

**Ph. D. értekezés tézisei**

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

dr. Nagy Judit

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

Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Laboratóriumi Medicina Intézet



Pécs, 2012.

## Rövidítések jegyzéke

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

## Bevezetés

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

Az emberi szervezet átlagos vastartalma férfiakban 3-4 g, nőkben kis mértékben kevesebb, 2-3 g. Ez a különbség a testméretekkel és a nők lényegesen kisebb vasraktáraival magyarázható. A szervezet vastartalma két nagy részre, aktív metabolikus és raktározott vasra osztható fel. A vaskészlet kb. 70%-a hemoglobinban, 5%-a mioglobinban, 4 %-a szöveti enzimekben (hem és nem hem formában) található, 15%-ban a szövetekben ferritinként és 6%-ban hemosziderinként raktározódik. Ezrelékes mennyiségben nem kötött vasat is találhatunk a vérben. Az elfogyasztott táplálék vastartalmának csak igen kis hányada, 5-10%-a szívódik fel a duodenumban, kisebb mértékben a jejunumban. Ez az arány vashiány vagy fokozott igény esetén 20-30%-ra növekedhet. Minden olyan körülmény ezt elősegíti, amely a vasat oldott állapotban és ferro (Fe<sup>2+</sup>) formában tartja. A táplálékkal bejutott Fe<sup>3+</sup> ionokat a duodenális citokróm b (DCYTB) Fe<sup>2+</sup>-vé redukálja. Az enterociták a hem vasat is képesek felvenni, a hasítás csak a sejten belül következik be. A duodenális enterociták apikális membránjában helyezkedik el egy, a vas felvételért is felelős transzporter, a DMT1/Nramp2. Ez a fehérje végzi az eritrociták endoszómáiból a citoplazmába történő vasszállítást is. Hiányában a Fe-transzferrinről leváló vasat az eritrociták az endoszómákból nem képesek a citoszólba juttatni és a vas nem tud a hemoglobinba beépülni. Az enterocitába jutott vasat a szervezet az igényeknek megfelelően raktározza, vagy a ferroportin vas exporteren keresztül a véráramba juttatja. A ferroportinon keresztül kijutott Fe<sup>2+</sup> ionokat a hefesztin oxidálja a transferrin számára felvehető Fe<sup>3+</sup> ionokká.

A vas a vérben egy 80000 molekulatömegű  $\beta$ -globulinhoz, a transferrinhez kötve kering, mely molekulánként két Fe<sup>3+</sup> iont képes megkötni, ezek leadását követően újabb ionokat köt. Ez a fehérje a májban képződik, féléletideje 8-10 nap. Normálisan a

kötőkapacitás 1/3 része telített vassal, de a szérumban vasszintek diurnális ingadozását is figyelembe kell vennünk, legmagasabb reggel és legalacsonyabb este. A kötött vas a transferrin receptoron (TfR) keresztül jut be a sejtekbe receptor mediálta endocitózissal. Az így létrejött endoszóma a sejten belül egy savas vezikulummal egyesül, ebben az acidotikus közegben a vas könnyen ledisszociál, majd a DMT1 az endoszóma membránján keresztül a citoplazmába juttatja, ahol felhasználásra kerül vagy raktározódik. Ezután a transferrin receptor ismét a sejt felszínére kerül, a transferrin is ledisszociál és mindkét fehérje ismét képes betölteni a funkcióját.

Szervezetünkben legnagyobb mennyiségű vas a májban raktározódik hemosziderin vagy ferritin formájában, utóbbiból szükség esetén gyorsan mobilizálható. Ezek a raktárak biztosítják, hogy annak ellenére, hogy a vasszükséglet jelentős diurnális ingadozást mutat, a szérumban vasszintje relatíve állandó.

Naponta 25-30 mg vasra van szükségünk az eritropoézishez, ennek jelentős része recirkularizáció révén az elhalt és a makrofágokban lebomló vörösvértestekből származik. A makrofágok hemoglobin-haptoglobin komplex, szabad hemoglobin, hem- hemopexin komplex, vagy szabad hem formájában képesek felvenni a vasat. A felesleget hasonlóan a májsejtekhez, ferritinhez vagy hemosziderinhez kötött formában raktározzák. A csontvelőben zajló eritropoézist a vese által termelt eritropoetin, közvetve a szérumban vastartalma szabályozza.

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

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

A vasanyagcserét szabályozó faktorok egyike az ezredfordulón azonosított hepcidin. Először, mint egy, a máj által termelt, a baktériumok életciklusát gátló peptidet azonosították, ezen antimikrobiális hatása miatt kapta a nevét is: **hepatic bacteriocidal protein**. Mára már ismert, hogy a májon kívül más szervekben, többek között a vesében, szívben, tüdőben, duodenumban, nyirokcsomókban is szintetizálódik ez a fehérje. A hepcidin génjét felfedezése után Pigeon HEPC-nek nevezte el, de a későbbiek során ez módosult, hivatalosan a HAMP (hepcidin antimikrobiális peptid) nevet kapta. Az is rövid időn belül nyilvánvalóvá vált, hogy a hepcidin fő funkciója a szervezet vas homeosztázisának biztosítása, azaz egy hormonnál van szó. A humán hepcidin génje a 19-es kromoszómán helyezkedik el (19q13.1), 3 exonból és 2 intronból áll. Más peptid hormonokhoz hasonlóan prepro formában képződik, amely egy 24 aminosav hosszúságú szignálszekvenciát tartalmaz, mely az endoplazmatikus retikulumhoz irányítja a fehérjét. Ennek a lehasadását követően a 60 aminosav nagyságú propeptid további érési folyamatokon megy át a Golgi-apparátusban. Végül, érett formáját egy, a szerin peptidázok közé tartozó furin által végzett hasítás következtében nyeri el. A szérumban mind

az érett, funkcióképes 25 aminosav hosszúságú hormon, mind a prohormon forma kimutatható. 20 és 22 aminosav hosszúságú hepcidint mutattak ki a vizeletből, mely az érett forma N terminálisáról 5, ill. 3 aminosav lehasadásával jön létre, ezek antimikrobiális, antifungális hatása nagyobb mértékű, mint a 25 aminosav hosszúságú hepcidiné.

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

Már az első hepcidinnel foglalkozó közleményekből ismert, hogy a hepcidin mRNS expressziója növekedését mutat, ha a szervezetet, sejteket gyulladással noxa éri, vagy vastúlterhelés áll fenn. Nicolas és munkatársai megfigyelték azt is, hogy egerekben a hepcidin mRNS expressziója a májban nemcsak anémia, hanem oxigén hiány hatására is csökken. Ebből arra következtettek, hogy ha a szervezetben hipoxia áll fenn, vagy a szervezet anémiás, az eritropoetin termelése fokozódik, valamint ezzel párhuzamosan a hepcidin gén expressziója csökken.

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

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

A hepcidin receptora a ferroportin, melyet a FPN1 gén kódol. Az 5' végén IRE (Iron Responsive Element) szekvencia található, translációját IRP (Iron Regulatory Protein), vasszabályozó fehérjék befolyásolják. 12 transzmembrán domént tartalmaz ez a vasexporter, mely a bélhámsejtek bazolaterális membránjában, a makrofágokban, a májsejtekben és a placentát alkotó sejtekben található meg. Legfontosabb szerepe a vas sejtéből történő exportja. A hepcidin N-terminálisán lévő 5 aminosav megléte alapvető a receptor-ligand kapcsolat kialakulásához. A kapcsolat létrejötte a ferroportin internalizációját és degradációját eredményezi. A hepcidin és ferroportin között létrejövő interakció a Jak2 autofoszforilálódásához vezet, majd ez az aktivált forma foszforilálja a ferroportint és a komplex multivezikuláris testekbe kerül, melyek a lizozómákkal fuzionálva a ferroportin lebontását végzik.

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

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

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

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

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

A két krónikus gyulladásos bélbetegségnek igen hasonló tünetei vannak, hasi görcsös fájdalommal járó krónikus hasmenés, mely colitis ulcerosában véres jellegű lehet. Crohn

betegek esetében gyakran fordul elő az anamnézisben perianális fissura, fistula is. Azonban főleg gyermekkorban az extraintesztinális tünetek lehetnek a vezetőek, úgy, mint az állandó és ismeretlen eredetű láz, növekedés elmaradása és a vérszegénység, izületi panaszok, gyakori afták a szájüregben, bőrtünetek. A diagnózis endoszkópos és szövettani vizsgálatok eredménye alapján állítható fel. Mindkét betegcsoportban a tünetmentes periódusokat aktív szakaszok követik, teljes gyógyulás csak sebészi kezelést követően jön létre. Specifikus kezelés nincs, a görcsök és a hasmenés orálisan adott antikolinerg szerekekkel enyhíthetőek, aktív fázisban kortikoszteroid adása indokolt, ennek hatástalansága esetén más, immunmoduláló kezelés is elfogadott. A remisszió eléréséhez és fenntartásához szulfoszalazint vagy mezalaminat kell a betegeknek szedniük.

