

A hepcidin szerepe a vas anyagcseréjében: lehetséges új aspektusok

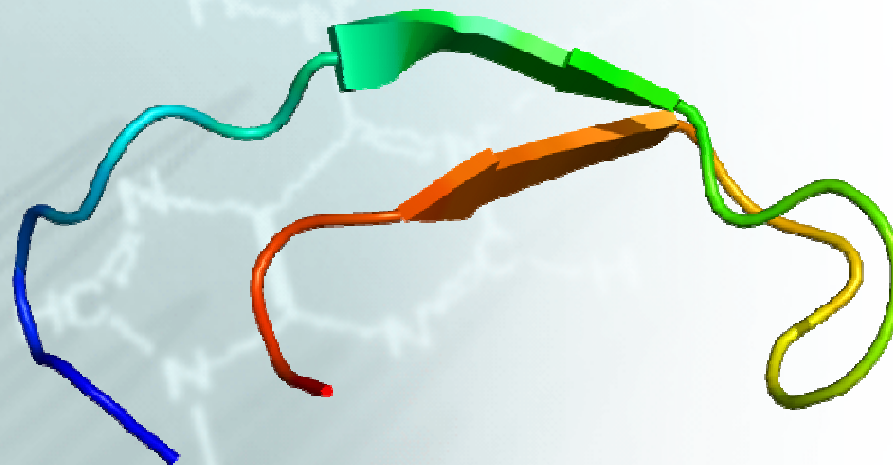
Miseta Attila, Pandur Edina, Fekete Zsuzsanna, Nagy Judit, Sipos Katalin

Laboratóriumi Medicina Intézet, PTE, Klinikai Központ

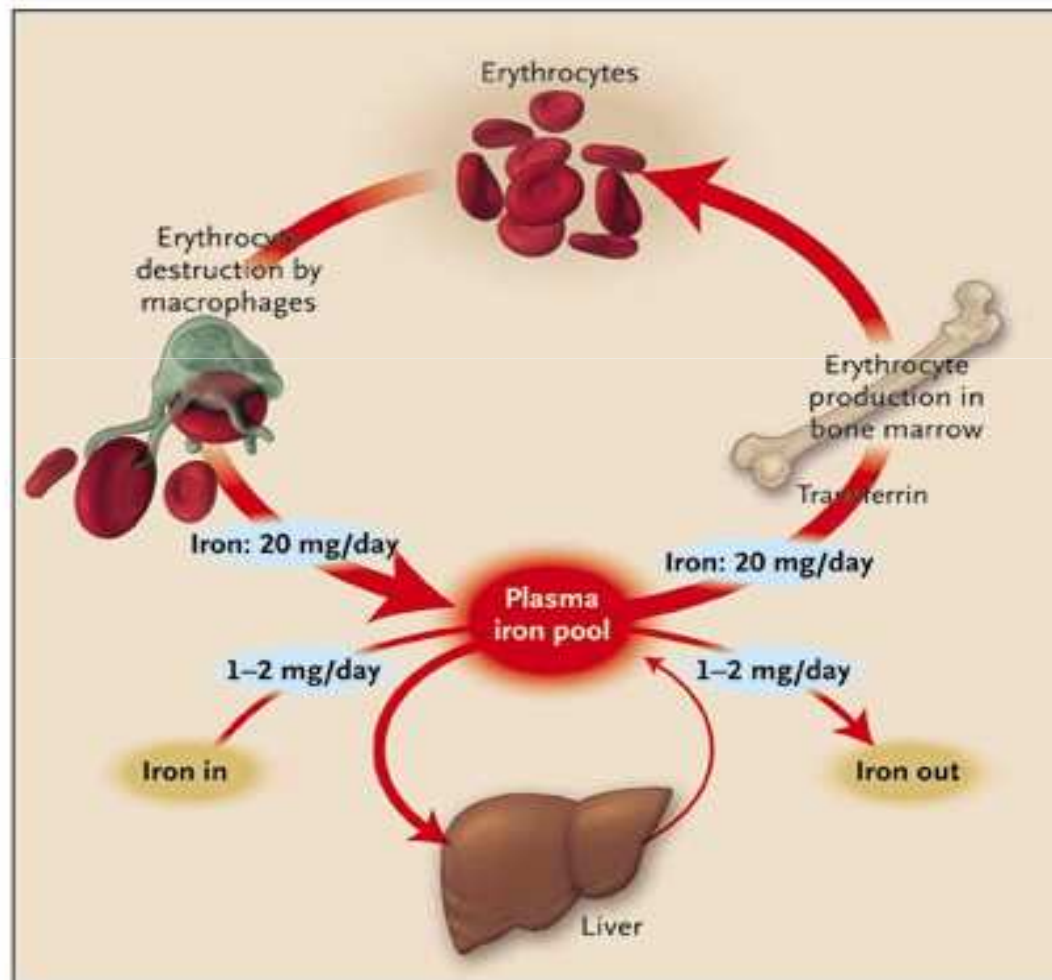
Pécs, Ifjúság u. 13.

Egy szerencsés felfedezés

- ❖ A felfedezés azért szerencsés, mert más célpontú kutatás eredménye: konkrétan antimikrobiális fehérjék/peptidek keresése során azonosították (Ganz T; *Blood* 2003:102 (3): 783–8.)
- ❖ Ennek megfelelő a név eredete hep- (hepar/máj) cidin.
- ❖ Azonban hamarosan kiderült, hogy a hepcidin erősen gátolja a bél mucosán keresztüli vas felszívódást, valamint a vasat raktározó makrofág sejtekből a vas kiszabadulását. A két hatás mindegyike a vér plazma vas szintjének a csökkenését eredményezi.



