

PDF hosted at the Radboud Repository of the Radboud University Nijmegen

The following full text is a publisher's version.

For additional information about this publication click this link.

<http://hdl.handle.net/2066/70063>

Please be advised that this information was generated on 2017-12-06 and may be subject to change.

Hepcidine: een ijzersterke biomarker?

Auteurs H.B. Brouwer, E.H.J.M. Kemna en D.W. Swinkels

Trefwoorden biomarker, erytropoëse, hepcidine, ijzerdeficiëntie, ijzerstapeling, ijzerstofwisseling

Samenvatting

IJzer is een essentieel element, waarvan de beschikbaarheid nauwkeurig moet worden gereguleerd. De balans tussen ijzergebrek en -overschot wordt bewaakt door hepcidine. Hepcidine is een klein eiwit dat de activiteit van het ijzerexporterende eiwit ferroportine in de basolaterale membraan van duodenale cellen en in de celmembraan van macrofagen reguleert, en daarmee de plasmajzerconcentratie beïnvloedt. Hepcidine wordt vooral geproduceerd in de lever. De kwantificering van hepcidine in urine of plasma is een specialistische bepaling waarvoor momenteel een zeer beperkt aantal analytisch gevalideerde methoden beschikbaar is.

De synthese van hepcidine is verminderd bij ijzerebreksanemie, hypoxie, verhoogde erytropoë-

tische activiteit en een gemuteerd hemochromatose (*HFE*)-gen, terwijl de productie toeneemt bij onder andere een ontsteking, een infectie of een verhoogde ijzervoorraad. Omdat hepcidine een functionele parameter is, kan het de diagnostiek van defecten in de ijzerregulatie bij patiënten met stoornissen in de ijzerstofwisseling in de toekomst verbeteren. Klinische validatie van hepcidine als biomarker is tot op heden echter alleen uitgevoerd in kleine patiëntengroepen.

In dit overzichtsartikel worden de regulatie van de hepcidinesynthese, de fysiologische effecten alsmede de kansen voor het gebruik van hepcidine als biomarker in de klinische praktijk besproken.

(Ned Tijdschr Hematol 2008;5:102-8)

Inleiding

IJzer is een onmisbaar element voor de normale celfysiologie, maar tegelijkertijd herbergt het een potentieel gevaar voor de gezondheid. Het is nodig als cofactor voor de vorming van functionele eiwitten, zoals heembevattende eiwitten en diverse enzymen. De chemische eigenschappen maken ijzer echter ook toxisch: Fe^{2+} is in staat hydroxylradicalen te genereren, wat kan leiden tot cellulaire schade. In de circulatie worden deze neveneffecten voorkomen door binding aan het ijzertransporteiwit transferrine. Slechts een klein deel circuleert als niet-transferrinegebonden ijzer ('non-transferrin bound iron'; NTBI). In de cel wordt de reactiviteit van ijzer beperkt door opslag van overtollig ijzer in complex met ferritine of hemosiderine.