Az RNáz L Inhibitor (Rli) egy konzervált, a prokariótákat kivéve valamennyi élőlényben megtalálható citoszólikus vas-kén fehérje. A humán Rli szerkezetét és szerepét régebb óta ismerjük. Két nukleotid kötő és hasító ABC doménnel, valamint egy 4 ciszteint tartalmazó ferredoxin-szerű szekvenciával rendelkezik, az utóbbi 4Fe-4S komplex kötésére alkalmas. Az élesztő és a humán Rli között 68%-os aminosav azonosság van, a homológia is magas. Az RNáz L az interferon által indukált fehérjék közé tartozik, az Rli első leírása is ennek a folyamatnak a szabályozása kapcsán történt. Az RNáz L 2'-5' oligoadenilát (2-5A) kötése révén aktiválódik, ez a molekula kettős szálú RNS molekulák jelenlétében képződik ATP-ből 2'-5' oligoadenilát- szintetáz enzim segítségével. Az RNáz L-nek egyes virális fertőzések elleni védekezésben is szerepe van. Ennek a válasznak a kioltásában, az RNáz L inaktiválásában van szerepe az Rli fehérjének. Ez a fehérje élesztőkben esszenciális, hiányában az élesztők elvesztik életképességüket. Érdekes, hogy az élesztőkben nincs RNáz L, így már korábban vizsgálta munkacsoportunk, hogy mi lehet ezekben a sejtekben az Rli szerepe. Korábbi kísérleteink során igazolódott funkciója a riboszómák érésében. Az Rli depletált sejtekben a kontrol sejtekkel összehasonlítva a transzláció nagyfokú csökkenését láttuk, azaz a legtöbb fehérje szintézise csökkent. Ez a változás a riboszómális fehérjék mennyiségére csak kis mértékben vonatkozik, tehát a transzláció csökkenésének más oka is kell, hogy legyen, mint a riboszómák mennyiségi változása. Saját és más laboratóriumok kísérletei alapján bebizonyosodott, hogy az Rli depletált sejtekben károsodott mind a riboszómális alegységek sejtmagból a citoszólba történő transzportja, mind az rRNS-ek érése. Ahhoz, hogy az Rli a transzlációban lévő szerepét be tudja tölteni szükséges a fehérjében lévő vas-kén komplex megléte.

Az endoplazmás retikulum (ER) feladatai közé tartozik a fehérjék, lipoproteinek szintézise, foldingja, poszttranszlációs módosítása, a makromolekuláris fehérje komplexek összeszerelése. A fehérjék vezikuláris transzporttal jutnak ki az ER lumenéből a citoszólba, de ezt megelőzően egy ellenőrzésen mennek át. Ha nem megfelelő a szerkezetük, akkor a lumenben maradva további foldingon esnek át vagy a citoszólba kijutva proteozómában proteolízissel degradálódnak. Az első esetben jön létre az ER túltöltődése (ER overload). Ha a foldingot gátló hatás éri az ER-ot, akkor specifikus jelátviteli utak aktiválódnak, ezek közül a legfontosabbak a sejtfehérje-válasz (unfolded protein response, UPR), az ER túltöltés válasz (EOR) és a szterol-válasz.

A UPR jelpálya részleteit élesztőben írták le először, de legtöbb elemét már humán sejtekben is azonosították. Három fő útvonal aktiválódik a folyamat során:

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

Ugyanez játszódik le humán sejtekben, ebben az esetben az Ire1p RNáz aktivitásának hatására az XBP mRNS hasítódik el, az így létrejött "spliced XBP1" (sXBP1) expressziójának eredménye egy kulcs transzkripciósi faktor, amely anti-apoptotikus fehérjék expresszióját képes indukálni. Az UPR célpontjai közé tartozó gének promótere tartalmaz egy 22 bázispárból álló UPR elemet (UPRE), melyet minden, UPR során indukálódó fehérje génjében megtaláltak. Többek között olyan fehérjék mennyisége nő meg a sejten belül, amelyek a foszfolipid szintézishez szükségesek, lumináris chaperonok, glikoziltranszferázok. Az élesztőben leírt, majd négyszáz gén közül, amelyik az UPR által aktiválódók közé tartozik, körülbelül csak a felének ismert a funkciója.

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

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

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

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

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

## Célkitűzések

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

## Eredmények

### 1. Szérum prohepcidin meghatározása colitis ulcerosás és Crohn betegek szérumból

A szombathelyi Vas megyei Markusovszky Kórház Gasztroenterológiai Osztályán és járó betegként kezelt krónikus gyulladásos bélbetegségben szenvedő betegektől előzetes tájékoztatást és beleegyezést követően vérmintát vettünk. A pácienseknél a gyulladásos bélbetegség diagnózisához a korábban elvégzett endoszkópos mintavétel alapján jutottunk. Nem tettünk különbséget a vizsgált egyének között nem, kor és az alkalmazott kezelés alapján. Vizsgálatainkba összesen 102 beteget vontunk be és 14 egészséges egyén esetében elemeztük a szérum prohepcidin szint és más paraméterek közötti összefüggést. 72 személy (42 nő, 30 férfi) colitis ulcerosa, 30 (15 nő és 15 férfi) Crohn-betegség miatt állt kezelés alatt. A betegek kora 19 és 84 év között volt, az átlagéletkor 41,375 év. A betegség aktivitását nemzetközileg elfogadott aktivitási indexszel jellemeztük, melyhez a betegek megfelelő kérdőíveket töltöttek ki. A vizsgálatra kerülő vérminták levétele a reggeli órákban (7-9 óra között) történtek, éhgyomorral. Ezt követően a szérumból megtörtént a szervezet vasháztartását jellemző (vörösvérsejtszám, hemoglobin, szérum vas, teljes vaskötő kapacitás, transferrin, transferrin szaturáció) és gyulladásos paraméterek (fehérvérsejtszám, C-reaktív fehérje, vörösvértest süllyedés) meghatározása. A szérum prohepcidin meghatározáshoz a mintákat a vizsgálat elvégzéséig  $-80^{\circ}\text{C}$ -ra lefagyasztottuk. A méréshez a Hpcidin Prohormon ELISA Kit-et (DRG International Deutschland) használtuk, a gyártó által ajánlott protokoll alapján. Az eredmények statisztikai elemzését <http://www.wessa.net/> internetes szoftver segítségével végeztük. Meghatároztuk az átlagokat,  $\pm$  standard deviációt. Student-féle t-próbát használtunk a betegcsoportok egymás közti és az egészséges kontroll csoporttal való összefüggések elemzésére, mivel a változók nem normális eloszlást mutatnak. A változók közötti kapcsolatot Spearman féle rank korrelációval vizsgáltuk. Abban az esetben mondtuk ki a statisztikailag szignifikáns összefüggést, ha a szignifikancia szintje, a p értéke kisebb vagy egyenlő 0,05. Vizsgálataink alapján elmondhatjuk, hogy a gyulladásos bélbetegségben szenvedőknél szignifikánsan magasabb ( $p < 0,01$ ) C-reaktív protein és vörösvértest-süllyedés értékek voltak mérhetőek, mint az egészséges kontroll csoportban. A colitis ulcerosás és a Crohn betegek vasháztartását vizsgálva a szérum vas szintjében ( $p < 0,001$ ) és a transferrin szaturációban ( $p < 0,01$ ) találtunk szignifikáns különbséget, alacsonyabb szintet az egészségesekhez képest.

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

A többi vizsgált paraméter (fehérvérsejt szám, szérum albumin, teljes vaskötő kapacitás, hemoglobin és transferrin) a betegek nagy többségénél normál tartományban mozgott. A két csoportban az egyes paraméterek átlaga eltérő volt, a különbség azonban nem volt szignifikáns. Megjegyzendő még, hogy szinte valamennyi érték jelentős szórást mutatott.



A kompetitív ELISA módszerrel meghatározott szérumban prohepcidin szint nem mutatott statisztikailag jelentősnek mondható különbséget sem a betegcsoportok között, sem a betegek és egészségesek viszonylatában. Csökkent, 240 ng/ml alatti értéket csak a vizsgált személyek 19,38%-ban, alacsony, 80 ng/ml alatti értéket pedig csak 9,8%-ban mértünk.

Ha az aktivitási index Crohn –betegség esetén 150 feletti, akkor mondhatjuk, hogy a betegség aktív, ez alatt remisszióról beszélünk. Colitis ulcerosa esetén szintén 150 alatt inaktív a betegség, 150-220 között enyhe, 220 felett közép-súlyos, súlyos stádiumról beszélhetünk. Mivel a vérmintákat betegeink nagy részétől ambuláns kontrollvizsgálat során nyertük, így csak a betegek kis részénél, 19,38%-nál, volt a betegség aktív stádiumban.

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

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

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

## **2. Az RNáz L Inhibitorral végzett kísérletek**

### **2.1. A humán és az élesztő Rli fehérje szekvenciájának összehasonlító vizsgálata**

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

### **2.2 A TeT-Rli sejtek komplementációs vizsgálata**

Az RLII gén esszenciális élesztőben, kiütése haploid sejtekben letális, ezért deléciós mutáns sejt vonalat nem lehet létrehozni. Annak vizsgálatához, hogy a humán Rli képes-e betölteni az élesztő Rli1p szerepét, előállítottunk egy olyan törzset, a TeT-Rli –t, melyben az RLII gén egy Tetraciklin által represszálható promóter szabályozása alatt áll. A Tetraciklin derivátum Doxiciklin antibiotikum hozzáadásával ezekben a sejtekben RLII gén átírása gátlódik, így az Rli1p fehérje mennyisége lecsökken.