A vas anyagcseréje



Hepcidin szintézist szabályozó jelátviteli útvonalak

- Vasszint által szabályozott
- Gyulladásokat kísérő, IL-6 által irányított útvonal: fokozott hepcidin szintézis, vér vas szintje csökken (antibakteriális hatás)
- Hipoxia, vashiány következtében: csökkent hepcidin szintézis, vas vérbe jutása fokozódik

A hormon

- ❖ A szintézis elsődleges helye a máj, azon belül a májsejtek.
- ❖ A HAMP gén-en termelődő traszkript (mRNS) egy 84 aminosav hosszúságú *preprohormont* kódol, amiből a vezető szekvencia lehasadása után keletkezik a 60 aminosavat tartalmazó *prohepcidin*. Ezt követően furin hatására alakul ki a 25 aminosav hosszúságú biológiailag aktív *hepcidin*.
- ❖ A HAMP gén deléciója (sérülése) súlyos (juvenilis) hemokromatózist eredményez, míg a túlzott aktivációja vashiányt és annak a tüneteit okozza.

Vas

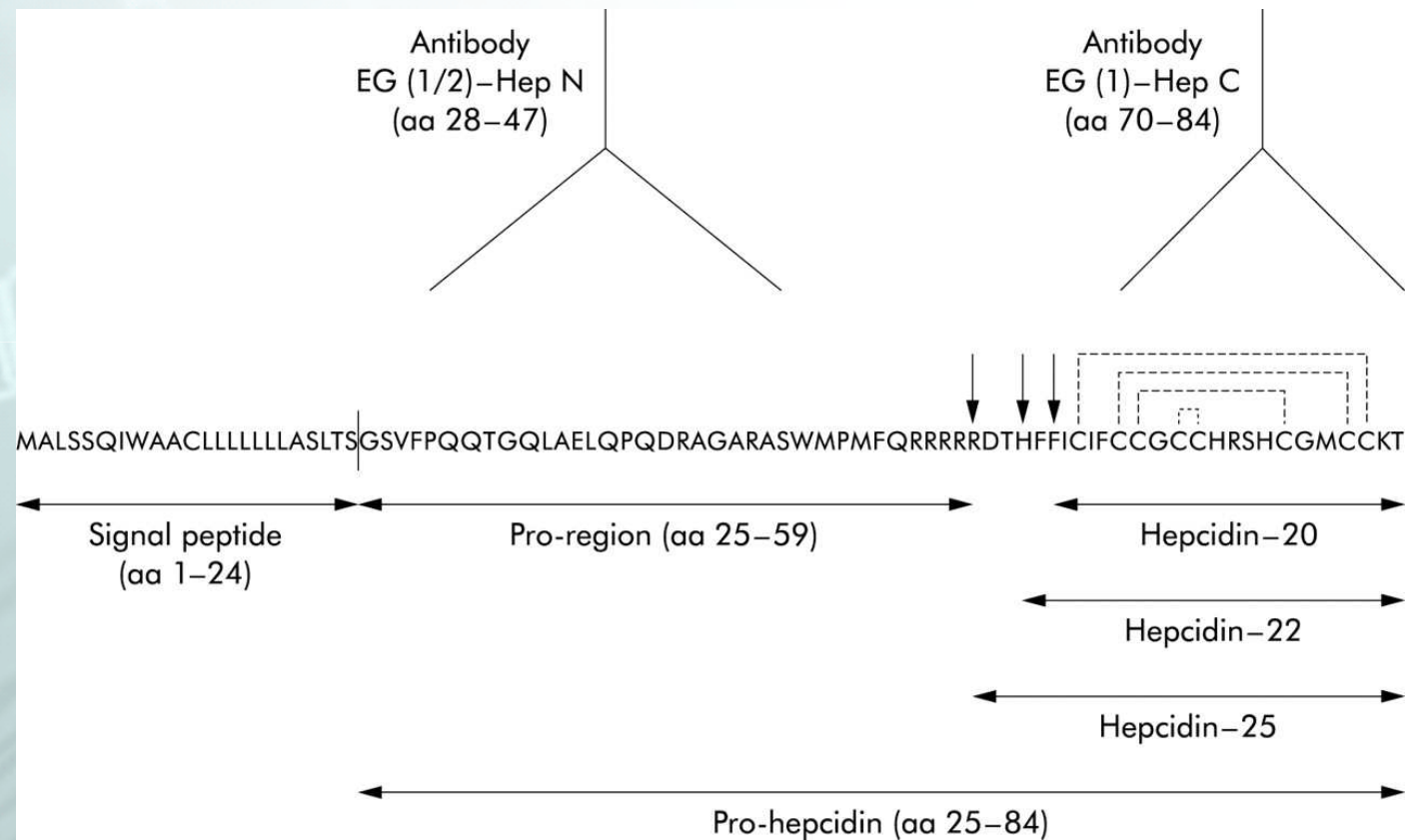
Normális vas
homeosztázis

Hepcidin

Hereditér hemokromatózis
Vas „töltő” anémiák

Gyulladásos anémia
Vas refrakter vashiányos anémia

