

OTKA zárójelentés

T 048793, 2005-2008.

Témavezető: Sipos Katalin

Kutatásaink során a hepcidin, egy májban szintetizálódó hormon hatásmechanizmusát és kölcsönhatásait vizsgáltuk. A hepcidin preprohormonként (84 aminosav: 84 AA) szintetizálódik a májban, és a furin nevezetű proteáz hatására prohormonná (60 AA) és érett hormonná (25 AA) hasad. A hepcidinnek kettős hatása van: egyrészt mikroorganizmusokat (egyes baktériumokat, gombákat) pusztít el, másrészt az emlős szervezet vasháztartásának fő szabályozója. Ez a két hatás részben össze is kapcsolódik, hiszen **a/** a fertőzéseket kísérő vashiányos anémia a mikrobák szaporodását is gátolja, és ezzel küzd a fertőzés okozója ellen, **b/** egyes intracelluláris kórokozók gyakrabban betegítenek meg olyan szervezeteket, amelyekben vasfelhalmozódás figyelhető meg.

A hepcidin vasanyagcserét befolyásoló szerepe a bélben való vasfelvétel, illetve a makrofágokból történő vaskibocsátás szabályozásán keresztül történik. A pályázat megírásakor a mi terveink között is szerepelt a hepcidin receptorának feltérképezése, de ezt nagyon korán egy amerikai kutatócsoport leírta. Ez a molekula a ferroportin, egy vas exportáló molekula, amely a bélhám sejtjeiben, a makrofágokban, a májsejtben és a placentában is megtalálható. A hepcidinnek azonban ezen kívül más fehérjével való kapcsolata nem vált ismertté, ezért kezdtük munkánkat annak felderítésével, hogy a hormon különböző érési alakjai mely proteinekhez kapcsolódnak *in vivo*. Ehhez a BacterioMatch nevű, bakteriális alapú 2-hibrid esszé rendszert alkalmaztunk. A 84 AA preprohepcidin több fehérjével is kapcsolódik, amelyek közül háromnak lehet fontos szerepe. Ezek a transthyretin, az α -1 savi protein és az α -1 antitripszin. Az első transzport fehérje lehet, amely a hormont (vagy előalakját) a plazmában szállítja, de ennek szerepét még nem vizsgáltuk. A legtöbb kísérletet az α -1 antitripszin (α -1 AT) és a hepcidin kapcsolatának vizsgálatára végeztünk. A BacterioMatch rendszerben az α -1 AT a prepro- és prohepcidinhez kötődött, az érett hepcidinhez azonban nem mutatott kapcsolódást. Emellett bebizonyítottuk, hogy a preprohormon *in vitro* is kötődik a proteáz gátlóhoz. A két molekula expressziója májsejt-kultúrában párhuzamosan változik. Szintén májsejt kultúrát kovalens keresztkötést előidéző szerrel kezelve a két molekula *in vivo* összekapcsolódását lehetett előidézni. Humán egészséges donorból származó szérum mintákat ultrafiltrációs esszében vizsgálva kimutatható volt a keringésben részt vevő α -1 AT és prohepcidin kötődése, amely tiszta α -1 AT szérumhoz adásával fokozható volt. A reakció specificitását koimmunoprecipitációs esszével és végső soron MALDI-TOF analízissel igazoltuk. Mindezen kísérletek azt a lehetőséget vetették fel számunkra, hogy a vérben található biológiailag aktív érett hormon szintje csak részben szabályozódik a transzkripció szintjén, az akut igényekhez poszttranszlációs éréssel is tud reagálni. Ezt az elképzelésünket alátámasztja az a tény is, hogy α -1 AT hiányos betegekben leírtak vasanyagcsere zavart is.

Fenti kísérleteinket bemutató cikkünk a FEBS Journal által elfogadásra került, és jelenleg közlés alatt áll.