Az élesztő és a humán Rli fehérje magas homológiát mutat. Ez inspirált bennünket arra, hogy megvizsgáljuk, hogy a humán fehérje képes-e kompenzálni az Rli1p csökkent szintjét az élesztősejtekben. A TeT-Rli sejteket Doxiciklin-kezelést követően transzformáltuk élesztő Rli1p/pRS426 vagy humán Rli/pRS426 expressziós vektorral. A Tet- Rli sejtek közül Doxiciklin jelenlétében csak azok növekedtek, amelyekbe az élesztő Rli1p-t kódoló génszakaszt juttattuk be. Ez az eredmény azt igazolja, hogy a humán fehérje nem képes az élesztő fehérje hiányzó funkcióját betölteni.

### **2.3. Humán/élesztő kimérák**

Az Rli négy fő doménből épül fel, két ABC típusú nukleotid kötő domén (NBD) és két ciszteinben gazdag régió található az N-terminálison, amelyek a két vas-kén klasztert

kapcsolják össze. Az élesztő és humán fehérje közötti funkcionális különbség vizsgálatához humán-élesztő kimérékat hoztunk létre. 1-es, 2-es, 3-as kimérék esetében az N-terminálison lévő 173, 221 illetve 372 aminosav élesztőből származik, és ehhez kapcsolódik a humán fehérje C-terminálisából származó 435, 378 illetve 236 aminosav. 4-es, 5-ös, 6-os kimérék esetében az N-terminálison található meg a humán szekvencia és ennek megfelelően a C-terminális tartalmazza az élesztőből származó aminosavakat.

Ezeket az újonnan létrehozott kimérékat használtuk a komplementációs vizsgálatainkhoz, mellyel bizonyítani akartuk, hogy mely aminosavak megléte szükséges a funkció betöltéséhez. Mind a hat kiméra szekvenciát pRS426 élesztő expressziós vektorba klónoztuk és Tet-Rli sejtekbe transzformáltuk, majd Doxiciklin tartalmú táptalajon növesztettük.

Eredményeink azt mutatják, hogy az első 173 aminosavat tartalmazó régió nem felelős a funkcionális különbségekért, hiszen ha kicseréljük ezt a szakaszt humán szekvenciára, nem jár fatális következményekkel. Ezzel ellentétben, ha az élesztő fehérje 173-221 aminosavat, amely régió tartalmazza az első különböző szakaszt, kicseréljük a humán szekvenciára, vagy, ha az élesztő C-terminálison lévő 236 aminosavat cseréljük le, akkor ezekben az esetekben a sejtek nem képesek növekedni, azaz az N-terminális 1-173 aminosavat leszámítva a human Rli többi szakasza nem komplementálja élesztőben az élesztő Rli hiányát.

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

A kimérékat tartalmazó plazmidokkal transzformált Tet-Rli sejtekben a Doxiciklin kezelés hatását vizsgáltuk a riboszómális RNS-ek expressziójára. Total RNS-t izoláltunk, majd a mintákat agaróz gélben szeparáltuk, a 18S és 28S rRNS-eket etidium-bromiddal tettük láthatóvá. Az előző kísérlethez hasonlóan csak két esetben láttunk a kontroll sejtekéhez hasonló rRNS mennyiséget, az egyik, amelyiket élesztő Rli1p/pRS426 plazmiddal, a másik, amelyiket a 4-es kimérékat tartalmazó expressziós vektorral transzformáltunk, tehát ebben a két esetben beszélhetünk a hiányzó Rli1p komplementációjáról. Ezekből a mintákból elvégzett valós idejű PCR során is hasonló eredményt kaptunk. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a két fehérje magasabb rendű szerkezetében lévő különbségek az Rli riboszóma érésben betöltött funkciójában is szerepet játszanak.

#### 2.5. Az Rli fehérje mennyiségének csökkentése

Kísérleteink során humán sejt vonalakat vizsgálva a két, leggyakrabban használt gén-csendesítési technikát alkalmaztuk az Rli mennyiségének csökkentésére: az antiszensz módszert és az siRNS technikát. A HeLa sejteket antiszensz Rli-t tartalmazó plazmiddal (RAS/pCDNA 3.1) transzfektáltuk. Az siRNS technikánál 20-25 bázispár hosszúságú kettős szálú RNS molekulák keverékét humán sejtekbe juttatva az Rli expresszióját csökkenteni tudtuk (Rli dicer). Mindkét módon Rli depletált sejteknél azt figyeltük meg, hogy az Rli szint nagyfokú csökkenése idővel a sejt halálához vezetett. A sejteket 12, 24 órás kezelés után gyűjtöttük össze, az Rli mennyiségi változását mRNS szinten real time PCR-rel, fehérje szinten Western blot analízissel bizonyítottuk.

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

## 2.6. Az Rli depléció hatása a fehérjeszintézisre

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

## 2.7. Az Rli depléció hatása a riboszómális komponensekre

A humán sejt vonalakban az Rli hiány fehérjeszintézisre gyakorolt hatását vizsgáló kísérleteink hasonló eredményt hoztak, mint a már korábban közölt élesztőben végzettek. Élesztőben Hinnebusch és munkatársai igazolták, hogy az Rli1p a 40S riboszómális alegységhez és több eukarióta iniciációs faktorhoz (eIF2, eIF3, eIF5) kapcsolódik. Munkacsoportunk ezzel egyidőben igazolta az Rli1p riboszóma érésben, nukleocitoplazmatikus transzportban betöltött fontos szerepét. HeLa sejtekben az Rli mennyiségét géncsendesítéssel csökkentettük, majd a sejtekből totál RNS-t izoláltunk, a riboszómális RNS-ek mennyiségét Northern blot analízissel és valós idejű PCR-rel határoztuk meg. A kezelt és a kontroll sejtekben vizsgáltuk a riboszóma alegységekben megtalálható két fehérje, Rpl30 és Rps3, mRNS-ének expressziós változását. Kísérleteink mindkét módszerrel azt igazolták, hogy az Rli mennyiségének csökkenése az 5.8S és 18S rRNS-ek expressziójának csökkenéséhez vezet. A riboszómális fehérjék mennyiségében növekedést tapasztaltunk az Rli depléció hatására.

## 2.8. Rli depléció hatása az unfolded protein response-ra

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

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

Következő lépésben Rli antiszensz pCDNA 3.1 plazmiddal transzfektált sejteknél és a transzfekciót követően tapszigarginnal kezelt sejtekben vizsgáltuk az UPR indukciót, real time PCR segítségével mértük az XBP (totál és splicingon átesett) mRNS mennyiségét. Mind magában az Rli depléció, mind a tapszigarginnal történt kezelés hatására a sejtekben növekedett az XBP és sXBP mRNS mennyisége. Az Rli depléciója is UPR aktivációt idézett

elő. A két kezelés hatása kumulálódva még látványosabb változást eredményezett. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a csökkent Rli fehérjeszint emlős sejtekben is az UPR aktivációjához vezet.

### **3. UPR aktiváció hatása a hepcidin szintre**

Az utóbbi években az irodalomban megjelent közlemények alapján az emlős sejtek vasanyagcseréjét befolyásoló hormon, a hepcidin expressziója többek között az endoplazmatikus retikulum stressz szabályozása alatt is áll. Úgy tűnik, hogy az UPR aktivációhoz vezető folyamatok különböző sejten belüli jelátviteli utakon keresztül hatással lehetnek a hepcidin transzkripciójára is. Kíváncsiak voltunk, hogy az Rli depléciójával kiváltott UPR is indukál-e a hepcidin szintézisében változást. Ahhoz, hogy ezt az összefüggést bizonyítsuk Rli antiszensz transzfektált sejtekből és tapszigarginnal kezelt HeLa sejtekből is totál RNS-t izoláltunk, majd hepcidin mRNS mennyiségét határoztunk meg real time PCR-ral. Érdekes eredmény volt, hogy a tapszigargin kezelés önmagában nem eredményezett változást a hepcidin expressziójában, addig az Rli depléción több mint négyszeres növekedést okozott.

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

## **Megbeszélés**

### **1. Szérum prohepcidin meghatározás Crohn betegségben és colitis ulcerosában szenvedőknél**

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

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

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

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

a prohormon és az érett hepcidin szintje is emelkedett a kontroll csoporthoz képest. A hepatocelluláris karcinoma kivételével a többi tumoros megbetegedésben a hepcidin expressziója fokozott mértékű, ez vezet a vashiány kialakulásához és az anémiához. Két autoimmun betegség esetében, a reumatoid arthritisnél és a szisztémás lupusz eritematosusnál leírták, hogy a betegség aktivitása, a szérum vas, hemoglobin, citokin szintek nem mutatnak szignifikáns korrelációt a prohepcidin szinttel, de kapcsolat van a ferritin, IL-6 és a reumafaktor titerével.

