a pTriex3-Neo expressziós vektorba klónoztuk, a prohepcidin és az érett hepcidin esetében BamHI-XhoI, az A1AT esetében pedig EcoRI-XhoI enzimek segítségével. A kísérletek specifikusságának vizsgálatára a

tranzin promóter 600 bp hosszúságú darabját pGL3 vektorba klónoztuk SacI-HindIII enzimekkel, valamint a preprohepcidin prepro régióját és a GAPDH cDNS szekvenciáját összefűzve pTriex3-Neo plazmidba klónoztuk BamHI-XhoI restriktív enzimek felhasználásával. A DNS amplifikáláshoz templátként humán vér genomiális DNS-t, illetve humán máj cDNS-t használtunk. A klónozáshoz használt génspecifikus primer párok listája a **5. Táblázatban** található.

5. Táblázat. A klónozáshoz alkalmazott primer párok listája.

| Konstrukt | Primerek |
|------------------------------------|--|
| HAMP/pGL3 | 5'-AAAGAGCTCGTACTCATCGGACTGTAGATG-3' 5'-AAAAAGCTTGTG ACAGTCGCTTTATGGGG-3' |
| Preprohepcidin/pcDNA3.1 | 5' AAAGAATTCGGCACTGAGCTCCCAGAT 3' 5' AAAGGATCCGCTCTGTTTTCCACAAACAG 3' |
| Preprohepcidin antiszensz/pcDNA3.1 | 5' AAAGAATTCGACTGTCACTCGGTCCCAGA 3' 5' AAAAAGCTTCTACGTCTTGCAGCACATCC 3' |
| Prohepcidin/pTriex3-Neo | 5' AAAGGATCCGCTCTGTTTTCCACAAACAG 3' 5' AAAGGATCCGACACCCACTTCCCCATCTGC 3' |
| Hepcidin/pTriex3-Neo | 5' AAAGGATCCGACACCCACTTCCCCATCTGC 3' 5' AAAGGATCCGACACCCACTTCCCCATCTGC 3' |
| A1AT/pTriex3-Neo | 5' AAAGGATCCGACACCCACTTCCCCATCTGC 3' 5' AAAGGATCCGACACCCACTTCCCCATCTGC 3' |
| Tranzin/pGL3 | 5' AAAGAGCTCTCAAACAGGTAATTAAG 3' 5' AAA AAGCTTTTCCACTGGCTTTACTTA 3' |
| Prepro-GAPDH/pTriex3-Neo | 5' AAAGGATCCGGCACTGAGCTCCCAGAT 3' 5' AAAGGATCCGGCACTGAGCTCCCAGAT 3' |

3.3.2. Immuncitokémia és konfokális mikroszkópia

Az immuncitokémiai vizsgálatot egy korábban leírt protokoll alapján végeztük el a következő módosításokkal [109]. Az első ellenanyagként használt anti-prohepcidin IgG-t (Alpha Diagnostics) 1:100 arányban hígítottuk blokkoló pufferben, majd a mintákat 50 µl térfogatban inkubáltuk éjszakán át, 4 °C-on. Második ellenanyagként Cy3-konjugált anti-nyúl IgG-t (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) használtunk 1:300-as hígításban. Az egy órás inkubációs idő letelte után a sejtmagokat Hoechst 33258 festéssel vizualizáltuk. A felvételeket OLYMPUS Fluoview FV1000 lézerpasztázó konfokális fluoreszcencia mikroszkópos rendszerrel készítettük, UPlanSApo 60X1,35 N.A. olaj immerziós objektív segítségével.

3.3.3. A prohepcidin DNS-kötő képességének meghatározása predikciós algoritmussal

A prohepcidin DNS kötő helyének meghatározásához Kumar és munkatársai által kifejlesztett SVM alapú predikciós algoritmust használtunk [110]. A szekvencia analízishez DNAsét SVM modellt alkalmaztunk, amely rövidebb fehérjeláncok illetve domének elemzésére alkalmas. A legmagasabb specificitás eléréséhez és az álpozitív eredmények kizárása érdekében a legmagasabb küszöbértéket választottuk (1,0). A módszer az SVM értéket a küszöbértékhez hasonlítva adja meg a fehérje DNS kötő képességét. Az analízist mind a prohepcidinnel, mind pedig az érett hepcidinnel elvégeztük az aminosav összetételt és a PSSM-et is (position-specific scoring matrix) alapul véve.

3.3.4. Luciferáz riporter esszé és β -galaktozidáz enzimaktivitás mérés

A WRL68 sejteket hat-lyukú lemezen növesztettük, majd tranziens kotranszfekciót végeztünk 1 μ g HAMP/pGL3 plazmid DNS-el valamint 1 μ g/lyuk plazmid DNS-el az alábbiak közül: preprohepcidin/pcDNA3.1; preprohepcidin antiszensz/pcDNA3.1; A1AT/pTriex3-Neo. A transzfekció hatékonyságának méréséhez pSV- β -Galactosidase Control Vector-t (Promega) alkalmaztunk. Transzfektálás után 24 órával a sejteket feltártuk 150 μ l luciferáz lízis pufferben (CCLR, Promega), majd a sejt extraktumokból luciferáz aktivitást mértünk Lumat 9507 Luminométerrel (Berthold Technologies, Oak Ridge, TN, USA), Luciferase assay system-et (Promega) használva: 20 μ l mintához, 100 μ l LAR-t (Luciferase assay reagent) adtunk, a mintát összeráztuk és azonnal enzimaktivitást mértünk. A minták fehérje koncentrációját DC Protein Assay Kit (BioRad) felhasználásával végeztük el. A β -galaktozidáz enzimaktivitás mérést a β -Galactosidase Enzyme Assay System (Promega) felhasználásával végeztük el a gyártó cég által megadott protokollt követve. A HAMP promóter aktivitását a fehérjekoncentrációt és a β -galaktozidáz aktivitást is figyelembe véve adtuk meg százalékban kifejezve, a protokollban foglaltaknak megfelelően.

3.3.5. Real-Time PCR analízis

A WRL68 sejteket preprohepcidin/pTriex3-Neo vagy preprohepcidin antiszensz/pcDNA3.1 vagy A1AT/pTriex3-Neo plazmiddal transzfektáltuk. 24 óra

elteltével a sejtekből totál RNS-t izoláltunk, majd 1 µg totál RNS felhasználásával a mintákból cDNS-t készítettünk. A Real-Time PCR-t a 3.2.5-ös pontban foglaltakkal azonosan végeztük el. A kísérlet során használt primereket a **4. Táblázat** tartalmazza.

3.3.6. Immunprecipitáció WRL68 sejtvonalon

A WRL68 sejteket 25 cm³-es palackban növesztettük, majd 6 µg pTriex3-Neo, illetve prohepcidin/pTriex3-Neo plazmid DNS-el transzfektáltuk. 24 órát követően a sejteket összegyűjtöttük és PBS-el (pH 7,4) mostuk, majd a sejtekből nukleáris kivonatot készítettünk. A sejteket 100µl NE1 pufferben (10 mM Hepes, pH 8, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM DTT) szuszpendáltuk, majd 15 percig jégen inkubáltuk. A szuszpenziókat 1 ml-es fecskendőbe felszívtuk, 5-ször 23G1-es tűn átnyomva homogenizáltuk, majd 20 másodpercig maximális fordulatszámon centrifugáltuk. A pelletet 75 µl NE2 (20 mM Hepes, pH 8, 1.5 mM MgCl₂, 25% glicerin, 420 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF) pufferben reszuszpendáltuk, 30 percig jégen inkubáltuk, ezt követően ismét 20 másodpercig maximális fordulatszámon centrifugáltuk. A nukleáris kivonatok fehérje koncentrációját DC Protein Assay Kit felhasználásával határoztuk meg. Penta-His IgG-t CNBr-aktivált Sepharose 4B gyöngyökhöz kötöttünk a gyártó által megadott protokoll alapján. A nukleáris kivonatok 30 µl Penta-His szefaróz gyönggyel inkubáltuk 600 µl kötőpufferben (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0.1% Triton X-100, 10% glicerin), egy órát, szobahőmérsékleten, majd a nem kötődött fehérjéket mosással távolítottuk el. A PCR alapú fehérje-DNS kötési próbához 50%-os szuszpenziót használtunk fel.

3.3.7. Immunprecipitáció BL21 baktériumtörzsből

Prohepcidin-His (6xHis tag-et a fehérje a C-terminálisán hordozza) fehérjét BL21(DE3) *E. coli* törzsben termeltettük. A prohepcidin/pTriex3-Neo plazmiddal transzformált sejteket 0,5 mM IPTG indukálószer jelenlétében növesztettük 2 órát 30 °C-on. Az indukciós idő letelte után a sejteket összegyűjtöttük és TBST pufferben (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100) proteáz gátló (Complete Mini, Roche) jelenlétében szuszpendáltuk, majd 4 °C-on ultrahanggal feltártuk. Centrifugálást követően a felülúszót 5 ml kötőpufferben 30 µl Penta-His CNBr-aktivált szefaróz gyönggyel inkubáltuk 30 percig, 4 °C-on. A prohepcidinnel kötődött gyöngyöket

centrifugálással összegyűjtöttük, majd háromszor 5 ml kötőpufferrel mostuk. A PCR alapú fehérje-DNS kötési próbához 50%-os szuszpenziót használtunk fel.

3.3.8. PCR alapú fehérje-DNS kötési esszé

10 μ l prohepcidint kötő Penta-His CNBr-aktivált szefaróz gyöngyöt 10 μ l 5X Ziff pufferben (50 mM Hepes, pH 7,4, 50% glicerol, 500 mM NaCl, 5 mM EDTA) 100 ng ssDNS, 1 μ g poly d(I)d(C), valamint 0,1 pmol *HAMP* vagy tranzin promóter próba hozzáadásával inkubáltuk, szobahőmérsékleten, 30 percen keresztül. Ezt követően a gyöngyöket háromszor mostuk 800 μ l 1X Ziff pufferrel. A fehérje-DNS komplexeket 100 μ l glicinnel (100 mM, pH 2,5) eluáltuk, majd 20 μ l Tris-HCl (1 M, pH 8) hozzáadásával neutralizáltuk. A polimeráz láncreakciót iProof High-Fidelity DNA Polymerase enzimmel végeztük el. A prohepcidinhez kötődött *HAMP* illetve tranzin promóter próba amplifikálásához az eluátumokból 1 μ l mintát használtunk. A próbák amplifikálását a következő promóter specifikus primer párok segítségével végeztük el: *HAMP* 5'-AAAG TACTCATCGGACTGTAGATG-3' és 5'-AAAGTGACAGTCGCTTTATGGGG-3', tranzin 5'-TATAAGATAAAACCAGGCCAT-3' és 5'-CAAAGAACTTCCAGAAGTC CAA-3'. A PCR reakciót követően a mintákból 3 μ l-t 3%-os agaróz gélen megfuttatunk. A minták vizualizálása SYBRGold (Invitrogen) nukleinsav festékkel történt. A géleképeket Dark Reader (Clare Chemical Research, Inc. Dolores, CO, USA) transzilluminátor felhasználásával, MultiGenius Bioimaging System (Syngene, Cambridge, UK) segítségével készítettük.

3.3.9. Kromatin Immunprecipitáció (ChIP)

Kiindulásként 80×10^6 WRL68 sejtet preprohepcidin/pTriex3-Neo plazmiddal transzfektáltunk 24 órán keresztül. A kromatin immunprecipitációt Carey FM és munkatársai által leírt protokoll alapján végeztük el a következő módosításokkal [111]. A prohepcidin-His peptid-DNS komplex immunprecipitációjához Penta-His ellenanyagot használtunk. Az eluálást követően a DNS-t PCR tisztító kit (Qiagen) segítségével nyertük ki a mintákból. A polimeráz láncreakciót iProof High-Fidelity DNA Polymerase enzimmel végeztük el, 20 μ l esszében. A PCR reakcióhoz 2 μ l DNS-t használtunk templákként. A *HAMP*-prohepcidin kötődés specifikusságának vizsgálatára a *HAMP*

amplifikálása mellett tranzin specifikus primerekkel (3.3.8. pontban található) is elvégeztük a polimeráz láncreakciót.

3.4. Statisztika

A kísérletek eredményeit Student t-tesztel analizáltuk. Az oszlopábrák az átlagokat és a standard devianciát mutatják. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha $P \leq 0,05$.

4. Eredmények

4.1. A hepcidin szerkezetének szerepe a receptorához, a ferroportinhoz történő kötődésében és internalizációjának szabályozásában

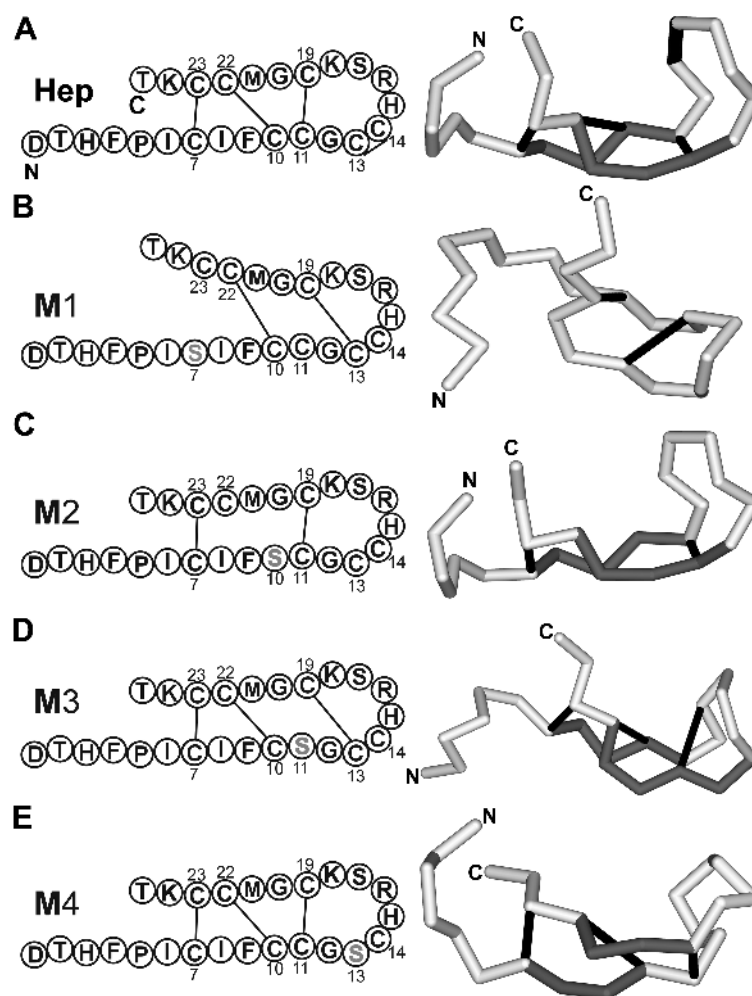
4.1.1. Mutáns peptidek háromdimenziós szerkezetbeli eltérései

Az érett hepcidin nyolc cisztein aminosavval rendelkezik. Ezek pontos pozíciója a peptid N-terminális végétől számítva a C7, C10, C11, C13, C14, C19, C22 és C23. A hepcidin stabil hajtúszerű szerkezettel rendelkezik, melyet a ciszteinek között kialakuló négy diszulfid-híd stabilizál (**9A. ábra**). A négy diszulfid-hídból három intramolekuláris elrendeződésű, a negyedik kötés pedig egy szokatlan vicinális diszulfid-híd, mely a peptid hajtúkanyarában helyezkedik el. Három diszulfid-híd a C7-C23, C10-C22, C11-C19, a vicinális diszulfid-híd a C13-C14 aminosavak között jön létre. A diszulfid-hidak kialakulása alapvető fontosságú az antiparalell lefutású, stabil β -lemez kialakulásában.

A hepcidin biológiai funkciójának betöltésében a diszulfid-hidak alapvető szerepet játszhatnak. Ennek a szerepnek a feltérképezéséhez a diszulfid-hidaknak megfelelően négy mutáns hepcidin peptidet készítettünk, oly módon hogy szisztematikusan lecseréltünk egy-egy ciszteint kódoló nukleotid tripletet (TGC), a legkisebb szerkezeti deformitást okozó szerint kódoló nukleotid tripletre (TCC). Az így létrehozott mutáns peptideket M1, M2, M3 és M4-nek neveztük el, attól függően, hogy az aminosavcsere melyik diszulfid-hidat érintette. Első diszulfid-hídnak a peptid N- és C-terminális végét összekötő diszulfid-kötést tekintettük. Mindegyik mutációt hordozó peptidben a megfelelő diszulfid-hidat alkotó ciszteinek első tagját cseréltük le. Így az M1-ben a C7 (**9B. ábra**), az M2-ben a C10 (**9C. ábra**), az M3 estében a C11 (**9D. ábra**), az M4 peptidben pedig a C13-as ciszteint (**9E. ábra**) helyettesítettük szerinnel.

A mutált hepcidin peptidek szerkezeti analízisét az aminosav szekvencia alapján az I-TASSER serverrel végeztük el (**9. ábra**). A szerkezeti predikció azt mutatja, hogy az M1 hepcidinben a C7 cisztein aminosav szubsztitúciója következtében a teljes szerkezet megváltozik, kialakul egy C13-C19 átrendeződött diszulfid-híd, valamint a vicinális diszulfid-híd is eltűnik. A többi mutánsal ellentétben, az M1-ben a hinyzó C7-C23 diszulfid-híd következtében a β -lemez is sérül és a fehérje N-és C-terminálisa eltávolodva egymástól más térsíkba kerül. A C10-es cisztein cseréje a C10-C22 diszulfid-híd mellett a vicinális diszulfid-híd kialakulását gátolta. Az M3 mutánsban a C11 cisztein-szerin

szubsztitúció diszulfid-híd átrendeződést okozott a szerkezetben, a C13-C19 között új híd alakult ki. Ugyanakkor a C13 csere nem volt hatással a diszulfid-hidak kialakulására. A predikció alapján elmondható, hogy a C7-C23 diszulfid-híd hiánya okozza a legnagyobb szerkezetbeli eltérést a vad típusú hepcidinhez képest. Ugyanakkor mind a négy mutáns peptid esetében elmondható, hogy egyetlen cisztein aminosav cseréje a vicinális diszulfid-híd elvesztését eredményezi.



9. ábra. A hepcidin és a mutáns hepcidin peptidok sematikus és 3D szerkezeti predikciója. **(A)** Vad típusú hepcidin hajtúszerkezete, β -lemezzel (szürke) és a stabilizáló négy diszulfid-híddal (fekete, C7-C23, C10-C22, C11-C19, C13-C14). **(B)** M1 mutáns a C7 szubsztitúcióval. β -lemez szétesett, és a két terminális eltávolodott egymástól. **(C)** Az M2 esetében a vicinális diszulfid-híd nem tud kialakulni. **(D)** Az M3 mutánsban a C11 hiányában egy átrendeződött C13-C19 híd alakult ki. **(E)** A C13 hiánya nem változtatja meg a diszulfid-hidak rendeződését.

4.1.2. Mutációt hordozó hepcidin peptidek interakciója a ferroportinnal

A szerkezeti predikciót követően BacterioMatch Two-Hybrid rendszerben vizsgáltuk a ferroportin és a mutáns hepcidin peptidek interakcióit. Az M1-M4 hepcidint expresszáló pBT plazmidot és a teljes hosszúságú ferroportint kifejező pTRG plazmidot kotranszformáltuk elektrokompetens baktérium sejtekbe. A kolóniák növekedését szelektív CTCK agar lemezen vizsgáltuk a pozitív és a negatív kontrollokhoz viszonyítva. Az érett hepcidin erős interakciót mutatott a ferroportinnal, ugyanakkor az M1 mutációt hordozó hepcidin egyáltalán nem növekedett szelektív táptalajon. Az M2, M3 és M4 hepcidin mutánsok a pozitív kontrollhoz és a vad típusú hepcidinhez hasonló interakciót mutattak a ferroportinnal (**6. Táblázat**). Mivel az M1 mutációt hordozó hepcidin nem volt képes kötődni a receptorához, a ferroportinhoz, ezért feltételezhetjük, hogy a hepcidin szerkezetében a C7-C23-as diszulfid-híd alapvető jelentőséggel bír a ferroportinnal való kapcsolat kialakításában.