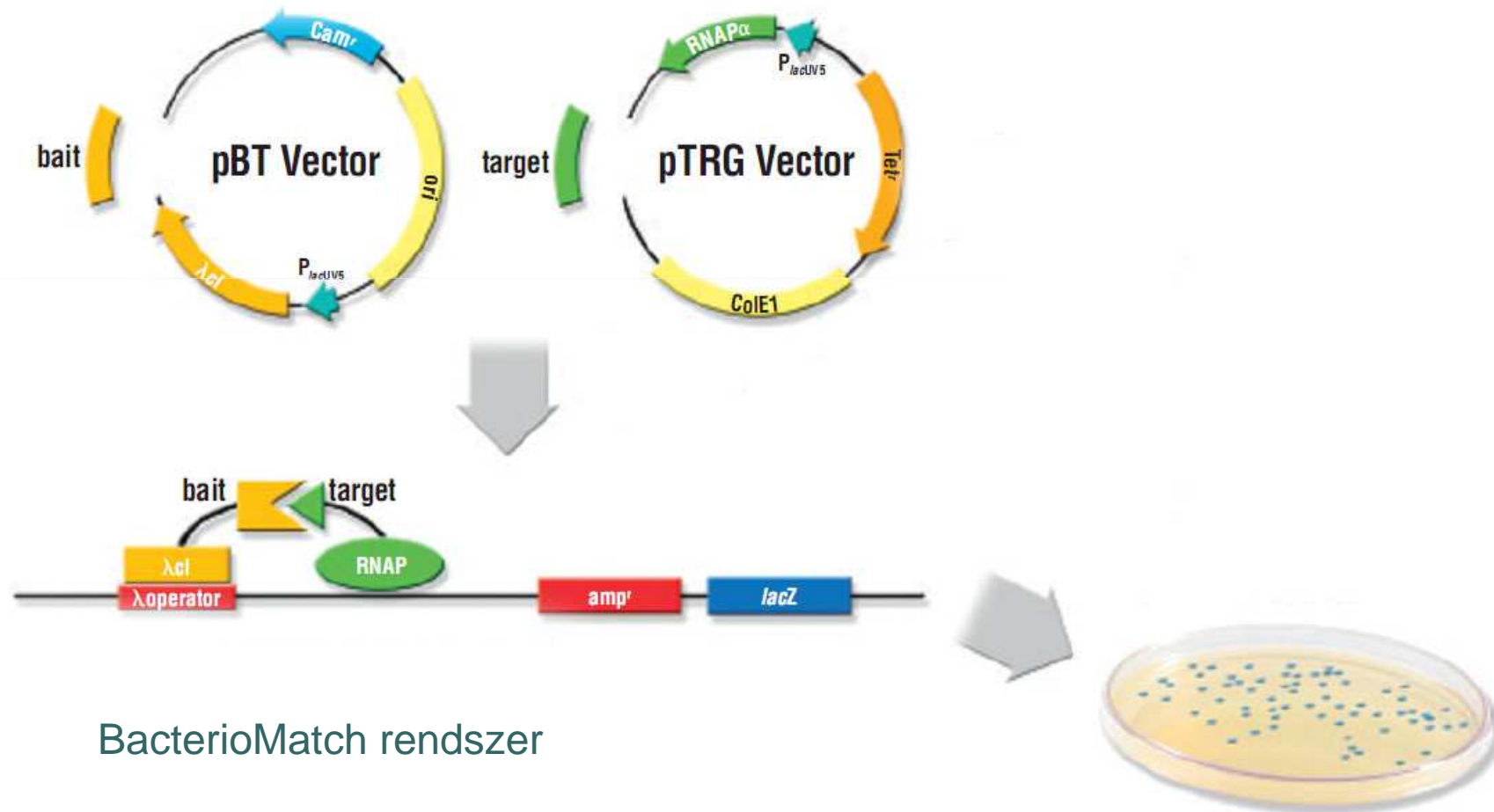
A hepcidin érése



Kérdéseink

- Prohepcidin és hepcidin más fehérjékkel való kapcsolata
 - Szintézisének szabályozása
- **Prohepcidin/hepcidin szint egyes kórképekben**
 - Hecpudin mérésének beállítása

Milyen más fehérjével kapcsolódik a prohepcidin/hepcidin?



BacterioMatch rendszer

Az interakciók

<i>Target protein Swiss-Prot no.</i>	<i>Function</i>	<i>Localization</i>
▪ Transthyretin P02766	Thyroid hormone binding	Secreted to plasma
▪ α-1 Acid protein P02763	Acute-phase protein	Secreted to plasma
▪ α-1 Antitrypsin P01009	Serine protease inhibitor	Secreted to plasma
▪ CytochromeP450 P05181	Drug metabolism	Membrane protein
▪ ATP/ADP translocase P12235	ATP–ADP exchange	Mitochondrion
▪ Enoyl-CoA hydratase P30084	Fatty acid oxidation	Mitochondrion

A prepro- prohepcidin interakciói

Insert in pBT	Insert in pTRG	Growth on CTCK plates
Preprohepcidin	α -1 Antitrypsin	+++
Prohepcidin	α -1 Antitrypsin	+++
Hepcidin	α -1 Antitrypsin	-