Méréseink célja az volt, hogy megvizsgáljuk a szérum prohepcidin szintjét mint lehetséges diagnosztikus vagy prognosztikus faktort a két krónikus autoimmun gyulladással járó bélbetegségben, a colitis ulcerosában és a Crohn betegségben. Ezek a betegségek a fent említett krónikus gyulladással járó betegségekkel szemben még annyival összetettebb klinikai képet mutatnak a vasanyagcsere szempontjából, hogy esetenként sérülhet a vas felszívódása is, illetve ami még jelentősebb, gyakran vérzés lép fel. Számos, a szervezet vasháztartását jellemző faktort (szérum vas, teljes vaskötő kapacitás, hemoglobin, transferrin és transferrin szaturáció), gyulladással járó paraméterekkel (C-reaktív fehérje, fehérvérsejt szám, süllyedés) és a betegségek súlyosságával (aktivitási index) kerestünk korrelációt. Elmondhatjuk, hogy mindkét betegcsoportban a C-reaktív protein, a vörösvértest-süllyedés szignifikánsan magasabb, mint az egészséges csoportban, függetlenül attól, hogy a betegség aktív vagy remisszió fázisában volt-e. Nem vizsgáltuk a betegekénél a szérum ferritin szintet, ami napjainkban a legelfogadottabb markere a vashiányos állapotnak, mert ez a fehérje egy akut fázis fehérje, szérumszintje gyulladással járó megbetegedésekben megemelkedik, ezáltal megtevesztő lehet a szervezet vasháztartásának megítélésében. Mindkét betegcsoportban a szérum vas szintje és a transferrin szaturáció alacsonyabb volt a kontrollcsoporthoz viszonyítva. A transferrin szintje, még ha nem is szignifikánsan, de szintén alacsonyabb volt, mint az egészséges kontrolloké. Ez azzal magyarázható, hogy a transferrin az anti akut fázis fehérjék csoportjába tartozik, tehát az IL-6-STAT3-cEBPa útvonal aktiválásával expressziója lecsökken. A transferrin szaturáció csökkenése a vashiányos állapot megbízhatóbb mutatója, mint a szérum vas csökkenése. A Crohn-betegekben korrelációt találtunk a szérum prohepcidin és a transferrin, transferrin szaturáció, a teljes vaskötő kapacitás és az aktivitási index között. Colitis ulcerosában szenvedőknél csak a transferrin szaturáció és a transferrin között lehetett kapcsolatot kimutatni. Ez azért érdekes, mert a colitis ulcerosás betegek esetében gyakran jön létre okkult vérzés a gasztrointesztinális csatornában, mely szekunder vashiányhoz vezethet, a vas direkt veszteségén keresztül. Tehát a betegség relapsusa esetén sem a vérzés miatt kialakuló anémia volt a meghatározó, hiszen ebben az esetben a hepcidin mennyiségének emelkedni kellett volna.

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

## **2. RNáz L inhibitorral végzett kísérleteink**

A munkánk során elvégzett kísérletekkel sikerült az RNáz L Inhibitornak egy eddig nem ismert funkcióját, az unfolded protein response-ban betöltött szerepét bizonyítani emlős sejt kultúrákban. Ezen kívül megállapíthatjuk az eredményeink alapján, hogy az Rli hiány által indukált UPR HeLa sejtekben hatással van a HAMP gén expressziójára, így a vas anyagcsere szabályozó hepcidin hormon mennyiségére. Három különböző sejtvonalban vizsgáltuk az Rli mRNS-ének mennyiségét, ezek közül kettő karcinóma eredetű sejtvonal volt. A tumoros sejtvonalakban, a HeLa-ban és a HepG2-ben a WRL-68 májsejtvonalhoz képest jelentősen

magasabb volt az Rli fehérje expressziója. Ez magyarázható egyrészt azzal, hogy a magas proliferációs aktivitást mutató és/vagy malignus transzformáción átesett sejtekben fokozott az anyagcsere, több fehérje termelődik és fokozott mértékű a transláció is, amelyben az Rli-nek fontos szerepe van. Ennek a folyamatnak a pontos tisztázásához azonban további kísérletek szükségesek.

Az Rli esszenciális funkcióját, a translációban betöltött szerepét, elsőként élesztő sejtekben írta le részben munkacsoportunk, részben Yaurin, Dong és munkatársaik. Ismert tény, az is, hogy az emlős sejtekben szintén szerepe van a fehérjeszintézisben. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy HeLa sejtekben, az élesztő sejtekhez hasonlóan, az Rli fehérje szintjének csökkenése csökkentette az újonnan szintetizálódó fehérjékbe történő metionin beépülést. Ez egy általános hatás, mely minden fehérje szintézisét károsan érintette az Rli depletált sejtekben. Érdekes eredmény, hogy a humán RNáz L Inhibitor a magas fokú szerkezeti és funkcionális hasonlóság ellenére sem képes komplementálni az élesztőben az Rli1p hiányát. Tet-Rli sejteken végzett kísérleteinkkel igazoltuk, hogy az N-terminálison az első 173 aminosavat tartalmazó régió lecserélése nem jár letális következményekkel, és csak ezek, az általunk 4-esnek jelzett kiméra sejtek képesek Doxycyklin jelenlétében növekedni, az élesztő Rli1p-t komplementálni. Ezzel ellentétben, ha az N-terminális közelében lévő első, a két fajban eltérő régiót a humán szekvenciával helyettesítjük (5-ös, 6-os kiméra), olyan változás jön létre, mely a sejtek számára letális hatású. Hasonló következményekkel jár, ha a C-terminális közelében lévő eltérő szekvenciát cseréljük humán eredetűre. Összegezve elmondhatjuk, hogy a két szekvencia nagyfokú hasonlósága ellenére csak egy rövid szakasz helyettesíthető humán szekvenciával az élesztő sejtekben, anélkül, hogy funkció kiesés alakulna ki. Ez valószínűleg a magasabb rendű struktúrát befolyásoló változásokkal magyarázható.

Az Rli unfolded protein response-ban betöltött szerepét korábban már igazoltuk élesztő sejtekben. Tet-Rli sejtekben Doxycyklin kezelést követően a Kar2p fehérje szint az Rli1p mennyiségének csökkenésével párhuzamosan növekedést mutatott és a Hac1 intront már nem tartalmazó, processzált mRNS-e volt kimutatható, azaz az UPR aktivációját láttuk. Ezek alapján megvizsgáltuk humán sejtvonalakban is az Rli ilyen irányú funkcióját. Eredményeink azt mutatják, hogy Rli depléción esetén az XBP mRNS-ének fokozott hasítódását figyelhetjük meg, tehát az UPR fokozott aktivitással működik. Ha az Rli depletált sejteket az endoplazmatikus retikulum stresszét kiváltó anyagokkal (tapszigargin, DTT) kezeljük, ez a változás még jelentősebb lesz. Irodalomból ismert adat, hogy az UPR aktiválódása a hepcidin expresszió fokozódásához vezet. Mivel nem minden mechanizmussal kiváltott unfolded protein response idézi elő a fenti hatást, megvizsgáltuk, hogy vajon az Rli expresszió csökkenése által kiváltott UPR aktiváció jár-e következményes hepcidin mRNS szint növekedéssel. Az a megfigyelésünk, hogy ez a kapcsolat valóban fennáll, azaz az Rli szint csökkenése a hepcidin expresszió fokozódását idézi elő, felveti a kérdést, hogy esetleg a vas-kén komplex szintézis és a hepcidin szintézis között van szoros összefüggés. Erre a lehetőségre utal az is, hogy az Rli mennyiségének csökkenése a mitokondriális vasanyagcserét befolyásoló komponensek változását is előidézi. Feltételezzük, hogy a mitokondriális vasanyagcsere (ahol a hem és a vas-kén komplex is szintetizálódik) szabályozásának változása a hepcidin szintézis legfőbb sejten belüli befolyásoló tényezője. A hepcidin szint emelkedésének következménye a vas sejten belüli szekvesztrációja. Feltételezésünk, hogy az Rli mennyiségének csökkenését a sejt a mitokondriális bioszintetizáló folyamatok, köztük a vas-kén komplex szintézis károsodásaként érzékeli, ezért a hepcidin szintézis fokozásával a vas sejten belül tartására törekszik. Elméletünk bizonyítására további kísérletek elvégzése szükséges.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az RNáz L inhibitor fehérjével kapcsolatban új megfigyeléseink az alábbiak: tumoros eredetű sejt kultúrákban az Rli expressziója fokozott az

embrionális sejtekhez képest; az Rli expressziójának csökkentése humán sejtekben nemcsak a fehérjeszintézis általános csökkenéséhez, hanem az unfolded protein response aktiválódásához is vezetett; az Rli mennyiségének csökkenése a humán sejtekben mindamelllett a hepcidin expresszióját is befolyásolta.