Hasonló vizsgálatokat kezdtünk a hepcidin különböző érési alakjai és az α -1 savi protein között. *In vitro* kötődést és a szérumban való kapcsolódást már igazoltunk a két molekula között. Eddigi eredményeink szerint hasonló, de talán gyengébb kapcsolat található a két molekula között.

A fent említett BacterioMatch rendszert is használtuk annak felderítésére, hogy a hepcidin molekula a ferroportinnak melyik részéhez kapcsolódik, illetve ebben a kötődésben a hepcidin molekulának a jellegzetes, 4 diszulfid híd által fenntartott hajtókanyarhoz hasonló térszerkezete mennyiben jelentős. A ferroportin molekula membránban elfoglalt helyzetéről

még jelenleg is folynak a viták, az egyes irodalomban szereplő feltételezett térbeli szerkezetek többé-kevésbé eltérnek egymástól. Kísérleteinkben a ferroportin (FP) molekula 3 darabját használtuk, amelyek feltételezhetően meghatározott számú transzmembrán domént tartalmaznak: egy rövidebb (FP1) és egy hosszabb (FP2) N-terminális darabot, valamint egy rövid C-terminális (FP3) darabot. A teljes FP molekula, valamint a megfelelő darabok kötődését vizsgáltuk az érett hepcidinnel. Összegezve azt mondhatjuk, hogy a teljes FP adta a legerősebb kötődést, míg a C-terminális darab nem kötődött egyáltalán. Ezután a hepcidin négy mutáns változatát hoztuk létre, amelyekben az egyes diszulfid kötések alkotó ciszteinek közül mindig egyet mutáltunk szerinre, ezáltal a diszulfid hidak szerkezete felbomlott. A mutánsok egyike sem kötődött a FP3 darabhoz, akárcsak a teljes hepcidin. Emellett az a mutáns (M1), amelyben a hajtú szerkezet leginkább sérült, nem kötődött sem a teljes FP molekulához, sem annak darabjaihoz. Az érett hepcidin és a mutánsok feltételezett térbeli szerkezetének vizsgálata igazolja a eredményeket: valamennyi vizsgált molekula közül egyedül az M1 mutánsban nem volt β -lemez a szerkezetben, és az N- és C-terminális vége a molekulának eltávolodott egymástól. Jelenleg ezen kísérleti eredményeink kéziratának szerkesztése zajlik. Reményeink szerint egy hónapon belül közlésre be tudjuk küldeni.

Ami a klinikai, különböző vasanyagcsere zavarban szenvedő betegek szérum hormon szintjének vizsgálatát illeti, a kereskedelmi forgalomban jelenleg a prohormon szintet meghatározó ELISA-kit kapható. Először krónikus C vírus hepatitisben szenvedő betegek szérum prohepcidin szintjének összefüggését vizsgáltuk a beteg egyéb (májfunkciós, gyulladós vagy vasanyagcserét mutató) laboratóriumi paramétereinek függvényében, azonban nem találtunk diagnosztikailag használható összefüggést. (A vizsgálatokat az indokolta, hogy a legtöbb krónikus hepatitiszes betegnél idővel vasfelhalmozódás alakul ki.) Az értékelést az is nehezítette, hogy ezen betegek zöme egyben haemachromatosisban is szenvedett.

A következő csoport, akiknél a szérum prohepcidin szint alakulását vizsgáltuk, a két leggyakoribb krónikus gyulladós bélbetegségben, a Crohn betegségben (CD) és az ulceratív colitisben (UC) szenvedő betegek voltak. A két betegség között hasonlóságok és eltérések is találhatóak, ez utóbbiak főként az érintett bélszakasz és a szövettani jellegzetességek tekintetében található. A hasonlóság részben az a két betegcsoport között, hogy idővel mindkét esetben normocitás anémia alakul ki. Ennek hátterében vashiány kifejlődése áll, amelyet a gyakori vérzések, a felszívódás zavara, és a gyulladós citokinek magas szintje okoz. Ez utóbbi miatt vetődik fel a hepcidin lehetséges szerepe, mert a hormon expressziót befolyásoló egyik tényező az IL-6 gyulladós citokin. Ennek hatására nő a hepcidin expressziója, amely következtében csökken a bélből illetve a makrofágokból a keringésbe jutó vas.