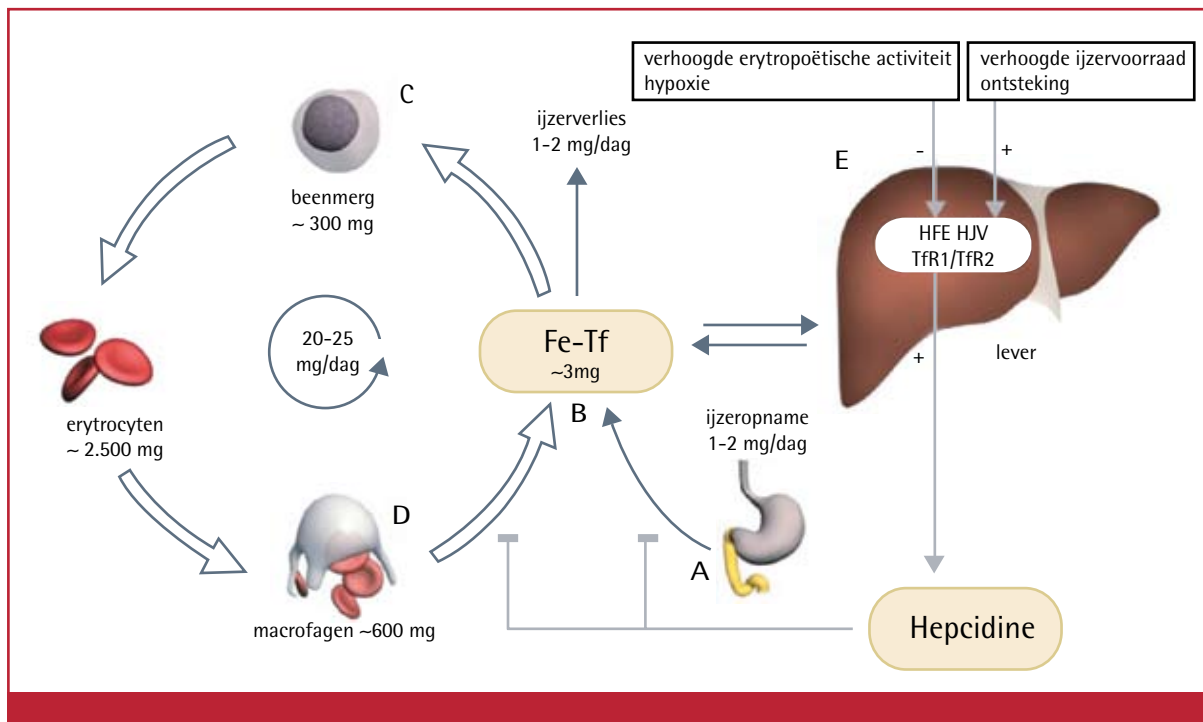
Ijzergebrek kan onder meer leiden tot afwijkingen in het rode bloedbeeld, terwijl een overschot kan leiden tot ontsteking, celdood en orgaan disfunctie. Regulatie van de ijzerhuishouding vindt vooral

plaats bij de opname uit voedsel en de mobilisatie uit de opslag.¹ Het recent ontdekte eiwithormoon hepcidine vervult hierbij een centrale rol. De ijzerexcretie is daarentegen passief en beperkt. Achtergrondinformatie over de ijzerstofwisseling en de rol van hepcidine daarin wordt weergegeven in *Figuur 1* op pagina 103.

Dit overzichtsartikel beschrijft de regulatie en het werkingsmechanisme van hepcidine en de potentie van dit hormoon als biomarker in de diagnostiek van aandoeningen van de ijzerstofwisseling.

Ontdekking

In 2000 werd hepcidine als cysteïnerijk peptide van 25 aminozuren (az) in humaan plasma en urine voor het eerst beschreven.^{3,4} Vanwege de overwegend hepatische synthese en antimicrobiële werking werd het peptide hepcidine genoemd. De belangrijkste functie van hepcidine ligt echter in de regulatie



Figuur 1. Schematische weergave van de ijzerstofwisseling. A. Dagelijks wordt in het duodenum een kleine hoeveelheid ijzer opgenomen uit het voedsel. Regulatie van de duodenale ijzeropname zorgt voor een compensatie van het ongecontroleerde ijzerverlies en vindt plaats door beperking van ijzerexport uit de basolaterale membraan van de enterocyt naar de bloedbaan. B. Ijzer wordt getransporteerd in complex met transferrine (Fe-Tf). Dit transport is essentieel aangezien de opslagplaatsen fysiek gescheiden zijn van de consumerende cellen. Het circulerende Fe-Tf bindt aan de transferrinereceptor 1 (TfR1) van cellen, waardoor het complex wordt geïnternaliseerd. Geïnternaliseerd ijzer komt vervolgens vrij door zure elutie. Normaal gesproken is ongeveer 20-30% van het plasmatransferrine verzadigd met ijzeratomen (circa 3 mg). C. Het beenmerg heeft verreweg de grootste ijzerbehoefte als bouwsteen voor het hemoglobine. In totaal wordt het ijzer in het beenmerg geschat op ongeveer 300 mg en in circulerende erythrocyten op ongeveer 2.500 mg. D. Wanneer erythrocyten verouderen, worden ze gefagocyteerd door de macrofagen van het reticulo-endotheliaal systeem. Hierbij wordt het hemoglobine afgebroken, waardoor het ijzer weer vrijkomt. Dit ijzer wordt vervolgens opgeslagen als ferritine en bij behoefte afgegeven aan het plasma. Zodoende wordt van de dagelijks benodigde 20-25 mg ijzer het grootste deel verkregen uit hergebruik. E. De lever speelt een belangrijke rol in de ijzeropslag en de regulatie van de ijzerstofwisseling. Hepcidine, gesynthetiseerd door de lever, remt de ijzerexport naar het plasma vanuit de duodenale enterocyten en de reticulo-endotheliale macrofagen. Daardoor leidt een toename in de hepcidineproductie tot een verminderde ijzerbeschikbaarheid voor de erythropoëse. De belangrijkste systemische regulatieprocessen voor hepcidine zijn erythropoëse, hypoxie, ijzervoorraad en ontsteking. Productie van hepcidine wordt in de hepatocyten beïnvloed door factoren, zoals hemachromatose (HFE), hemojuveline (HJV), TfR1 en TfR2. Dit figuur is met toestemming van de American Association for Clinical Chemistry overgenomen uit referentie 2.