## **Összefoglalás**

- 1.** A két, gyulladós bélbetegségben szenvedő betegcsoport laboratóriumi eredményeit megvizsgálva elmondhatjuk, hogy a gyulladós paraméterek (C-reaktív protein, süllyedés) szignifikánsan magasabbak, mint a kontroll csoportban, attól függetlenül, hogy a nemzetközileg elfogadott kérdőívek alapján számított, a terápiát is befolyásoló aktivitási index alapján remisszióban voltak-e a betegek vagy sem. Mind a colitis ulcerosás, mind a Crohn-betegek esetében alacsonyabb volt a szérum vas szintje a transferrin és a transferrin szaturáció, mint az egészségesek esetében.
- 2.** A Crohn-betegekben korrelációt találtunk a szérum prohepcidin és a transferrin, transferrin szaturáció, a teljes vaskötő kapacitás és az aktivitási index között. Ezzel szemben colitis ulcerosában szenvedőknél csak a transferrin szaturáció és a transferrin mutatott kapcsolatot a szérum prohepcidin szinttel. Ezek alapján elmondható, hogy a prohepcidin szint meghatározása alkalmas a vérszegénység nyomon követésére ebben a betegcsoportban is.
- 3.** Tumoros eredetű sejt kultúrákban az RNáz L Inhibitor expressziója az embrionális sejt vonalakhoz képest fokozott.
- 4.** A humán és élesztő Rli szekvenciájának nagyfokú a hasonlósága ellenére egy rövid szakasz helyettesíthető humán szekvenciával az élesztő sejtekben, anélkül, hogy funkció kiesés alakulna ki, mely letális hatással jár. Ez valószínűleg a magasabb rendű struktúrát befolyásoló változásokkal magyarázható.
- 5.** Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy HeLa sejtekben, az élesztő sejtekhez hasonlóan, az Rli fehérje szintjének csökkenése csökkentette az újonnan szintetizálódó fehérjék mennyiségét.
- 6.** Vizsgáltuk az RNáz L Inhibitor szerepét az unfolded protein response folyamatában. A fehérje hiányában az UPR fokozott aktivitással működik. Abban az esetben, ha az Rli depletált sejteket UPR-t aktiváló anyagokkal kezeljük a változás még jelentősebb mértékű.
- 7.** Elmondhatjuk, hogy a vasanyagcsere szabályozó hormon, a hepcidin expressziójára hatással van az RNáz L Inhibitor hiánya által indukált UPR.

## **Köszönetnyilvánítás**

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

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

**Ph. D. Thesis**

**The examination of iron metabolism in chronic inflammatory bowel disease  
and the functional analysis of RNase L Inhibitor**

Judit Nagy M.D.

Program leader: Gábor L. Kovács M.D., DSc  
Supervisor: Katalin Sipos M.D., Ph.D.

University Pécs  
Faculty of Medicine  
Department of Laboratory Medicine



Pécs, 2012.



## Abbreviations

**ABC** ATP binding cassette, **ATF6** activating transcription factor 6, **CD** Crohn's disease, **c/EBP $\alpha$**  CCAAT/enhancer-binding protein alpha, **CREBH** cyclic AMP response element-binding protein H, **DCYTB** Duodenal cytochrome B, **DMT1/Nramp2** divalent metal transporter 1/ natural resistance-associated macrophage protein 2, **DTT** Dithiothreitol, **ELISA** enzyme-linked immunosorbent assay, **EMEM** Eagle's minimal essential medium, **EOR** endoplasmic reticulum overload response, **ER** endoplasmic reticulum, **FBS** foetal bovin serum, **HAMP** hepcidin antimicrobial peptide, **IL-6** interleukin-6, **IRE** iron responsive element, **IRP** iron regulatory protein, **LPS** lipopolysaccharid, **MMD** yeast minimal medium, **NBD** nucleotide-binding domain, **NOD2/CARD15** nucleotide-binding oligomerization domain containing 2/caspase recruitment 15, **PMSF** phenylmethanesulfonylfluoride, **Rli** RNase L inhibitor, **SDS-PAGE** sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, **SERCA** sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, **STAT3** signal transducer and activator of transcription 3, **TfR** transferrin receptor, **UC** ulcerative colitis, **UPR** unfolded protein response, **UPRE** unfolded protein response element, **XBP** X box binding factor 1, **YNB** yeast nitrogen base, **YPD** Yeast Peptone Dextrose (media for growing yeast).

## Introduction

Iron is one of the essential elements in all organisms. In mammals the majority of iron is incorporated into heme and iron-sulfur clusters, which molecules besides other functions are essential in respiration. The blood iron level in mammals is regulated by the peptide hormone hepcidin which is synthesized predominantly in the liver as an 84 amino acid preprohepcidin encoded by *HAMP* gene. Following cleavage and maturation the 25 amino acid active hormone is secreted into the blood. The main action of hepcidin is its binding to ferroportin, the only known iron exporter molecule, causing the internalization and degradation of ferroportin. The consequences of this mechanism will be the reduction of iron export from enterocytes, hepatocytes, and macrophages which process will lead to blood iron level decrease. The regulation of hepatic expression of hepcidin is controlled by the body iron status, anemia, hypoxia and inflammations.

Hepcidin is synthesized in the liver as a prohormone, secreted as a 60 amino acid (AA) prohormone, and processed by furin to a 25 AA mature hormone. The details of this cleavage are not known yet, one possible regulator is alpha-1 antitrypsin which can bind to the prohormone and inhibits the maturation process. The mature hepcidin binds to its receptor ferroportin, an iron exporter transmembrane protein, which is found in the intestine, placenta and macrophages. The increased level of hepcidin blocks the iron absorption in the intestine and the iron release from the macrophages through the internalization of ferroportin, thus lowering the serum iron content. During inflammation body iron homeostasis is damaged and anemia will develop as a consequence of the illness. One of the major mediators of

inflammatory response is IL6 cytokine which is produced by macrophages and T cells. This cytokine induces the expression of the majority of acute phase proteins including hepcidin. This transcriptional regulation eventuates through the classical JAK-STAT pathway.

Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are the two most frequent chronic inflammatory bowel diseases (IBDs). They affect mainly children and middle-aged adults in the well-developed countries. In Crohn's disease any part of the gastrointestinal tract may be involved but most often the small bowel and sometimes the colon, therefore the presence of impaired absorption may occur. In ulcerative colitis the inflammation is limited to the large bowel. In the two diseases the histological findings are the following: in colitis ulcerosa only the mucosa and the submucosa are affected, while in Crohn's disease transmural inflammation is observed. Despite some fundamental differences in the characteristics of the two conditions, they have a few features in common. Clinical manifestations could be similar: abdominal pain, diarrhea, changes in certain laboratory parameters. The etiology of these disorders is complex. There are theories assuming that the development of IBD is the result of an inappropriate immune response to microorganisms.

In both conditions hypochromic anemia and low serum iron level will arise with time. The reasons of these complications are frequent intestinal bleedings, malabsorption, and the high level of inflammatory cytokines which contribute to the so called anemia of chronic disease or anemia of inflammation.

The development of anemia of chronic disease (ACD) is the result of numerous factors. One of them is hepcidin, a peptide hormone which is the main regulator of iron homeostasis. Hepcidin mRNA expression is regulated by the iron status of the body, hypoxia, and inflammation. Besides playing an important part in iron metabolism, hepcidin also has a direct antimicrobial effect.

Lately it has been proved that other pathways for hepcidin induction exist which act through the activation of unfolded protein response (UPR). ER stress induced transcription factors CHOP, C/EBP $\alpha$  and CREBH are described to be involved in *HAMP* gene transcription activation. The activation of UPR in mammals is generated through the action of ER stress sensors IRE1, ATF6 and PERK. They all have influence on downstream signaling molecules. IRE1 is built up of four distinct domains. The N-terminal ER luminal domain is proposed to sense the accumulation of unfolded proteins. Beside a transmembrane domain IRE1 contains a cytoplasmic kinase and an endonuclease domain. The kinase domain is responsible for the autophosphorylation of Ire1p which will lead to the activation of the endonuclease domain. The substrate of the endonuclease domain is the mRNA of Xbp which will be spliced as the result of the enzymatic activity of Ire1p. The spliced form of Xbp is an active transcription factor which is able to bind to the promoters of ER chaperones and ERAD components. Within the cells the major site of iron assembling into molecules is the mitochondria. Iron-sulfur clusters for extramitochondrial proteins are build in the mitochondria as well. So far the only essential cytosolic iron-sulfur protein, which is not involved in the iron-sulfur cluster biosynthesis is the RNase L inhibitor, Rli. First Rli was recognized as the inhibitor of RNase L, an 2-5A activated nuclease, which degrades single-stranded viral and cellular RNAs. Later it became obvious that Rli has functions in almost every step in translation: ribosomal RNA

maturation and export, cytosolic ribosome biogenesis, translation termination and ribosome recycling.

It is noteworthy to mention that RNase L has a kinase-like and an RNase domains which show sequence similarities to the kinase and nuclease domains of Ire1p. It is tempting to suppose that Rli may have inhibitory effect on the activity of Ire1p. In this paper we present a novel function of human Rli, the involvement in the activation of UPR. We prove that after the reduction of Rli expression in HeLa cells, the amount of spliced *XBP* mRNA significantly increases in the cells. Also it was demonstrated by us that low level of Rli1p in HeLa cells gave rise to increased *HAMP* gene expression. This latter observation may indicate a connection between iron-sulfur cluster biosynthesis and hepcidin expression regulation.

## Aims

1. Our study aimed at unraveling whether the serum prohepcidin level can provide a useful diagnostic parameter in Crohn's disease and colitis ulcerosa.
2. Structural analysis of human and yeast Rli: the differences and their consequences.
3. Examination of already known yeast functions of Rli in human cells in protein synthesis, ribosome assembly and unfolded protein response.
4. Relationship between the expression of hepcidin and the activity of unfolded protein response.