6. Táblázat. A ferroportin kapcsolata a hepcidinnel és a mutáns hepcidin peptidekkel.

| pBT vektor inszertje | pTRG vektor inszertje | Növekedés CTCK plate-en ^a |
|----------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| Hepcidin | Ferroportin | +++ |
| M1 | Ferroportin | - |
| M2 | Ferroportin | +++ |
| M3 | Ferroportin | ++ |
| M4 | Ferroportin | ++ |

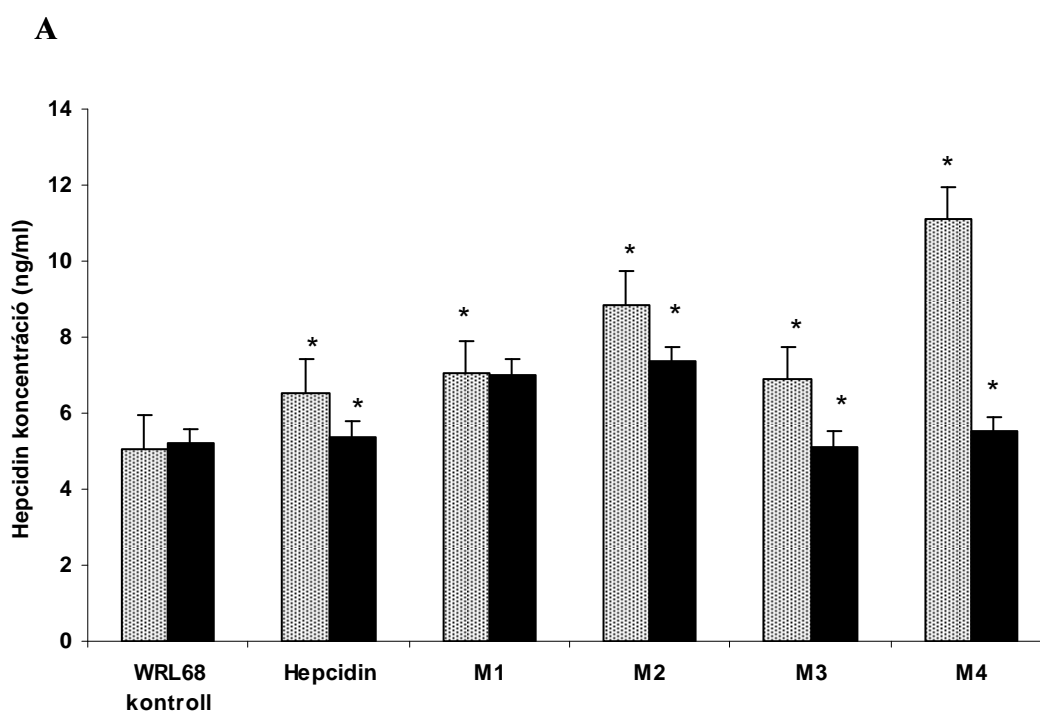
^a kolónia növekedés osztályozása: - nincs növekedés, +++ erős növekedés

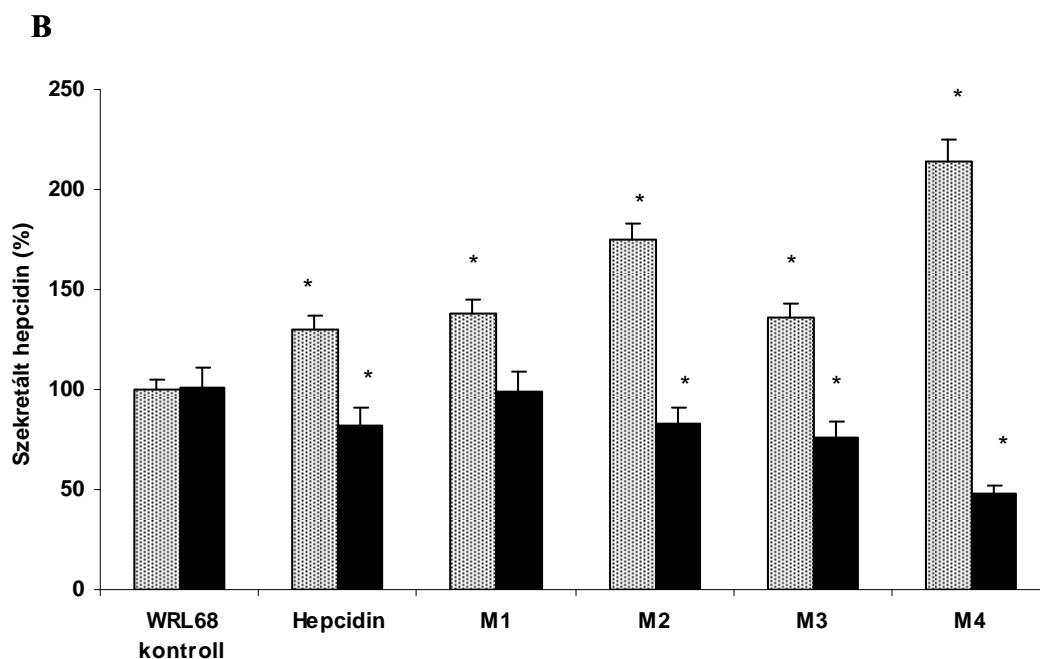
4.1.3. Szekretált hepcidin és mutációt hordozó hepcidin peptidek kötődése a májsejtek ferroportinjához

A hepcidinben lévő diszulfid-hidak a ferroportinhoz való kötődésben betöltött szerepének további vizsgálatához a mutáns hepcidin peptideket hepatocitákban expresszáltattuk, majd vizsgáltuk, hogy képesek-e a májsejtek membránjában elhelyezkedő ferroportinnal kapcsolatot kialakítani.

WRL68 sejteket preprohepcidinnel illetve mutáns preprohepcidint kódoló plazmiddal transzfektáltunk 24 órán keresztül. A preprohepcidin és a mutációt hordozó preprohepcidin mRNS-ek expressziójának növekedését Real-Time PCR-rel ellenőriztük

(ábra nem mutatja). Ezt követően a tenyésztő médiumot összegyűjtöttük és a szekretált hepcidin illetve mutáns hepcidin peptidek mennyiségét (ng/ml) Hecpidin ELISA Kit segítségével meghatároztuk. Az eredmények azt mutatják, hogy a transzfektált plazmidról átíródó preprohepcidin poszttranszlációs érési folyamata a sejtekben végbemegy és a hasítások során keletkező érett peptid szekretálódik a sejtekből a médiumba. A transzfektált sejtekről gyűjtött médiumot új WRL68 sejtekre vittük át, majd hat óra elteltével a médiumban maradt hepcidin mennyiségét ismét meghatároztuk ELISA teszt segítségével (**10A. ábra**). A 24 órás transzfekeciót követően a hepcidin, illetve a mutációt hordozó hepcidin peptidek mennyisége szignifikánsan megnövekedett (129%-222%) a kontroll, nem transzfektált sejtekhez viszonyítva (**10B. ábra**). A 6 órás kezelést követően a tenyésztő folyadékban csökkent ugyanezen peptidek koncentrációja a 100%-nak tekintett kiindulási mennyiség 82%, 82%, 74% illetve 47%-ára a hepcidin, az M2, az M3 és az M4 mutáns hepcidin peptidek esetében (**10B. ábra**). A koncentrációváltozást az okozza, hogy a peptid kötődik a receptorához, ezáltal kivonódik a médiumból. Az M1 mutáns peptidet tartalmazó médiummal kezelt sejtek esetében a peptid koncentrációja a tenyésztő folyadékban nem változott szignifikánsan. Ennek magyarázata lehet, hogy míg a hepcidin, az M2, M3 és M4 mutáns hepcidin peptidek kötődnek a ferroportinhoz, a C7-C23 diszulfid-híd hiánya miatt az M1 mutáns nem képes interakcióba lépni a receptorával.





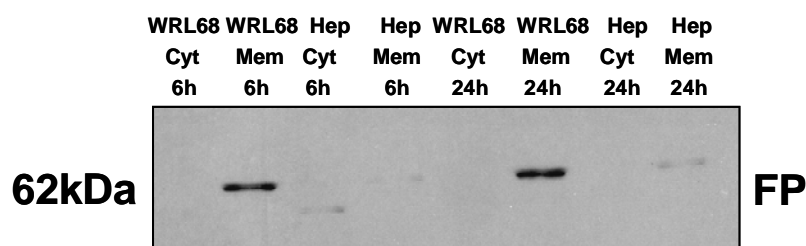
10. ábra. Szekretált hepcidin és mutáns hepcidin peptidek koncentráció vizsgálata. WRL68 sejteket preprohepcidint illetve mutációt hordozó preprohepcidint kódoló plazmid DNS-sel transzfektáltunk. **(A)** 24 óra elteltével megmértük a tenyésztő folyadékba szekretálódó peptidek mennyiségét (mintás oszlop). A médiummal ezt követően új WRL68 sejteket kezeltünk 6 órán át, majd meghatároztuk a hepcidin és a mutáns hepcidin peptidek mennyiségét a médiumban (fekete oszlop). A koncentráció értékeket az élő sejtszámra normalizáltuk. **(B)** A hepcidin szekrécója minden esetben növekedett, mely azt mutatja, hogy a preprohepcidin poszttranszlációs érési folyamata lezajlott és az érett peptid szekretálódott a médiumba a transzekciót követően (mintás oszlop). A kísérletben a kezeletlen WRL68 sejtek által termelt hepcidint tekintettük 100%-nak. A hat órás kezelést követően a hepcidin mennyisége csökkent a hepcidin, M2, M3 és M4 peptideket tartalmazó tápfolyadékokban, mely arra utal, hogy ezek a hepcidin peptidek képesek a ferroportinhoz kötődni (fekete oszlop). Ebben az esetben a kiindulási 24 órás médium hepcidintartalmát vettük 100%-nak. Az M1 esetében nem tapasztaltunk változást, mely alátámasztja a BacterioMatch kötési próba eredményét. Az értékeket három független mérés átlaga \pm standard hiba (SEM) formájában adtuk meg. * $P < 0,05$

4.1.4. Mutáns hepcidin fehérjék hatása a ferroportin internalizációjára

Az érett hepcidin a szervezet vas homeosztázisát azáltal szabályozza, hogy a receptorához, a ferroportinhoz kötődik és indukálja annak internalizációját, ezáltal gátolva a vasexportját. Korábbi eredményeink azt mutatták, hogy a C7-C23 diszulfid- híd

hiánya a hepcidinben gátolja a hepcidin ferroportinhoz való kötődését. Ugyanakkor az M2, M3 és M4 esetében ez a gátlás nem tapasztalható. A következőkben arra kerestük a választ, hogy a mutációt hordozó hepcidin fehérjék a kötődés mellett képesek-e biológiai funkciójukat betölteni, azaz a mutáció jelenlétének van-e hatása a ferroportin internalizációjára.

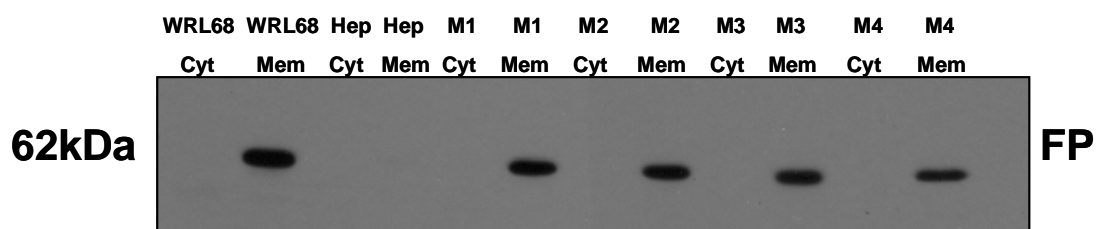
WRL68 sejtvonalban preprohepcidint overexpresszáltunk a korábban leírt módon. Ezt követően a sejtek médiumát új WRL68 sejtekre vittük át és 6 illetve 24 órás kezelést végeztünk. A kezelést követően a sejteket összegyűjtöttük és sejtfrakciókat szeparáltunk Qproteome Cell Compartment Kit felhasználásával. A citoszól és a membrán frakciókban jelen lévő ferroportint Western blottal mutattuk ki. A médiumba szekretálódott hepcidin hatására a ferroportin 6 óra elteltével internalizálódott a membránból a kontroll sejtekhez viszonyítva. A 24 órás kezelést követően pedig jól láthatóan a hepcidin hatása lecseng, a membránban növekedett a ferroportin mennyisége (**11. ábra**).



11. ábra. Az érett hepcidin ferroportint internalizáló hatása. WRL68 sejteket szekretált hepcidint tartalmazó sejtenyésző folyadékkal kezeltünk 6 illetve 24 órán keresztül. Ezt követően a sejteket összegyűjtöttük, majd frakcionáltuk. **(WRL68 Cyt-Mem 6h)** Kontroll WRL68 sejteket 24 órát fenntartott, de nem transzfektált sejtek médiumában tartottuk 6 órán keresztül. A ferroportin jól látható a membrán frakcióban. **(Hep Cyt-Mem 6h)** Hecpidint tartalmazó médiummal kezelt WRL68 sejtek citoszól és membrán frakciója. **(WRL68 Cyt-Mem 24h)** 24 órás kezelés kontroll WRL68 sejteinek citoszól és membrán frakciója. **(Hep Cyt-Mem 24h)** Hecpidint tartalmazó tápfolyadékban 24 órát kezelt WRL68 sejtek. A membránban növekedett a ferroportin mennyisége. A Western blottot anti-FP ellenanyaggal készítettük.

Ezt követően a kísérletet a preprohepcidin mutánsok transzfektálásával is elvégeztük. Az előkísérlet alapján a kezelés idejét hat órában határoztuk meg. A sejteket

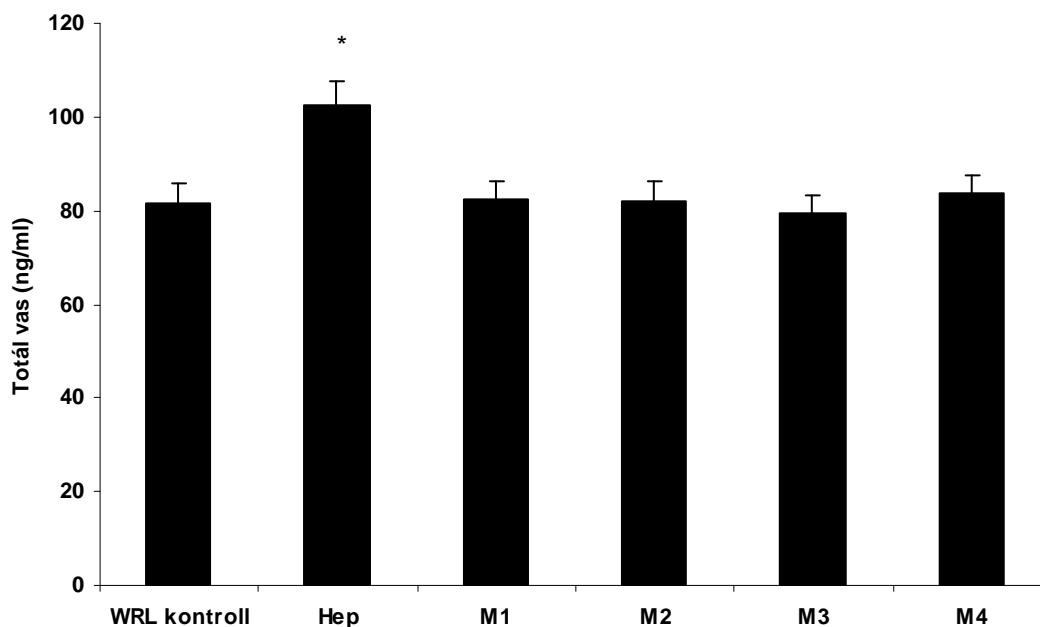
a kezelést kövően frakcionáltuk és vizsgáltuk a hepcidin ferroportin internalizáló hatását. Az M1 mutációt hordozó hepcidin peptid kötődés hiányában a vártnak megfelelően nem volt képes a receptor internalizációjára. Ugyanakkor az M2, M3 és M4 mutánsok, melyek képesek a ferroportinhoz kötődni, annak internalizációját szintén nem tudták kiváltani a 6 órás kezelés alatt (**12. ábra**). Az eredmények alapján elmondható, hogy a hepcidinben mind a négy diszulfid-híd megléte szükséges a ferroportin internalizációjának kiváltásához. Az eredményeket összevetve a szerkezeti predikcióval levonható az a következtetés, hogy míg a C7-C23 diszulfid-híd alapvető fontosságú a hepcidin ferroportinhoz való kötődésében, addig a receptor internalizációban a C13-C14, vicinális diszulfid-hídnek lehet szerepe.



12. ábra. A mutáns hepcidin peptidek internalizáló hatásának vizsgálata. WRL68 sejteket preprohepcidin/pTriex3-Neo vagy mutációt hordozó preprohepcidin/pTriex3-Neo plazmid DNS-sel transzfektáltuk. 24 óra elteltével a hepcidin peptideket tartalmazó médiummal WRL68 sejteket kezeltünk 6 órán keresztül. A sejteket Qproteome Cell Compartment Kit segítségével frakcionáltuk és a membrán illetve citoszól frakciókból Western blottot készítettünk anti-FP IgG felhasználásával. WRL68 sejtek membrán frakcióját használtuk kontrollnak. Hecpidint tartalmazó médiummal kezelt sejteknél a ferroportin internalizálódott (Hep Mem). A mutáns peptideket tartalmazó sejtenyésző folyadékkal kezelt sejtek esetében nem tapasztalható a ferroportin degradációja, tehát a mutáns peptidek nem képesek a receptor internalizációjára a 6 órás kezelés során.

Kísérleti eredményeink alátámasztásához a hepcidinnel, illetve a mutációt hordozó hepcidin peptidekkel kezelt sejtekből totál vasmeghatározást végeztünk. Az eredmények megerősítették korábbi megfigyeléseinket: csak a hepcidinnel kezelt sejtek esetében tapasztaltunk vasszint növekedést (**13. ábra**). A sejtek a vasat képesek voltak felvenni, de a ferroportin internalizációjának következtében leadni nem tudták. A mutáns hepcidin

peptidekkel kezelt sejtek továbbra is képesek voltak a vas exportjára a ferroportinon keresztül, így ezekben a sejtekben nem alakult ki vasfelhalmozódás.



13. ábra. WRL68 sejtekben lévő ferrovass (FeII) meghatározása. A hepcidint tartalmazó médiummal kezelt sejtek esetében a ferroportin internalizálódott, így a sejtek csak a vas felvételére képesek, annak leadására nem (Hep). A mutáns hepcidin peptideket tartalmazó sejtenyészti médiummal kezelt sejtek esetében nem tapasztaltunk vasszint növekedést, mely azt mutatja, hogy ezek a sejtek a vas felvételére és leadására is képesek. A kapott értékeket a kezeletlen WRL68 sejtekhez viszonyítottuk és átlag \pm standard hiba (SEM) formájában adtuk meg. * $P < 0,05$

A kísérleti eredményeket összefoglalva elmondható, hogy a hepcidin stabil szerkezetét kialakító négy diszulfid-híd alapvető fontosságú a hepcidin biológiai aktivitásának fenntartásában. A C7-C23 diszulfid-kötés megléte pedig elengedhetetlen feltétele a hepcidin-ferroportin interakció kialakulásához.

4.2. A preprohepcidin és a prohepcidin kapcsolata az alfa-1 antitripsinnel

A szervezetben a vasanyagcserét a hepcidin hormon szabályozza. Ebben a szabályozásban alapvető szerepet játszik receptorával, a ferroportinnal történő kapcsolódása. Mindeztáig a ferroportin-hepcidin interakción kívül más bizonyítottan a hepcidinhez kötődő fehérje nem ismert. Munkacsoportunk a hepcidin mellett vizsgálta a hormon prepro- és proformáinak lehetséges sejten belüli célfehérjéit, valamint ezeknek a molekuláknak a hepcidin működésében illetve a vas homeosztázisban betöltött funkcióját.

4.2.1. Hepatocita fehérjék in vivo kapcsolata a preprohepcidinnel és az érett hepcidinnel

A BacterioMatch Two-Hybrid rendszer két riporter gént tartalmaz: *lacZ* és carbenicillin rezisztencia gén. A két gén akkor fejeződik ki, ha a pBT és a pTRG plazmid által expresszált „csali” és „cél” fehérjék egymással összekapcsolódnak. Ha a transzkripció aktiváció teljesül, a baktérium kolóniák X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-galactopyranoside) tartalmú LB agar lemezekeken kék színűek lesznek, és a pozitív kontrollhoz hasonló növekedést mutatnak carbenicillin-tetraciklin-kloramfenikol-kanamicin (CTCK) antibiotikumokat tartalmazó táptalajon.