van de ijzerstofwisseling. Mutatie van het gen bij de mens en knock-out van het gen in de muis leidden tot een fenotype van ernstige ijzerstapeling in de lever, de pancreas en het hart, en verhoogde ijzer- en ferritineconcentraties in serum.^{5,6} Daarentegen leidde overexpressie van hepcidine in muizen en mensen tot een symptomatische ijzerdeficiëntie.^{7,8}

Synthese en processing

Het humane hepcidinegen (*HAMP*; OMIM 606464)

bevindt zich op chromosoom 19q13.1. Het genproduct is een eiwit van 84 az, inclusief signaalpeptiden voor secretie (pre-prohepcidine). Na processing tot prohepcidine (64 az) wordt uiteindelijk het bioactieve hepcidine gesecreteerd als een 25 az-polypeptide. N-terminaalgetrunceerde isovormen zijn in serum (20 az) en urine (20 en 22 az) aangetoond.^{4,9} De huidige visie is dat de 20 en 25 az-isovormen secretieproducten zijn en dat de 22 az-isovorm een renaal geklaard degradatieproduct is.¹⁰ Studies met synthetisch hepcidine hebben laten zien dat de N-terminale az

essentieel zijn voor de regulatie van de ijzerstofwisseling en dat de 25 az-isovorm hiervoor verantwoordelijk is.¹¹ De biologische activiteit van het 20 az-polypeptide is onduidelijk, maar zou antimicrobieel kunnen zijn.⁴ Identificatie van ijzeratomen in een gezuiverd hepcidinepreparaat leverde aanwijzingen op dat ijzer mogelijk van belang is voor de structuur en de biologische activiteit van hepcidine.¹²

De hepcidinesynthese vindt voornamelijk plaats in de hepatocyt, hoewel ook enige extrahepatische productie (bijvoorbeeld in de retina, de renale tubulaire cellen, het hart, de vetcellen, de macrofagen en de neutrofielen) voorkomt. Of deze extrahepatische productie naast een lokale rol ook systemisch een rol speelt, is onbekend.

Analyse

Degelijke methoden om hepcidine te kwantificeren zijn schaars. De compacte structuur en de evolutionaire conservering van hepcidine maken het moeilijk om geschikte antistoffen te genereren. Nemeth et al. zijn er desalniettemin in geslaagd om het totale hepcidine in urine te kwantificeren met een (semi)kwantitatieve immunochemische dotblot.¹³ Daarnaast worden massaspectrometrische bepalingen gebruikt, waarmee ook de verschillende kleinere isovormen van hepcidine in urine en serum kunnen worden onderscheiden.^{9,14-16} De klinische relevantie van de 20 en 22 az-isovormen is grotendeels onbekend, maar hun betekenis voor de ijzerstofwisseling is gering. Daarom biedt een specifieke kwantificering van de 25 az-isovorm mogelijk voordeel voor de klinische toepasbaarheid ten opzichte van het totale, immunochemisch gemeten hepcidine.