## Results

### 1. Measure of serum prohormone concentrations in two inflammatory bowel diseases

114 patients participated in our clinical and laboratory studies including 12 healthy volunteers (control group). Of the 114 patients 72 (42 women and 30 men) were diagnosed with ulcerative colitis, while 30 patients (15 women and 15 men) suffered from Crohn's disease. The mean age of the study group was 41.375 years (range 19-84 years). Serum samples were collected and clinical parameters were obtained from each participant. All the patients and the volunteers were informed about the study and gave written informed consent in accordance with the regulations of the local Ethics Committee. Crohn's disease and ulcerative colitis activity indexes were calculated according to published methods. Serum prohormone concentrations were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay, Hepcidin Prohormone ELISA kit (DRG International, Inc., USA) according to the manufacturer's protocol.

Of the serum factors indicating the presence of inflammation C-reactive protein level and the erythrocyte sedimentation rate were significantly higher ( $P < 0.01$ ) in both disease groups than in the healthy people. Among the parameters revealing the iron supply of the patients only serum iron level ( $P < 0,001$ ) and transferrin saturation ( $P < 0.01$ ), a derivative of this value were significantly lower in people suffering from CD or UC compared to healthy controls.

61.5% and 44.4% of the patients with CD and UC, respectively, had serum iron level below 14 $\mu$ mol/L, the others presented the normal values. We performed statistical analyses of these subgroups. However, this division did not change the correlations discussed above.

The other laboratory parameters determined (leukocyte count, serum albumin, total iron-binding capacity, hemoglobin, and transferrin) were in the normal range in most cases, but showed relatively high standard deviations in both groups. Prohepcidin levels measured by competitive ELISA did not show statistical differences between CD and UC patients or healthy and ill persons. Elevated prohepcidin levels (>240 ng/mL) were measured in the 19.38% of the patients, while 9.8% had reduced prohepcidin levels (<80 ng/mL).

Endoscopic control examinations were not carried out routinely. The calculated activity indexes were based on clinical parameters. Regarding the activity indexes few patients were in active status of the diseases (AI>150), only 19.38% of the two groups (4 patients with CD, 15 patients with UC). The majority of the patients (80.6%) were in remission.

Serum transferrin levels and transferrin saturation significantly correlated with prohepcidin levels in CD (P=0.04) and showed weaker correlation in UC (P=0.05). The total iron binding capacity showed low correlation with prohepcidin levels in CD patients (P=0.05). There was no significant correlation between the levels of prohepcidin and serum iron or hemoglobin contents in neither of the diseases.

Although C-reactive protein levels and erythrocyte sedimentation rates were significantly higher in UC than in the healthy controls, these parameters did not show any correlation with prohepcidin measurements (P>0.05). The activity indexes, leukocyte count and albumin levels were not correlated with serum prohepcidin level, either (P>0.05).

In the case of Crohn's disease, there was a positive but weak correlation between prohepcidin levels and the activity index. Serum albumin also correlated weakly with prohepcidin levels. Serum transaminase activities were found in the normal range in the majority of the cases (data not shown).

## **2. Study with RNase L Inhibitor**

### **2.1. Comparison of human and yeast Rli protein sequences**

As human Rli was not able to complement its yeast homologue, we focused on and analysed the sequence similarities of these proteins. The protein sequence alignment was performed by ClustalW software and the result was analysed with GeneDoc program. The statistic report indicated 67% homology/identity and 82% similarity and revealed 18% difference between the two Rli proteins. The difference in protein length was 9 AA (1%). We found two larger regions closer to the N terminus showing high divergence, in addition to a moderately divergent region closer to the C terminus, while the rest of the sequences seemed to be highly conserved.

## 2.2. Human Rli cannot complement Tet-Rli in budding yeast cells

Previous studies have revealed that the deletion of Rli1p gene in *Saccharomyces cerevisiae* is lethal. Therefore, to be able to investigate the lack of Rli1p, we have previously constructed a yeast strain (Tet-Rli) in which Rli mRNA level was controlled under a tetracycline-repressible promoter. On rich medium, in the presence of tetracycline derivative doxycycline, Tet-Rli cells exhibit growth arrest because of the decreased Rli1p level. As yeast and human Rli proteins share high level of homology it was tempting to try whether the human protein will compensate for the reduced level of Rli1p in yeast cells. In the complementation assay Tet-Rli yeast cells were transformed with yeast Rli1/pRS424 or human Rli/pRS424 expression vectors then treated with doxycycline. The Tet-Rli yeast cells exhibited strong growth after transformation with yeast Rli/pRS424 in the presence of doxycycline. By contrast, the cells expressing the human Rli protein did not grow in the presence of doxycycline, indicating, that the expression of human Rli protein could not compensate for the lack of the original yeast Rli1p.

## 2.3. The role of highly divergent regions in the function of Rli1p

Rli proteins are composed of four main domains, two ABC-type nucleotide binding domains (NBD) and two cysteine-rich motifs at the N-termini which bind two iron-sulfur clusters. To find out which region is responsible for the functional differences between the human and the yeast homologue, we created six chimera proteins, in which the fusion regions were not at the domain limits but according to the highly conserved sequences. Therefore, the N termini of chimera 1, 3 and 5 contain the yeast sequences until AA 173, AA 221 and AA 372, and these sequences were fused with the 435, 387 and 236 AA long C termini of human Rli sequence, respectively. Chimera 2, 4, and 6 consist of the human Rli sequences at their N termini, so their sequences started with the first 173, 221 and 372 AA of the human Rli sequence, which were fused with the 435, 387 and 236 AA long C termini of the yeast Rli1p, respectively.

These newly constructed chimeras were used in the complementation experiment/assay. We cloned all the six chimera sequences into pRS424 yeast expression vector and transformed them into Tet-Rli cells, then these strains were grown on Doxycycline containing rich medium.

Our results indicate that the first 173 AA region is not responsible for the functional differences at all, as replacing this part in the yeast protein with the human counterpart sequence did not have fatal consequences (ch 4). Contrary, when we replaced the N terminal part of yeast protein containing the first divergent region with its human counterpart (ch 5), or when we replaced the yeast C terminal 236 AA (including a divergent region) with its human counterpart (ch 3), the result of the complementation experiment showed, that these regions were indispensable for the yeast protein, because none of the above chimeras could grow in the presence of doxycycline. However, these regions alone were not sufficient for the yeast cells, as neither chimera 2 containing the first divergent yeast region, nor chimera 6 containing the third yeast region could successfully replace the original Rli1p. In case of the

second divergent region our results suggest that this region is not enough for the complementation even in combination with the first or with the third region (ch 3 and ch 5).

These data clearly declare, that despite their overall high homology, Rli1p contains more highly divergent regions indispensable for the function of the yeast protein. All these divergent regions are crucial, as replacing them with the human counterpart sequence failed yeast growing in each cases. This raises the possibility that not just one specific region, but rather the the higher molecular structure of Rli proteins are responsible for the functional differences.

#### 2.4. Effects of Rli chimera proteins on ribosomal RNA content of Tet-Rli1 cells

Next we examined the effects of chimera Rli proteins expression on ribosomal RNA levels in Doxycycline treated Tet-Rli1 cells. Yeast cells were transformed with expression vectors as before and total RNA were isolated from the Tet-Rli1 cells. RNA was loaded onto agarose gel and 18 S and 28 S rRNAs were visualized by ethidium bromide staining. Similarly to the previous experiment, only two strains had normal rRNA content: one which was transformed with yeast Rli1-pRS424, the other with that chimera (ch4) expressing vector, the only which was able to complement Rli depletion in Tet-Rli1 cells. We obtained similar results when we measured the ribosomal RNA levels of the strains using real time PCR. Similarly to the result of the complementation assay, only two strains had normal rRNA content: the strain in which the original yeast Rli1p was overexpressed and in which that chimera Rli was overexpressed, which was able to compensate for the loss of the original Rli1p (ch4). We obtained similar results when we measured the ribosomal RNA levels of the strains using real time PCR.

#### 2.5. Downregulation of Rli in HeLa cells

For the examination of the consequences of reduced level of Rli in mammalian cells, first we compared the two most widely used gene-silencing methods in mammalian cell lines: the antisense technique and the siRNA method. HeLa cells were transfected with an antisense Rli plasmid construct or with purified diced siRNA, cells were collected after 12 h or 24 h transfection, and Rli mRNA level was determined by real time PCR. Rli mRNA levels were diminished by both transfection methods, especially after 24 h. Even after 12 h transfection the Rli mRNA levels were reduced, and 24 h treatment gave significant Rli protein level reduction compared with the untreated cells suggesting that both methods are equally suitable for the Rli level reduction in HeLa cells. Northern blot of HeLa cells transfected with antisense Rli (RAS) and Rli dicer for 24 h. Beta actin mRNA was used as loading control. To find the most powerful method to reduce the level of Rli in HeLa cells, we compared the endogen Rli protein level of three different human cell lines: HepG2, a hepatoma cell derivative, WRL68, an embryonic hepatic cell line, and HeLa cancer cell line. We performed Western blot analysis using anti-human Rli antiserum (data not shown). After loading equal amounts of total proteins onto SDS gels, the extract of HeLa cells gave the strongest reaction with anti-human Rli antiserum, suggesting that the expression level of Rli protein is the highest in HeLa cells among these three cell lines.