Elsőként a preprohepcidinhez kötő fehérjék feltérképezését végeztük el. A preprohepcidint „csali” fehérjeként használtuk, a humán máj cDNS könyvtár pedig targetként szolgált a kísérletben. X-gal tartalmú agar plate-en kékülő kolóniákat 250 µg/ml illetve 500 µg/ml carbenicillin tartalmú táptalajra szélesztettük, majd a jól növekvő kolóniákból plazmidot izoláltunk. Az izolált plazmidokat újra kotranszformáltuk BacterioMatch riporter baktériumtörzsbe, hogy igazoljuk a fehérje-fehérje interakciókat. Ezt követően a plazmidokat újra izoláltuk, majd pTRG plazmidokban lévő cDNS szakaszokat szekvenáltuk. A szekvenálás során kapott DNS szakaszokból BLASTN program segítségével azonosítottuk a preprohepcidinnel kapcsolódó fehérjéket. Az eredményeket az **7. Táblázat** foglalja össze.

7. Táblázat. A 84 aminosav hosszúságú preprohepcidin *in vivo* fehérjekapcsolatai.

| Fehérje | Swiss-Prot Szám | Funkció | Lokalizáció |
|--------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|
| Transztiretin | P02766 | Tiroid hormon kötés | Plazmába szekretálódik |
| Alfa-1 savi glikoprotein | P02763 | Akut fázis fehérje | Plazmába szekretálódik |
| Alfa-1 antitripszin | P01009 | Szerin proteáz inhibitor | Plazmába szekretálódik |
| Citokróm P450 | P05181 | Gyógyszer metabolizmus | Membránfehérje |
| ATP/ADP transzlokáz | P12235 | ATP-ADP kicserélődés | Mitochondrium |
| Enoil-KoA hidratáz | P30084 | Zsírsvav oxidáció | Mitochondrium |

A preprohepcidin kötődést mutatott a tiroid-hormon szállító szérum fehérjével a transztiretinnel (prealbuminnal) valamint a gyulladáshoz kapcsolódó folyamatokban emelkedett szintet mutató és diagnosztikus markerként használt akut fázis fehérjével, az alfa 1-savi glikoproteinnel, melynek szerepe a plazmában mindezidáig tisztázatlan.

A legerősebb kötődést a preprohepcidin az alfa-1 antitripszinnel mutatta, mely a szerin proteáz inhibitor fehérje családba (szerpin család) tartozik. A legnagyobb számban az A1AT DNS szekvenciája volt megtalálható az izolált target plazmidokban (a pozitív klónok egyharmadában volt jelen). Ez jelentheti azt, hogy az A1AT-preprohepcidin kapcsolat állandó és releváns, ugyanakkor nem zárható ki, hogy a használt máj cDNS könyvtárban nagyobb számban volt jelen az A1AT-t kódoló szakasz. Az A1AT-t kódoló DNS szakaszt a pTRG plazmidba klónoztuk, majd vizsgáltuk az interakcióját a pBT plazmidba klónozott preprohepcidinnel. A kísérlet eredményeként bebizonyosodott, hogy a preprohepcidin erősen kötődik az A1AT-hez, mivel a magas (500 µg/ml) carbenicillin koncentrációjú LB agar plate-en is erős növekedést mutatott a pozitív kontrollhoz képest. Mivel a hepcidin érésében alapvető szerepet játszik a furin, egy szerin proteáz, ezért a szerin proteáz gátló A1AT-nek is fontos része lehet a hepcidin érési folyamatának szabályozásában.

A preprohepcidint követően megnéztük, hogy az A1AT képes-e kötődni a 60 aminosav hosszúságú prohepcidinnel, illetve a 25 aminosavas érett hepcidinnel. Ehhez a prohepcidint és a hepcidint kódoló cDNS szakaszt a pBT plazmidba klónoztuk, majd kotranszformációt végeztünk az A1AT cDNS-t tartalmazó pTRG plazmiddal BacterioMatch riporter baktériumtörzsben. A carbenicillin tartalmú LB agar plate-en történő növekedést figyelembe véve elmondhatjuk, hogy az A1AT szelektíven köt a

prepro- és prohepcidinhez, de az érett hepcidinnel, valamint a preprohepcidin irányító szekvenciájával nem mutat interakciót (**8. Táblázat**).

8. Táblázat. Az alfa-1 antitripszin in vivo kapcsolata a preprohepcidinnel, a prohepcidinnel, és az érett hepcidinnel.

| pBT vektor inszertje | pTRG vektor inszertje | Növekedés CTCK plate-en ^a |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| preprohepcidin | α -1 antitripszin | +++ |
| prohepcidin | α -1 antitripszin | +++ |
| hepcidin | α -1 antitripszin | - |
| ^a kolónia növekedés | osztályozása: - nincs | növekedés, +++ erős növekedés |

A preprohepcidin a korábban említett fehérjék mellett gyenge interakciót mutatott a citokróm P450-el, ATP/ADP transzlokázzal illetve az enoil-KoA hidratázzal. Ezen fehérjék között többszörös illesztéssel szignifikáns hasonlóságot, illetve közös domént nem találtunk.

A BacterioMatch Two-Hybrid rendszerrel történő szűrést az érett 25 aminosav hosszúságú hepcidinnel is elvégeztük. Az azonosított fehérjék közül egy sem egyezett a preprohepcidin esetében talált fehérjékkel. Erősebb kapcsolatot mindössze két fehérjével találtunk: a CD74 membrán fehérjével és a ferritin nehézlánccal. Ezeknek az interakcióknak a feltérképezése még további kísérleteket igényel.

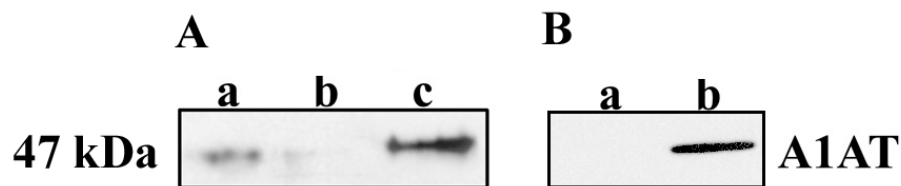
4.2.2. *In vitro* GST-fúziós fehérje kötési esszé

A preprohepcidint és az A1AT-t kódoló cDNS szakaszokat indukálható expressziós vektorokba klónoztuk (pGex4T-1 illetve pET51b(+)). A rekombináns plazmidokat BL21 sejtbe transzformáltuk, majd expresszáltattuk. A preprohepcidin expresszióját Western blottal ellenőriztük (**14. ábra**).

36 kDa preprohepcidin-GST

14. ábra. Bakteriálisan expresszált preprohepcidin. A preprohepcidint a pGex4T-1 expressziós vektorba klónoztuk, majd BL21 baktériumtörzsbe transzformáltuk. A sejteket indukciót követően összegyűjtöttük, a sejtízátumot 14%-os SDS-poliakrilamid gélen futattuk, majd blottoltuk. A Western blottot anti-hepcidin ellenanyaggal hívtuk elő.

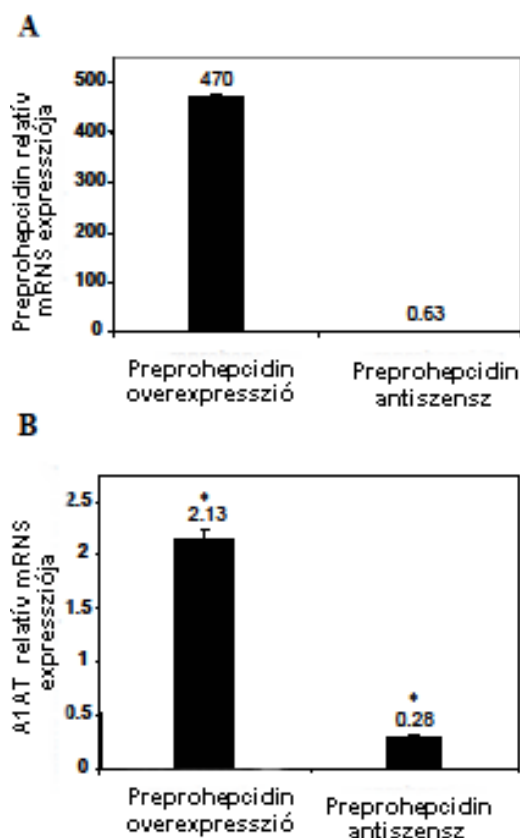
A glutation S-transzferáz (GST) tag-et hordozó preprohepcidint glutation szefaróz gyöngyön affinitás tisztítottuk, majd vizsgáltuk kötődését az A1AT expresszálo BL21 lizátummal, illetve humán szérumban lévő A1AT-el. A két fehérje interakcióját Western blottal mutattuk ki, anti-A1AT IgG ellenanyagot használva. A preprohepcidin-A1AT *in vitro* kötődés specifikusnak bizonyult. A negatív kontrollként alkalmazott GST-t hordozó szefaróz gyönggyel az A1AT minimális kötődést mutatott (**15. ábra**).



15. ábra. Preprohepcidin-A1AT *in vitro* (pull down) kötési esszé. BL21 *E. coli* törzsben expresszált GST illetve preprohepcidin-GST fúziós fehérjét Glutathione Sepharose 4B gyöngyökkel affinitás tisztítottuk. A gyöngyöket A1AT-t expresszálo BL21 sejtízátummal, illetve humán szérummal reagáltattuk. A fehérje komplexeket eluáltuk, majd a Western blottot anti-A1AT ellenanyaggal hívtuk elő. **A. (a)** Pozitív kontroll: A1AT fehérjét expresszálo BL21 sejtízátum. **(b)** Negatív kontroll: A1AT-t expresszálo BL21 sejtízátum és GST-glutathion szefaróz gyöngy interakciója. **(c)** A1AT-t expresszálo BL21 sejtízátum és preprohepcidin-GST fúziós fehérjét hordozó glutathion szefaróz gyöngy kötési esszé. **B. (a)** Negatív kontroll: GST-glutathion szefaróz gyöngy és humán szérum interakciója. **(b)** *In vitro* kötési esszé humán szérummal és preprohepcidin-GST fúziós fehérjét hordozó glutathion szefaróz gyönggyel.

4.2.3. A preprohepcidin és az A1AT mRNS expressziója egymással párhuzamosan változik

Megvizsgáltuk a preprohepcidin overexpressziójának illetve antiszensz technikával történő csendesítésének hatását az A1AT mRNS expressziójára. WRL68 sejtvonalat preprohepcidin/pTriex3-Neo plazmival transzfektáltunk, majd RNS izolálás és cDNS szintézist követően Real-Time PCR-rel 470-szeres preprohepcidin mRNS expresszió növekedést tapasztaltunk. Antiszensz technika alkalmazásával (preprohepcidin antiszensz/pcDNA3.1) preprohepcidin szintet 63%-ra redukáltuk a kezeletlen sejtekhez viszonyítva (**16A. ábra**). Emellett az A1AT mRNS expresszióját is vizsgáltuk, melynek értéke a preprohepcidin overexpressziója során több mint kétszeresére növekedett. A preprohepcidin szintjének 37%-os csökkenésekor az A1AT mRNS expressziója közel az egynegyedére (28%-ra) csökkent a kezeletlen sejtekhez viszonyítva (**16B. ábra**).

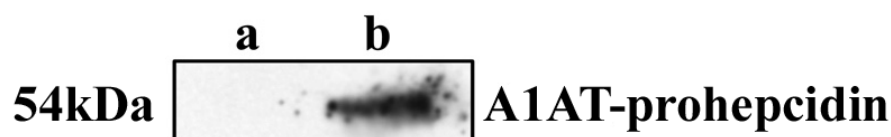


16. ábra. A1AT mRNS szintjének változása preprohepcidin overexpresszió és preprohepcidin csendesítés hatására WRL68 sejtvonalon. Az mRNS szinteket Real-Time PCR-rel határoztuk meg, az expressziós szinteket a β -aktinhez, mint referencia génhez viszonyítottuk. Az értékeket három független mérés átlaga \pm standard hiba (SEM) formájában adtuk meg. **(A)** A preprohepcidin mRNS szintje a két kezelést követően. **(B)** Az A1AT relatív mRNS expressziója

párhuzamosan változik a preprohepcidin mRNS szintjével a kezelések hatására. *P<0,01 a kezeletlen sejtekhez viszonyítva.

4.2.4. A prohepcidin és az A1AT *in vivo* keresztbekötése Huh7 sejtvonalon

A kísérlet során bizonyítottuk, hogy az A1AT *in vivo* kapcsolódik a preprohepcidinnel Huh7 sejten belül. Huh7 sejteket preprohepcidin/pTriex3-Neo plazmiddal (preprohepcidin a C-terminális végén His-tag-et hordoz) transzfektáltuk, majd 24 óra elteltével a sejt kultúrát DSS reagenssel kezeltük. A preprohepcidinhez kötődött fehérjéket His-tag-gel rendelkező fehérjék szelektív megkötésére alkalmas NiNTA agaróz gyönggyel tisztítottuk. A gyöngyök mosása után a kötődött fehérjéket Laemmli pufferrel eluáltuk, majd Western blottot végeztünk. A membránt anti-A1AT IgG ellenanyaggal hívtuk elő. Az A1AT-t kötő preprohepcidin specifikusan egy csíkot ad, bizonyítva, a két fehérje *in vivo* kapcsolatát. A kísérletet megismételtük a negatív kontrollként szolgáló üres pTriex3-Neo plazmiddal, melynek során nem kaptunk jelet (**17. ábra**).



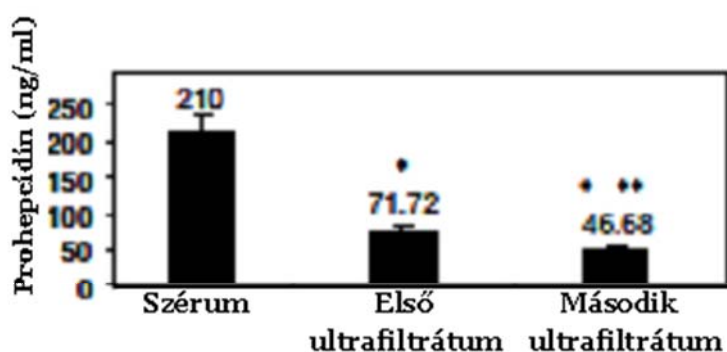
17. ábra. Az A1AT és a prohepcidin *in vivo* keresztbekötése Huh7 sejtvonalon. A Huh7 sejteket His-tag-es preprohepcidint expresszáló plazmid DNS-sel transzfektáltuk, majd disuccinimidil-szuberáttal (DSS) kezeltük. A fehérje komplexeket NiNTA agaróz gyönggyel tisztítottuk, majd Western blottot végeztünk. A membránt anti-A1AT ellenanyaggal hívtuk elő. **(a)** Negatív kontroll: a sejteket üres pTriex3-Neo plazmiddal transzfektáltuk. **(b)** A Huh7 sejteket preprohepcidin/pTriex3-Neo plazmiddal transzfektáltuk.

4.2.5. Az A1AT a szérumban a prohepcidinhez kötődik

A plazmában lévő A1AT és prohepcidin kapcsolatát szérum ultrafiltrációs esszével vizsgáltuk. Egészséges donoroktól származó szérumot Microcon-YM30 oszlopon ultrafiltráltunk, mely a 30 kDa-nál nagyobb fehérjéket nem engedi át. Először a

szérumok, majd az első ultrafiltrátum prohepcidin koncentrációját határoztuk meg Hepcidin Prohormone ELISA Kit-tel. A prohepcidin önmagában nem kötődött a Microcon oszlop membránjához, és az A1AT nem volt kimutatható a szérum ultrafiltrátumból. A szérum prohepcidin szintek átlaga 210 µg/ml, ugyanakkor az első ultrafiltrátum prohepcidin koncentrációja 71,7 µg/ml átlagértéket mutatott (**18. ábra**). Ezek alapján a szérumban lévő prohepcidin 60%-a a 30 kDa-nál nagyobb fehérjékhez kötötten fordul elő, melynek egy része az A1AT lehet.

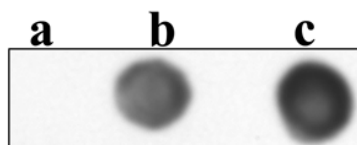
Továbbiakban azt bizonyítottuk, hogy a szérumban lévő szabad prohepcidint az A1AT képes megkötni. Az első szérum ultrafiltrátumhoz 1,5 g/L A1AT-t adtunk, majd inkubálás után további ultrafiltrációt végeztünk, majd a második ultrafiltrátum prohepcidin tartalmát is meghatároztuk. A prohepcidin koncentráció tovább csökkent a kiindulási érték 22%-ára, illetve az első ultrafiltrátum koncentrációjának 65%-ára (**18. ábra**).



18. ábra. Szérum ultrafiltrációs esszé. Ismert A1AT koncentrációjú humán szérumot Microcon YM-30 oszlopon filtráltuk. Az így kapott első ultrafiltrátumot 1.5 g/L A1AT-el inkubáltuk, majd ismét centrifugáltuk (második ultrafiltrátum). Ezt követően meghatároztuk a kiindulási szérum, az első és a második ultrafiltrátum prohepcidin koncentrációját Hepcidin Prohormone ELISA Kit-tel. Az értékeket három független mérés átlaga ± standard hiba (SEM) formájában adtuk meg. *P<0,01 a szérumhoz viszonyítva; **P<0,01 az első ultrafiltrátumhoz viszonyítva.

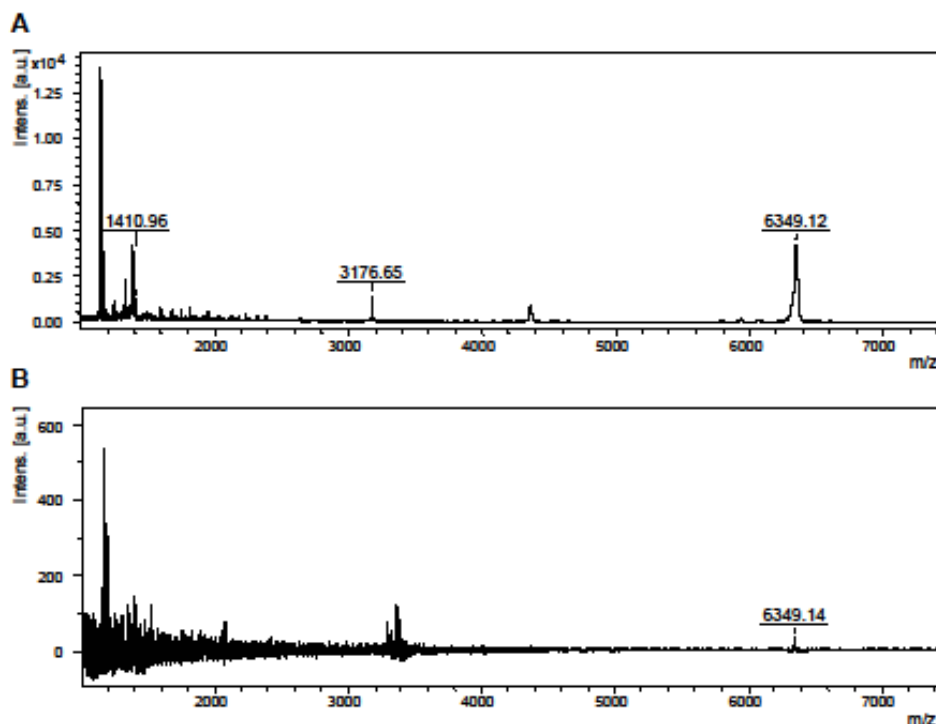
A szérum prohepcidin-A1AT kapcsolat specifikusságának vizsgálatára koimmunprecipitációt végeztünk. Anti-A1AT ellenanyagot CNBr-aktivált szefaróz gyöngyöz kötöttünk, majd humán szérummal inkubáltuk. A szefaróz gyöngyöket lemostuk, majd az A1AT-hez kötődött fehérjéket Laemmli pufferrel eluáltuk és dot blotot végeztünk anti-hepcidin ellenanyaggal. A dot blot erős pozitív jelet adott, mutatva,

az A1AT és a prohepcidin *in vivo* interakcióját a szérumban. A kísérletben a szabad (nem kötött) prohepcidint tartalmazó szérum ultrafiltrátum szolgált negatív kontrollként (**19. ábra**).



19. ábra. Az A1AT és a prohepcidin kötődésének bizonyítása koimmunprecipitációval. Az A1AT-hez asszociált fehérjéket CNBr-aktivált szefaróz gyöngyhöz kötött anti-A1AT IgG-vel tisztítottuk ki humán szérumból. A gyöngyről eluált fehérjékkel dot blottot végeztünk anti-hepcidin ellenanyag felhasználásával. **(a)** Negatív kontroll: Szabad prohepcidint tartalmazó szérum ultrafiltrátumot A1AT ellenanyagot hordozó CNBr-aktivált szefaróz gyönggyel inkubáltuk. **(b)** Pozitív kontroll: Szintetikus érett hepcidin. **(c)** Koimmunprecipitáció humán szérummal.