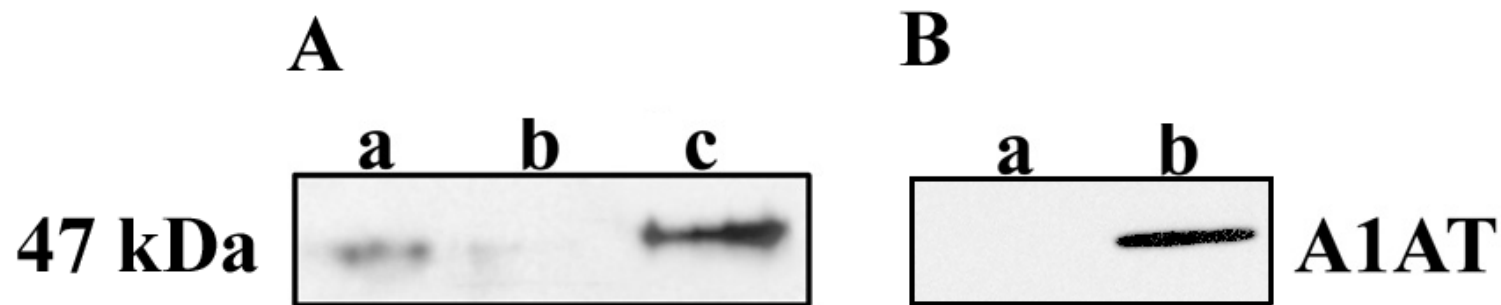
Colony growth was classified as follows: - no growth; +++ strong growth.

In vitro elúciós esszé az A1AT és preprohepcidin interakciójának bizonyítására

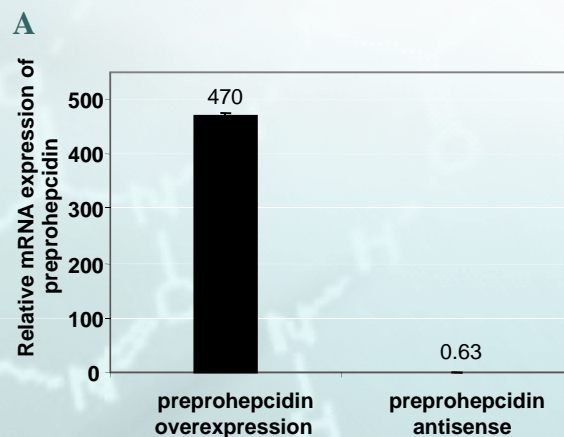
Glutathion Sepharose (GST) gyöngyök felszínére GST, vagy GST-preprohepcidin fúziós fehérje asszociál.
A fúziós fehérje elúciója után vizsgáljuk, hogy az „hoz-e” magával A1AT-t.
(Western blott anti-A1AT IgG-vel.)

A,
a, pozitív kontrol: A1AT-t expresszáló sejtek (BL21) lizátuma
b, negatív kontrol: A1AT lizátum + GST gyöngyök
c, A1AT lizátum + GST-preprohepcidin gyöngyök

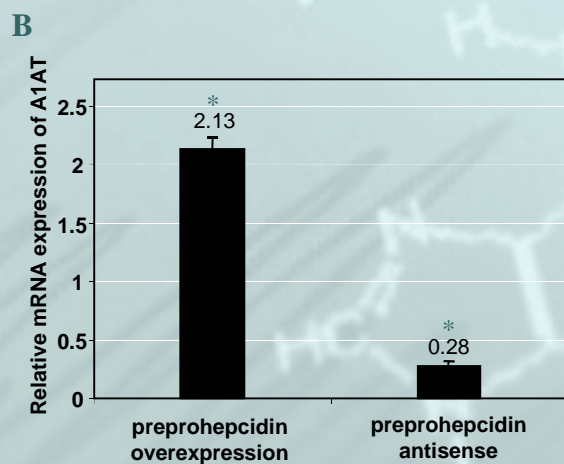
B,
a, emberi szérum + GST gyöngyök
b, emberi szérum + GST-preprohepcidin gyöngyök



A preprohepcidin expressziója és annak gátlása azonos irányú változásokat okoz az A1AT expressziójában



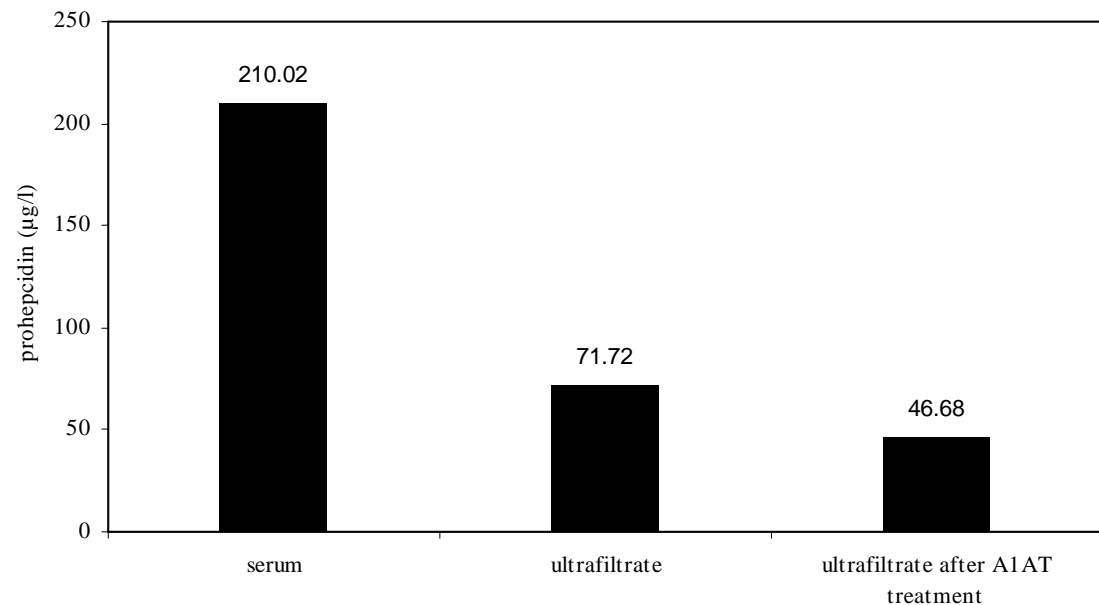
Preprohepcidin mRNS szint meghatározása (Real time PCR)



