

Correlation analysis between chemical modification of hepcidin 25 peptide and invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma

Analiza korelacji między chemiczną modyfikacją hepcydyny-25 a inwazją i przerzutami raka płaskonabłonkowego przełyku



DOI: 10.15199/62.2025.10.9

Zaproponowano strategię wykorzystania nieredukujących wiązań tioeterowych jako substytutów do wykrywania wymiany wiązań disiarczkowych między małymi białkami bogatymi w disiarczki a ich receptorami. Syntony diaminodikwasowe zostały osadzone w pozycjach 4 par wiązań disiarczkowych w hepcydynie poprzez syntezę peptydową w fazie stałej, tworząc pochodne hepcydyny zawierające wiązania tioeterowe.

Słowa kluczowe: synteza peptydów, modyfikacja leków, sonda aktywna, hepcydyna, białko transportujące żelazo, ferroportyna

A strategy of using non reducing thioether bonds as substitutes to detect disulfide bond exchange between disulfide-rich small proteins and their receptors was proposed. The diaminodiacid synthons were embedded into the positions of 4 pairs of disulfide bonds in hepcidin protein by solid-phase peptide synthesis, forming thioether bond-contg. hepcidin derivatives.

Keywords: peptide synthesis, drug modification, active probe, hepcidin, iron transport protein, ferroportin

Jony żelaza są niezbędne do życia. Ich przyswajanie przez organizm ludzki odbywa się głównie poprzez wchłanianie żelaza zawartego w pożywieniu przez jelita. Komórki jelitowe transportują wchłonięte jony żelaza do krwiobiegu za pomocą transporterów żelaza, które następnie przenoszą je do różnych części ciała w celu wykorzystania przez różne tkanki¹⁾. Żelazo jest obecne w rozmaitych postaciach w różnych tkankach i narządach. Około 70% jonów żelaza występuje głównie w czerwonych krwinkach w postaci związanej z hemoglobina. Niemal 20% jonów żelaza jest magazynowanych w wątrobie, jelitach, śledzionie i makrofagach²⁻⁴⁾. Ponadto jony żelaza występują w komórkach mięśniowych w postaci związanej z enzymami katalitycznymi. Aby jony żelaza spełniały swoje funkcje regulacyjne, często muszą najpierw połączyć się w organizmie z makrocząsteczkami. Następnie wpływają na dalsze procesy w organizmie poprzez regulację i aktywację struktury i funkcji tych makrocząsteczek. Niektóre enzymy zależne od metali, takie jak cytochrom c, reduktaza rybonukleotydowa i dehydrogenaza bursztynianowa, wymagają regulacji przez jony żelaza. Jeśli droga transportu jonów żelaza zostanie zakłócona, może to prowadzić do takich chorób jak hemochromatoza i zaburzenia neurologiczne. Dlatego równowaga jonów żelaza w organizmie ma kluczowe znaczenie

Iron ions are essential substances for life activities. The human body's intake of iron ions mainly comes from the absorption of dietary iron by the intestine. Absorbent intestinal cells transport the absorbed iron ions to the bloodstream through iron transporters, which then transport them to various parts of the body and are utilized by various tissues¹⁾. It is distributed in different forms in different tissues and organs. About 70% of iron ions are mainly present in red blood cells in the form of binding with hemoglobin. Nearly 20% of iron ions are stored in the liver, intestine, spleen, and macrophages²⁻⁴⁾. In addition, other iron ions mainly exist in muscle cells in the form of binding to catalytic enzymes. When iron ions exert physiological regulatory effects, they often need to first bind with macromolecules in the organism, and further affect downstream pathways by regulating and activating the structure and function of these macromolecules. Some metal dependent catalytic enzymes, such as cytochrome c, ribonucleotide reductase, and succinate dehydrogenase, require regulation by iron ions. If the iron ion pathway is disrupted, it can lead to diseases such as hemochromatosis and neurological disorders. Therefore, the balance of iron ions in organisms is crucial for maintaining the orderly functioning of physiological activities⁵⁻⁷⁾.