Hasonló affinitástisztítást végeztünk el ZipTip segítségével: az A1AT ellenanyagot a ZipTip C18-as oszlophoz kötöttük, majd humán szérummal inkubáltuk. A mintát eluálást követően MALDI TOF tömegspektrométeren analizáltuk. A kísérlethez BL21 *E. coli* törzsben expresszált His-tag-es prohepcidint használtunk, melyet előzőleg NiNTA oszlopon tisztítottunk, majd eluáltunk. A bakteriálisan expresszált kontroll prohepcidin-His molekulatömege 7760.08 Da. Az analízis során, a spektrumon két csúcs jelent meg, az 1410.96 m/z értékű, mely a 6xHis-tag-hez és a prohepcidin C-terminális végén lévő öt aminosavhoz (MCCKTHHHHHH) tartozó érték (**20A. ábra**), illetve a prohepcidin további 55 aminosavához tartozó 6349.12 m/z értékű. A szérumból ZipTip affinitás tisztított prohepcidin ugyanezt a 6349.14 m/z értékű csúcsot mutatta, mely hasonló fragmentációra utal (**20B. ábra**). Ezen a spektrumon az MCCKT aminosavakhoz tartozó csúcs nem jelent meg, mivel a detektálás 1000 m/z és 7500 m/z értéktartományban történt az alacsony molekulatömegű mátrix molekulák zavaró jeleinek kizárása érdekében.



20. ábra. A1AT kötött prohepcidin ZipTip affinitás tisztítása és tömegspektrometriás analízise. A szérumban lévő A1AT-hez asszociált prohepcidint ZipTip C18 oszlophoz kötött anti-A1AT ellenanyaggal tisztítottuk. A mintákat MALDI TOF tömegspektrométerrel analizáltuk. **(A)** BL21 baktériumtörzsben expresszált prohepcidin-His fúziós fehérjét használtuk a kísérletben prohepcidin standardként. A prohepcidin-His molekulatömege 7760,08 Da. A spektrumon megjelenő 1410,96 m/z és 6349,12 m/z értékek a prohepcidin-His fehérjének két fragmentjét mutatják. Az 1410,96 m/z értékű csúcs a hat hisztidinhez és a prohepcidin C-terminálisán lévő 5 aminosavhoz tartozó érték (MCCKTHHHHHH). **(B)** Az affinitás tisztított prohepcidin kimutatása humán szérumból. A 6349,14 m/z értékű csúcs a prohepcidin azonos fragmentjét mutatja, mint a standard esetében.

4.3. A prohepcidin expresszió szabályozásának új módja

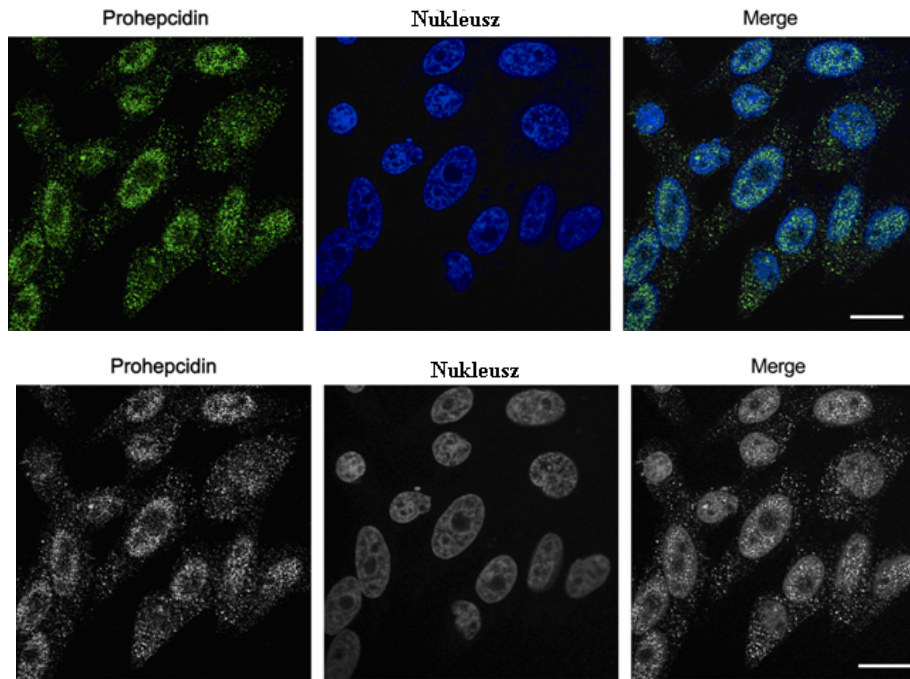
Munkacsoportunk a hepcidin sejten belüli interakcióinak feltérképezésén túl a fehérje expresszió szabályozásának lehetséges útvonalait vizsgálta. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a *HAMP* gén kifejeződését a májban számos faktor befolyásolja. A pozitív regulátorok közül a legtöbbet vizsgált fehérjék az öröklött hemokromatózis fehérje (HFE), a transferrin receptor 2 (TfR2), a hemojuvelin (HJV) és a csont morfogén fehérjék (BMP). Ugyanakkor a hepcidin szabályozásában számos, a szervezet

vasszintjétől független faktor is szerepet játszik: hipoxia, gyulladási folyamatok, eritroid faktorok. A hepcidin szintézisének gátlásában szerepet játszó fehérjéről viszonylag keveset tudunk még. Az első negatív regulátorként azonosított molekula a *TMPRSS6* gén által kódolt matriptáz-2, mely a membránban elhelyezkedő HJV elhasításával gátolja a hepcidin génjének aktivációját. A *HAMP* gén második potenciális inhibitora a nemrég leírt SMAD7 fehérje, mely a TGF- β és a BMP jelátvitelt gátolva csökkenti a hepcidin expresszióját.

A *HAMP* gén transzkripciós szabályozását, valamint az érett hepcidin vasanyagcserét szabályozó funkcióját már jól ismerjük, ugyanakkor a prohepcidin a májsejtekben és a vérben betöltött szerepéről keveset tudunk. A prohepcidint először egy nukleáris peptidként írták le, majd kimutatták a Golgi apparátusban és citoplazmatikus granulumokban is. Munkacsoportunk az irodalmi adatokat alapul véve prohepcidin májsejten belüli lokalizációjának vizsgálatát és a propeptid esetleges expressziót szabályozó szerepének kimutatását tűzte ki célul. Mivel munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy az A1AT specifikusan kötődik a prohepcidinhez mind a szérumban, mind pedig a májsejtekben belül, lehetségesnek tartottuk, hogy A1AT szerepet játszik a *HAMP* gén expressziójának szabályozásában.

4.3.1. A prohepcidin lokalizációja májsejtekben

WRL68 hepatocita sejteket prohepcidint kódoló pTriex3-Neo expressziós vektorral tranziensen transzfektáltuk, majd az overexpresszált prohepcidin celluláris lokalizációját *in vivo* immuncitokémiával vizsgáltuk. A sejteket anti-prohepcidin ellenanyaggal jelöltük, mely a peptid pro-régiójára specifikus, és a prohepcidin sejten belüli elhelyezkedését lézer scanning konfokális mikroszkóp segítségével térképeztük fel. Az eredmények azt mutatják, hogy a prohepcidin granuláris citoplazmatikus festődés mellett, mely a fehérje vezikuláris elhelyezkedésére utal, megtalálható a májsejtek sejtmagi régiójában is (**21. ábra**).



21. ábra. A prohepcidin a WRL68 májsejtek citoplazmájában és a sejtmagjában lokalizálódik. A WRL68 sejteket prohepcidin/pTriex3-Neo plazmiddal transzfektáltuk. 24 óra elteltével a sejteket fixáltuk majd az overexpresszált prohepcidin-His sejten belüli elhelyezkedését *in vivo* immuncitokémiával mutattuk ki, anti-prohepcidin első ellenanyag és Cy3-konjugált anti-nyúl második ellenanyag felhasználásával (bal oldali ábra). A sejtmagok láthatóvá tételéhez Hoechst festést végeztünk (középső ábra). A „mergelt”, egyesített kép jobbra látható. A méret skála 20 μm -t jelöl.

4.3.2. A prohepcidin a HAMP gén promóteréhez kötődik

A fehérje sejtmagi lokalizációja felveti annak a lehetőségét, hogy a prohepcidin génexpresszió befolyásoló szerepet is betölthet, szabályozhatja a saját génjének (*HAMP*) kifejeződését. A prohepcidin DNS kötő képességének meghatározásához Kumar és munkatársai által kifejlesztett SVM (Support Vector Machine) alapú predikciós algoritmust használtunk (<http://www.imtech.res.in/raghava/dnabinder>, Kumar et al., 2007). Az analízist a 60 aminosav hosszúságú prohepcidinnel és az érett hepcidinnel egyaránt elvégeztük. Az eredményeket a **9. Táblázat** tartalmazza. A prohepcidin elemzésekor kapott SVM értékek mind az aminosav összetételt (1,47) mind pedig a PSSM-et (position-specific scoring matrix, 1,07) alapul véve meghaladták a küszöbértéket, ami valószínűsíti, hogy a prohepcidin rendelkezik DNS kötő motívummal.

A 25 aminosavas hepcidin esetében az eredmények azt mutatják (SVM értékek: 0,03 és 0,16), hogy az érett hepcidin nem tartalmaz DNS kötő régiót.

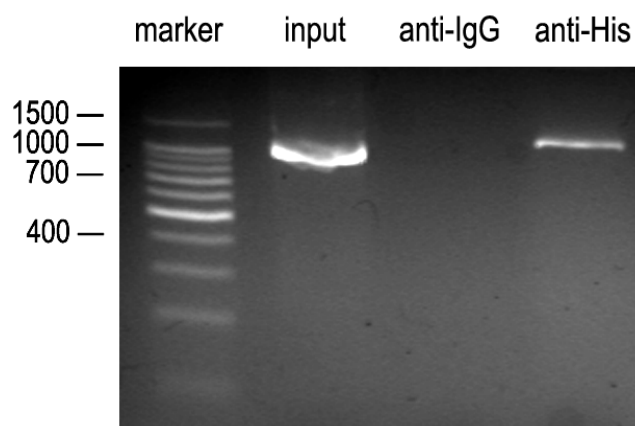
9. Táblázat. A prohepcidin és a hepcidin DNS kötő képességének meghatározása SVM alapú predikciós algoritmussal, aminosav összetétel és PSSM alapján.

| Módszer | Dataset | Prohepcidin | Hepcidin |
|---------------------|---------|-------------|----------|
| Aminosav összetétel | Main | 1,47 | 0,03 |
| PSSM | Main | 1,06 | 0,16 |

A prohepcidin DNS kötési képességének igazolásához a lehetséges sejtmagi célmolekulákat kerestünk. Először azt a lehetőséget vizsgáltuk meg, hogy a prohepcidin kötődhet-e a saját génjének (*HAMP*) promóter régiójához, ezáltal valamilyen módon befolyásolhatja a saját expresszióját. A prohepcidin-*HAMP* promóter kötődésének vizsgálatához kromatin immunprecipitációt végeztünk, majd egy PCR alapú promóter kötési esszét dolgoztunk ki.

A kromatin immunprecipitációhoz WRL68 sejteket preprohepcidin/pTriex3-Neo plazmiddal transzfektáltuk. Mivel a prohepcidin C-terminálisan histidin tag-et hordoz, ezért a fehérje-DNS komplexek immunprecipitációját Penta-His ellenanyaggal végeztük el. A tisztított DNS-ből PCR reakciót végeztünk *HAMP* specifikus primerekkel. A prohepcidin-*HAMP* kötődés specifikusságának vizsgálatához a PCR reakciót tranzin specifikus primerekkel is elvégeztük. Ebben az esetben az input DNS-nél igen, az immunprecipitált mintában nem kaptunk terméket (ábra nem mutatja), tehát eredményünk specifikus a *HAMP* promóterre nézve.

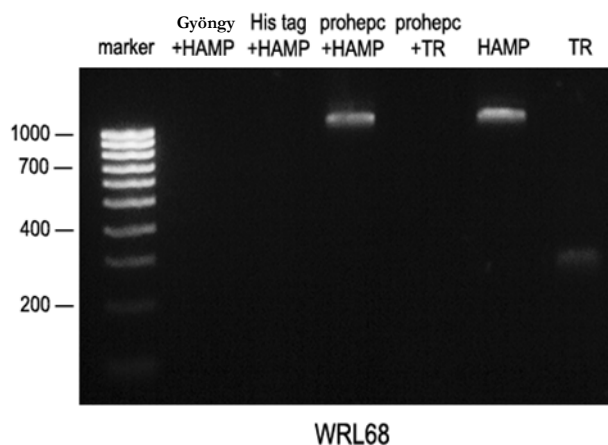
Az eredmények alapján elmondható, hogy a prohepcidin képes kötődni a *HAMP* promóter 942 bp hosszúságú darabjához (**22. ábra**).



22. ábra. A prohepcidin-*HAMP* promóter kromatin immunprecipitációja. A prohepcidin képes kötődni a saját promóteréhez (anti-His). A polimeráz láncreakciót *HAMP* promóter specifikus primerekkel végeztük el. A kísérletben pozitív kontrollként az ún. input DNS-t használtuk, mely tartalmazza a sejt teljes DNS állományát. Negatív kontrollként anti-nyúl IgG-vel immunprecipitált DNS-t használtuk fel.

Az általunk kifejlesztett kötési próbához a C-terminálisan His-tag-et (6 hisztidin) hordozó prohepcidint overexpresszáltuk WRL68 sejtvonalban, majd a fehérjét sejtmag kivonatból izoláltuk Penta-His ellenanyagot hordozó CNBr-aktivált szefaróz gyöngyök segítségével. Ezt követően a prohepcidint hordozó gyöngyöket *HAMP* promóter próbával inkubáltuk. A peptid-DNS komplexet eluáltuk a szefaróz gyöngyök felszínéről, majd a prohepcidin-*HAMP* kötődés kimutatásához az eluátumot templátként használva PCR-t végeztünk *HAMP* promóter specifikus primer párral.

Az eredmények azt mutatják, hogy a prohepcidin képes kötődni a saját promóteréhez. A kísérlet során csak a prohepcidin-His peptid jelenlétében kaptunk pozitív PCR reakciót (**23. ábra**). Az elvégzett kontroll kísérletek esetében nem kaptunk kötődést. (1) magkivonat nélkül, a *HAMP* promóter próba önmagában nem kötődik a Penta-His CNBr-aktivált szefaróz gyöngyökhöz. (2) csak a hisztidin tag-et expresszáló sejtekből készített nukleáris extrakt sem mutat interakciót a promóter próbával: a His-tag önmagában nem köti meg a promóter próbát, illetve más DNS-kötő fehérjék sem kötődnek nem-specifikusan a gyöngyökhöz. (3) a tranzin promóter próbával végzett kötési reakció sem mutatott pozitív reakciót: a prohepcidin specifikusan kötődik a *HAMP* promóterhez.

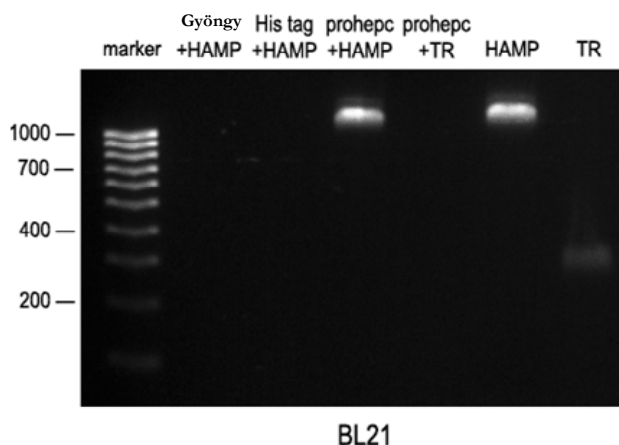


23. ábra. A prohepcidin a *HAMP* gén promóteréhez kötődik. WRL68 sejtekből immunprecipitációval izolált prohepcidin-His fehérjét *HAMP* promóter próbával inkubáltunk. A prohepcidin-His-hez kötődött DNS-t PCR templátként használtuk. A polimeráz láncreakciót *HAMP* promóter specifikus primerekkel végeztük el (prohepc+HAMP). A kontroll reakciókban nukleáris extrakt nélkül (gyöngy+HAMP), His-tag-et expresszáló sejtek nukleáris kivonatával (His+HAMP), és *HAMP* promóter próba helyett tranzin promóter próbával (prohepc+TR) végeztük el a kísérletet. A pozitív kontrollok esetében leukocita kromoszómális DNS-t használtunk PCR templátként.

A kísérletet elvégeztük azzal a módosítással, hogy az azonos módon transzfektált WRL68 sejtekből készített sejtmag kivonatot először a *HAMP* promóter próbával inkubáltuk, majd ezt követően a *HAMP*-prohepcidin-His komplexeket tisztítottuk Penta-His CNBr-aktivált szefaróz gyöngyökkel. A korábbi eredményekhez hasonlóan csak a prohepcidin-His fehérjét tartalmazó sejtmag kivonat mutatott pozitív interakciót a *HAMP* promóter próbával (ábra nem mutatja). Mindezek alapján elmondható, hogy a prohepcidin specifikusan kötődik a saját génjének promóteréhez.

A kapott eredmények felvetik annak a lehetőségét, hogy a prohepcidin nem önmagában kötődik a promóteréhez, hanem egy nagyobb komplex részeként, mely tartalmazhat más DNS-kötő fehérjét/fehérjéket. Ezeknek a fehérjéknek a jelenléte a nukleáris kivonatokban hozzájárulhattak a prohepcidin-*HAMP* pozitív interakciójához. Ahhoz, hogy megállapítsuk, hogy a prohepcidin egyedül vagy más fehérjékkel alkotott komplex formájában képes-e a *HAMP* gén promóteréhez kötni, a prohepcidin-His fehérjét BL21 baktériumtörzsben termeltettük. Az így expresszált prohepcidin nem képes az esetleg szükséges nukleáris DNS-kötő fehérjékkel komplexet képezni. A prohepcidin-

His peptidet immunprecipitációval tisztítottuk és a korábbi kísérletekkel azonos módon elvégeztük a *HAMP* promóter kötési próbát. Az eredmények alapján elmondható, hogy csak a bakteriálisan expresszált prohepcidin-His fehérjét tartalmazó minta mutatott pozitív PCR reakciót, míg DNS kötődést a kontroll minták esetében nem tapasztaltunk (24. ábra). A kísérleti eredmények azt bizonyítják, hogy a prohepcidin önmagában, más nukleáris DNS-kötő fehérjék nélkül is képes a saját génjének promóteréhez kötődni.



24. ábra. A prohepcidin más nukleáris DNS-kötő fehérjék nélkül is képes kötődni a promóteréhez. BL21 baktériumsejtekből immunprecipitációval izolált prohepcidin-His fehérjét *HAMP* promóter próbával inkubáltunk. A prohepcidin-His-hez kötődött DNS-t PCR templátként használtuk. Csak a prohepcidin-His fehérjét tartalmazó minta esetén kaptunk kötődést (prohepc+HAMP). A kontroll kísérletek esetében (Gyöngy+HAMP, His tag+HAMP, prohepc+TR) nem kaptunk PCR terméket. A pozitív kontrollhoz leukocita kromoszómális DNS-t használtunk PCR templátként.

4.3.3. A prohepcidin csökkenti a saját génjének (*HAMP*) expresszióját

Miután bizonyítást nyert, hogy a prohepcidin képes a saját génjének promóteréhez kötődni, továbbiakban arra kerestük a választ, hogy ennek az interakciónak lehet-e szerepe a *HAMP* gén szabályozásában. A prohepcidin *HAMP* génre kifejtett hatásának vizsgálatához, a *HAMP* promóter aktivitását mértük eltérő intracelluláris prohepcidin szintek mellett.