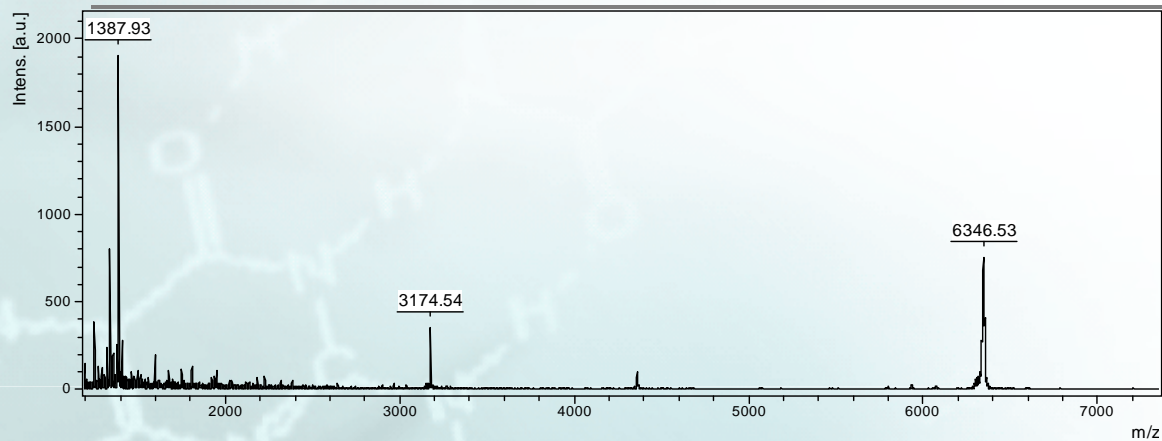
A1AT mRNS szintek ezzel párhuzamosan változnak

Szérum ultrafiltráció

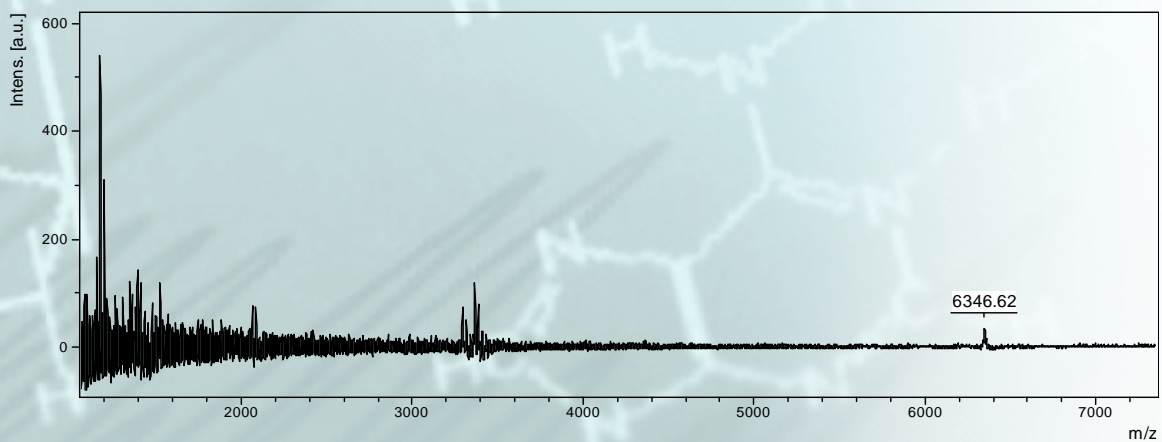
- Szérum prohepcidin szint meghatározás: prohormon ELISA kittel
- Ultrafiltrálás: Microcon YM-30 csőben



Tömegspektrometriás analízis



Bakteriálisan
expresszált
prohepcidin



Affinitás tisztított
szérum prohepcidin
tömegspektrometriás
analízise

A hepcidin mérése

- A hepcidin mérése eleinte immun módszerekkel történt. Itt a prohepcidin mérése sokkal egyszerűbben volt kivitelezhető mint a hepcidiné.
- Ma a hepcidint RIA-val ELISA-val illetve tömegspektrometriás analízissel mérjük.
- Sajnálatos módon az egyes metódusok között jelentős az eltérés a normál referencia tartomány tekintetében. Ennek részben oka lehet, hogy a hepcidin az alpha-2 makroglobulinhoz kötött.
- Zavaró tényező lehet, a prohepcidin és hepcidin közötti keresztreakció ill. a degradációs termékek jelenléte a biológiailag aktív hepcidin-25 mellett.

TABLE II. Relative Laboratory Measures of Iron Status

Diagnosis	Hemoglobin	Iron	Ferritin	Transferrin saturation	Hepcidin
Iron deficiency anemia	↓	↓	↓	↓	↓
Anemia of chronic disease	↓	↓	↑	↓	↑*
Iron refractory iron deficiency anemia	↓	↓	↓	↓	↑
Hereditary hemochromatosis	Normal	↑	↑	↑	↓

Vashiányos anémia

A vashiányos anémia normál labor jelei közül a szérum vas, ferritin, transferrin telítettség mellett a hepcidin szint is csökken. A hepcidin szint csökkenése következmény, hiszen fokozni kell a vas felszívódást és szervezet tartalék vas mobilizálását.

A hemoglobin szintek mérhető csökkenése és mikrocitózis már az előrehaladott vashiányos állapotát jelzik.

