

37

A DISZULFID-HIDAK SZEREPE A HEPCIDIN-MEDIÁLTA FERROPORTIN INTERNALIZÁCIÓBAN

Pandur Edina^{1,2}, Nagy Judit², Poór Viktor Soma², Rapp Judit²,
Mayer Mátyás², Miseta Attila³, Sipos Katalin²

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, ¹Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet, ²Igazságügyi Orvostani Intézet, ³Laboratóriumi Medicina Intézet, Pécs

A hepcidin a vasanyagcserét szabályozó 25 aminosav hosszúságú peptid hormon, mely főként a májban termelődik. A 84 aminosavas prepropeptidből a szignálszekvencia lehasad, majd a furin proprotein konvertáz a keletkezett prohepcidint elhasítva alakítja ki az érett hepcidint. A hepcidin molekulában négy diszulfid-híd stabilizálja az antiparallel lefutású β -lemezt tartalmazó hajtűszerű szerkezetet. A peptidben található egy szokatlan, vicinális diszulfid-híd, mely a 13. és 14. cisztein között a hajtűkanyarban helyezkedik el. Ennek a diszulfid-hídnek nagy jelentőséget tulajdonítanak a hepcidin szerkezetének kialakításában és funkciójának betöltésében. A hepcidin hatását receptorán, a ferroportin nevű vasexporteren keresztül fejt ki, hozzákötődve a ferroportin internalizálódik és degradálódik a sejtben. Ennek eredményeként a hepcidin gátolja a vas felszabadulását makrofágokból és enterocitákból, ezáltal csökkenti a szérum vas szintjét. A humán populációban jelenleg öt olyan mutáció ismert, mely az érett hepcidint érinti (C70R, G71D, C78T, C82Y, K83R). Ebből három a diszulfid-hidak kialakításában szerepet játszó konzervált ciszteinek szubsztitúcióját okozza. Ezek a mutációk homozigóta formában súlyos vasfelhalmozódást, juvenilis hemokromatózist okoznak. A hemokromatózis kialakulásának két oka lehetséges ezekben az esetekben: a hepcidin nem képes kötődni a ferroportinhoz, vagy az interakció ugyan megvalósul, de a ferroportin internalizációja nem következik be. Ebből a hipotézisből kiindulva munkacsoportunk arra kereste a választ, hogy a hepcidin ciszteinek szubsztitúciójának hatással van-e a peptid biológiai aktivitására. PCR technikával négy mutáns hepcidin peptidet állítottunk elő, melyekben egy-egy diszulfid-hidat ciszteinek szubsztitúcióval elimináltunk, úgy hogy a ciszteint kódoló nukleotid tripletet (TCC) szubsztitúcióval kódot váltóvá (TGC) változtattunk. Ezt követően vizsgáltuk az *E. coli* baktériumban, illetve WRL68 hepatocitában termelt mutáns hepcidin peptidok ferroportinnal való kötődését, illetve internalizációs hatásukat. Eredményeink azt mutatják, hogy az érett hepcidin C7-C23 diszulfid-kötése alapvető fontosságú a hepcidin-ferroportin kapcsolat kialakításában. Ugyanakkor elmondható az is, hogy egyetlen cisztein cseréje a peptid biológiai aktivitásának elvesztésével jár. Ezek az eredmények magyarázhatják a hepcidin mutációk következtében kialakult hemokromatózist.

38

KATIONCSATORNA-GÁTLÓSZEREK HATÁSA MITOGÉNNEL STIMULÁLT T-LIMFOCITÁKRA

Pethő Zoltán Dénes, Balajthy András, dr. Varga Zoltán, dr. Panyi György

Debreceeni Egyetem OEC, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

A humán T-limfociták ioncsatornáinak működése nagymértékben befolyásolja ezen sejtek aktivációját, és ezáltal az immunválaszt. A legfontosabb ioncsatornák a feszültségfüggő Kv1.3 és a Ca^{2+} -aktivált IKCa1 K^{+} -csatornák, illetve a CRAC, vagyis a Ca^{2+} felszabadulás aktiválta Ca^{2+} -csatorna. Ezen ioncsatornák gátlhatóak specifikus gátlószerekkel, ami különböző mechanizmusokon keresztül a sejtaktiváció és -proliferáció gátlásához vezethet. Vizsgálatainkkal arra kerestük a választ, hogy az egyes ioncsatornák gátlása a különböző koncentrációjú mitogénnel kezelt sejtek proliferációját és aktivációját hogyan befolyásolja. A vizsgálatokhoz humán perifériás vér limfocitákat használtunk fel. A sejteket a T-sejt receptor-CD3-komplexhez és a ko-stimulátor CD28-hoz kötődő antitestekkel (anti-CD3 és anti-CD28) stimuláltuk, ezeket együttesen, különböző koncentrációkban használtuk. A sejtekhez Kv1.3 gátlószert (TEA, Anuroctoxin), IKCa1 gátlószert (TRAM-34) vagy CRAC gátlószert (2-Apb), illetve ezek kombinációját adtuk három koncentrációban: a disszociációs állandónak megfelelő, azaz átlagosan a csatornák felét gátló koncentrációban (K_d), ennek a háromszorosában ($3K_d$), illetve tízszeresében ($10K_d$). Ez követően az ötödik napon áramlási citométerrel vizsgáltuk a sejtosztódás mértékét CFS (karboxifluorescein szukcinimidil észter) hígítási esszével. Eredményeink alapján az anti-CD3 és anti-CD28 koncentrációjának emelése fokozta a proliferáció mértékét. Hasonlóképp az alkalmazott gátlószerek is dózisfüggően csökkentették az osztódó sejtek arányát, a 2-Apb kivételével. A 2-Apb viszont késleltette a sejtaktivációt, vagyis amíg a kontrollsejtek mitogénkezelés mellett a többi esetben akár négy osztódási cikluson is végigmentek, addig 2-Apb hatására csak kettőn. A mitogénkoncentráció növelésével ugyanakkor egyre kisebb lett a gátlószerek proliferációt gátló hatása, és a maximális koncentráció mellett még $10K_d$ koncentrációban alkalmazott gátlószer sem okozott szignifikáns csökkenést az aktivációban. A proliferáció legnagyobb mértékű gátlását a gátlószerek együttes alkalmazása esetén tapasztaltuk, ami a különböző csatornák szabályozási útvonalainak szinergizmusára utal.