The regulation of iron ion levels in living organisms is a dynamic and complex process. During the process

* Address for correspondence/Adres do korespondencji:

Luohe Medical College, Luohe 462002, China; e-mail: liuenna2008@hotmail.com

dla utrzymania prawidłowego funkcjonowania procesów fizjologicznych⁵⁻⁷).

Regulacja poziomu jonów żelaza w organizmach żywych jest procesem dynamicznym i złożonym. Po dostarczeniu jonów żelaza do organizmu, komórki jelita cienkiego absorbują je i przenoszą do krwiobiegu poprzez znajdujące się na powierzchni błony komórkowej jelita białko transportujące żelazo – ferroportynę FPN (*ferroportin*), kończąc w ten sposób proces wchłaniania żelaza pochodzącego ze źródeł pokarmowych. Z drugiej strony przepływ jonów żelaza w środowisku *in vivo*, między komórkami tkanki magazynującej jony żelaza a krwią, również zależy od transportu FPN. Jest to obecnie jedyne znane białko transportujące żelazo w organizmie człowieka, należące do kanałów jonowych, czyli wielkocząsteczkowych białek wbudowanych w błonę komórkową, kontrolujących przepływ jonów przez tę błonę. Funkcją FPN jest transport jonów żelaza z komórek jelitowych lub wątrobowych do krwiobiegu i jest ona pozytywnym regulatorem stężenia jonów żelaza we krwi⁸⁻¹⁰). Gdy stężenie jonów we krwi jest zbyt wysokie, może to spowodować wydzielanie hepcydyny (Hep) przez wątrobę. Hep jest peptydem sygnałowym zawierającym 4 pary wiązań disiarczkowych, który wiąże się z receptorem FPN i powoduje internalizację i degradację w obrębie FPN. Blokowanie nadmiernego transportu jonów żelaza z komórek do krwiobiegu przez FPN jest czynnikiem obniżającym stężenie jonów żelaza we krwi. FPN i Hep współpracują w celu utrzymania równowagi dwóch głównych szlaków krążenia krwi *in vivo*, *in vitro* oraz we krwi komórek tkankowych. Gdy funkcje regulacyjne tych dwóch elementów nie są skoordynowane, stężenie jonów żelaza we krwi odbiega od normalnego zakresu. Może to prowadzić do wystąpienia objawów chorobowych, jak hemochromatoza i choroba Alzheimera¹¹⁻¹⁵). W praktyce klinicznej hamujący wpływ Hep na FPN wykorzystuje się w leczeniu chorób związanych z wysokim stężeniem jonów żelaza we krwi. Hormon Hep z częściowym sukcesem zastosowano jako lek terapeutyczny. Jednak mechanizm, dzięki któremu Hep wiąże się z FPN, nie jest dokładnie poznany.

Przeglądu chemicznych metod produkcji peptydów i białek dokonano już wcześniej¹⁶).

W niniejszej pracy stabilny symulowany szkielet w pozycji wiązań disiarczkowych został osadzony *in situ*, a nieredukowalność symulowanego szkieletu wykorzystano do zbadania, czy interakcja między Hep i FPN zależy od wiązań disiarczkowych na poziomie komórkowym. W odniesieniu do szkieletów nieredukujących, poprzednio badacze opracowali serię symulowanych szkieletów, które można wykorzystać w badaniach do zastąpienia wiązań disiarczkowych w peptydach białkowych lub do „przypięcia” sekwencji peptydowych w celu zwiększenia stabilności białek i wydłużenia ich okresu półtrwania.