A prohepcidin sejten belüli mennyiségének emeléséhez a WRL68 sejteken tranziens transzfekciót végeztünk a preprohepcidin kódoló DNS-ét tartalmazó pcDNA3.1 plazmiddal. A prohepcidin szint csökkentését antiszensz technika segítségével végeztük

el. Ebben az esetben a preprohepcidin antiszensz DNS-ét tartalmazó pcDNA3.1 vektorral transzfektáltuk a sejteket. A *HAMP* promóter aktivitásának meghatározásához a promóter 942 bázispár hosszúságú darabját a szentjánosbogár luciferáz enzimét kódoló DNS szakasszal fuzionáltattuk pGL3 expressziós vektorban. Az így elkészített plazmiddal kotranszekciót végeztünk preprohepcidin/pcDNA3.1 vagy preprohepcidin antiszensz/pcDNA3.1 plazmid DNS-el WRL68 sejtvonalon. A preprohepcidin mRNS expreszióját Real-Time PCR segítségével, a promóter aktivitásának változását luciferáz enzimaktivitás méréssel határoztuk meg.

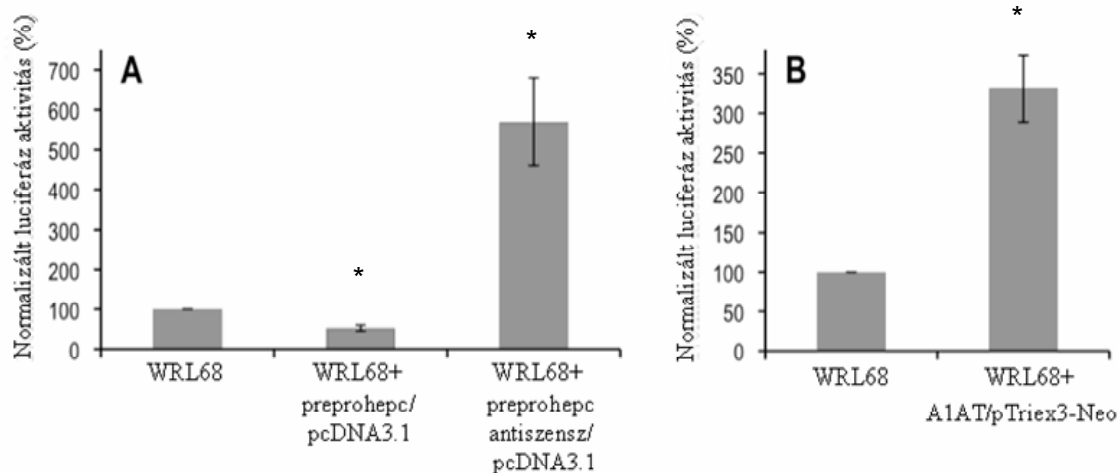
Normál prohepcidin szint mellett a *HAMP* promóter-luciferáz riporter vektor aktivitását tekintettük a WRL68 sejtek alap promóter aktivitásának. Ezt az alap aktivitást ítéltük 100%-nak (**25A. ábra**). Overexpresszió hatására a preprohepcidin mRNS szintje 435-szörösére növekedett a normál prohepcidin szinthez képest, a *HAMP* promóter aktivitása ezzel szemben az alap aktivitás 52%-ára csökkent. A prohepcidin mennyiségének csökkentésére a sejtek sokkal erőteljesebben reagáltak. Antiszensz DNS hatására a preprohepcidin mRNS expressziója a normál szint 63%-ára redukálódott, míg a *HAMP* promóter aktivitása az alap aktivitás 5,2-szeresére emelkedett.

Annak ellenőrzésére, hogy a *HAMP* promóter aktivitásának változását ténylegesen a prohepcidin illetve annak hiánya és nem csupán a prepro régió okozza, a kísérletet elvégeztük a következő módon is: a hepcidint megelőző prepro szakaszt fuzionáltattuk a citoszolikus elhelyezkedésű gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) kódoló régiójával, majd pTriex3-Neo plazmidba klónoztuk. Ezt követően a luciferáz esszét megismételtük a prepro-GAPDH/pTriex3-Neo plazmid transzfektálásával. A promóter aktivitása nem változott szignifikánsan (98%) a kontroll sejtekhez képest.

A prohepcidin *HAMP* promóterre gyakorolt hatásának, specifikusságának vizsgálatához a kísérletet a tranzin promóterrel is elvégeztük. Ehhez a tranzin promóter 591 bp hosszúságú darabját pGL3 vektorba klónoztuk, majd vizsgáltuk a prohepcidin, illetve a prohepcidin antiszensz DNS hatását a tranzin promóter aktivitására. Eredményeink azt mutatják, hogy sem a prohepcidin overexpressziója, sem annak mennyiségi csökkenése nem változtatja meg szignifikánsan a promóter aktivitását (109-109%). Tehát a prohepcidin hatása specifikus a *HAMP* promóterre nézve.

A kísérletet elvégeztük az érett hepcidin kódoló DNS-ét tartalmazó pTriex3-Neo plazmid WRL68 sejtbe történő transzfekciójával. Ebben az esetben az érett hepcidin szintjének emelkedése a *HAMP* promóter aktivitására nem volt negatív hatással (ábra

nem mutatja). Tehát a kapott eredmények specifikusak a hormon pro-formájára. Kísérleteink eredményei alátámasztják a hipotézisünket, mely szerint a prohepcidin képes szabályozni a saját génjének expresszióját, azáltal, hogy hozzákötődik a *HAMP* gén promóteréhez és csökkenti annak aktivitását.



25. ábra. A *HAMP* promóter aktivitását a prohepcidin és az A1AT szintje is befolyásolja. **(A)** WRL68 sejtekben a prohepcidin intracelluláris szintjét preprohepcidin/pcDNA3.1 vagy preprohepcidin antiszensz/pcDNA3.1 plazmidok transzfekciójával emeltük illetve csökkentettük. A *HAMP* promóter 942 bp hosszúságú darabját fúzonáltattuk a szentjánosbogár luciferáz enzimét kódoló DNS szakasszal pGL3 plazmidban, majd kotranszfekciót végeztünk az így elkészített vektorral WRL68 sejteken. A transzfekció hatékonyságának meghatározásához pSV- β -Galactosidase Control Vector-t alkalmaztunk. 24 óra elteltével a sejteket összegyűjtöttük, majd a sejt extraktumokból luciferáz aktivitást mértünk. A kapott aktivitás értékeket a normál prohepcidin szintet mutató kezeletlen WRL68 sejtekhez viszonyítottuk. **(B)** WRL68 sejteket kotranszfektáltuk A1AT/pTriex3-Neo illetve *HAMP*/pGL3 vektorokkal. 24 óra elteltével a sejteket összegyűjtöttük, majd luciferáz aktivitást mértünk. A kapott értékeket a normál A1AT szintet mutató kezeletlen WRL68 sejtekhez viszonyítottuk. A *HAMP* promóteraktivitást a fehérjekoncentrációt és a β -galaktozidáz aktivitást is figyelembe véve adtuk meg százalékban kifejezve. Az értékeket három független mérés átlaga \pm standard hiba (SEM) formájában adtuk meg. * $P < 0,05$ a WRL68 sejtekhez viszonyítva.

4.3.4. Az A1AT által kötött prohepcidin nem gátolja a HAMP gén expresszióját

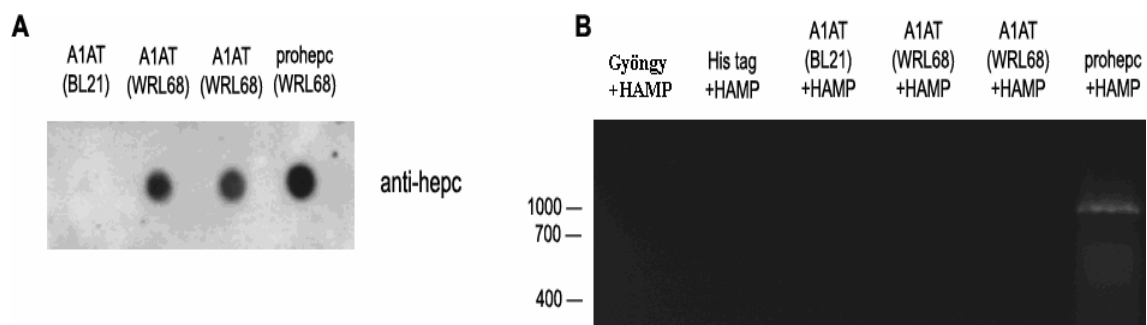
Korábban kimutattuk, hogy a prohepcidin specifikusan kötődik az α -1 antitripszinhez a sejten belül és a szérumban is. Feltételezhetően ennek a kapcsolatnak a prohepcidin poszttranszlációs módosulásaiban van szerepe. Az α -1 antitripszin valószínűleg védi a prohepcidint a furin általi hasítástól.

Következőkben azt vizsgáltuk, hogy a két fehérje kapcsolata befolyásolja-e a *HAMP* gén expresszióját. Ennek felderítéséhez WRL68 sejtekben overexpresszáltuk az A1AT-t, majd vizsgáltuk a *HAMP* promóter aktivitására kifejtett hatását Luciferáz esszével. Az A1AT mRNS szintjének növekedését Real-Time PCR-ral ellenőriztük (ábra nem mutatja). Az A1AT overexpresszió hatására a *HAMP* promóter aktivitás háromszorosára emelkedett, a kezeletlen, normál A1AT szintet mutató WRL68 sejtekhez képest (**25B. ábra**). Az emelkedett promóter aktivitás azt mutathatja, hogy az A1AT által kötött prohepcidin nem képes a *HAMP* gén expresszióját csökkenteni.

Továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy az A1AT által kötött prohepcidin képes-e a *HAMP* promóterhez kötődni. WRL68 sejteket A1AT/pTriex3-Neo plazmiddal transzfektáltunk, majd 24 óra múlva a sejtizátumokból immunprecipitációval izoláltuk a fehérjét. Az A1AT jelenlétét Western blottal igazoltuk anti-A1AT ellenanyag felhasználásával (ábra nem mutatja). Ezt követően a mintákból dot blottot készítettünk anti-hepcidin ellenanyaggal. Az eredmények azt támasztották alá, hogy a mintában nem csak az A1AT, hanem az A1AT-hez kötött prohepcidin is jelen van (**26A. ábra**).

Az immunprecipitációval tisztított A1AT-prohepcidin komplexszel elvégeztük a *HAMP* promóter kötési próbát a korábban leírtak szerint. A kötési próba alapján elmondhatjuk, hogy sem a prohepcidint nem kötő, „szabad” A1AT (BL21 baktériumtörzsben termelt), sem az A1AT által kötött prohepcidin nem képes a *HAMP* promóterhez kapcsolódni (**26B. ábra**).

A kísérleti eredményeket összegezve feltételezhető, hogy csak az A1AT által nem kötött, tehát „szabad” prohepcidin képes a saját promóteréhez kötődni, és ezáltal csökkenteni a *HAMP* gén expresszióját.



26. ábra. Az A1AT által kötött prohepcidin nem lép interakcióba a *HAMP* promóterrel. **(A)** WRL68 sejtekben overexpresszált A1AT fehérjét a hozzá kötődött prohepcidinnel együtt immunprecipitációval tisztítottuk, majd dot blottot készítettünk anti-hepcidin ellenanyag felhasználásával. (A1AT(WRL68)). Pozitív kontrollként a WRL68 sejtekből izolált prohepcidin-His fehérjét használtuk (prohepc(WRL68)). Negatív kontrollként BL21 baktériumtörzsben termelt, majd tisztított A1AT-t használtunk A1AT(BL21)). **(B)** WRL68 (A1AT(WRL68)+HAMP) és BL21 (A1AT(BL21)+HAMP) baktériumtörzsből Penta-His CNBr-aktivált szefaróz gyöngyökkel A1AT-His fehérjét izoláltunk, majd *HAMP* promóter kötési esszét végeztünk. Csak a „szabad” prohepcidint tartalmazó minta adott pozitív PCR reakciót (prohepc+HAMP).

5. Megbeszélés

A *HAMP* gén által kódolt hepcidin egy újonnan leírt peptid hormon, mely főként a májban termelődik [112]. Az emberi szervezetben eddig két fontos szerepét írták le: szabályozza a szervezet vasháztartását, valamint részt vesz a kórokozók elleni védelemben [113-115]. A fehérje egy 84 aminosav hosszúságú prepro formában szintetizálódik, majd a szignál szekvencia lehasadása után a 60 aminosavas prohepcidin a Golgi készülékbe kerül és érett hepcidinné alakul [17]. A 25 aminosav hosszúságú hepcidint a májban termelődő prohormon konvertáz a furin szerin proteáz hasítja le a proformából [15]. A szérumban mind a prohepcidin, mind pedig az érett hepcidin jelen van, biológiai aktivitással azonban csak az érett forma rendelkezik. A hormon a receptorához, a ferroportinhoz kötődve fejt ki szabályozó hatását. A ferroportin egy 12 transzmembrán doménnel rendelkező, 62 kDa nagyságú, komplex molekula. A ferroportin a hepcidin kötődésének hatására internalizálódik, majd degradálódik. Ennek következtében az enterociták kevesebb vasat adnak le a keringésbe, ezáltal a bélből történő vasfelvétel csökken. A hepcidin negatívan regulálja a makrofágokból történő vasexportot is, ezáltal csökken a szérum vasszintje.

Az érett hepcidin nyolc ciszteint tartalmaz, melyek négy diszulfid-hidat képezve stabilizálja a peptid szerkezetét. A peptidben található egy szokatlan vicinális diszulfid-híd, mely a 13. és 14. cisztein között a hajtúkanyarban helyezkedik el. Ennek a diszulfid-hídnak nagy jelentőséget tulajdonítanak a hepcidin szerkezetének kialakításában és funkciójának betöltésében. Az amfipatikus (asszimmetrikusan poláris) struktúra összetartásában hat cisztein vesz részt, intramolekuláris diszulfid-hidakat képezve [19]. Aschi és munkatársai szerkezeti analízissel kimutatták, hogy a négy diszulfid-kötésen kívül a hepcidin szerkezetének kialakításában és stabilizálásában három vagy négy hidrogén-híd is szerepet játszik [22].

Nemeth és munkacsoportja vizsgálta a diszulfid-hidak szerepét a hepcidin funkciójának betöltésében [20]. Olyan szintetikus hepcidin peptidek aktivitását vizsgálták, amelyekben az egy-egy diszulfid-hidat alkotó ciszteinek mindkét tagját alaninra cserélték, tehát az adott diszulfid-kötést eliminálták, miközben a többi diszulfid-híd ép maradt. A kísérleteikben az egyes, a hármas és a négyes diszulfid-híd eliminációjának hatását vizsgálták, és megállapították, hogy az egyes diszulfid-hidak hiánya nem változtatja meg lényegesen a peptid szerkezetét, ezáltal az aktivitását sem.

Irodalmi adatok szerint a hepcidin génjében, a *HAMP* génben három olyan mutáció is ismert, melyek a peptid diszulfid-hídjaikat kialakító ciszteinek érinti. Két családban a harmadik diszulfid-hidat érintő homozigóta C70R (cisztein-arginin, C11 az érett hepcidinben) és C78T (cisztein-treonin, C19 az érett hepcidinben) mutációkat azonosították, melyek következtében a betegekben juvenilis hemokromatózis alakult ki [116-117]. A C82Y (cisztein-tirozin, C23 az érett hepcidinben) első diszulfid-kötést érintő mutáció felnőttkori hemokromatózist okoz homozigóta formában [118]. A hemokromatózis kialakulásának két oka lehetséges ezekben az esetekben: a hepcidin nem képes kötődni a ferroportinhoz, vagy az interakció ugyan megvalósul, de a ferroportin internalizációja nem következik be.

Ez utóbbi hipotézisből kiindulva olyan mutáns hepcidin peptideket hoztunk létre, melyekben a diszulfid-hidat képező cisztein párok csak egyik tagját helyettesítettük másik aminosavval (szerinnel), ezáltal lehetőséget adva az intramolekuláris diszulfid-hidak átrendeződésére. A mutációt DNS szinten hoztuk létre azáltal, hogy a megfelelő ciszteint kódoló nukleotid tripletet (TGC), egy szerint kódoló tripletté változtattuk (TCC). Ezt követően a mutáns DNS szakaszt expressziós vektorba klónoztuk és a fehérjét bakteriális rendszerben illetve humán májsejtekben termeltettük. Ezzel a módszerrel négy, mutációt hordozó hepcidin peptidet hoztunk létre, melyekben egyesével a C7, C10, C11 és C13 cisztein aminosavakat cseréltük le. Így az M1 esetben az első (C7-23), az M2 estében a második (C10-C22) az M3-nál a harmadik (C11-C19) és az M4 mutáns hepcidinben a negyedik (C13-C14), vicinális diszulfid-híd kialakulását gátoltuk meg.

A BacterioMatch Two Hybrid rendszerben végzett hepcidin-ferroportin kötési kísérlet azt mutatta, hogy a hepcidin első diszulfid-hídja (C7-C23) alapvető fontosságú a receptor-ligand kapcsolat kialakításában. Az M1 mutáns hepcidin peptid nem képes kötődni a ferroportinhoz, ugyanakkor a második, harmadik, illetve negyedik diszulfid-híd hiánya a kapcsolatot gyengítheti, de nem szünteti meg. Ennek az eredmények magyarázata lehet a 3D szerkezeti predikciós analízis, mely szerint az első diszulfid-kötés hiányában a peptid szerkezete torzul, a két terminális más síkba kerül, valamint a β -lemez megszűnik. Ugyanakkor a mutációk következtében diszulfid-híd átrendeződés mehet végbe, melynek során egy új kötés alakul ki a C13 és C19 cisztein aminosavak között. Ez az átrendeződés valamint az intramolekulárisan jelen lévő hidrogén-kötések együttesen biztosíthatják a mutációt hordozó M2, M3 és M4 peptidek receptorhoz való kötődését.

A mutáns hepcidin peptidek biológiai aktivitás vizsgálata kimutatta, hogy mind a négy diszulfid-híd szükséges a ferroportin internalizációjának kiváltásához. Egyetlen

cisztein szubsztitúciója elegendő ahhoz, hogy a peptid elveszítse biológiai aktivitását. Az M2, M3 és M4 hepcidin peptidek ugyan képesek kapcsolatot kialakítani a ferroportinnal, de annak internalizációját nem tudják kiváltani. A szerkezeti predikciót alapul véve megfigyelhető, hogy nemcsak a C13, de a C7, a C10 és a C11 cisztein szubsztitúciója során kialakult szerkezeti változások is hatással vannak a vicinális diszulfid-hídra, akadályozzák annak kialakulását. Így feltételezhető, hogy a hepcidin vicinális diszulfid-hídja szükséges a megfelelő szerkezet kialakításához, így a hepcidin mediálta ferroportin internalizációhoz. Ennek bizonyításához további szerkezeti vizsgálatokra van szükség.

Az egyes diszulfid-hidakban mutációt hordozó hepcidin peptidek közül az M1 és az M3 hasonló, illetve azonos a humán populációban is előforduló mutációkkal. Az eredmények alapján feltételezhető, hogy az ismert C82Y első diszulfid-hidat érintő hepcidin mutáció esetében a peptid nem képes a receptorához kötődni. A C70R illetve a C78T harmadik diszulfid-kötést érintő mutációk esetében pedig a hepcidin képes a ferroportinnal kapcsolatot kialakítani, de annak internalizációját nem tudja kiváltani. Ennek következtében a homozigóta mutációkat hordozó egyéneknél felnőttkori illetve juvenilis hemokromatózis alakul ki.

Mivel ezekben az esetekben a hepcidin ugyan termelődik, de funkcióját nem tudja betölteni, a hemokromatózis kialakulásának megakadályozására a hepcidin pótlása lehetne a megoldás a jövőben. Gardenghi és munkatársai β -thalasszemiás egérmodellen már vizsgálták a pótlólag beadott hepcidin illetve a transzgénnel bejuttatott hepcidin hatását a vastültelítettségre illetve kifejlődő anémiára. A kezelt egerekben a vastelítettség csökkent, emellett csökkent a membránhoz kötődő α -globin lánc mennyisége, csökkent a ROS képződés, a vvt-k életideje növekedett, emelkedett a hemoglobin szint és az anémia ia visszafejlődött [119]. A jövőben a vastültelítettséggel járó betegségek kezelésében nagy szerepet játszhat a hepcidin expressziójának csökkentése illetve növelése. Sajnos a hepcidin rövid féléletideje ($5,3 \pm 2,7$ h) miatt a szintetikus peptid bejuttatása a szervezetbe nem jelenthet végleges megoldást. Ugyanakkor a hepcidin modulátorok, illetve a vaskeláló szerek alkalmazása megfelelő stratégia lehet.

Ezidáig a hepcidinhez bizonyítottan kötődő fehérjék, a ferroportin vasexporteren kívül, kevésbé ismertek. Hipotézisünk szerint, a vasanyagcsere szabályozásában illetve a hepcidin működésének szabályozásában a ferroportinon kívül más fehérjék is részt vehetnek, ezért munkacsoportunk az érett hepcidin mellett annak proformájának májban termelődő fehérjékkel történő interakcióit vizsgálta májsejtben illetve a szérumban.

