

Ph.D. értekezés tézisei

A vasanyagcserét szabályozó hormon, a hepcidin interakciói és autoregulációja

Pandur Edina

Programvezető: Prof. Dr. Kovács L. Gábor

Témavezető: Dr. Sipos Katalin

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Laboratóriumi Medicina Intézet**



Pécs, 2011

Rövidítések

A1AT: alfa-1 antitripszin, **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 , **CD**: Cirkuláris Dikroizmus, **EPO**: eritropoetin, **EPOR**: eritropoetin receptor, **FP**: ferroportin, **GAPDH**: glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz, **GDF15**: erythroid factor growth differentiation factor 15, **GST**: glutation S-transzferáz, **HAMP**: Hepcidin antimikrobiális peptid, **HFE**: humán hemokromatózis fehérje, **HIF1 α** : Hypoxia inducible factor 1 α , **HJV**: hemojuvelin, **HRE**: Hypoxia response element, **IL-6**: Interleukin-6, **IRE**: Iron Resposive Element, **IRP**: Iron Regulatory Protein, **LB agar plate**: Luria-Bertani agar plate, **LEAP-1**: liver-expressed antimicrobial peptide, **MALDI TOF**: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight, **NE**: nukleáris extrakt, **NLS**: Nukleáris lokalizációs szignál, **NMR**: Nuclear magnetic resonance, **PSSM**: Position-Specific Scoring Matrix, **sHJV**: szolubilis hemojuvelin, **SMAD7**: Mothers against decapentaplegic homolog 7, **STAT3**: Signal transducer and activator of transcription 3, **SVM**: Support Vector Machine, **Tf**: Transzferrin, **TfR**: Transzferrin receptor, **TGF- β** : Transforming Growth Factor- β , **TMPRSS6**: Transmembrane protease, serine 6, **TWSG1**: Twisted Gastrulation cytokine

Bevezetés

A vas homeosztázist szabályozó hormont, a hepcidint 2000 óta ismerjük. Felfedezését követően a termelés 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. 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. A hepcidint kódoló gén (*HAMP*) 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. A szignál szekvencia lehasadása után egy 60 aminosavas propeptid képződik, melynek érett formává történő átalakulása a Golgi-komplexben következik be. A funkcionálisan aktív peptid kialakítását egy a prohormon konvertázok családjába tartozó szerin peptidáz enzim, a furin végzi, melynek konszenzus cél szekvenciája: R(X/R/K)(X/R/K)R. A májsejtekből mind az érett, mind pedig a prohepcidin szekretálódik és kimutatható a szérumból.

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. 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. A peptidben található egy szokatlan vicinális diszulfid-híd, mely a 13. és 14. cisztein között a hajtúkanyarban helyezkedik el. Az amfipatikus (asszimmetrikusan poláris) struktúra összetartásában a nyolc ciszteinből hat vesz részt, intramolekuláris diszulfid-hidakat képezve. A hepcidin stabil szerkezetének fenntartásában a diszulfid-kötéseken kívül hidrogén-hidak is részt vesznek.

A hepcidin fokozott expressziója a vér vasszintjének csökkenését idézi elő azáltal, hogy gátolja a vas duodenumból történő felszívódását és a makrofágokból történő recirkularizációját. 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. A ferroportint a *FPN1* gén kódolja, melynek 5' végén IRE szekvencia található, így transzlációját vasszabályozó fehérjék (IRP) kontrollálják. A ferroportin egy 12 transzmembrán doménnel rendelkező vasexporter fehérje, megtalálható az enterociták, a makrofágok, a hepatociták és a placenta sejtek felszínén. Szerepe a vas vérplazmába történő exportjában van.

Ismert, hogy a ferroportin internalizációját és degradációját a hepcidin regulálja. 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.

A ferroportin állandó jelenléte a sejtfelszínen alacsony hepcidin szintet okoz, mely a klasszikus öröklött hemokromatózis egyik tünete. A ferroportinban bekövetkező más típusú mutációk defektív vasexportot okoznak, többnyire azért, mert a mutáns ferroportin megváltozott szerkezete miatt nem tud megfelelően a membránba ágyazódni, ezáltal nem képes funkcióját ellátni. Tehát egyes hemokromatózisos esetekben a ferroportin mutációja következtében nem tudja a hepcidin a hatását kifejteni (IV-es típusú hemokromatózis).

A sejten belüli vas a vasanyagcserében részt vevő összes sejtben (makrofágok, hepatociták, duodenális enterociták) kifejeződő ferroportin molekulák részvételével kerül a plazmába. A vaskiáramlás a sejtfelszínen 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. A plazmába és a csontvelőbe irányuló vasáramlás központi szabályozó molekulája a hepcidin, amely biztosítja, hogy elegendő mennyiségű vas álljon rendelkezésre a vérképzéshez, tehát a hepcidin szint felelős a plazma vaskoncentrációjának kialakításáért.