of iron ions flowing from the body to the body, human small intestine cells absorb iron ions and transfer them to the bloodstream through the surface iron transport protein ferroportin (FPN) on the intestinal cell membrane, completing the absorption of dietary iron sources. On the other hand, the flow of iron ions in the in vivo environment – between iron ion storage tissue cells and blood – also depends on the transport of FPN. It is currently the only known iron transporter protein in the human body, belonging to a type of ion channel protein. Its function is to transport iron ions from intestinal or liver cells to the bloodstream, and it is a positive regulator of iron ion concentration in the blood⁸⁻¹⁰). When the ion concentration in the blood is too high, it can result in secretion of hepcidin (Hep) by the liver. Hep is a signal peptide containing 4 pairs of disulfide bonds, which binds to the FPN receptor and results in internalization and degradation within the FPN. Inhibiting the excessive transport of intracellular iron ions to the bloodstream by FPN is a negative regulator of iron ion concentration in the blood. FPN and Hep work together to maintain the balance of the 2 major blood circulation pathways in vivo, in vitro and in tissue cell blood. Once the regulatory functions of the two are not coordinated, it will cause the iron ions in the blood to deviate from the normal concentration range. This can lead to the occurrence of symptoms such as hemochromatosis and Alzheimer's disease¹¹⁻¹⁵). In clinical practice, the inhibitory effect of Hep on FPN is used to treat related diseases caused by high iron ion concentration in the blood. Hep has achieved partial success as a therapeutic drug. However, the mechanism by which Hep binds to FPN is currently unclear.

Chemical methods for peptide and protein production were formerly reviewed¹⁶).

In the paper, a stable simulated skeleton at the position of disulfide bonds was embedded in situ, and the non-reducibility of the simulated skeleton was used to study whether the interaction between Hep and FPN depends on disulfide bonds at the cellular level. Regarding non-reducing skeletons, previous researchers have developed a series of simulated skeletons, which could be used to replace disulfide bonds in protein peptides or to “pin” peptide sequences in order to enhance protein stability and half-life.

Experimental

Analytical instruments and equipment

The experimental instruments used in this section of the project mainly included Shimadzu high-performance liquid chromatography, Shimadzu mass spectrometry workstation, Yuexu analytical, semi preparative, and preparative chromatography columns, various types of round bottom flasks, conical flasks, funnels, glass

Część doświadczalna

Sprzęt laboratoryjny i aparatura analityczna

Instrumenty doświadczalne wykorzystane w tej części projektu obejmowały głównie wysokosprawny chromatograf ciekłowy Shimadzu, stację roboczą do spektrometrii mas Shimadzu, kolumny chromatograficzne analityczne, półpreparatywne i preparatywne Yuexu, różne rodzaje kolb okrągłodennych, kolb stożkowych, lejeków, prętów szklanych i mieszadeł. W badaniu wykorzystano również ogrzewaną wyparkę obrotową, płytkę z żelazem krzemionkowym, rurkę magnetyczną jądrową, cząstki magnetyczne, rurkę do syntezy peptydów, tłokową pompę sprężonego powietrza, stojak żelazny, wytrząsarkę wysokotemperaturową, wytrząsarkę pokojową, butelkę reakcyjną próżniową oraz wagę analityczną.