Tot op heden is er 1 commerciële immunochemische methode beschikbaar voor het meten van prohepcidine (DRG International, Inc.). De resultaten van deze testkit zijn echter controversieel, omdat de prohepcidinespiegels in veel studies niet correleren met urine- en serumhepcidineconcentraties en niet reageren op relevante fysiologische stimuli.^{14,17}

Kwantificering van hepcidine is een specialistische, niet-geautomatiseerde bepaling die niet behoort tot het routinepakket op klinisch chemische laboratoria. In Nederland is de kwantificeringsmethode van hepcidine in serum en urine beschikbaar via de website www.umcn.nl/hepcidin. Deze methode betreft een analytisch gevalideerde analyse, waarbij de hepcidine-isovormen na een selectieve voorbereiding worden gekwantificeerd met behulp van 'time-of-flight' massaspectrometrie. De analyses worden

onder gestandaardiseerde condities uitgevoerd, wat onder meer leidt tot een hoge mate van reproduceerbaarheid (intra- en interassayvariatiecoëfficiënt <10%). Tot nu toe heeft de analyse van enkele tientallen patiënten met een onbegrepen stoornis in de ijzerstofwisseling (bijvoorbeeld anemie, ijzertherapie) bijgedragen aan het stellen van de diagnoses. Een protocollaire afname is geïndiceerd, omdat uit de initiële studies is gebleken dat serumhepcidine een vrij hoge intra-individuele dag-tot-dagvariatie en een diurnaal patroon vertoont.^{9,16}

Fysiologische effecten

Hepcidine bindt aan het transmembraaneiwit ferroportine, een essentiële en tot dusver enige bekende cellulaire ijzerexporter. Binding induceert internalisatie en degradatie van ferroportine.¹⁸ Er lijkt sprake te zijn van een celspecifieke gevoeligheid voor hepcidine: macrofagen zijn bijvoorbeeld gevoeliger dan duodenale cellen.¹⁹ Daarnaast lijkt ook de ijzeropname uit voeding door duodenale cellen te worden gereduceerd als gevolg van een verminderde expressie van de ijzertransporter divalentemetaaliontransporter 1 ('divalent metal transporter 1'; DMT-1).²⁰

Regulatie

Ijzerconsumerende weefsels, de productieplaats van hepcidine en de belangrijkste ijzeropslagweefsels zijn fysiek gescheiden, dus moeten er coördinerende humorale factoren in het bloed aanwezig zijn.

Stimuli die verantwoordelijk zijn voor de systemische regulatie van hepcidine-expressie, zijn hoofdzakelijk ijzer voorraad, ontsteking/infectie, hypoxie en anemie.²¹⁻²³ Als gevolg van hypoxie en anemie zal de erythropoëtische activiteit veelal toenemen. Dit zal leiden tot een afname van de hepcidinesynthese, waardoor ijzer beschikbaar komt uit de macrofagen van het reticulo-endotheliale systeem. Daarnaast verhogen ontsteking en een hoog plasmaijsgehalte de hepcidineproductie, waardoor de ijzeropname en -beschikbaarheid worden beperkt. Diverse andere factoren, zoals alcoholgebruik, diabetes, hypertensie en overgewicht, lijken ook effect te hebben op de ijzerstofwisseling, maar worden in dit artikel buiten beschouwing gelaten.

Identificatie van receptoren en de systemische en cellulaire metabole routes in de ijzerstofwisseling zijn momenteel belangrijke speerpunten binnen het onderzoek, waarbij nog veel vragen onbeantwoord zijn. Zoals blijkt uit *Tabel 1* op pagina 105 is van

Tabel 1. Reguliemechanismen van hepcidinesynthese in de hepatocyt.