A prohepcidin szérum szinteket részben a vas homeosztázist jellemző paraméterekkel, részben a gyulladásra jellemző labor értékekkel próbáltuk összefüggésbe hozni. Az irodalomban szereplő, más krónikus (gyulladós) betegségeket jellemző adatokhoz hasonlóan mi is csak kevés és gyenge összefüggést találtunk. A vasanyagcsere jellemzői közül mindkét betegcsoportban összefüggés mutatkozott a prohepcidin szint és a transferrin szint, illetve a transferrin telítettség között. A teljes vaskötő kapacitás a Crohn betegek esetében mutatott összefüggést a prohepcidin szinttel. A gyulladást jellemző paraméterek közül egyedül a Crohn betegek között mutatkozott kapcsolat a prohepcidin értékek és az aktivitási indexek között.

Az irodalomban található hasonló vizsgálatoknak megfelelően mi is azt a megállapítást tehetjük, hogy a szérum prohormon szintjének mérése nem szolgáltat diagnosztikai vagy prognosztikai jelentőségű adatot a krónikus bélbetegségben szenvedő betegek anémiájának kialakulásában. A legújabb tendencia ezen a téren az érett hepcidin szintjének meghatározása

akár a vérből, akár a vizeletből. A prohormon szint mérése azért sem járható út véleményünk szerint, mert a korábbiakban igazoltuk, hogy az α -1 AT is szerepet játszik a hormon végső éréseben, azaz az érett hormon szintje szükség esetén nagyon gyorsan megemelkedhet a szérumban.

A fenti vizsgálati eredményeinket a közeljövőben kívánjuk közlésre beküldeni, a kézirat elkészítés alatt áll.

A kísérletek harmadik csoportja a preprohormon mRNS expressziójának szabályozására vonatkozik. Előkísérleteink során az irodalomban szereplőhöz hasonlóan májsejt kultúrára tettünk ki különböző hatásoknak: vaskezelésnek, vas-kezelésnek, a glutation szint csökkentésének. A hepcidin szint változása mellett számos egyéb, a vas anyagcserében szereplő fehérje mRNS szintjének változását vizsgáltuk real time módszerrel. A sejtkultúrában szokatlan módon a vaskezelés hatására a hepcidin expressziója csökkent, a ferroportin változása megfelelt a kezelésnek. Érdekes módon változott a ferrokelatáz és a hem szintézis lépésmeghatározó enzimének (ALAS) a szintje a különböző behatások hatására, ezek értékelése még további kísérleteket igényel.

Kísérletei adataink egy része a hepcidin overexpressziójára és mRNS szintjének csökkentésére adott válaszokra vonatkozik. Az előbbi a hepcidin cDNS-ének expressziós vektorba klónozásával és transektálásával értük el, az utóbbira két módszert is próbáltunk, a dicer technikát és az antiszensz DNS transektálását. A hepcidin mRNS szintje akkor nőtt legjelentősebben, amikor az overexpressziót a hem szintézis gátlása is kísérte. Mivel a hepcidin transzkripció közvetlen, sejten belüli szabályozója még nem ismert, további vizsgálatokat tervezünk ezen a téren, mindenképpen megvizsgáljuk a hem szintézis és a hepcidin expresszió kapcsolatát.

A hepcidin mRNS szint elnyomásának érdekes módon a leglátványosabb következménye egyes transzkripciós faktorok (elsősorban a SMAD4 és a C/EBP α) mRNS szintjében bekövetkezett változás volt. Ezért a következőkben ezen transzkripciós faktorok hatását vizsgáltuk elsősorban. Először a transzkripciós faktorokat overexpresszáltuk májsejt kultúrában. A hepcidin szintjének változását a C/EBP α overexpressziója befolyásolta legnagyobb mértékben. Azonban ezt a hatást jelentősen fokozták az overexpresszióval egyidejű különböző kezelések (vasmegvonás, glutation szint csökkentés). Ez a hatás még további vizsgálatokat igényel.