Vas refrakter vashiányos anémia

A vashiányos anémia normál labor jelei közül a szérum vas, transferrin telítettség mellett a hepcidin szint megnövekedett. A hepcidin szint emelkedése nem következmény hanem ok, gátolja a vas felszívódást és szervezet tartalék vas mobilizálását. Ezért a ferritin normál vagy emelkedett.

A hemoglobin szintek mérhető csökkenése és mikrocitózis már az előrehaladott vashiányos állapotát jelzik.

A krónikus megbetegedések anémiaja

Ebben az esetben a ferritin és a hepcidin mint akut fázis fehérjék emelkedettek.

Az emelkedett hepcidin nem engedi meg a vas raktárak mobilizálását és csökkenti a felszívódást a bélből.

A vas túlzott adagolása ezért veszélyes is lehet a vasraktárak túltöltése miatt.

Örökletes hemokromatózis

Gyakran mérünk csökkent hepcidin szinteket a megnövekedett ferritin szintek mellett.

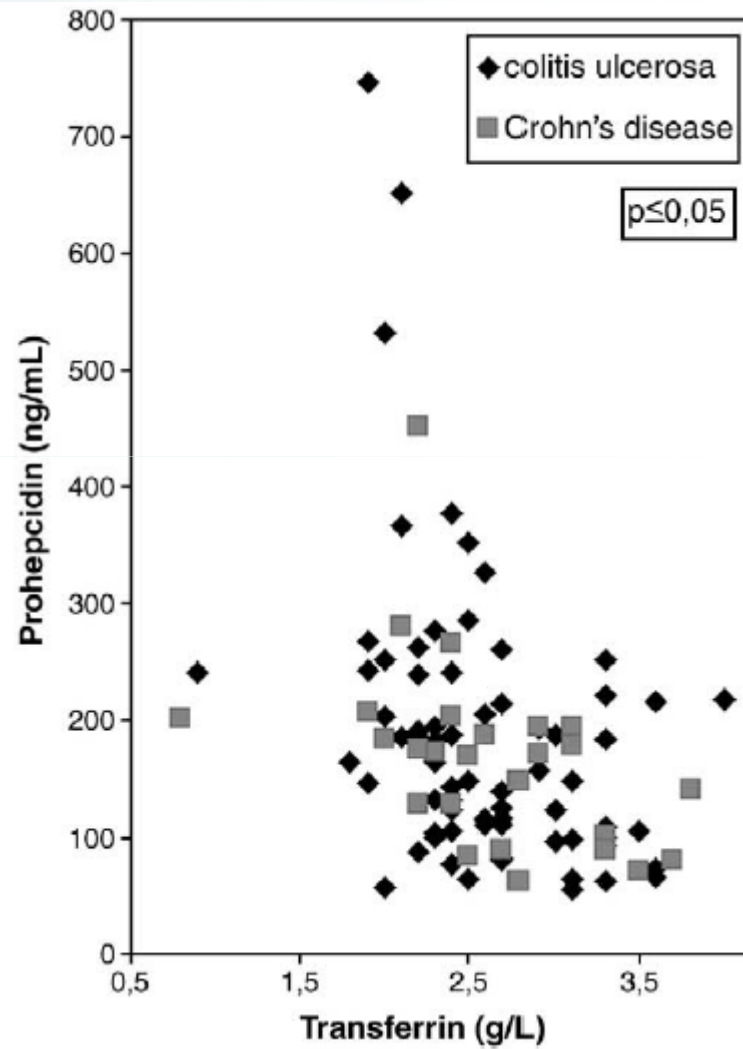
A csökkent hepcidin, vagy a szövetek hepcidin refrakter jellege vasfelhalmozódáshoz vezet.

Prohepcidin mérések krónikus gyulladós Bélbetegségekben: összefüggés egyéb paraméterekkel