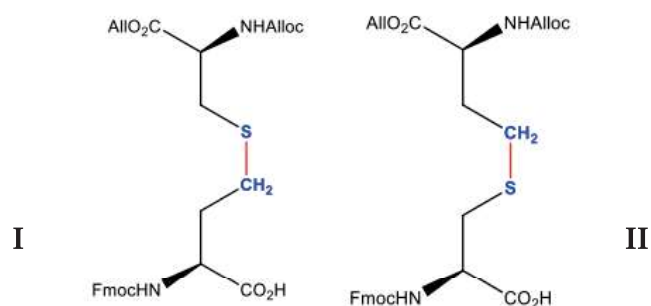
Materiały

Powszechnie stosowane chronione aminokwasy [Fmoc-Asn(Trt), Fmoc-Asp(OtBu), Fmoc-Cys(Trt), Fmoc-Cys(Acm), Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Glu(OtBu), Fmoc-Gly, Fmoc-His(Trt), Fmoc-Ile, Fmoc-Leu, Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Met, Fmoc-Phe, Fmoc-Pro, Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Trp(Boc), Fmoc-Tyr(tBu), Fmoc-Val, Fmoc-Thz, Fmoc-Ala, Fmoc-Arg(Pbf)], a także piperidyna, *N,N*-dimetyloformamid, dichlorometan, *N,N*-diizopropyletyloamina, dimetylosulfotlenek, 2-oksycyjanooctanetylu, *N,N*-diizopropylkarbodiimid, *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametylomocznik, chlorowodorek hydrazyny Fmoc-NHNH₂, kwas trifluorooctowy, eter, fenyltiometan i 1,2-etanoditiol zostały zakupione od firmy Gill Biochemical w opakowaniach o masie 1 kg.

Metodyka badań

Wprowadzenie podgrupy odpowiedzialnej za syntezę kwasu diaminodikarboksylowego

Do syntezy Hep wybrano kwas diaminodikarboksylowy związany wiązaniem siarczkowym na podstawie ortogonalnej ochrony Alloc/Allo2. Chociaż szkielet wiązań siarczkowych różnił się od naturalnych wiązań disiarczkowych tylko jednym atomem węgla, w celu wyeliminowania ewentualnego wpływu położenia przestrzennego tego atomu węgla, zastosowano wcześniej opracowaną technikę syntezy w celu uzyskania kwasów diaminodikarboksylowych związanych wiązaniem tioeterowym S-C/C-S (**I** i **II**) i wbudowano je jako grupę kontrolną w odpowiednim miejscu Hep.



rods, and stirrers. Heating rotary evaporator, silica gel plate, nuclear magnetic tube, magnetic particle, peptide synthesis tube, reciprocating compressed air pump, iron stand, high-temperature shaker, room temperature shaker, vacuum reaction bottle and analytical balance were also used in the study.

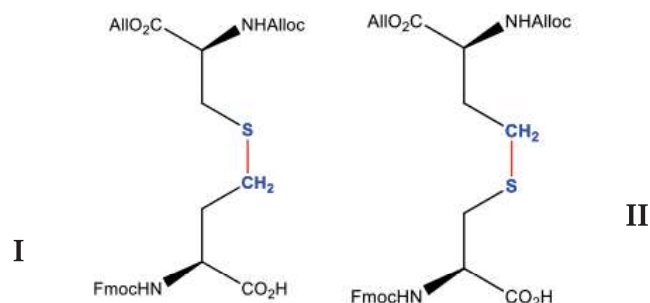
Materials

Commonly used protected amino acids [Fmoc-Asn(Trt), Fmoc-Asp(OtBu), Fmoc-Cys(Trt), Fmoc-Cys(Acm), Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Glu(OtBu), Fmoc-Gly, Fmoc-His(Trt), Fmoc-Ile, Fmoc-Leu, Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Met, Fmoc-Phe, Fmoc-Pro, Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Trp(Boc), Fmoc-Tyr(tBu), Fmoc-Val, Fmoc-Thz, Fmoc-Ala, Fmoc-Arg(Pbf)] as well as piperidine, *N,N*-dimethylformamide, dichloromethane, *N,N*-diisopropylethylamine, dimethyl sulfoxide, ethyl 2-oxime cyanoacetate, *N,N*-diisopropylcarbodiimide, *O*-(7-azabenzotriazole-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethylurea, hydrazine hydrochloride Fmoc-NHNH₂, trifluoroacetic acid, ether, phenylthiomethane and 1,2-ethanedithiol were purchased from Gill Biochemical with a specification of 1 kg.

Methods

Acquisition of diamino dicarboxylic acid synthesis subgroup

Sulfide-bonded diaminodicarboxylic acid based on orthogonal protection of Alloc/Allo2 was selected for the synthesis of Hep. Although the skeleton of sulfide bonds differed from natural disulfide bonds by only one carbon atom, in order to eliminate the possible influence of the spatial position of this carbon atom, a previously developed synthesis techniques was used to obtain the diaminodicarboxylic acids of S-C/C-S thioether-bonded diaminodiacids (**I** and **II**) and embedded it as a control group at the corresponding site of Hep.