Kísérleteinkben BacterioMatch Two-Hybrid rendszert alkalmaztunk annak felderítésére, hogy a preprohepcidin illetve a hepcidin milyen máj által termelt fehérjékkel állhat kapcsolatban.

Eredményeink azt mutatják, hogy a szerpin peptidáz inhibitor alfa-1 antitripszin erős kötődést mutat a preprohepcidinnel és a prohepcidinnel, ugyanakkor nem kapcsolódik az érett hepcidinhez. Ebből arra következtethetünk, hogy az A1AT védi a prohepcidint a furin általi hasítástól. A furin egy szerin proteáz, mely a hormon érési folyamatát katalizálja azáltal, hogy elhasítja azt. A furin RNS szintű szabályozása a Tfr2-n keresztül valósul meg: a holotranszferrin a Tfr2-HFE komplexhez kötődve aktiválja az Erk1/2 foszforilációját, ezáltal serkenti a furin expresszióját. A furin a hepcidin érési folyamatában betöltött szerepén túl a BMP fehérjék éréseben is szerepet játszik, ezáltal növeli a hepcidin expresszióját [53]. Ugyanakkor a furin gátolhatja is a hepcidin kifejeződését a membránhoz kötött hemojuvelin elhasításával. A keletkezett szolubilis HJV ugyanis gátolja a hepcidin expressziót a BMP jelátviteli útvonal antagonistájaként [62].

Irodalmi adatok is alátámasztják a feltételezést, miszerint az A1AT-nek prohepcidint védő hatása lehet, mivel az öröklött A1AT mutációk vasfelhalmozódással és májbetegségekkel (májcirózis, hepatocelluláris karcinóma) járnak együtt [120]. Súlyos A1AT deficienciát okozó leggyakoribb mutáció a Z-variáns, mely esetben a molekula először konformációs változáson esik át, majd dimerizálódik, végül hosszú polimereket képezve aggregálódik. Z-mutáció esetén az A1AT szekrécija a májsejtekből jelentősen csökken, ami alacsony szérumkoncentrációt eredményez [121]. Az A1AT mutációk egyik következménye a hiperferritinémia [122]. A tünet lehetséges magyarázata, hogy a mutációt hordozó proteáz inhibitor a sejtek endoplazmatikus retikulumjában felhalmozódva nem tudja a prohepcidint megfelelően védeni az enzimatikus hasítástól, melynek következményeként több érett hepcidin keletkezik. A prohepcidin furin általi hasítódása ugyan elengedhetetlen a receptorához, a ferroportinhoz való kötődéshez és internalizálásához [123], de a szükségesnél nagyobb mennyiségű hepcidin hatására vastültelítettség alakul ki a retikuloendoteliális rendszerben, a parenchimális szervekben, miközben a szérum ferritin szint emelkedik.

A prohepcidin ELISA kit-et számos betegség esetén (Hepatitis C; rheumatoid arthritis; lupus erythematosus; β -thalassemia; gyulladós bélbetegségek, mint Crohn betegség és Colitis ulcerosa; örökletes hemokromatózis) megpróbálták alkalmazni a szérum prohepcidin szint és egyéb klinikai laboratóriumi paraméterek összefüggéseinek

felderítésére. A prohepcidin jelenléte a szérumban önmagában is azt jelentheti, hogy van a keringésben olyan molekula, mely megvédi a proteolitikus hasítástól. Ugyanakkor a proteáz inhibitor jelenléte akadályozhatja az ELISA kit-ben lévő ellenanyag prohepcidinhez kötődését, ezáltal a prohepcidin szint pontos meghatározását. A prohepcidin szint meghatározás helyett az érett hepcidin szintjének meghatározása lehet egy új diagnosztikus eszköz a vasanyagcsere betegségek esetében [124]. Az érett hepcidin szérumból törénő mennyiségi meghatározása kiegészítve a ferritin és a cöruoplazmin szintjének meghatározásával egy potenciális diagnosztikus tesztként alkalmazható hemokromatózis és más vasanyagcsere betegségek esetén [125]. A szérum hepcidin szint meghatározása felválthatja a bonyolultabb ferritin index használatát a vasdeficiens anémia és a krónikus betegség következtében kialakult anémia elkülönítéséhez [126].

Gyulladásos folyamatokban a biológiailag aktív érett hepcidin mennyisége jelentősen megnő a vérben, még mielőtt a hepcidin mRNS szintézise beindulna [127]. Ugyanakkor számos patológiás esetben a szérum prohepcidin és a hepcidin szint nem mutat különbséget [128]. Ennek egy lehetséges magyarázata az emelkedett proteáz aktivitás és/vagy a proteáz inhibitor működésbeli eltérései. Az A1AT szintje megemelkedik a gyulladás kezdeti szakaszában, melynek fő funkciója a granulocitákból az elasztáz felszabadulásának gátlása. Ezért akut gyulladásos folyamatokban az A1AT kevésbé védheti a prohepcidint a proteolitikus hasítástól, így emelkedhet a hepcidin szintje a szérumban [129].

A preprohepcidin szintén interakciót mutatott az alfa-1 savi glikoproteinnel és a transztiretinnel. Az előbbi az egyik fő plazmafehérje, mely az immunokalinok családjába tartozó immun- és gyulladásos folyamatokat moduláló molekula. Ezen kívül számos bázikus és neutrális gyógyszer molekula megkötésére és szállítására képes [130]. A savi glikoprotein chaperon funkciója is ismert [131] ezáltal a prohepcidin védelmét láthatja el a szérumban. Az alfa-1 savi glikoprotein szintje akut és krónikus gyulladással együtt járó kórképekben [132], vírusfertőzéseknel (Hepatitis B, HIV-1) megemelkedik [133]. A krónikus gyulladás gyakran szöveti vasfelhalmozódással és anémiával jár együtt [101, 129]. Ayoya és munkatársai kimutatták, hogy *Schistosoma haematobium* fertőzéses gyerekeknél kialakult krónikus gyulladásban és anémiában az alfa-1 savi glikoprotein szintje megemelkedik, és pozitív korrelációt mutat a vizeletben lévő hepcidin mennyiségével [134].

A transztiretin (prealbumin) egy erősen konzervált szállítófehérje, mely a tiroxin és a trijód-tironin mellett a retinol szállítását végzi a vérben. Ezen kívül proteáz aktivitása

is ismert [135]. A transztiretin talán a prohepcidin szállítását végzi a szérumban. Ugyanakkor az érett hepcidin szállítását a vérben nagy valószínűséggel az alfa-2 makroglobulin végzi [136].

Kísérleteink során a preprohepcidin és néhány intracelluláris fehérje (citokróm P450, ATP/ADP transzlokáz, enoil-KoA hidratáz) között gyenge kapcsolatot találtunk. Ezen fehérjék között szerkezetbeli hasonlóságokat nem találtunk, esetleges szerepük további vizsgálatokat igényel.

A prohepcidinnel kapcsolatba lépő fehérjék közül egy sem mutatott interakciót az érett 25 aminosav hosszúságú hepcidinnel a BacterioMatch szűrés során, ami megerősíti a feltételezést, hogy az A1AT a prohepcidin védelmét látja el a furinnal szemben.

Az érett hepcidinnel erősebb kapcsolatot a CD74 membránfehérje és a ferritin nehézlánc mutatott. A hepcidin-ferritin nehézlánc közötti összefüggést vizsgáló Vanoaica és munkatársai kimutatták, hogy ferritin nehézlánc gén-kiütött egereknél a hepcidin mRNS szintje megemelkedik, és a májban vasfelhalmozódás alakul ki. A hepcidin mediálta vasfelszívódás szabályozás a vékonybélben önmagában nem elegendő a vas homeosztázis fenntartásához, ebben a folyamatban a ferritin nehézlánc alapvető szerepet játszik [137].

A CD74 fehérje szintje gyulladásos bélbetegségekben (IBD), illetve *Helicobacter pylori* fertőzés esetén emelkedik meg bél és a gyomor epiteliális sejteinek felszínén [138]. A CD74 receptorként szolgál a *H. pylori* számára, melynek kapcsolódása következtében gyulladásos folyamatok indulnak be. Darshan és munkacsoportja azt is kimutatta, hogy súlyos vashiány esetén a megemelkedett hepcidin szint mellett az LPS nem tudja a gyulladásos citokinekre és a *HAMP* génre kifejteni a hatását [139].

A CD74 molekula receptorként szolgál az IBD-ben szintén emelkedett szintet mutató monocita migráció inhibitor faktor (MIF) számára. A MIF kötődése következtében nagy mennyiségben termelődnek a proinflammatorikus citokinek: IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF α . Az IL-1, IL-6 valamint TNF α hatására megnövekszik a hepcidin expressziója [138]. Ugyanakkor monociták esetében kimutatták, hogy az emelkedett TNF α szint gátolja az IL-6-on keresztüli hepcidin aktivációt [140].

A hepcidin a ferroportinhoz kötődve gátolja a vas leadását, melynek következtében vashiány alakul ki. De Domenico és munkatársai kimutatták, hogy hepcidin-ferroportin kapcsolat aktiválja a Jak2-t, mely a ferroportin foszforilációján túl a STAT3 foszforilációjában is szerepet játszik. A p-STAT3 a vashiány miatt nem aktiválja

a hepcidin expressziót, viszont növeli a SOCS3 expresszióját. A SOCS3 pedig gátolja a gyulladáshoz vezető citokinek és a hepcidin expresszióját [141].

A vashiány miatt a gyulladáshoz vezető citokinek hatása csökken a hepcidin expresszióra, mivel az anémia erősebb stimulus a szervezet számára, a hepcidin expressziója stagnál, illetve csökkenni kezd. IBD-ben szenvedő betegeknél a szérumban hepcidin szintje alacsonyabb a kontroll csoportéhoz képest [142]. A gyulladás és fertőzés hatására termelődő hepcidin kötődése a CD74 receptorhoz gátolhatja a további gyulladáshoz vezető citokin felszabadulást, ezáltal csökkentve a szervezetben kialakult vashiányt. A CD74-hepcidin interakció feltérképezésére további kísérletekre van szükség.

A *HAMP* gén transzkripcióját számos faktor befolyásolja. Ezek közül a legismertebbek a HFE, Tfr2, HJV, BMP [55]. A szervezet vastelítettsége mellett azonban a gyulladás, a hipoxia és a vérvérvetés is befolyásolja a hepcidin expresszióját [38]. Végül soron a különböző stimulusok összeadódva szabályozzák a szervezet vasháztartását [84]. A hepcidin expressziójáról eddig keveset tudunk. A negatív szabályozásban a matriptáz-2 [70], a GDF15 [76] és a SMAD7 [79] fehérje szerepét vizsgálták.

Az érett hepcidin vasanyagcserét szabályozó mechanizmusait jól ismerjük, ugyanakkor a prekursor prohepcidin sejten belüli és szérumban betöltött funkciójáról kevés információ ismert. Ezért munkacsoportunk a prohepcidin lehetséges funkcióinak vizsgálatát tűzte ki célul.

A prohepcidin sejten belüli elhelyezkedését számos sejtvonalon vizsgálták. Pigeon és munkatársai a GFP-tag-el ellátott emlős prohepcidint a sejtmagból mutatták ki [143], ugyanakkor a GFP-tag jelenléte a peptid N-terminálisán felveti annak a lehetőségét, hogy a prohepcidin nem megfelelően processzálódott, illetve szállítódott a sejtben [144]. Ezt a feltételezést cáfolja meg az a kísérlet, melyben az NLS szekvenciát törölték a prohepcidinből és ezt fúzionáltatták GFP-tag-el. Az így kapott mutáns elsődlegesen a citoplazmában helyezkedett el. Ez az eredmény felveti annak lehetőségét, hogy az NLS szekvencia fontos szerepet tölt be a fehérjében és a peptid nukleáris lokalizációjának biológiai funkciója lehet. Wallace és munkatársai kimutatták indirekt immunfluoreszcencia analízissel, hogy a humán hepcidin HEK293 humán embrionális vese sejtekben főként a Golgi apparátusban helyezkedik el [14]. Immunhisztokémiával humán és tengerimalac májban a prohepcidin a hepatociták bazolaterális membránjában mutattott festődést a portális triádok környezetében [17]. További kísérletekben kimutatták, hogy HepG2 hepatóma sejtekben a hepcidin erőteljes granuláris citoplazmatikus elrendeződést mutatott [145].

Munkahipotézisünk kiindulópontja az volt, ha a prohepcidin rendelkezik NLS szekvenciával, és ténylegesen a sejtmagba irányítódik, akkor a nukleuszban valamilyen szabályozó szerepet tölthet be.

Kísérleteinkhez a WRL68 humán májsejt derivált sejtvonalat választottuk, mely morfológiailag hasonlóságot mutat a hepatocitákkal illetve a primer májsejtkultúrával [146]. Immuncitokémiai vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a prohepcidin a granuláris citoplazmatikus elrendeződés mellett megtalálható a sejtmagban is. Ebből az eredményből kiindulva feltételeztük, hogy a prohepcidinnnek génexpressziót szabályozó funkciója lehet. Először megvizsgáltuk *in silico*, hogy a prohepcidin rendelkezhet-e DNS-kötő motívummal. Ehhez egy olyan SVM-alapú módszert használtunk, mely alkalmas rövid peptidek DNS kötésének jóslására. A program a legmagasabb specificitást adó beállítások mellett is a prohepcidint DNS-kötő fehérjeként írta le.

A prohepcidin DNS-kötő képességének vizsgálatához egy PCR alapú promóter kötési metodikát dolgoztunk ki. A módszer az immunprecipitációt ötvözi egy EMSA-hoz hasonló DNS- fehérje kötési reakcióval. A fehérjéhez kötődött DNS-t ezután PCR technikával mutattuk ki. A kifejlesztett módszerrel kimutattuk, hogy a prohepcidin erősen kötődik a *HAMP* promóterhez, mely felveti annak a lehetőségét, hogy a prohepcidin szabályozó szerepet játszik a saját szintézisében. Hipotézisünk bizonyításához megvizsgáltuk, hogy a változó prohepcidin szint hogyan befolyásolja a *HAMP* promóter aktivitást *in vivo*. A prohepcidin szintjének növekedése illetve csökkenése egyaránt megváltoztatta a promóter aktivitását. A prohepcidin mennyiségét antiszensz technikával csökkentettük WRL68 sejtvonalon, melynek következtében a *HAMP* promóter aktivitása szignifikánsan emelkedett. A prohepcidin overexpressziójának hatására a promóter aktivitása kisebb mértékben, de szignifikánsan csökkent. A kapott eredmények alátámasztják a prohepcidin autoregulációs szerepét.

Munkacsoportunk kimutatta, hogy a szerin proteáz inhibitor A1AT *in vivo* a prohepcidinhez kötődik. Kísérleteink során az A1AT-t használtuk, hogy a sejten belül lecsökkentsük a „szabad” prohepcidin mennyiségét. Az A1AT overexpresszió hatására csökkenő „szabad” prohepcidin szint mellett a *HAMP* promóter aktivitása háromszorosára emelkedett. Ennek megfelelően az A1AT-nel kötött prohepcidin a promóter kötési esszé során nem mutatott kapcsolatot a *HAMP* promóterrel.

Az A1AT overexpressziójának hatására bekövetkező *HAMP* promóter aktivitás-emelkedésnek egyik lehetséges magyarázata, hogy a nagyobb mennyiségben jelen levő A1AT megköti a szabad prohepcidint, melynek következtében a prohepcidin nem képes a

promóterhez kötődni és csökkenteni annak aktivitását. Összefoglalva elmondható, hogy csak a szabad, tehát A1AT által nem kötött prohepcidin képes az autoregulációs hatás kifejtésére a *HAMP* promóteren. Ennek az *in vivo* szabályozási mechanizmus pontos részleteinek a megismeréséhez további vizsgálatokra van szükség. Lehetséges, hogy a májsejtekben a prohepcidin egyedül vagy egy nagyobb fehérje komplex részeként kapcsolódik a saját promóteréhez. A DNS-kötő fehérje komplexben a prohepcidin lehetséges szerepe a kötőhely felismerése, majd kötődése a *HAMP* promóterhez.

A prohepcidinnek, mint szekréciónak a sejtmag nem szokványos célállomás, ugyanakkor ez a jelenség nem példanélküli. Az egyik ilyen fehérje, mely a szekréciónak elött a sejtmagba vándorol, az FGF 2-es izoformája a szaruhártya endotél sejtjeiben [147]. Hasonló működést mutatnak a BMP2, BMP4 és a Gdf5/CDMP1 fehérjék [148]. Mindhárom fehérje a TGF β szupercsaládon belül a csont morfogén fehérjékhez (BMP) tartozik. A csont morfogén fehérjéket eredetileg szekretált növekedési faktorokként írták le. A sejten belüli vándorlásuk azonban hasonlóan történik a hepcidinéhez. Ugyanúgy, mint a hepcidin a BMP2, BMP4 és Gdf5/CDMP1 is inaktív preproteín formában szintetizálódik. Az N-terminális végükön elhelyezkedő szignál szekvencia a szintézisüket követően a durva endoplazmás retikulumba irányítja a fehérjéket, ahol a szignálszekvencia lehasadása után képződött proproteineket a prohormon konvertáz furin elhasítja a konvertáz felismerési helynél. Az így felszabadult C-terminális érett fehérje kerül szekréciónak a sejtből [149-150]. Ezeknek a fehérjéknek a nukleáris variánsait nemrégiben fedezték fel különböző sejtvonalakban [148]. A BMP2, BMP4 és Gdf5/CDMP1 fehérjék nukleáris variánsainál olyan kétrétű NLS szekvenciát találtak, mely átfed a furin proproteín konvertáz felismerési szekvenciájával (BMP2- **KREKRQAKHKQRKRLKS**, BMP4- **RRAKRSPKHHHPQRSRKK**, Gdf5/CDMP1- **RKRRAPLATRQQKRPSK**). A humán prohepcidin PSORTII programmal történő analízise hasonló, a furin felismerési helyét átfedő feltételezett NLS szekvenciát mutatott ki (PMFQRRRR). A nukleáris csont morfogén fehérjék esetében a kutatók egy alternatív start kodont találtak a fehérjék aminosav szekvenciájában a szignál szekvenciától downstream. Ennek ismeretében azt feltételezik, hogy a nukleáris BMP2, BMP4 és Gdf5/CDMP1 fehérjék átíródása ennél az alternatív metioninnál kezdődik, ugyanakkor ennek az aminosav kódznak a mutációja nem eliminálja teljesen a nukleáris variánsok szintézisét. A prohepcidin aminosav szekvenciáját vizsgálva szintén található metionin a szignál szekvenciától C-terminális (downstream) irányban, ami felveti annak a lehetőségét, hogy a prohepcidin az említett csont morfogén fehérjékhez hasonló módon

szintetizálódik. Tehát lehetséges, hogy egy alternatív start kodonnál indul a szintézise a sejtmagban szabályozó szerepet betöltő prohepcidinnek.

A prohepcidin esetében kimutatott autogregulációs funkció is megfigyelhető más fehérjék esetében is. A transzkripciós faktorok között ismertek olyan fehérjék, amelyek represszorként vagy aktivátorként fejtik ki hatásukat saját génjük expressziójára. Ilyen transzkripciós faktorok például a hepatocita nukleáris faktor LFB1/HNF1, mely számos máj specifikus gén szabályozásáért felelős, ugyanakkor negatív feedback mechanizmussal gátolja a saját génjének expresszióját a promóteréhez kötődve [151]. A homeodomén Oct4 embrionális őssejtekben szintén negatív feedback mechanizmussal szabályozza saját génjének kifejeződését [152], míg a Pax6 fehérje, mely a szem és idegrendszer normális fejlődéséért felelős transzkripciós faktor, pozitív feedback mehanizmussal szabályozza a saját kifejeződését [153].

A prohepcidinnél kimutatott negatív autoreguláció lehetőséget ad a hepcidin expresszió szabályozás pontosabb leírására. Bizonyos betegségek esetén pl. IBD, ez a negatív szabályozás is hozzájárulhat, hogy az érett hepcidin szintje a szérumban annak ellenére csökken, hogy a szervezetben krónikus gyulladás alakul ki. A betegség bizonyos stádiumában a megemelkedett hepcidin expresszió hatására kialakult anémia erősebb stimulus lehet a szervezet számára, mint maga a gyulladás, ezért a májsejtekben termelődő prohepcidin negatív feedback mechanizmussal gátolhatja a további hepcidin átíródást, ezáltal csökkenti a hepcidin szekréción.