Több kísérletsorozatot végeztünk a hepcidin különböző hosszúságú promotereinek vizsgálatával. Ezeket a promoter szakaszokat luciferáz riporter plazmidokba klónoztuk, a sejteket transektáltuk velük, majd kezeléseknél vetettük alá őket. A sejtlyúzumból mért luciferáz aktivitása mutatta a promoter szakaszok válaszát az eltérő kezelésekre. A transektálás hatásfokából adódó különbségeket béta-galaktozidáz aktivitású plazmidok kotransektálásával, és a sejtlyúzumból való galaktozidáz aktivitás mérésével küszöböltük ki.

A kísérletek során itt is a már említett két transzkripciós faktor (SMAD4 és C/EBP α) overexpressziójának hatását vizsgáltuk önmagukban, illetve vasterhelés vagy vasmegvonás együttes alkalmazásával. A luciferáz aktivitásból meghatározható promoter aktiválás nagyon jó összhangot mutatott a megfelelő kezeléseknél hepcidin szintre gyakorolt hatásával, igazolva, hogy ezen effektusok a hepcidin promoteren keresztül hatnak. A továbbiakban, mivel korábban összefüggést láttunk a hepcidin mRNS szint és a hem szintézis aktivitása között, a promoterek aktivitását a hem szintézisre gyakorolt gátló és serkentő kezeléseket követően is megmérjük. Az ugyanis már bizonyítottnak tűnik, hogy a hepcidin szintézis szabályozása nem közvetlenül a sejten belüli vas mennyiségén keresztül valósul meg, hanem valamely más közvetítő molekulán keresztül. Lehetségesnek tartjuk, hogy ez a molekula a vasat tartalmazó hem lenne a májsejtekben.

A promoter szabályozásával kapcsolatos kísérleti adatainkat reményeink szerint hamarosan ki tudjuk egészíteni a hem szintézissel való összefüggés vizsgálatával, és ilyen módon még ebben az évben lehetőségünk lesz ezen adatok közleményben való összefoglalására.

Előkísérleteket végeztünk a hepcidin baktericid hatásmechanizmusának feltárására. Egyértelműen sikerült igazolnunk, hogy a baktériumokhoz adott szintetikus peptid baktériumölő hatását az egyidejű vasmegvonás jelentősen fokozza. Ezzel áttételesen igazoltuk, hogy valószínűleg nem direkt baktericid hatásról van szó, hanem a baktériumok vasfelvételének gátlásáról. Ennek pontos mechanizmusa még nem tisztázott.

Vasterhelés és vasmegvonás hatását vizsgáltuk még vastagbél eredetű sejtvonalon is. Érdekes eredmény, hogy vaskezelés hatására ezekben a sejtekben a hepcidin mRNS szint megnőtt, míg vasmegvonásra csökkent. Ez a reakció nem egyezik a májsejtkultúránál megfigyelttel. A DMT1, a vasnak a bél lumenből a sejtbe történő transzportjáért felelős molekula expressziója a vas adás hatására csökkent. Ezt a legújabb irodalmi adatok is igazolják. A továbbiakban szeretnénk azt megvizsgálni, hogy esetleg itt is felmerül-e a hemnek, mint „közvetítő” molekulának a szerepe.

Mindezekből látható, hogy a hepcidin transzkripciójának szabályozása meglehetősen összetett folyamat. A helyzetet még komplikáltabbá teszi, hogy nagy valószínűséggel a vasfelhasználás szempontjából eltérő funkciójú sejtípusok (bélhám, máj, eritroid) esetében a szabályozásban is vannak eltérések.

A beszámolómat bíráló bizottságtól tisztelettel kérem, hogy a beszámoló és így az elvégzett munka végső értékelése csak 2009 végén történjék meg, mert bízom abban, hogy ennek az évnek a folyamán még 2-3 közleményünk elfogadásra kerül.