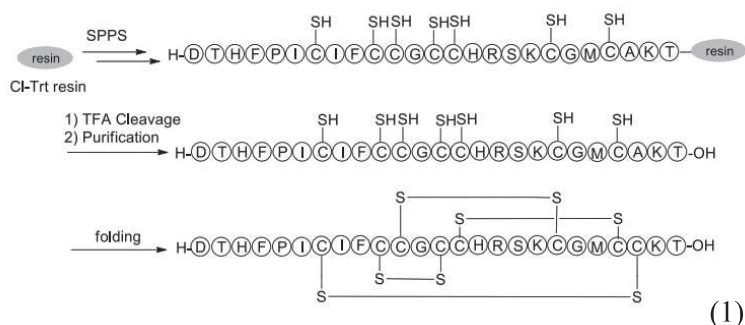
Chemical synthesis of Hep and its derivatives

Ferritin is a small protein containing 25 amino acid residues, in which 8 cysteine residues form 4 pairs of disulfide bonds at positions 7-23, 10-13, 11-19, and 14-22. Natural hepcidin (Hep0) containing 4 pairs of

Synteza chemiczna hepcydyny i jej pochodnych

Ferrytyna jest małym białkiem zawierającym 25 reszt aminokwasowych, w którym 8 reszt cysteinowych tworzy 4 pary wiązań disiarczkowych w pozycjach 7-23, 10-13, 11-19 i 14-22. Naturalna hepcydyna (Hep0) zawierająca 4 pary wiązań disiarczkowych została najpierw uzyskana zgodnie z reakcją (1) jako próbka kontrolna do badań pochodnych Hep (Hep1–8) z podstawionymi innymi wiązaniami tioeterowymi.

Żywicę z chlorku 2-chlorotrifenylometylu (160 mg, początkowy stopień zastąpienia 0,40 mmol/g) namoczono w mieszanym roztworze DMF/DCM (5 mL) i pozostawiono na 20 min do spęcznienia. Po ustaniu wzrostu objętości żywicy przepłukano ją 3-krotnie roztworami kolejno DMF/DCM/DMF. Po dodaniu Fmoc-L-Thr (tBu)-OH, 2,0 równoważniki), DIEA (3,8 równoważnika) i DMF (1,2 mL) mieszaninę wytrząsano przez 30 s. Żywicę mieszało w temp. 37°C i przy 150 rpm przez 40 min. Czynności te powtórzono w celu sprzężenia pozostałych aminokwasów. Po połączeniu przygotowano mieszaną odczynnik do cięcia (TFA/fenol/woda/anizosulfid/EDT, 82,5:5:5:5:2,5), dodano żywicę i wymieszano w celu odcięcia peptydu od żywicy. Po 2 h wprowadzono azot, aby przyspieszyć ulatnianie się kwasu trifluorooctowego. Na koniec wytrącono surowy peptyd, wykorzystując słabą rozpuszczalność peptydów w eterze lodowym w niskich temperaturach. Osad zebrano przez odwirowanie i rozdzielono metodą HPLC.