Systemische regulatie	Effect op hepcidine	Betrokken factoren	Referenties
basale route	basale stimulatie	BMP, BMPR, HJV, SMAD-gemedieerde signaaltransductie	24
ijzervoorraad	stimulatie bij verhoogde ijzervoorraad	TfR1, TfR2, HFE, Fe ₂ -transferrine	25
ontsteking, infectie	stimulatie bij acutefasereactie	IL-6, IL-6R, Jak/STAT-3	8, 13, 21
erythropoëtische activiteit	verlaging bij anemie, hypoxie, toegenomen erythropoëse	sHJV, GDF-15, sTfR, HIF1 α	21, 25, 26

BMP='bone morphogenic proteins', BMPR='bone morphogenic protein receptor', HJV=hemojuveline, SMAD='small mother against decapentaplegic homologue', TfR=transferrinereceptor, HFE=hemochromatose ijzereiwit, IL-6=interleukine-6, IL-6R=IL-6-receptor, Jak/STAT-3='Janus kinase/signal transducer and activator of transcription-3', sHJV=circulerend HJV, GDF-15='growth differentiation factor 15', sTfR=circulerend TfR, HIF1 α '=hypoxia inducible factor 1 α '.

diverse factoren inmiddels vastgesteld dat ze invloed hebben op de hepcidinesynthese, hoewel over de relatieve bijdrage van de verschillende routes onder fysiologische en pathofysiologische condities nog weinig bekend is. Er zijn zowel stimulerende (plasma- en weefselijzer, 'bone morphogenic proteins' (BMP's), interleukine-6 (IL-6), holotransferrine) als remmende (pO₂, vrij circulerend hemojuveline (sHJV), 'growth differentiation factor 15' (GDF-15)) signalen geïdentificeerd die een onderlinge interactie hebben.^{18,25}

Recentelijk is het remmende effect van de door erythrocytvoorlopers geproduceerde GDF-15 op de hepcidinesynthese bij patiënten met β -thalassemie beschreven.²⁶ Hiermee is een link tussen het beenmerg en de lever geïdentificeerd. De rol van deze humorale factor in de regulatie van de hepcidinesynthese is voor andere vormen van toegenomen en/of ineffektieve erythropoëse nog niet duidelijk.

Synthese bij stoornissen in ijzerstofwisseling

In verschillende studies zijn de urine- en plasmahepcidineconcentraties bepaald bij patiënten met stoornissen in de ijzerstofwisseling. Daarbij zijn duidelijk verschillen in de hepcidineconcentratie gevonden tussen de diverse patiëntengroepen.^{9,27}

Primaire en secundaire ijzerstapeling

Primaire ijzerstapeling wordt veroorzaakt door mutaties in de *HFE*-, *HJV*-, *TfR2*-, *HAMP*- en *SLC40A1*- (ferroportine) genen. De meest voorkomende mutaties zijn de *HFE*-genmutaties als gevolg van p.Cys282Tyr homozygotie of samengestelde heterozygotie p.Cys282Tyr/His63Asp.²

De primaire vormen, met uitzondering van ferroportinemutaties, gaan gepaard met een relatief lage hepcidineconcentratie in het serum en de urine. Bij defecten in de genen die coderen voor HFE, hemojuveline en hepcidine lijkt een gestoorde terugkoppeling bij toename van de plasma- en weefselijzerconcentratie het onderliggende mechanisme te zijn.²⁷ Bij deze ziektebeelden past derhalve ook een verhoogde transferrinesaturatie en ijzerstapeling in parenchymaal weefsel ten gevolge van een toegenomen ijzeropname in de darm.

Het belang van de verschillende eiwitten bij de ijzerstofwisseling wordt weerspiegeld door de hepcidine-serumconcentratie en de leeftijd waarop symptomen zich openbaren. Zo gaan mutaties in *HJV* en *HAMP* gepaard met zeer lage of onmeetbare hepcidineconcentraties en symptomen in het eerste en tweede decennium. Mutaties in *TfR2* gaan gepaard met verlaagde hepcidineconcentraties en symptomen in het tweede tot vierde decennium, en mutaties in *HFE* met matig verlaagde hepcidineconcentraties en een zeer wisselende klinische penetrantie vanaf het 30^e jaar. Onderzoek van het Nijmegen hepcidineteam heeft recentelijk laten zien dat homozygotie voor de p.Cys282Tyr-mutatie zich eerder biochemisch openbaart bij een verlaagde serum hepcidine/ferritine-ratio (ongepubliceerde data, mw. dr. B.A.C. van Dijk et al.).