Az eredményeink alátámasztják, hogy az A1AT nemcsak a hepcidin érési folyamatában játszhat fontos szerepet, hanem a *HAMP* gén expressziójában is. Az A1AT a szabad prohepcidin mennyiségének szabályozásával, hatással van a *HAMP* gén kifejeződésére, ugyanakkor ennek a molekuláris mechanizmusa még tisztázásra vár. További kísérletek szükségesek ahhoz, hogy megértsük az összefüggést az A1AT, a proprotein konvertázok, és a prohepcidin autoregulációs funkciója között, valamint feltárjuk a *HAMP* gén expresszióját befolyásoló komplex molekuláris mechanizmusokat.

6. Összefoglalás

A vasanyagcsere szabályozásában kulcsfontosságú hepcidin és a vele bizonyítottan interakcióba lépő fehérjék közül eddig csak a receptorát a ferroportint ismertük. A ferroportin internalizációjának mechanizmusa jól ismert ugyanakkor ebben a folyamatban a hepcidinben található diszulfid-hidak alapvető szerepet játszhatnak. Kimutattak olyan hepcidin mutációt, mely diszulfid-hidat érint, következményeként pedig juvenilis hemokromatózis alakult ki. Kísérleteink során vizsgáltuk a hepcidinben lévő egyes diszulfid-hidak szerepét a ferroportinhoz való kötődésben és internalizációs hatásában:

- Igazoltuk, hogy az első diszulfid-híd alapvető jelentőségű a ferroportinnal való kapcsolat kialakításában.
- Kimutattuk, hogy a hepcidin receptorának internalizációjához mind a négy diszulfid-híd szükséges, egyetlen cisztein szubsztitúciója a hepcidin biológiai aktivitásának megszűnését eredményezi.

Az eredmények ismeretében valószínűsíthetjük, hogy a természetben előforduló, az érett hepcidin ciszteinjeit érintő mutációk esetén (C70R, C78T) a hormon ugyan képes kötődni a receptorához, de annak internalizációját a hibás térszerkezete miatt nem tudja kiváltani.

További hipotézisünk szerint, a vasanyagcsere és a hepcidin működésének szabályozásában a ferroportinon kívül más fehérjék is aktívan részt vehetnek, ezért munkacsoportunk az érett hepcidin valamint a pre- és prohormon potenciális kötőpartnereinek kimutatását tűzte ki célul:

- BacterioMatch Two-Hybrid rendszerrel kimutattuk, hogy a preprohepcidin és a prohepcidin erős kötődést mutat az alfa-1 antitripszin szerin proteáz gátló fehérjével.
- Kimutattuk, hogy a preprohepcidin interakcióba lép az alfa-1 savi glikoprotein akut fázis fehérjével, valamint a transztiretin (prealbumin) tiroid kötő szállítófehérjével.
- Kimutattuk, hogy az A1AT mRNS expressziója párhuzamosan változik a hepcidin mRNS szintjének csökkenésével, illetve emelkedésével.

- Bizonyítottuk *in vivo* (crosslinking) és *in vitro* (glutation S-transzferáz kötési esszé) módszerekkel, hogy az A1AT specifikusan kötődik a preprohepcidinhez a májsejtekben.
- Kimutattuk, hogy a prohepcidin specifikusan kötődik az A1AT-hez a szérumban (ELISA, koimmunprecipitáció, szérum ultrafiltrációs esszé, MALDI TOF).
- Kimutattuk, hogy a hepcidin erős kötődést mutat a ferritin nehéz láncsal, illetve a CD74 molekulával.

Vizsgálataink során bebizonyítottuk, hogy az A1AT szerin proteáz inhibitor specifikusan kötődik a preprohepcidinhez Huh7 hepatóma sejtekben. Az A1AT szerepet játszhat a preprohepcidin érési folyamatában, a preprohepcidinhez kötődve gátolhatja a prohormon konvertáz, a furin hasítását, ezáltal gátolja, hogy a prohepcidin érett hepcidinné alakuljon. Ez megmagyarázhatja, hogy a prohormon miért van jelen a keringésben. Ugyanakkor kimutattuk, hogy az A1AT a szérumban is képes a prohepcidinhez kötődni. Ez az eredmény felveti annak a lehetőségét, hogy prohepcidin-hepcidin átalakulás a szervezet hepcidin igényének megfelelően a plazmában is végbemegy, ezáltal gyorsabb szabályozást tesz lehetővé.

A hepcidin prekursorának a prohepcidinnek szerepéről kevés információ ismert, ezért munkacsoportunk a továbbiakban a prohepcidin sejten belüli elhelyezkedésével és funkciójának vizsgálatával foglalkozott. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a GFP tag-el fuzionáltatott prohepcidint a sejtmagból mutatták ki humán oszteosarkoma U2O-S sejtvonalon [143]. HEK293 embrionális vesesejtekben a Golgi készülékben írták le [14], HepG2 hepatóma sejtvonalban pedig granuláris citoplazmatikus elhelyezkedést figyeltek meg [145]. Hipotézisünk kiindulópontja az volt, hogy ha a prohepcidin a sejtmagba lokalizálódik, akkor szerepet játszhat génexpresszió szabályozásban:

- Kimutattuk, hogy a prohepcidin a granuláris citoplazmatikus elhelyezkedés mellett a sejtmagban is megtalálható WRL68 hepatocita sejtvonalban.
- SVM-alapú algoritmussal kimutattuk, hogy a prohepcidin rendelkezik DNS-kötő motívummal.
- Igazoltuk, az általunk kidolgozott PCR alapú promóter kötési módszerrel, valamint kromatin immunprecipitációval, hogy a prohepcidin kötődik a saját promóteréhez (*HAMP*).

- Kimutattuk, hogy a prohepcidin önmagában, más nukleáris DNS-kötő fehérjék nélkül is képes a *HAMP* promóterhez kötődni.
- Kimutattuk, hogy a prohepcidin képes szabályozni a saját génjének expresszióját.
- Igazoltuk, hogy az A1AT szintjének változása befolyásolja a *HAMP* gén expresszióját.
- Bizonyítottuk, hogy az A1AT-nel kötődő prohepcidin nem képes a *HAMP* promóterhez kötődni, ezáltal szabályozó hatást kifejteni.

Vizsgálataink során tehát kimutattuk, hogy a prohepcidin megtalálható a májsejtek sejtmagjában, ahol a saját génjéhez, a *HAMP* gén promóteréhez kötődve negatívan szabályozza a gén expresszióját. Ezzel a hepcidin expresszió szabályozásának egy új módját írtuk le, mely hozzájárul a hepcidin kifejeződés több komponensű szabályozásának pontosabb megértéséhez.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Sipos Katalinnak munkám során nyújtott szakmai és emberi támogatásáért. Köszönöm Dr. Kovács L. Gábor professzor úrnak és Dr. Miseta Attila professzor úrnak segítőkész támogatásukat, valamint a Laboratóriumi Medicina Intézet, az Igazságügyi Orvostani Intézet és a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet valamennyi munkatársának hasznos tanácsaikat és segítségüket. Külön köszönettel tartozom dr. Fekete Zsuzsannának szakmai segítségéért és tanácsaiért. Köszönettel tartozom Dr. Polgár Beátának türelméért és az értekezés elkészítésében nyújtott segítségéért. Végezetül szeretném megköszönni családomnak a támogatásukat.

8. Irodalomjegyzék

1. Anderson, G.J., D.M. Frazer, and G.D. McLaren, *Iron absorption and metabolism*. Curr Opin Gastroenterol, 2009. **25**: p. 129-35.
2. Kaplan, J., D.M. Ward, and I. De Domenico, *The molecular basis of iron overload disorders and iron-linked anemias*. Int J Hematol, 2011. **93**: p. 14-20.
3. Dunn, L.L., Y.S. Rahmanto, and D.R. Richardson, *Iron uptake and metabolism in the new millennium*. Trends Cell Biol, 2007. **17**: p. 93-100.
4. Theil, E.C. and D.J. Goss, *Living with iron (and oxygen): questions and answers about iron homeostasis*. Chem Rev, 2009. **109**: p. 4568-79.
5. Hentze, M.W., M.U. Muckenthaler, and N.C. Andrews, *Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism*. Cell, 2004. **117**: p. 285-97.
6. Ganz, T. and E. Nemeth, *Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1763**: p. 690-9.
7. Kemna, E.H.J.M., et al., *Hepcidin: from discovery to differential diagnosis*. Haematologica, 2008. **93**: p. 90-7.
8. Iolascon, A. and L. De Falco, *Mutations in the gene encoding DMT1: clinical presentation and treatment*. Semin Hematol, 2009. **46**: p. 358-70.
9. Beaumont, C. and C. Delaby, *Recycling iron in normal and pathological states*. Semin Hematol, 2009. **46**: p. 328-38.
10. Mariani, R., P. Trombini, M. Pozzi, et al., *Iron Metabolism in Thalassemia and Sickle Cell Disease*. Medit J Hemat Infect Dis, 2009. **1**: p. e2009006.
11. Krause, A., S. Neitz, H.J. Magert, et al., *LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity*. FEBS Lett, 2000. **480**: p. 147-50.
12. Park, C.H., E.V. Valore, A.J. Waring, et al., *Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver*. J Biol Chem, 2001. **276**: p. 7806-10.
13. Nicolas, G., L. Viatte, M. Bennoun, et al., *Hepcidin, a new iron regulatory peptide*. Blood Cells Mol Dis, 2002. **29**: p. 327-35.
14. Wallace, D.F., L. Summerville, P.E. Lusby, et al., *Prohepcidin localises to the Golgi compartment and secretory pathway in hepatocytes*. J Hepatol, 2005. **43**: p. 720-8.
15. Valore, E.V. and T. Ganz, *Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin*. Blood Cells Mol Dis, 2008. **40**: p. 132-8.

16. Schranz, M., R. Bakry, M. Creus, et al., *Activation and inactivation of the iron hormone hepcidin: Biochemical characterization of prohepcidin cleavage and sequential degradation to N-terminally truncated hepcidin isoforms*. Blood Cells Mol Dis, 2009. **43**: p. 169-79.
17. Kulaksiz, H., S.G. Gehrke, A. Janetzko, et al., *Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia*. Gut, 2004. **53**: p. 735-43.
18. Lauth, X., J.J. Babon, J.A. Stannard, et al., *Bass hepcidin synthesis, solution structure, antimicrobial activities and synergism, and in vivo hepatic response to bacterial infections*. J Biol Chem, 2005. **280**: p. 9272-82.
19. Hunter, H.N., D.B. Fulton, T. Ganz, et al., *The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis*. J Biol Chem, 2002. **277**: p. 37597-603.
20. Nemeth, E., G.C. Preza, C.L. Jung, et al., *The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study*. Blood, 2006. **107**: p. 328-33.
21. Jordan, J.B., L. Poppe, M. Haniu, et al., *Hepcidin revisited, disulfide connectivity, dynamics, and structure*. J Biol Chem, 2009. **284**: p. 24155-67.
22. Aschi, M., A. Bozzi, R. Di Bartoomeo, et al., *The role of disulfide bonds and N-terminus in the structural properties of hepcidins: insights from molecular dynamics simulations*. Biopolymers, 2010. **93**: p. 917-26.
23. Schibli, D.J., H.N Hunter, V. Aseyev, et al., *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, 2002. **277**: p. 8279-89.
24. Shike, H., C. Schimizu, X. Lauth, et al., *Organization and expression analysis of the zebrafish hepcidin gene, an antimicrobial peptide gene conserved among vertebrates*. Dev Comp Immunol, 2004. **28**: p. 747-54.
25. Mena, N.P., A. Esparza, V. Tapia, et al., *Hepcidin inhibits apical iron uptake in intestinal cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. **294**: p. G192-8.
26. Zhang, A.S. and C.A. Enns, *Molecular mechanisms of normal iron homeostasis*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: p. 207-14.
27. De Domenico, I., E. Nemeth, J.M. Nelson, et al., *The hepcidin-binding site on ferroportin is evolutionarily conserved*. Cell Metab, 2008. **8**: p. 146-56.
28. Donovan, A., C.A. Lima, J.L. Pinkus, et al., *The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis*. Cell Metab, 2005. **1**: p. 191-200.
29. Nemeth, E., M.S. Tuttle, J. Powelson, et al., *Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization*. Science, 2004. **306**: p. 2090-3.
30. De Domenico, I., D.M. Ward, C. Langelier, et al., *The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation*. Mol Biol Cell, 2007. **18**: p. 2569-78.

31. Auriac, A., A. Willemetz, and F. Canonne-Hergaux, *Lipid raft-dependent endocytosis: a new route for hepcidin-mediated regulation of ferroportin in macrophages*. *Haematologica*, 2010. **95**: p. 1269-77.
32. De Domenico, I., E. Lo, D.M. Ward, et al., *Hepcidin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**: p. 3800-5.
33. Rice, A.E., M.J. Mendez, C.A. Hokanson, et al., *Investigation of the biophysical and cell biological properties of ferroportin, a multipass integral membrane protein iron exporter*. *J Mol Biol*, 2009. **386**: p. 717-32.
34. De Domenico, I., D.M. Ward, G. Musci, et al., *Iron overload due to mutations in ferroportin*. *Haematologica*, 2006. **91**: p. 92-5.
35. Liu, X.B., F. Yang, and D.J. Haile, *Functional consequences of ferroportin 1 mutations*. *Blood Cells Mol Dis*, 2005. **35**: p. 33-46.
36. De Domenico, I., D.M. Ward, G. Musci, et al., *Evidence for the multimeric structure of ferroportin*. *Blood*, 2007. **109**: p. 2205-9.
37. Oates, P.S., *The role of hepcidin and ferroportin in iron absorption*. *Histol Histopathol*, 2007. **22**: p. 791-804.
38. Nicolas, G., C. Chauvet, L. Viatte, et al., *The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation*. *J Clin Invest*, 2002. **110**: p. 1037-44.
39. Leong, W.I. and B. Lönnnerdal, *Hepcidin, the recently identified peptide that appears to regulate iron absorption*. *J Nutr*, 2004. **134**: p. 1-4.
40. Ganz, T., *Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation*. *Blood*, 2003. **102**: p. 783-8.
41. Melino, S., L. Garlando, M. Patamia, et al., *A metal-binding site is present in the amino terminal region of the bioactive iron regulator hepcidin-25*. *J Pept Res*, 2005. **66 Suppl 1**: p. 65-71.
42. Tselepis, C., S.J. Ford, A.T. McKie, et al., *Characterization of the transition-metal-binding properties of hepcidin*. *Biochem J*, 2010. **427**: p. 289-96.
43. Farnaud, S., A. Patel, and R.W. Evans, *Modelling of a metal-containing hepcidin*. *Biometals*, 2006. **19**: p. 527-33.
44. Farnaud, S., C. Rapisarda, T. Bui, et al., *Identification of an iron-hepcidin complex*. *Biochem J*, 2008. **413**: p. 553-7.
45. Truksa, J., P. Lee, H. Peng, et al., *The distal location of the iron responsive region of the hepcidin promoter*. *Blood*, 2007. **110**: p. 3436-7.
46. Balesaria, S., B. Ramesh, H. McArdle, et al., *Divalent metal-dependent regulation of hepcidin expression by MTF-1*. *FEBS Lett*, 2010. **584**: p. 719-25.

47. Darshan, D. and G.J. Anderson, *Interacting signals in the control of hepcidin expression*. *Biometals*, 2009. **22**: p. 77-87.
48. Johnson, M.B. and C.A. Enns, *Diferic transferrin regulates transferrin receptor 2 protein stability*. *Blood*, 2004. **104**: p. 4287-93.
49. Lin, L., E.V. Valore, E. Nemeth, et al., *Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4*. *Blood*, 2007. **110**: p. 2182-9.
50. Goswami, T. and N.C. Andrews, *Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing*. *J Biol Chem*, 2006. **281**: p. 28494-8.
51. Giannetti, A.M. and P.J. Björkman, *HFE and transferrin directly compete for transferrin receptor in solution and at the cell surface*. *J Biol Chem*, 2004. **279**: p. 25866-75.
52. Schmidt, P.J., F.W. Huang and D.M. Wrighting, *Hepcidin expression is regulated by a complex of haemochromatosis-associated proteins*. *ASH Annu Meeting Abstr* , 2006. **108**: p. 267.
53. Poli, M., S. Luscietti, V. Gandidni, et al., *Transferrin receptor 2 and HFE regulate furin expression via mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/Erk) signaling. Implications for transferrin-dependent hepcidin regulation*. *Haematologica*, 2010. **95**: p. 1832-40.
54. Forejtniková, H., M. Vieillevoys, Y. Zermati, et al., *Transferrin receptor 2 is a component of the erythropoietin receptor complex and is required for efficient erythropoiesis*. *Blood*, 2010. **116**: p. 5357-67.
55. Viatte, L. and S. Vaulont, *Hepcidin, the iron watcher*. *Biochimie*, 2009. **91**: p. 1223-8.
56. Xiao, Y.T., L.X. Xiang, and J.Z. Shao, *Bone morphogenetic protein*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **362**: p. 550-3.
57. Truksa, J., H. Peng, P. Lee, et al., *Bone morphogenetic proteins 2, 4, and 9 stimulate murine hepcidin 1 expression independently of Hfe, transferrin receptor 2 (Tfr2), and IL-6*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**: p. 10289-93.
58. Babitt, J.L., F.W. Huang, Y. Xia, et al., *Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance*. *J Clin Invest*, 2007. **117**: p. 1933-9.
59. Babitt, J.L., F.W. Huang, D.M. Wrighting, et al., *Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression*. *Nat Genet*, 2006. **38**: p. 531-9.
60. Andriopoulos, B., Jr., E. Corradini, Y. Xia, et al., *BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism*. *Nat Genet*, 2009. **41**: p. 482-7.
61. Malyszko, J., *Hemojuvelin: the hepcidin story continues*. *Kidney Blood Press Res*, 2009. **32**: p. 71-6.
62. Silvestri, L., A. Pagani, and C. Camaschella, *Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis*. *Blood*, 2008. **111**: p. 924-31.

63. Lin, L., Y.P. Goldberg, and T. Ganz, *Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin*. *Blood*, 2005. **106**: p. 2884-9.
64. Niederkofler, V., R. Salie, and S. Arber, *Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload*. *J Clin Invest*, 2005. **115**: p. 2180-6.
65. Lee, P.L., E. Beutler, S.V. Sao, et al., *Genetic abnormalities and juvenile hemochromatosis: mutations of the HJV gene encoding hemojuvelin*. *Blood*, 2004. **103**: p. 4669-71.
66. Lee, D.H., L.J. Zhou, J.X. Xie, et al., *Neogenin inhibits HJV secretion and regulates BMP-induced hepcidin expression and iron homeostasis*. *Blood*, 2010. **115**: p. 3136-45.
67. Zhang, A.S., F. Yang, J. Wang, et al., *Hemojuvelin-neogenin interaction is required for bone morphogenic protein-4-induced hepcidin expression*. *J Biol Chem*, 2009. **284**: p. 22580-9.
68. Knutson, M.D., *Into the matrix: regulation of the iron regulatory hormone hepcidin by matriptase-2*. *Nutr Rev*, 2009. **67**: p. 284-8.
69. Du, X., E. She, T. Gelbart, et al., *The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency*. *Science* (80-), 2008. **320**: p. 1088-92.
70. Finberg, K.E., R.L. Whittlesey, M.D. Fleming, et al., *Down-regulation of Bmp/Smad signaling by Tmprss6 is required for maintenance of systemic iron homeostasis*. *Blood*, 2010. **115**: p. 3817-26.
71. Melis, M.A., M. Cau, R. Congiu, et al., *A mutation in the TMPRSS6 gene, encoding a transmembrane serine protease that suppresses hepcidin production, in familial iron deficiency anemia refractory to oral iron*. *Haematologica*, 2008. **93**: p. 1473-9.
72. Lee, P., *Role of matriptase-2 (TMPRSS6) in iron metabolism*. *Acta Haematol*, 2009. **122**: p. 87-96.
73. Finberg, K.E., *Iron-refractory iron deficiency anemia*. *Semin Hematol*, 2009. **46**: p. 378-86.
74. Tanno, T., P. Porayette, O. Sripichai, et al., *Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells*. *Blood*, 2009. **114**: p. 181-6.
75. Tanno, T., N.V. Bhanu, P.A. Oneal, et al., *High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin*. *Nat Med*, 2007. **13**: p. 1096-101.
76. Lakhali, S., N.P. Talbot, A. Crosby, et al., *Regulation of growth differentiation factor 15 expression by intracellular iron*. *Blood*, 2009. **113**: p. 1555-63.
77. Murakami, G., T. Watabe, K. Takaoka, et al., *Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads*. *Mol Biol Cell*, 2003. **14**: p. 2809-17.
78. Yan, X., Z. Liu, and Y. Chen, *Regulation of TGF-beta signaling by Smad7*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2009. **41**: p. 263-72.
79. Mleczo-Sanecka, K., G. Casanovas, A. Ragab, et al., *SMAD7 controls iron metabolism as a potent inhibitor of hepcidin expression*. *Blood*, 2010. **115**: p. 2657-65.