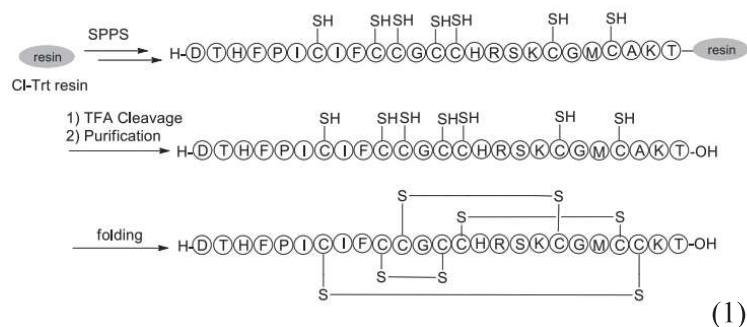


Wyniki badań i ich omówienie

Zgodnie z proponowaną strategią o szerokim zastosowaniu, szkielet został zastąpiony nieredukowalnymi wiązaniami siarczkowymi w celu zbadania, czy sposób oddziaływania między małymi białkami bogatymi w mostki disiarczkowe a ich receptorami zależy od wymiany mostków disiarczkowych. Ta strategia miała tę zaletę, że minimalnie wpływała na strukturę i stabilność białka w warunkach redukcyjnych. Syntony diaminodikwasowe zostały osadzone w pozycjach 4 par wiązań disiarczkowych w białku Hep przy użyciu technologii syntezy peptydów w fazie stałej (SPPS), tworząc pochodne Hep zawierające substytucje wiązań tioeterowych. Pochodne Hep zostały wykorzystane do zweryfikowania sposobu wiązania między Hep i FPN – nie stwierdzono klasycznego sposobu wiązania mostkiem disiarczkowym między Hep i FPN, zwłaszcza między Hep Cys7 i FPN Cys326. Umożliwiło to nowe podejście do modyfikacji medycznej

disulfide bonds was firstly obtained according to reaction (1) as a blank experimental control sample for Hep derivatives (Hep1–8) substituted with other thioether bonds.

2-Chlorotriphenylmethyl chloride resin (160 mg, initial degree of substitution 0.40 mmol/g) was soaked in a mixed solution of DMF/DCM (5 mL) and swollen for 20 min. After the resin volume stopped expanding, it was rinsed 3 times with DMF/DCM/DMF in sequence. After mixing Fmoc-L-Thr (tBu)-OH (2.0 equiv.), DIEA (3.8 equiv.), and DMF (1.2 mL) was shaken for 30 s. The resin was mixed at 37°C and 150 rpm for 40 min. The above steps were repeated to conjugate the remaining amino acids. After connection, mixed cutting reagent (TFA/phenol/water/anisulfide/EDT, 82.5:5:5:5:2.5) was prepared, the resin was added and mixed to cut the peptide from the resin. After 2 h, nitrogen gas was blown in to promote the volatilization of trifluoroacetic acid. Finally, the crude peptide was precipitated by utilizing the low solubility of peptides in ice ether at low temperatures. The precipitate was collected by centrifugation and separated by HPLC.



Results and discussion

According proposed strategy with broad application value, the skeleton was replaced with non-reducible sulfide bonds to investigate whether the interaction mode between disulfide rich small proteins and their receptors depend on disulfide bond exchange. This strategy had the advantage of minimal disturbance to protein structure and stability under reducing conditions. The diamino-diacid synthons were embedded into the positions of 4 pairs of disulfide bonds in Hep protein by using solid-phase peptide synthesis (SPPS) technology, forming Hep derivatives containing thioether bond substitutions. Hep derivatives were used to verify the binding mode between Hep and FPN, and to obtain a clearer conclusion: there was no classical disulfide bond binding mode between Hep and FPN, especially between Hep Cys7 and FPN Cys326. This provided a new approach for the modification of medicinal Hep: Cys7 was not the determining factor for Hep activity. After modification, Mini Hep with high activity and strong stability was finally obtained. As expected, with increasing interest in the pharmacological potential of biologically active peptides rich in

Hep: Cys7 nie był czynnikiem determinującym aktywność Hep. Po modyfikacji uzyskano w końcu Mini Hep o wysokiej aktywności i dużej stabilności. Zgodnie z oczekiwaniami, wraz ze wzrostem zainteresowania potencjałem farmakologicznym biologicznie aktywnych peptydów bogatych w wiązania disiarczkowe, nieredukowalne disiarczki zastępujące szkielety stanowiły potężne narzędzie do badania zależności między strukturą a aktywnością.