Ferroportineziekte is zeldzaam en wordt gekenmerkt door 2 fenotypes, te weten de zogenoemde 'verlies van functie'- en de 'toename van functie'-variant. De gemeten hepcidineconcentraties zijn verhoogd of verlaagd, afhankelijk van het fenotype. Het onderliggende mechanisme voor ferroportineziekte is nog niet volledig opgehelderd.

Secundaire vormen van ijzerstapeling, als gevolg van onder meer thalassemie, chronisch hemolytische anemieën en myelodysplasie, worden gekarakteriseerd door een anemie ondanks toegenomen erythropoëse, en ijzerstapeling ondanks toegenomen ijzerbehoefte van het beenmerg. De hepcidineconcentratie bij deze patiënten met secundaire vormen van hemochromatose, zoals bij thalassemie intermedia of major, congenitale dyserythropoëse, sikkelcelanemie en hereditaire sferocytose, is laag of relatief te laag ten opzichte van de ijzervoorraad. Dit suggereert een erytroïde ijzerhonger ondanks voldoende ijzervoorraad. Indien de patiënt transfusieafhankelijk is, zal dit tevens bijdragen aan de opbouw van excessieve ijzervoorraad ofwel ijzerstapeling.

Ijzerdeficiëntie

Ijzerebreksanemie en anemie van de chronische ziekte zijn condities met respectievelijk een absoluut en een relatief ijzerebrek. Hypoferremie bij anemie van de chronische ziekte wordt veroorzaakt door een cytokinegedeelde toename in de hepcidineproductie, waardoor de plasmaijzerconcentratie daalt en dus de ijzerbeschikbaarheid voor de groei van micro-organismen wordt beperkt.²³ Bij ijzerdeficiëntieanemie is de hepcidineconcentratie juist laag als een fysiologische respons om de ijzeropname te vergroten.

Chronische nierziekten

Bij patiënten met chronisch nierfalen en bij hemodialyse zijn verhoogde hepcidineconcentraties gemeten.¹⁵ Dit wordt toegeschreven aan een laaggradige ontsteking bij deze patiëntenpopulatie in combinatie met een verminderde renale hepcidineklaring. Het ontstaan van anemie bij chronische nierziekten kan verklaard worden door de verminderde beschikbaarheid van ijzer door deze toename van hepcidine in combinatie met het (relatieve) tekort aan erythropoëtine.

Is hepcidine dé biomarker bij ijzerstoornissen?

De bovenstaande ontwikkelingen in ogenschouwnemende, rest de vraag of hepcidine een waardevolle aanvulling of vervanger is voor bestaande ijzerparameters zoals ferritine, serumijzer, transferrineverzadiging, zinkprotoporfyrine, hemoglobine in reticulocyt, oplosbaar transferrinereceptor (sTfR) en de sTfR/ferritine-ratio. Sinds de ontdekking van hepcidine is het inzicht in de ijzerstofwisseling fors toegenomen. Huidige klinische studies zijn gebaseerd op kleine populaties waarin variaties die inherent zijn aan de ontwikkeling van nieuwe biomarkers

niet uitgesloten kunnen worden. Desondanks biedt hepcidine aanknopingspunten voor innovatieve diagnostiek en therapeutische strategieën.

Hepcidine zou kunnen bijdragen aan de indicatiestelling voor orale of intraveneuze ijzersuppletie. Wanneer hepcidine immers verhoogd is, zal ook de resorptie in het duodenum grotendeels geblokkeerd zijn en na opname in de macrofagen relatief verminderd aan de bloedbaan worden afgegeven. Dit is relevant bij de behandeling van een ijzerebreksanemie, maar zou ook mee kunnen spelen bij de behandeling van anemische patiënten met chronisch nierfalen. Deze laatste groep wordt behandeld met erythropoëtine. Bij een deel van deze behandelde patiënten wordt echter geen adequate stijging van het hemoglobine waargenomen, maar wel een hogere mortaliteit.²⁸ Een verklaring voor de resistentie zou gevonden kunnen worden in de tekortschietende ijzerbeschikbaarheid voor herstel van de erythropoëse ondanks ijzersuppletie. Hepcidine is daarmee mogelijk een maat voor het voorspellen en monitoren van de erythropoëtinetherapie.