## 2.6. Protein synthesis is diminished in HeLa cells after decreased Rli expression

The yeast Rli1p has been demonstrated to perform in protein translation and ribosome biogenesis. The human homologue, ABCE1 was just recently proved to interact with eukaryotic initiation factors. To obtain further evidences, that the human Rli may be of importance for translation, we decreased Rli protein level of HeLa cells. After 24 h transfection with either antisense Rli/pCDNA 3.1 plasmid or purified diced siRNA HeLa cells were incubated with Isolabel <sup>35</sup>S-Methionine. Protein concentrations of cell lysates were determined and equal amounts of protein samples were loaded onto SDS gel. This reduction of translational efficiency is a general effect, and strengthens the fact that the depletion of Rli protein impairs protein synthesis in human cultured cells.

## 2.7. Effect of Rli depletion on the expression of ribosomal components in HeLa cells

Even though, the role of yeast Rli1p in ribosome biogenesis has been previously demonstrated, the role of the human homologue ABCE1 in the same process is still unknown. Since the two proteins share high homology and the human RLI was proved to be needed for translation, it is tempting to examine the possible role of this protein in the maturation of ribosomes. Hence, we analysed the consequences of human Rli protein depletion onto ribosomal RNA and protein content of HeLa cells. After Rli depletion total RNA was extracted, and ribosomal RNA levels were determined by Northern blot analyses and by real time PCR. The result of the Northern blot illustrates that Rli protein depletion caused reduced 5.8 S and 18 S rRNA expressions, and we obtained similar results with real time PCR concerning rRNA levels. It is intriguing that the mRNA levels of both ribosomal subunit proteins (Rpl 30 and Rps 3) increased following Rli protein depletion. These data suggest a role for human Rli in ribosome biogenesis similar to its yeast homologue.

## 2.8. Activation of XBP mRNA splicing, UPR in HeLa cells transfected with antisense-Rli

As yeast and human Rli do not complement each we searched for functional differences between the two proteins. Interestingly RNase L and IRE1p, which is one of the stress sensors of UPR, share a homology on their C-terminal part: the kinase and endonuclease domains of IRE1 are very similar to the kinase-like and nuclease domains of RNase L. We were curious whether because of this structural similarity human Rli1p may take part in the process of unfolded protein response (UPR).

To induce UPR, HeLa cells were treated with thapsigargin or with DTT. Thapsigargin treatment reduces ER Ca<sup>2+</sup>-content, while DTT disrupts disulfide bonds in proteins triggering UPR. To follow UPR activation we determined total and spliced XBP mRNA levels by real time PCR. As it is seen on Fig 7 thapsigargin treatment caused 7-fold increase in XBP mRNA level, while the spliced XBP mRNA level rose 80-fold compared to the untreated cells. Upon DTT treatment we gained (obtained) the same effect on the levels of total and spliced XBP mRNA (of HeLa cells).

When HeLa cells were transfected with Rli antisense pCDNA3.1 and XBP (total and spliced) mRNA levels were measured with real time PCR, we observed the elevation of both types of mRNA the same way as in case of thapsigargin treatment. When thapsigargin was added together with Rli antisense transfection, the two effects. Taken together, these data led us to conclude that diminished Rli expression activates UPR in mammalian cells.

### **3. Activation of UPR had influence on hepcidin expression in HeLa cells**

Lately there are evidences in the literature that the expression of hepcidin, the iron regulatory hormone of mammals is under the control of ER stress. It seems that the different effects which lead to UPR activation may influence hepcidin transcription through different intracellular signaling pathways. We wondered whether UPR activation via Rli depletion can cause the induction of hepcidin synthesis. To verify this assumption, we isolated total RNA from Rli antisense transfected or thapsigargin treated HeLa cells and analysed the expression of HAMP mRNA by real time PCR. Interestingly, thapsigargin treatment of HeLa cells by itself led to no change (did not change the level of hepcidin mRNA) in hepcidin mRNA level, while Rli depletion resulted in more than 4-fold increase in HAMP mRNA level. From these results we concluded that hepcidin expression is not increased by every type of UPR upregulation, but Rli depletion is one of the factors which can effect the HAMP gene transcription.

## **Discussion**

### **1. Serum prohepcidin measurement in two inflammatory bowel diseases**

The present study was undertaken to clarify whether prohepcidin ELISA measurement can provide some useful information on IBD. Our plan was to reveal any difference in the prohepcidin levels in colitis ulcerosa and Crohn's disease. Another aim of this study was to find relationship between prohepcidin serum levels and the development of anemia or presence of inflammation in chronic bowel diseases.

Patients with IBD demonstrate laboratory features of acute phase reaction and histological signs of leukocyte migration of the intestine. Normally the mucosal immune system generates immune response against pathogenic material while maintaining tolerance to self-antigens. Part of the unspecific antimicrobial system of mucosal cells in mammals is the peptide family of defensins. Hepcidin and defensins possess similar synthetic pathways and higher structures, like hairpin-shape molecules with 3-4 intramolecular disulfid bridges. In IBD levels of certain defensins are diminished, which raised the possibility that defensins may be involved in their pathogenesis. Though hepcidin has a definite antimicrobial activity, in this case its iron metabolism regulator effect is determinant.

Hepcidin is the major hormone regulator of iron homeostasis. This peptide is synthesized in the liver as an 84 amino acid preprohormone, and targeted at the secretion



pathway by a 24 amino acid N-terminal targeting sequence. The resulting 60 amino acid prohepcidin is processed further into mature C-terminal 25 amino acid active peptide.

The present study was also meant to find out whether the serum prohepcidin level could be used as a diagnostic or prognostic factor of Crohn's disease and colitis ulcerosa. We sought for any correlations between serum prohepcidin levels and laboratory parameters of iron homeostasis (serum iron, total iron binding capacity, hemoglobin, transferrin, and transferrin saturation), inflammatory parameters (C-reactive protein, leukocyte count, and erythrocyte sedimentation rate) or activity indexes.

A large number of previous studies deal with chronic disorders accompanied by iron metabolism disregulation especially by apparent anemia. A number of authors have tried to find relationship between prohepcidin or hepcidin serum levels and various laboratory parameters in hepatic cirrhosis, chronic renal failure, malignant diseases, rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus (SLE). In general, serum prohepcidin levels and hepcidin mRNA expression are decreased in hepatic illnesses (hepatocellular carcinoma, alcohol induced cirrhosis, chronic hepatitis C). In chronic renal failure the levels of prohepcidin and mature hepcidin are elevated. In the case of tumours other than hepatocellular carcinoma hepcidin expression is up-regulated, leading to anemia of chronic disease.

Recent studies indicate that in two chronic inflammatory diseases, rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus the prohepcidin levels do not correlate with the disease activity scores, hemoglobin, serum iron and cytokine levels. In patients suffering from RA with high levels of ferritin correlations between serum prohepcidin level and IL-6 or rheumatoid factor titer were found.

In IBD patients included in the present study the C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate are significantly higher, while serum iron levels and transferrin saturation are significantly lower than the same parameters of the control (healthy) group. We demonstrated correlation between serum prohepcidin level and transferrin, transferrin saturation, total iron binding capacity, activity index and albumin in CD, and transferrin, transferrin saturation in UC. We did not carry out serum ferritin level determinations routinely, as in this study a relatively large number of patients were involved for several years. The relationship between prohepcidin and serum ferritin is already known, we were interested in uncovering new correlations.

However, it seems that the prohepcidin measurement itself does not provide useful information on the CD or UC status. It is known that the regulation of hepcidin expression is complex, the most important factors which determine serum hepcidin levels are the intracellular iron content, serum iron level, and inflammatory factors. While these stimuli have unequal relative weight, the effect of one can overrule that of another. The situation is more complex if we consider that hepcidin expression control is different in hepatic and erythropoietic cells. It is also recognized that serum hepcidin level may change rapidly, and hepatic hepcidin expression modifications are not always followed by peptide level shift. Further investigations are necessary to measure hepcidin in the blood and/or in the urine. These data are currently gathering and with time the conclusion will be clear.

## 2. Experiments with RNase L Inhibitor

In our study we presented a novel function of human RNase L inhibitor in the unfolded protein response of mammalian cultured cells. We also demonstrated that UPR activated by diminished Rli1p expression in HeLa cells has an effect in HAMP gene expression. This gene is encoded by hepcidin, the major iron metabolism regulator hormone in mammals.

We compared Rli mRNA levels in three different laboratory cell cultures, two of which originated from carcinomas. It is worth to mention that Rli protein expression was definitely higher in tumorous cell cultures than in the WRL 68 cell line. This raises the possibility that in cells with high proliferation activity and/or malignant transformation the Rli1p level is elevated. For the explanation of this phenomenon further experiments are needed.

The essential function of Rli1p in different steps of translation was first proved in yeast, but now it is obvious that Rli is indispensable in the protein synthesis of mammalian cells. In this report we demonstrated that the depressed Rli protein level concluded in reduced methionine incorporation into newly synthesized proteins in HeLa cells. This was a general effect, the synthesis of every types of proteins became defected in Rli-depleted HeLa cells. It seems intriguing that besides the above mentioned functional similarities of yeast and human Rli proteins, the latter one is not able to complement the Rli1p depressed yeast strain, though the two proteins possess high degree of structural relationship. It is feasible that the higher structure of human Rli protein differs from its yeast relative, which can cause functional differences.