80. Kearney, S.L., E. Nemeth, E.J. Neufeld, et al., *Urinary hepcidin in congenital chronic anemias*. *Pediatr Blood Cancer*, 2007. **48**: p. 57-63.
81. Pinto, J.P., S. Ribeiro, H. Pontes, et al., *Erythropoietin mediates hepcidin expression in hepatocytes through EPOR signaling and regulation of C/EBPalpha*. *Blood*, 2008. **111**: p. 5727-33.
82. Camberlein, E., G. Zanninelli, L. Détiavaud, et al., *Anemia in beta-thalassemia patients targets hepatic hepcidin transcript levels independently of iron metabolism genes controlling hepcidin expression*. *Haematologica*, 2008. **93**: p. 111-5.
83. Origa, R., R. Galanello, T. Ganz, et al., *Liver iron concentrations and urinary hepcidin in beta-thalassemia*. *Haematologica*, 2007. **92**: p. 583-8.
84. Huang, H., M. Constante, A. Layoun, et al., *Contribution of STAT3 and SMAD4 pathways to the regulation of hepcidin by opposing stimuli*. *Blood*, 2009. **113**: p. 3593-9.
85. Ramos, P., E. Guy, N. Chen, C.C. Proenca, et al., *Enhanced erythropoiesis in Hfe-KO mice indicates a role for Hfe in the modulation of erythroid iron homeostasis*. *Blood*, 2011. **117**: p. 1379-89.
86. Peyssonnaud, C., A.S. Zinkernagel, R.A. Schuepbach, et al., *Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs)*. *J Clin Invest*, 2007. **117**: p. 1926-32.
87. Volke, M., D.P. Gale, U. Maegdefrau, et al., *Evidence for a lack of a direct transcriptional suppression of the iron regulatory peptide hepcidin by hypoxia-inducible factors*. *PLoS ONE*, 2009. **4**: p. e7875.
88. Choi, S.O., Y.S. Cho, H.L. Kim, et al., *ROS mediate the hypoxic repression of the hepcidin gene by inhibiting C/EBPalpha and STAT-3*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **356**: p. 312-7.
89. Chaston, T.B., P. Matak, K. Pourvali, et al., *Hypoxia inhibits hepcidin expression in HuH7 hepatoma cells via decreased SMAD4 signaling*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011. **300**: p. 888-95.
90. Lakhal, S., J. Schoedel, A.R. Townsend, et al., *Regulation of Type II Transmembrane Serine Proteinase TMPRSS6 by Hypoxia-inducible Factors: New link between hypoxia signaling and iron homeostasis*. *J Biol Chem*, 2011. **286**: p. 4090-7.
91. Sakamori, R., T. Takehara, T. Tatsumi, et al., *STAT3 signaling within hepatocytes is required for anemia of inflammation in vivo*. *J Gastroenterol*, 2010. **45**: p. 244-8.
92. Nemeth, E., E.V. Valore, M. Territo, et al., *Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein*. *Blood*, 2003. **101**: p. 2461-3.
93. Wrighting, D.M. and N.C. Andrews, *Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3*. *Blood*, 2006. **108**: p. 3204-9.
94. Verga Falzacappa, M.V., S.M. Vujic, R. Kessler, et al., *STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation*. *Blood*, 2007. **109**: p. 353-8.
95. Fleming, R.E., *Hepcidin activation during inflammation: make it STAT*. *Gastroenterology*, 2007. **132**: p. 447-9.

96. Tacchini, L., E. Gammella, C. De Ponti, et al., *Role of HIF-1 and NF-kappaB transcription factors in the modulation of transferrin receptor by inflammatory and anti-inflammatory signals*. J Biol Chem, 2008. **283**: p. 20674-86.
97. Inamura, J., K. Ikuta, J. Jimbo, et al., *Upregulation of hepcidin by interleukin-1beta in human hepatoma cell lines*. Hepatol Res, 2005. **33**: p. 198-205.
98. Laftah, A.H., N. Sharma, M.J. Brookes, et al., *Tumour necrosis factor alpha causes hypoferraemia and reduced intestinal iron absorption in mice*. Biochem J, 2006. **397**: p. 61-7.
99. Constante, M., W. Jiang, D. Wang, et al., *Repression of repulsive guidance molecule C during inflammation is independent of Hfe and involves tumor necrosis factor-alpha*. Am J Pathol, 2007. **170**: p. 497-504.
100. Ganz, T. and E. Nemeth, *Iron sequestration and anemia of inflammation*. Semin Hematol, 2009. **46**: p. 387-93.
101. Weiss, G., *Iron metabolism in the anemia of chronic disease*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**: p. 682-93.
102. Wallace, D.F. and V.N. Subramaniam, *Co-factors in liver disease: the role of HFE-related hereditary hemochromatosis and iron*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**: p. 663-70.
103. Wallace, D.F. and V.N. Subramaniam, *Non-HFE haemochromatosis*. World J Gastroenterol, 2007. **13**: p. 4690-8.
104. Fix, O.K. and K.V. Kowdley, *Hereditary hemochromatosis*. Minerva Med, 2008. **99**: p. 605-17.
105. Roetto, A., G. Papanikolaou, M. Politou, et al., *Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis*. Nat Genet, 2003. **33**: p. 21-2.
106. Roetto, A., F. Daraio, F. Alberti, et al., *Hemochromatosis due to mutations in transferrin receptor 2*. Blood Cells Mol Dis, 2002. **29**: p. 465-70.
107. Dove, S.L., J.K. Joung, and A. Hochschild, *Activation of prokaryotic transcription through arbitrary protein-protein contacts*. Nature, 1997. **386**: p. 627-30.
108. Dove, S.L. and A. Hochschild, *Conversion of the omega subunit of Escherichia coli RNA polymerase into a transcriptional activator or an activation target*. Genes Dev, 1998. **12**: p. 745-54.
109. Setalo, G. Jr., M. Singh, I. S. Nethrapalli, et al., *Protein kinase C activity is necessary for estrogen-induced Erk phosphorylation in neocortical explants*. Neurochem Res, 2005. **30**: p. 779-90.
110. Kumar, M., M.M. Gromiha, and G.P.S. Raghava, *Identification of DNA-binding proteins using support vector machines and evolutionary profiles*. BMC Bioinformatics, 2007. **8**: p. 463.
111. Carey, FM, L.C. Peterson, and T.S. Tale, *Chromatin immunoprecipitation*. Cold Spring Harb Protoc , 2009. doi: 10.1101/pdb.prot.5279.
112. Verga Falzacappa, M.V. and M.U. Muckenthaler, *Hepcidin: iron-hormone and anti-microbial peptide*. Gene, 2005. **364**: p. 37-44.

113. Collins, H.L., *Withholding iron as a cellular defence mechanism--friend or foe?* Eur J Immunol, 2008. **38**: p. 1803-6.
114. Paradkar, P.N., D.I. De, N. Durchfort, et al., *Iron depletion limits intracellular bacterial growth in macrophages.* Blood, 2008. **112**: p. 866-74.
115. Weinberg, E.D., *Iron availability and infection.* Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**: p. 600-5.
116. Roetto, A., F.Daraio, P. Porporato, et al., *Screening hepcidin for mutations in juvenile hemochromatosis: identification of a new mutation (C70R).* Blood, 2004. **103**: p. 2407-9.
117. Delatycki, M.B., K.J. Allen, P. Gow, et al., *A homozygous HAMP mutation in a multiply consanguineous family with pseudo-dominant juvenile hemochromatosis.* Clin Genet, 2004. **65**: p. 378-83.
118. Biasiotto, G., F. Daraio, and G. Cavallero, *Homozygous or compound heterozygous R59G mutation of hepcidin gene in patients with adult-onset hemochromatosis.* Bioiron 2005 Abstracts, 2005. P139.
119. Gardenghi, S., P. Ramos, M.F. Marongiu, et al., *Hepcidin as a therapeutic tool to limit iron overload and improve anemia in β -thalassemic mice.* J Clin Invest, 2010. **120**: p. 4466-77.
120. Fregonese, L. and J. Stolk, *Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences.* Orphanet J Rare Dis, 2008. **3**: p. 16.
121. Knaupp, A.S. and S.P. Bottomley, *Serpin polymerization and its role in disease--the molecular basis of alpha-1-antitrypsin deficiency.* IUBMB Life, 2009. **61**: p. 1-5.
122. Fink, S. and M.L. Schilsky, *Inherited metabolic disease of the liver.* Curr Opin Gastroenterol, 2007. **23**: p. 237-43.
123. Gagliardo, B., N. Kubat, A. Faye, et al., *Pro-hepcidin is unable to degrade the iron exporter ferroportin unless matured by a furin-dependent process.* J Hepatol, 2009. **50**: p. 394-401.
124. Bergamaschi, G. and L. Villani, *Serum hepcidin: a novel diagnostic tool in disorders of iron metabolism.* Haematologica, 2009. **94**: p. 1631-3.
125. Kaneko, Y., H. Miyajima, A. Piperno, et al., *Measurement of serum hepcidin-25 levels as a potential test for diagnosing hemochromatosis and related disorders.* J Gastroenterol, 2010. **45**: p. 1163-71.
126. Thomas, C., U. Kobold, S. Balan, et al., *Serum hepcidin-25 may replace the ferritin index in the Thomas plot in assessing iron status in anemic patients.* Int J Lab Hematol, 2010. **33**: p. 187-93.
127. Constante, M., W. Jiang, D. Wang, et al., *Distinct requirements for Hfe in basal and induced hepcidin levels in iron overload and inflammation.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **291**: p. G229-37.
128. Kemna, E.H., A.E. Karikasari, L.J. van Tits, et al., *Regulation of hepcidin: insights from biochemical analyses on human serum samples.* Blood Cells Mol Dis, 2008. **40**: p. 339-46.

129. Kartikasari, A.E.R., R. Roelofs, R.M. Schaeps, et al., *Secretion of bioactive hepcidin-25 by liver cells correlates with its gene transcription and points towards synergism between iron and inflammation signaling pathways*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1784**: p. 2029-37.
130. Israili, Z.H. and P.G. Dayton, *Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs*. *Drug Metab Rev*, 2001. **33**: p. 161-235.
131. Zsila, F., *Chaperone-like activity of the acute-phase component human serum alpha 1-acid glycoprotein: inhibition of thermal- and chemical-induced aggregation of various proteins*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010. **20**: p. 1205-9.
132. Hocheppied, T., F.G. Berger, H. Baumann, et al., *Alpha(1)-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003. **14**: p. 25-34.
133. Mondal, G., U. Chatterjee, H.R. Das, et al., *Enhanced expression of alpha-1-acid glycoprotein and fucosylation in hepatitis B patients provides an insight into pathogenesis*. *Glycoconj J*. *Glycoconj J*, 2009. **26**: p. 1226-34.
134. Ayoya, M.A., M.G. Spiekermann-Brouwer, J.R. Stoltzfus, et al., *Alpha 1-acid glycoprotein, hepcidin, C-reactive protein, and serum ferritin are correlated in anemic schoolchildren with Schistosoma haematobium*. *Am J Clin Nutr*, 2010. **91**: p. 1784-90.
135. Prapunpoj, P. and L. Leelawatwattana, *Evolutionary changes to transthyretin: structure-function Relationships*. *FEBS J*, 2009. **276**: p. 5330-41.
136. Peslova, G., J. Petrak, K. Kuzelova, et al., *Hepcidin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to alpha-2-macroglobulin in blood*. *Blood*, 2009. **113**: p. 6225-36.
137. Vanoaica, L., D. Darshan, L. Richman, et al., *Intestinal ferritin H is required for an accurate control of iron absorption*. *Cell Metab*, 2010. **12**: p. 273-82.
138. Beswick, E.J. and V.E. Reyes, *CD74 in antigen presentation, inflammation, and cancers of the gastrointestinal tract*. *World J Gastroenterol*, 2009. **15**: p. 2855-61.
139. Darshan, D., M.D. Frazer, J.S. Wilkins, et al., *Severe iron deficiency blunts the response of the iron regulatory gene Hmp and pro-inflammatory cytokines to lipopolysaccharide*. *Haematologica*, 2010. **95**: p. 1660-7.
140. Zhang, X. and B.H. Rovin, *Hepcidin expression by human monocytes in response to adhesion and pro-inflammatory cytokines*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1800**: p. 1262-7.
141. De Domenico, I., Y.T. Zhang, L.C. Koenig, et al., *Hepcidin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine-induced inflammatory responses in mice*. *J Clin Invest*, 2010. **120**: p. 2395-405.
142. Arnold, J., A. Sangwaiya, B. Bhatkal, et al., *Hepcidin and inflammatory bowel disease: dual role in host defence and iron homeostasis*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2009. **21**: p. 425-9.

143. Pigeon, C., G. Ilyin, B. Courselaud, et al., *A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload.* J Biol Chem, 2001. **276**: p. 7811-9.
144. Wallace, D.F., M.D. Jones, P. Pedersen, et al., *Purification and partial characterisation of recombinant human hepcidin.* Biochimie, 2006. **88**: p. 31-7.
145. Fein, E., U. Merle, R. Eehalt, et al., *Regulation of hepcidin in HepG2 and RINm5F cells.* Peptides, 2007. **28**: p. 951-7.
146. Gutiérrez-Ruiz, M.C., L. Bucio, V. Souza, et al., *Expression of some hepatocyte-like functional properties of WRL-68 cells in culture.* In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1994. **30A**: p. 366-71.
147. Choi, J., M.K. Ko, and E.P. Kay, *Subcellular localization of the expressed 18 kDa FGF-2 isoform in corneal endothelial cells.* Mol Vis, 2000. **6**: p. 222-31.
148. Felin, J.E., J.L. Mayo, T.J. Loos, et al., *Nuclear variants of bone morphogenetic proteins.* BMC Cell Biol, 2010. **11**: p. 20.
149. Constam, D.B. and E.J. Robertson, *Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases.* J Cell Biol, 1999. **144**: p. 139-49.
150. Chen, D., M. Zhao, S.E. Harris, et al., *Signal transduction and biological functions of bone morphogenetic proteins.* Front Biosci, 2004. **9**: p. 349-58.
151. Piaggio, G., L. Tomei, C. Toniatti, et al., *LFBI/HNF1 acts as a repressor of its own transcription.* Nucleic Acids Res, 1994. **22**: p. 4284-90.
152. Pan G, J. Li, Y. Zhou, et al., *A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal.* FASEB J, 2006. **20**: p. 1730-32.
153. Pinson J, T.I. Simpson, J.O. Mason, et al., *Positive autoregulation of the transcription factor Pax6 in response to increased levels of either of its major isoforms, Pax6 or Pax6(5a), in cultured cells.* BMC Dev Biol, 2006. **6**: p. 25.

9. Tudományos közlemények jegyzéke

9.1. A disszertáció alapját alkotó közlemények

1. **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
2. **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 WRL68 cell line
2011. Biochimie. Elbírálás alatt.
3. **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. Peptides. Elbírálás alatt.

9.2. Témához kapcsolódó egyéb tudományos közlemények

1. 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 1,729
2. 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.

9.3. Referált folyóiratban megjelent absztraktok

1. **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
2. 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: 424. IF 3,14
3. 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 Vol. 275. s1 p 127. IF 3,14

9.4. Témához kapcsolódó kongresszusi poszterek

1. **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.
2. **Pandur E.**; Nagy J.; Szabó A.; Montskó G.; Peti M. A.; Sipos K.: Ferroportin egy hepcidin hormon által szabályozott vas transzporter- **Előadásra kiválasztott poszter**
36. Membrán-Transzport konferencia Sümeg máj. 23-26. 2006.
3. **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 Pécs aug. 30- szept. 2. 2006.
4. **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.
5. 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.
6. **Pandur E.**; Nagy J.; Poór V. S.; Sipos K.: C/EBP alfa és SMAD4 transzkripciós faktorok szerepe a vasanyagcsere szabályozásában WRL68 sejtenyészetben
XVI. Nemzetközi Semmelweis Szimpózium és VI. Magyar Sejtanalitikai Konferencia Budapest nov. 15-17. 2007.
7. Poór V. S.; **Pandur E.**; Nagy J.; Sipos K.: A hepcidin és ferroportin expressziójának változása CaCo₂, WRL és HepG2 sejtekben
XVI. Nemzetközi Semmelweis Szimpózium és VI. Magyar Sejtanalitikai Konferencia Budapest nov. 15-17. 2007.
8. Nagy J.; Lakner L.; **Pandur E.**; Poór V. S.; Mózsik Gy.; Sipos K.; Miseta A.: Prohepcidinszint meghatározása gyulladásozó bélbetegségekben
XVI. Nemzetközi Semmelweis Szimpózium és VI. Magyar Sejtanalitikai Konferencia Budapest nov. 15-17. 2007.
9. **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.
10. Nagy J.; **Pandur E.**; Poór V. S.; Rab A.; Sipos K.; Miseta A.: C/EBP alfa és SMAD4 transzkripciós faktorok hatása a hepcidin expressziójára
38. Membrán-Transzport konferencia Sümeg máj. 20-23. 2008.
11. 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.

12. **Pandur E.**, Nagy J., Poór V. S., Sarnyai Á., Rapp J., Miseta A., Sipos K.: A hepcidin promóterének aktivitás-vizsgálata luciferáz rendszerrel
A VIII. Magyar Genetikai Kongresszus és a XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok Nyíregyháza ápr. 17-19. 2009.

13. Poór V. S., **Pandur E.**, Nagy J., Sarnyai Á., Miseta A., Sipos K.: A hepcidin kapcsolata két akut fázis fehérjével
A VIII. Magyar Genetikai Kongresszus és a XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok Nyíregyháza ápr. 17-19. 2009.

14. **Pandur E.**; Nagy J.; Poór V. S.; Montskó G.; Sarnyai Á.; Miseta A.; Sipos K.: Az $\alpha 1$ -antitripszin szerepe a hepcidin éréseben
39. Membrán-Transzport konferencia Sümeg máj. 19-22. 2009.

15. Poór V. S, **Pandur E.**, Nagy J, Rapp J, Sarnyai Á, Miseta A, Sipos K: Hecpidin mutációk: a térbeli szerkezet és a biológiai aktivitás összfüggése
39. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg máj. 19-22. 2009.

16. Nagy J, **Pandur E.**, Poór V. S, Sarnyai Á, Miseta A, Sipos K: A hem szintézis és a hepcidin transzkripció szabályozásának kapcsolata
39. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg máj. 19-22. 2009.

17. Frank D, **Pandur E.**, Poór V. S, Nagy T, Sarnyai Á, Miseta A: A hepcidin kimutatása a nagy nyálmirigyekből
39. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg máj. 19-22. 2009.

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

19. 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.

9.5. Előadások

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

2. 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.

3. 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.

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

9.6. Témához nem kapcsolódó kongresszusi poszterek

1. B. Sümegi; A. Pálfi; K. Kovács; K. Hantó; P. Deres; **E. Pandur**; E. Bognár; A. Toth; K. Toth: Akt/GSK-3 β , PKC and MAP kinase cascades contribute to the protective effect of PARP inhibition
PARP 2005 Symposium Newcastle England oct. 5-7. 2005.

2. Nagy J.; **Pandur E.**; Szabó A.; Montskó G.; Bognár Z.; Sipos K.: A humán RNáz L inhibitor szerepe a translációban
V. Magyar sejtanalitikai konferencia Budapest máj. 4-6. 2006.

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

4. 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 Pécs aug. 30- szept. 2. 2006.

5. 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.

6. Polgár B.; **Pandur E.**; Gajdos G.; Fekete Zs.; Berki T.; Jerry N. Slootstra N.J.; van Dijken P.; Szekeres-Barthó J.: PIBF specifikus poli- és monoklonális antitestek előállítása, jellemzése és alkalmazása az immunbiológiai kutatásokban
Magyar Immunológiai Társaság XXXIX. Vándorgyűlése Szeged nov. 3-5. 2010.

7. Bogdán Á.; Polgár B.; **Pandur E.**; Szekeres-Barthó J.: A PIBF mRNS expressziós mintázatának vizsgálata terhességhez asszociált szövetekben
A Magyar Immunológiai Társaság XXXIX. Vándorgyűlése Szeged nov. 3-5. 2010.