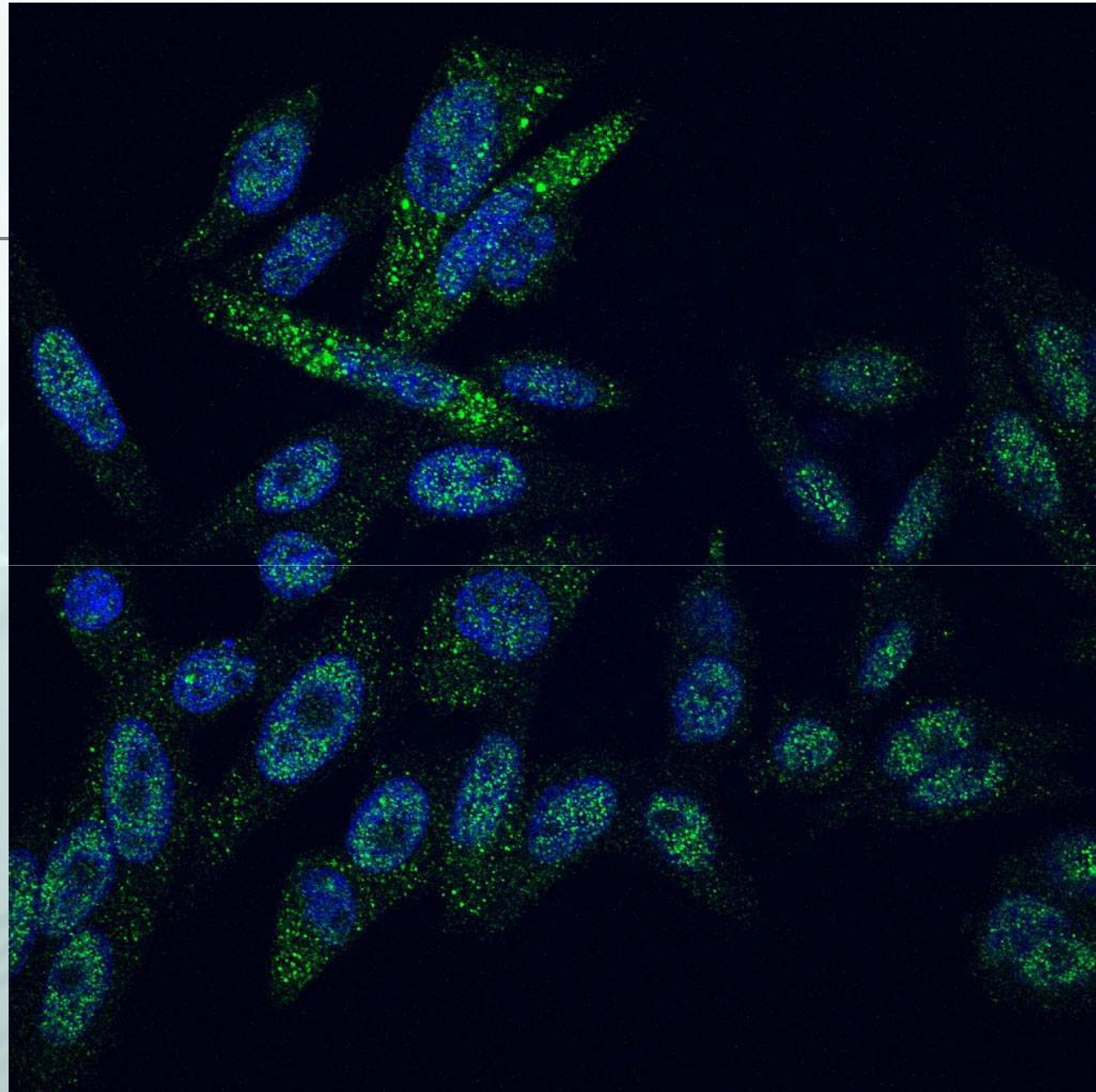
	Cronh's disease		Colitis ulcerosa	
	r value	P value	r value	P value
Serum iron	0.05	0.06	0.053	0.08
Hemoglobin	0.153	0.07	0.21	0.07
Transferrin	0.573	0.04*	0.4	0.05*
Total iron-binding capacity (TIBC)	0.2	0.05*	0.076	0.09
Transferrin saturation	0.086	0.04*	0.031	0.05*

Note: *:P<0.05

Gyenge korreláció a prohepcidin és transferrin szintek között

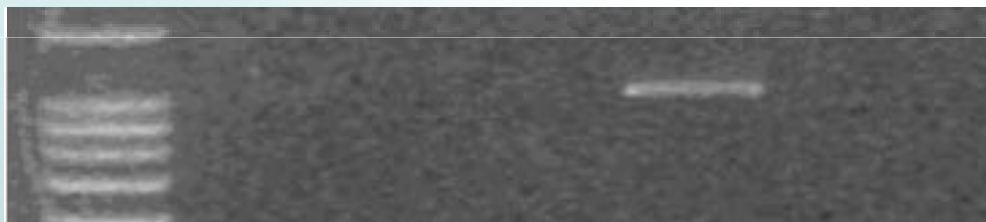


Prohepcidin
lokalizációja
WRL68
sejtek
magjában



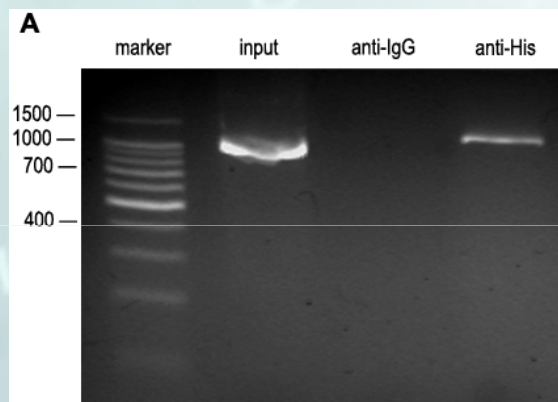
A prohepcidin köti a saját promóterét

- HAMP: hepcidin antimicrobial peptide
- Gyöngyhöz kötött molekula inkubációja hepcidin promóterrel, specifikus primerekkel PCR
 - Hecpcidin gén promótere nem kötődött sem a Sepharose gyöngyhöz, sem a kontrol vektorhoz, és a kötődés specifikus volt.