During seeking for another potential interaction partner for Rli1p we became interested in IRE1. This protein is one of the mammalian ER stress sensor molecules located in the ER membrane. The cytoplasmic domain of IRE1 contains a kinase and an endonuclease domain, which feature both structural and functional similarities to those of RNase L. As human RLI is a known binding partner of RNase L, it is conceivable that Rli may have interaction with IRE as well.

In our experiments of Rli deprived HeLa cells we observed seven-fold increase of XBP mRNA and eighty-fold elevation of spliced XBP mRNA level compared to the untreated cells. Randal et al demonstrated that dimerized IRE1 caused XBP mRNA splicing in the cytoplasm without UPR activation. Similarly, by reducing Rli in HeLa cells, the RNase activity of IRE1 may be activated.

Just like in 2'-5' A pathway, where Rli binds to and inhibit the endonuclease activity of Rnase L, Rli may bind to IRE1, as well. This interaction may protect the dimerization of IRE1, thus may regulate its endonuclease activity. However, there is no direct proof of direct binding between these proteins, it is ceasable, that Rli may work as a potent inhibitor of IRE1 protein. It is not clear yet what is the exact relationship between Ire1 and Rli proteins. We are not aware of any direct connections between Ire and Rli molecules but this binding may exist in the cells as the endonuclease domain of Ire1p is located in the cytoplasm. By diminishing the amount of Rli, the RNase domain of Ire may become „unprotected”. The outcome of such an event can be the unleashing of RNase activity of Ire1p.

Lately two independent studies revealed a connection between UPR activation and HAMP gene expression. In Science 2009 the authors demonstrated hepcidin expression induction following different treatments by ER stressors. The expression of mRNA from HAMP gene increased as the result of each chemical addition. Another group administered DTT to HepG2 cells and demonstrated hepcidin expression elevation. Others demonstrated increased hepcidin expression after DTT treatment. In our work we proved that the essential iron-sulphur protein Rli deprivation not only activated UPR pathway in HeLa cells, as shown in increased level of spliced XBP mRNA, but hepcidin gene expression was also induced. We do not know the exact explanation of this phenomenon at the moment, but we have preliminary experimental data which suggest a link between mitochondrial iron supply and hepcidin expression. The correct explanation of this phenomenon is not known so far, although we have preliminary data suggesting a link between hepcidin expression and mitochondrial iron supply. It seems possible that the Rli protein reduction may cause mitochondrial iron homeostasis disturbance which can lead to elevated hepcidin expression. Further studies are needed to elucidate this regulatory mechanism.

## **Summary**

1. Of the serum factors indicating the presence of inflammation C-reactive protein level and the erythrocyte sedimentation rate were significantly higher in both disease groups than in the healthy control group. The serum iron level and transferrin saturation were significantly lower in people suffering from CD or UC compared to healthy controls.
2. Serum transferrin levels and transferrin saturation significantly correlated with prohepcidin levels in CD and showed weaker correlation in UC. The total iron binding capacity showed low correlation with prohepcidin levels in CD patients. In the case of Crohn's disease, there was a positive but weak correlation between prohepcidin levels and the activity index.
3. The expression of RNase L inhibitor is elevated in tumor cell lines compared to embryonic cell lines.
4. Although it the difference between the yeast and human Rli proteins is only 18%, the expression of human Rli protein could not compensate the lack of the original Rli1p in yeast.
5. The depletion of Rli protein impairs protein synthesis in human cultured cells; the reduction of translational efficiency is a general effect.
6. The results led us to conclude that diminished Rli expression activates UPR in mammalian cells.
7. The hepcidin expression is not increased by every type of UPR upregulation, but Rli depletion is one of the factors which can affect the HAMP gene transcription.

## **Acknowledgement**

My most sincere thanks and gratitude to Dr. Katalin Sipos for pushing me and supporting me continuously during my research. I would like to thank Prof. Dr. Attila Miseta and Prof. Dr. Gábor L. Kovács for managing our work and giving support and useful advices. I would like to thank Dr. Edina Pandur, Viktor S. Poór the support I received. I would like to express my gratitude to Ilona Hajnikné Gábor for their tireless assistance in the laboratory.

I would also like to thank all my colleagues at the Department of Laboratory Medicine, the Department of Biochemistry and Medical Chemistry, Department of Anaesthesia and Intensive Therapy.

Finally, I would like to thank my family for their patience, and support, without which this work would not have been possible.

## **Publikációs jegyzék/ Publications**

### **A disszertáció alapját alkotó közlemények/ Publications in topic**

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

**J. Nagy**, V. S. Poór, E. Pandur, B. Debreceni, Zs. Fekete, A. Miseta, K. Sipos: Connection of Rli expression to UPR activation in HeLa cells. 2012

### **Témához kapcsolódó egyéb tudományos közlemények/ Other publications**

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

E. Pandur, K. Sipos, **J. Nagy**, V.S. Poór, L. Grama, A. Miseta and Zs. Fekete: Prohepcidin binds to HAMP promoter and regulates its own gene expression in hepatocytes. 2012 JBC

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. 2012

### **Referált folyóiratban megjelent absztraktok/ Citable abstracts**

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

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

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

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

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

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

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

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

### **Témához kapcsolódó kongresszusi poszterek/ Posters**

Antus Zs., Sipos K., Fekete Zs., **Nagy J.** , Mártonfalvi Zs., Kispál Gy.: Az Rli1p szerepe az unfolded protein response-ban.

A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 8. Munkaértekezlete, Tihany, 2003. május 12–15.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Poór V. S.; Pandur E.; **Nagy J.** ; Sipos K.: A hepcidin és ferroportin expressziójának változása CaCo, WRL és HepG2 sejtekben

XVI. Nemzetközi Semmelweis Szimpózium és VI. Magyar Sejtanalitikai Konferencia Budapest nov. 15-17. 2007.

**Nagy J.** ; Lakner L.; Pandur E.; Poór V. S.; Mózsik Gy.; Sipos K.; Miseta A.: Prohepcidinszint meghatározása gyulladásoos bélbetegségekben

XVI. Nemzetközi Semmelweis Szimpózium és VI. Magyar Sejtanalitikai Konferencia Budapest nov. 15-17. 2007.

Pandur E.; **Nagy J.** ; Poór V. S.; Miseta A.; Sipos K.: A hepcidin és a ferroportin kapcsolatának vizsgálata BacterioMatch Two-Hybrid rendszerrel

38. Membrán-Transzport konferencia Sümeg máj. 20-23. 2008.

**Nagy J.** ; Pandur E.; Poór V. S.; Rab A.; Sipos K.; Miseta A.: C/EBP alfa és SMAD4 transzkripciós faktorok hatása a hepcidin expressziójára

38. Membrán-Transzport konferencia Sümeg máj. 20-23. 2008.

Poór V. S.; Pandur E.; **Nagy J.** ; Rideg O.; Miseta A.; Sipos K.: Protein-protein kapcsolatok vizsgálata BacterioMatch rendszerrel

38. Membrán-Transzport konferencia Sümeg máj. 20-23. 2008.

Pandur E., **Nagy J.** , Poór V.S., Rapp J., Miseta A., Sipos K., Fekete Zs.: A hepcidin gén (HAMP) expresszió szabályozásának új mechanizmusa hepatocitákban.

40. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg máj. 18-21. 2010.

Poór V.S., Pandur E., **Nagy J.**, Rác E., Miseta A., Sipos K.: A hepcidin és az alfa-1 savas glikoprotein interakciója

40. Membrán- Transzport Konferencia Sümeg máj. 18-21. 2010.

Pandur E., **Nagy J.** , Poór V. S., Rapp J., Mayer M., Miseta A., Sipos K.: A diszulfid-hidak szerepe a hepcidin-mediálta ferroportin internalizációban

41. Membrán- Transzport Konferencia Sümeg máj.17-20. 2011.

Poór V. S., **Nagy J.** , Pandur E., Debreceni B., Rác E., Mayer M., Sipos K.: Az RNáz L inhibitor szerepe az Unfolded Protein Response -ban

41. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg máj. 17-20. 2011.

Poór V. S. Pandur E., **Nagy J.**, Rác E., Miseta A., Sipos K.: A hepcidin és az alfa-1 savas glikoprotein kapcsolata

A Magyar Biokémiai Egyesület 2011. évi Vándorgyűlése Pécs aug. 28-31. 2011.

### **Előadások/ Oral presentations**

Sipos K.; Pandur E.; **Nagy J.** ; Poór V. S.: A hepcidin, egy vasanyagcserét szabályozó hormon jellemzése

37. Membrántranszport Konferencia Sümeg máj. 22-25. 2007.

V.S. Poór, E. Pandur, **J. Nagy**, A. Miseta, K. Sipos: New protein- protein interactions of the human hepcidin

The 5th International Conference of Postgraduate Medical Students Hradec Králové Czech Republic nov. 27-29. 2008.

Miseta A.; Pandur E.; **Nagy J.** ; Huszár A.; Sipos K.: Az alfa-1 antitripszin szerepe a hepcidin érésében

Erdélyi Múzeum Egyesület, Orvos és Gyógyszerésztudományi Szakosztály, XIX. Tudományos Ülésszak Marosvásárhely Románia ápr. 23-25. 2009.

Miseta A.; Pandur E.; **Nagy J.** ; Poór V.S.; Huszár A.; Sipos K.: Az alfa-1 antitripszin szerepe a hepcidin érésében

XI. Pécsi Hepatológia Nap Pécs máj. 23. 2009.