Een tweede potentiële toepassing is het gebruik van de hepcidineconcentratie bij de screening op primaire hemochromatose. De verwachte hepcidineconcentratie is laag en lijkt te variëren met het type hemochromatose. Hierdoor zouden personele en materiële kosten van uitgebreide procedures bij de zoektocht naar sequentievarianties als oorzaak van zeldzame vormen van hereditaire hemochromatose beperkt kunnen blijven. Bovendien is de hepcidineconcentratie waarschijnlijk een indirecte indicator voor de hoogte van ijzerresorptie bij HFE-gerelateerde hemochromatose, en derhalve voor de ernst en prognose van de ijzerstapeling en de behoefte aan therapie.

Het herkennen van een ijzerebreksanemie bij een anemie van de chronische ziekte is niet eenvoudig met behulp van de bestaande parameters. Hepcidine heeft de potentie om hier een extra onderscheidend vermogen te verschaffen, vanwege de tegengestelde effecten van ontsteking en ijzerebrek op de hepcidinesynthese.

Tot slot worden patiënten die risico lopen op weefselschade ten gevolge van secundaire ijzerstapeling momenteel vervolgd door het bepalen van het serumferritinegehalte als maat voor de ijzervoorraad. Hepcidine geeft meer functionele informatie. Het is weliswaar net als ferritine verhoogd bij ontsteking en ijzerstapeling, maar het geeft tevens een indruk van de ijzerexport uit het reticulo-endotheliale systeem. Hepcidine zou daarmee een parameter kunnen zijn die bijdraagt aan het management van patiënten met ijzerstapelende anemieën.

Aanwijzingen voor de praktijk

1. De hepcidineconcentratie in het bloed bepaalt of ijzer kan worden geresorbeerd uit voedsel en of het beschikbaar is voor de erythropoëse.
2. Heparidine is reeds voor een aantal indicaties een veelbelovende biomarker. Voor de klinische validatie is echter meer klinisch onderzoek nodig.
3. De meting van hepcidine is in Nederland beschikbaar voor specialistische patiëntenzorg en onderzoek (www.umcn.nl/hepcidin). Inzet voor de routinediagnostiek behoort tot de toekomstige mogelijkheden.

Conclusie

Al met al is het belangrijk zich te realiseren dat hepcidine de regulerende factor is van ijzerstofwisseling die bepaalt of ijzer beschikbaar is voor biologische processen. Wereldwijd zijn er enkele gevalideerde analytische methoden voor urine- en/of serummetingen beschikbaar, waaronder 1 in Nederland. Meting van hepcidine met deze methoden kan dus relevante diagnostische informatie opleveren voor het instellen van therapie, zowel bij een ijzergebrek en -overschot als bij een verstoring van de verdeling van het lichaamsijzer. Routinediagnostiek is op dit moment echter nog een stap te ver. Wereldwijd worden steeds meer klinische studies geïnitieerd. Hieruit zal moeten blijken of hepcidine inderdaad die ijzersterke biomarker is voor het management van patiënten met stoornissen in de ijzerstofwisseling.

Dankwoord

Collega's van het Nijmegen hepcidineteam, met name dhr. dr. H. Tjalsma, mw. C. Laarakkers, mw. dr. B.A.C. van Dijk, mw. drs. J. Kroot, mw. dr. A.E.R. Kartikasari, en dhr. prof. dr. J.F.M. Wetzels (afdeling Nierziekten) namen deel aan stimulerende discussies die ten grondslag hebben gelegen aan de totstandkoming van dit artikel.

Referenties

1. De Domenico I, Ward DM, Kaplan J. Heparidine regulation: ironing out the details. *J Clin Invest* 2007;117:1755-8.
2. Swinkels DW, Janssen MC, Bergmans J, Marx JJ. Hereditary hemochromatosis: genetic complexity and new diagnostic approaches. *Clin Chem* 2006;52:950-68.
3. Krause A, Neitz S, Magert HJ, Schulz A, Forssmann WG,

Schulz-Knappe P, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 2000;480:147-50.

4. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Heparidine, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001;276:7806-10.

5. Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Girelli D, Christakis J, et al. Mutant antimicrobial peptide hepcidine is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 2003;33:21-2.