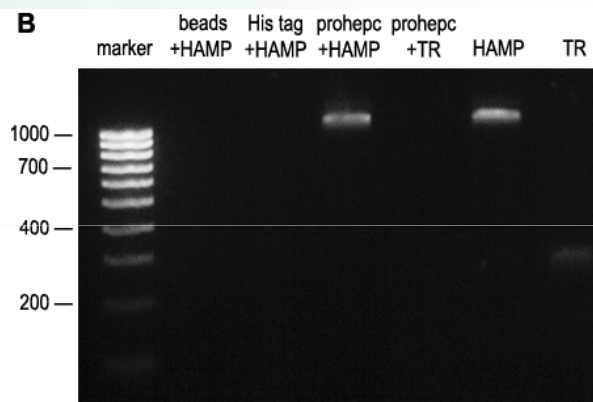


beads	His tag	prohepc	prohepc
+HAMP	+HAMP	+HAMP	+TR

A prohepcidin promóterhez kötődése nem más fehérjével együtt valósul meg



WRL68

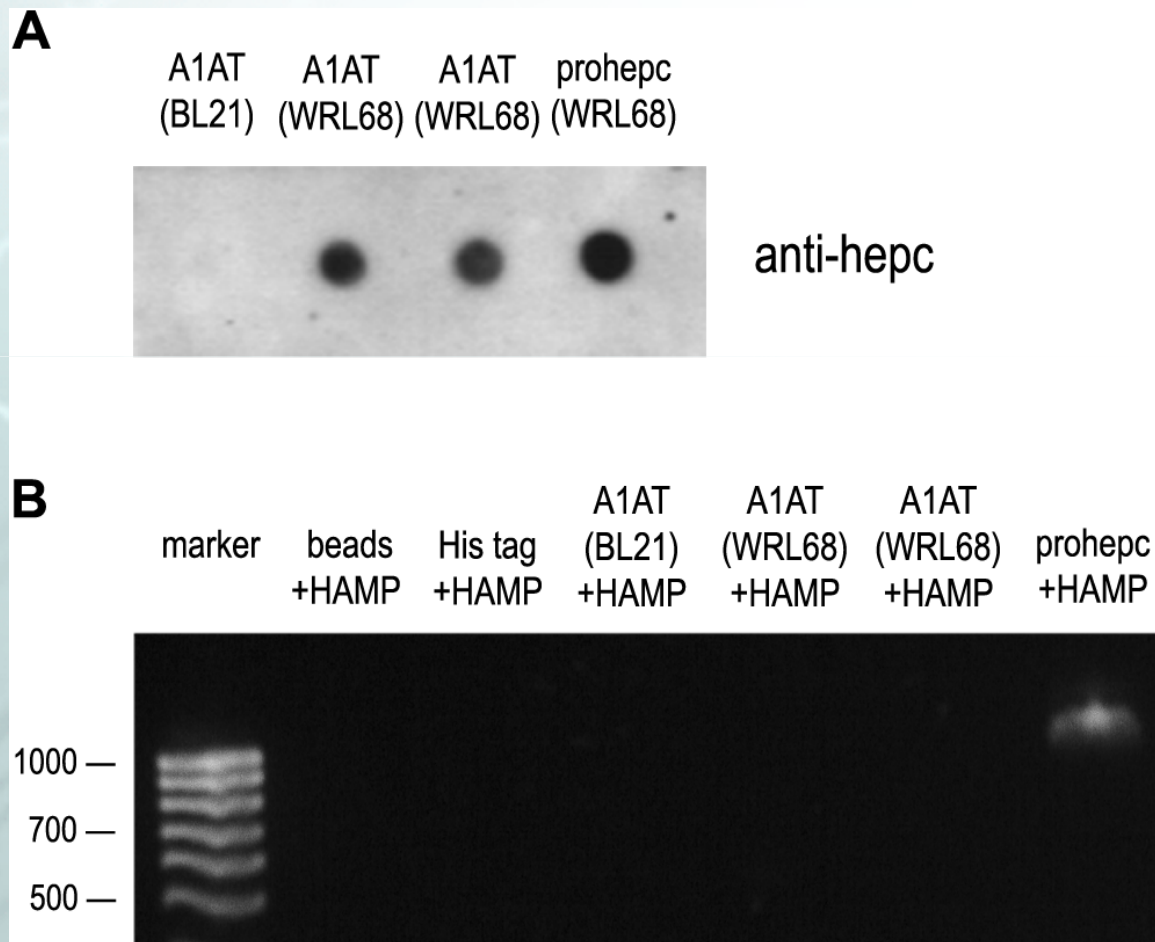


WRL68



BL21

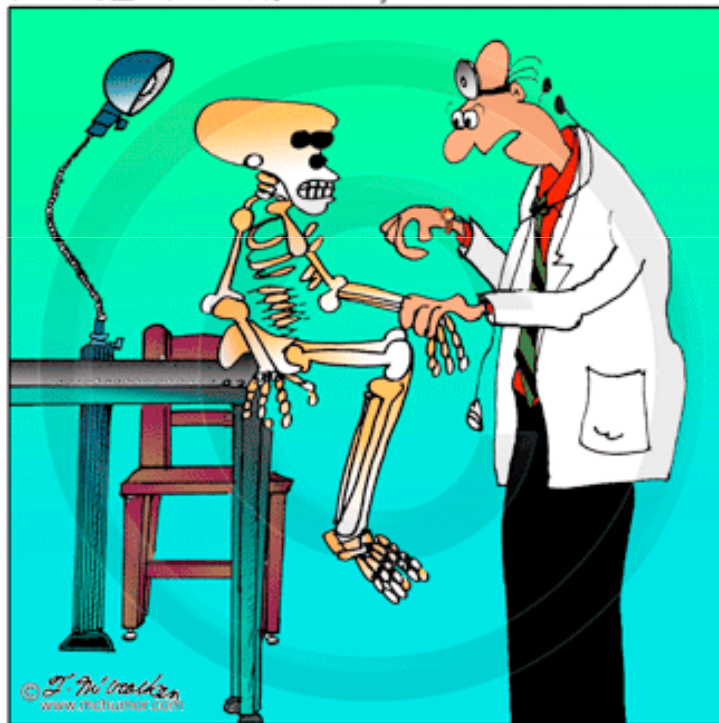
A1AT által kötött prohepcidin nem kötődik a promóteréhez



Köszönöm a figyelmet!

„Ne aggódjon! Még van pár kezelési lehetőségünk!”

MCHUMOR.com by T. McCracken



“Don't worry. We still have a few more treatment options available.”

© T. McCracken mchumor.com