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. Ez a feedback mechanizmus a plazma vasszintjét viszonylag állandó szinten tartja és megakadályozza a túlzott vasszint emelkedését és szöveti lerakódást. A folyamat pontos hatásmechanizmusa még nem ismert.

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. További kísérletek azonban kimutatták, hogy a hepcidin a ciszteinek kén atomján keresztül ugyan képes ferrivassal komplexet képezni, azonban ennek pontos funkciója még nem tisztázott. Szakirodalmi adatok alapján elképzelhető, hogy a komplex-képződés 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.

A hepcidin szabályozása alapvetően négy útvonalon történik: ez a vastelítettség, hipoxia, gyulladás és az eritropoezis. A folyamatok egyes szabályozó faktorai még nem ismertek, vagy pontos szerepük még nem tisztázott. 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 szabályozásában számos faktor még nem ismert, feltételezhetően a GDF15 negatív regulátora a hepcidin expressziójának. Az eritropoetin (EPO) a receptorán (EPOR) keresztül csökkenti a C/EBP α aktivitást, ugyanakkor a STAT3 és SMAD útvonalak gátlása révén csökkenti a gyulladásos és vasszinttel összefüggő érzékelést. Hipoxia esetén a HRE-hez (Hypoxia response element) kötődő HIF1 α , vasdeficiencia esetén pedig a HFE-hez kapcsolódó Tfr1 képes gátolni a hepcidin expresszióját. Ha a szérum 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 GDF15 és TWSG1 eritropoetikus szabályozó fehérjék mellett a hepcidin negatív szabályozásában a SMAD7 transzkripciós faktornak is alapvető jelenősége van. Korábban kimutatták, hogy a SMAD7 a SMAD4 transzkripciós faktoral együtt szabályozódik és negatív feedback mechanizmussal gátolja a TGF- β és a BMP jelátvitelt. 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.

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 hemokromatózisnak 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 ciszteintirozin 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. A II-es típusú hemokromatózist (Juvenilis hemokromatózis) a hemojuvelin gén (*HJV*, 2A típus) vagy a hepcidin gén (*HAMP*, 2B típus) mutációja okozza. A *HJV* génben eddig hat mutációt írtak le, közülük a leggyakoribb a G320V aminosavcsere. A *HAMP* génben bekövetkező mutációk viszonylag ritka okai a juvenilis hemokromatózisnak. A szabályozó szerepű érett hepcidinben eddig öt mutációt találtak, melyek közül kettő a harmadik diszulfidhíd ciszteinjeit (C70R, C78T) egy pedig az első diszulfidhíd egyik ciszteinjét (C82Y) érinti. A III-as típusú hemokromatózist a 2-es típusú transzferrin receptorban bekövetkező mutációk okozzák. A IV-es típusú hemokromatózist 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.

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. 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.

Eredmények

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

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.

A mutált hepcidin peptidek szerkezeti analízisét az aminosav szekvencia alapján az I-TASSER serverrel végeztük el. 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 mutánsnál ellentétben, az M1-ben a hiányzó 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.

A szerkezeti predikciót követően BacterioMatch Two-Hybrid rendszerben vizsgáltuk a ferroportin és a mutáns hepcidin peptidek interakcióit. 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. 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.

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

WRL68 sejteket preprohepcidinnel illetve mutáns preprohepcidint kódoló plazmáddal transzfektáltunk 24 órán keresztül. Ezt követően a tenyésztő médiumot összegyűjtöttük és a szekretált hepcidin illetve mutáns hepcidin peptidek mennyiségét (ng/ml) Hecpudin 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. A 24 órás transzfekciót követően a hepcidin, illetve a mutációt hordozó hepcidin peptidek mennyisége szignifikánsan megnövekedett (129%-222%) a kontroll, nem transzfektált sejtekhez viszonyítva. 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. 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.

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 illetve preprohepcidin mutánsokat overexpresszáltunk. Ezt követően a sejtek médiumát új WRL68 sejtekre vittük át és 6 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. 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. 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.

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. 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.

A preprohepcidin és a prohepcidin kapcsolata az alfa-1 antitripszinnel

A hepatocita fehérjék a preprohepcidinnel és az érett hepcidinnel történő interakcióinak vizsgálatát BacterioMatch Two-Hybrid rendszerrel végeztük el. A preprohepcidin kötődést mutatott a tiroid-hormon szállító szérumból a transztiretinnel (prealbuminnal) valamint a gyulladással kapcsolatos folyamatokban emelkedett szintet mutató és diagnosztikus markerként használt akut fázis fehérjével, az alfa 1-savi glikoproteinnel, melynek szerepe a plazmában mindeztidáig tisztázatlan.