6. Nicolas G, Bennoun M, Devaux L, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, et al. Lack of hepcidine gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:8780-5.

7. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:4596-601.

8. Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, Loda MF, Wolfsdorf JL, Andrews NC. Inappropriate expression of hepcidine is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood* 2002;100:3776-81.

9. Kemna EH, Tjalsma H, Podust VN, Swinkels DW. Mass spectrometry-based hepcidine measurements in serum and urine: analytical aspects and clinical implications. *Clin Chem* 2007;53:620-8.

10. Ganz T. Heparidine. A regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005;18:171-82.

11. Nemeth E, Preza GC, Jung CL, Kaplan J, Waring AJ, Ganz T. The N-terminus of hepcidine is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood* 2006;107:328-33.

12. Farnaud S, Patel A, Evens RW. Modeling of a metal-containing hepcidine. *BioMetals* 2006;19:527-33.

13. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflam-

mation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 2004;113:1271-6.

14. Kemna EH, Tjalsma H, Laarakkers C, Nemeth E, Willems HL, Swinkels DW. Novel urine hepcidin assay by mass spectrometry. *Blood* 2005;106:3268-70.

15. Tomosugi N, Kawabata H, Wakatabe R, Higuchi M, Yamaya H, Umehara H, et al. Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System. *Blood* 2006;108:1381-7.

16. Murphy AT, Witcher DR, Luan P, Wroblewski VJ. Quantitation of hepcidin from human and mouse serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Blood* 2007;110:1048-54.

17. Kemna EH, Kartikasari AE, Van Tits LJ, Pickkers P, Tjalsma H, Swinkels DW. Regulation of hepcidin: Insights from biochemical analyses on human serum samples. *Blood Cells Mol Dis* 2007; [Epub ahead of print].

18. De Domenico I, Ward DM, Langelier C, Vaughn MB, Nemeth E, Sundquist WI, et al. The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol Biol Cell* 2007;18:2569-78.

19. Chaston T, Chung B, Mascarenhas M, Marks J, Patel B, Srai SK, et al. Evidence For Differential Effects Of Hepcidin In Macrophages And Intestinal Epithelial Cells. *Gut* 2008;57:374-82.

20. Mena NP, Esparza A, Tapia V, Valdés P, Núñez MT. Hepcidin inhibits apical iron uptake in intestinal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G192-8.

21. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 2002;110:1037-44.

22. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001;276:7811-9.

23. Kemna EH, Pickkers P, Nemeth E, Van der Hoeven H, Swinkels DW. Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. *Blood* 2005;106:1864-6.

24. Wang RH, Li C, Xu X, Zheng Y, Xiao C, Zervas P, et al. A role of SMAD4 in iron metabolism through positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab* 2005;2:399-409.

25. Kemna EH, Tjalsma H, Willems HL, Swinkels DW. Hepcidin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica* 2008;93:90-7.

26. Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh SH, Staker P, Lee YT, et al. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med* 2007;13:1096-101.

27. Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis JI, Bogdanos D, Tsimirika K, MacFarlane J, et al. Hepcidin in iron overload disorders. *Blood* 2005;105:4103-5.

28. Besarab A, Bolton WK, Browne JK, Egrie JC, Nissenson AR, Okamoto DM, et al. The effects of normal as compared with low hematocrit values in patients with cardiac disease who are receiving hemodialysis and epoetin. *N Engl J Med* 1998;339:584-90.

Ontvangen 28 januari 2008, geaccepteerd 28 maart 2008.

Correspondentieadres

Dhr. dr. H.B. Brouwer, klinisch chemicus i.o.
Dhr. dr. E.H.J.M. Kemna, klinisch chemicus i.o.
Mw. prof. dr. D.W. Swinkels, arts klinische chemie

Universitair Medisch Centrum St Radboud
Afdeling Klinische Chemie 441
Postbus 9101
6500 HB Nijmegen
Tel.: 024 361 89 57
E-mailadres: d.swinkels@akc.umcn.nl

Correspondentie graag richten aan de laatste auteur.

Belangenconflict: geen gemeld.
Financiële ondersteuning: geen gemeld.