A legerősebb kötődést a preprohepcidin az alfa-1 antitripszinnel mutatta, mely a szerin proteáz inhibitor fehérje családba tartozik. 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. A carbenicillin tartalmú LB agar lemezen 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.

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.

In vitro GST-fúziós fehérje kötési esszéivel bizonyítottuk, hogy a preprohepcidin-A1AT kötés specifikus mind BL21 baktériumtörzsben expresszált A1AT, mind pedig humán szérumban lévő A1AT esetén. Ezt követően megvizsgáltuk a preprohepcidin overexpressziójának illetve antiszensz technikával történő csendesítésének hatását az A1AT mRNS expressziójára. WRL68 sejtvonalat preprohepcidin/pTriex3-Neo plazmával transzfektáltunk, majd RNS izolálás és cDNS szintézist követően Real-Time PCR-ral 470-szeres preprohepcidin mRNS expresszió növekedést tapasztaltunk. Antiszensz technika alkalmazásával preprohepcidin szintet 63%-ra redukáltuk a kezeletlen sejtekhez viszonyítva. 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.

Huh7 sejtvonalon történő keresztkötési reakció kimutatta, hogy az A1AT *in vivo* a sejten belül specifikusan kötődik a prohepcidinnel. A plazmában lévő A1AT és prohepcidin kapcsolatát szérum ultrafiltrációs esszéivel vizsgáltuk. Először a szérumok, majd az első ultrafiltrátum prohepcidin koncentrációját határoztuk meg Hepcidin Prohormone ELISA Kittal. A szérum prohepcidin szintek átlaga 210 µg/ml, ugyanakkor az első ultrafiltrátum prohepcidin koncentrációja 71,7 µg/ml átlagértéket mutatott. 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.

A szérum prohepcidin-A1AT kapcsolat specifikusságának vizsgálatára koimmunprecipitációt végeztünk. Anti-A1AT ellenanyagot CNBr-aktivált szefaróz gyöngyhöz kötöttünk, majd humán szérummal inkubáltuk. A szefaróz gyöngyöket lemostuk, majd az A1AT-hez kötődött fehérjéket Laemmli pufferrel eluáltuk és dot blottot 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.

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 és tisztított His-tag-es prohepcidint használtunk. 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, 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. 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.

A prohepcidin expresszió szabályozásának új módja

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.

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 alapú predikciós algoritmust használtunk. Az analízist a 60 aminosav hosszúságú prohepcidinnel és az érett hepcidinnel egyaránt elvégeztük. A prohepcidin elemzésekor kapott SVM értékek mind az aminosav összetételt (1,47) mind pedig a PSSM-et (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.

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, tehát eredményünk specifikus a *HAMP* promóterre nézve. Az eredmények alapján elmondható, hogy a prohepcidin képes kötődni a *HAMP* promóter 942 bp hosszúságú darabjához.

Az általunk kifejlesztett kötési próbához a C-terminálisan His-tag-et hordozó prohepcidint overexpresszáltuk WRL68 sejtvonalonban, 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. Az elvégzett kontroll kísérletek esetében nem kaptunk kötődést.

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.

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 fehérjéket. 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. A kísérleti eredmények azt bizonyítják, hogy a prohepcidin önmagában, más nukleáris DNS-kötő fehérjék nélkül is képes a saját génjének promóteréhez kötődni.

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 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. A *HAMP* promóter aktivitásának meghatározásához a promóter 942 bázispár hosszúságú darabját a szentjánosbogár luciferáz enzimét kódoló DNS szakasszal fúzionáltattuk pGL3 expressziós vektorban. Az így elkészített plazmiddal kotranszfekciót végeztünk preprohepcidin/pcDNA3.1 vagy preprohepcidin antiszensz/pcDNA3.1 plazmid DNS-el WRL68 sejt vonalon. A preprohepcidin mRNS expresszióját 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. 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 fúzionáltattuk a citoszolikus elhelyezkedésű gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz 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. 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.

Következőekben azt vizsgáltuk, hogy a prohepcidin és az A1AT 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 overexpresszió hatására a *HAMP* promóter aktivitás háromszorosára emelkedett, a kezeletlen, normál A1AT szintet mutató WRL68 sejtekhez képest. 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 sejtizlátumokból immunprecipitációval izoláltuk a fehérjét. 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.

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.

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.

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. 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* (glutathion 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 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:

- 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.

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 tanácsaikát és segítségüket. Külön köszönettel tartozom dr. Fekete Zsuzsannának szakmai segítségéért és tanácsaiért. Köszönettel tartozom Dr. Polgár Beátának türelméért és az értekezés elkészítésében nyújtott segítségéért.