Spójne wyniki badań IHC i qRT PCR wykazały, że poziom ekspresji hepcydyny-25 w tkankach raka płaskonabłonkowego przełyku (ESCC) był znacznie wyższy niż w normalnych tkankach sąsiadujących z nowotworem i wiązał się z niekorzystnym rokowaniem. Zgodnie z wynikiem IHC, 102 pacjentów podzielono na grupę o wysokiej ekspresji ($n = 8$) i grupę o niskiej ekspresji ($n = 34$). Analiza korelacji wykazała, że wysoka ekspresja Hep25 była związana z głębszym naciekaniem guza (stopień zaawansowania T, $P = 0,007$). Przerzuty do węzłów chłonnych ($P < 0,001$) były istotnie skorelowane z późniejszym stopniem zaawansowania TNM ($P = 0,003$). Analiza przeżywalności Kaplana i Meiera wykazała, że 5-letni wskaźnik przeżywalności ogólnej i wskaźnik przeżywalności bez nawrotów choroby u pacjentów z grupy o wysokiej ekspresji były znacznie mniejsze niż w grupie o niskiej ekspresji. Wielowymiarowa analiza Coxa potwierdziła, że wysoka ekspresja Hep25 jest niezależnym czynnikiem ryzyka wpływającym na rokowanie pacjentów z ESCC (HR = 2,45, 95% CI: 1,38–4,36, $P = 0,002$).

Regulacja ekspresji Hep25 wpływała na zdolność proliferacji, migracji i inwazji komórek ESCC. Pomyślnie skonstruowano stabilne linie komórkowe z obniżeniem ekspresji i nadekspresją Hep25. Eksperymenty z CCK-8 i tworzeniem kolonii wykazały, że obniżenie poziomu Hep25 znacznie hamowało zdolność proliferacji komórek KYSE-150 i TE-1, podczas gdy nadekspresja sprzyjała proliferacji. Inne eksperymenty wykazały, że obniżenie poziomu hepcydyny-25 znacznie osłabiło zdolność migracji i inwazji komórek; przeciwnie, nadekspresja znacznie wzmacniała te złośliwe fenotypy.

Hepcydyna-25 sprzyjała inwazji komórek ESCC poprzez indukowanie procesu przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT). Wykrywanie markerów EMT metodą Western Blot wykazało, że w komórkach Hep25 z obniżoną ekspresją genu ekspresja markera nabłonkowego E-kadheryny była zwiększona, natomiast ekspresja markerów zrębu N-kadheryny i wimentyny była zmniejszona. Nadekspresja Hep25 dała odwrotny wynik. Wskazywało to, że Hep25 była skutecznym induktorem EMT, co mogło stanowić główny mechanizm sprzyjający inwazji i przerzutom ESCC.

Wnioski

Hep jest peptydem sygnałowym zawierającym 4 pary wiązań disiarczkowych, który wiąże się z receptorem FPN i powoduje internalizację i degradację w obrębie FPN.

disulfides, the irreducible disulfides replacing skeletons provided a powerful solution for the study of structure/activity relationships.

The consistent results of IHC and qRT PCR showed that the expression level of Hepcidin-25 in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) tissues was significantly higher than that in normal tissues adjacent to the cancer and was associated with poor prognosis. According to the IHC score, 102 patients were divided into a high expression group ($n = 8$) and a low expression group ($n = 34$). Correlation analysis showed that high expression of Hep25 was associated with deeper tumor infiltration (T staging, $P = 0.007$). Lymph node metastasis ($P < 0.001$) was significantly correlated with later TNM staging ($P = 0.003$). Kaplan-Meier survival analysis showed that the 5-year overall survival rate and disease-free survival rate of patients in the high expression group were significantly lower than those in the low expression group. Cox multivariate analysis confirmed that high expression of Hep25 is an independent risk factor affecting the prognosis of ESCC patients (HR = 2.45, 95% CI: 1.38–4.36, $P = 0.002$).

Regulating Hep25 expression affected the proliferation, migration, and invasion ability of ESCC cells. Successfully constructed stable cell lines with knockdown and overexpression of Hep25. CCK-8 and colony formation experiments showed that knocking down Hep25 significantly inhibited the proliferation ability of KYSE-150 and TE-1 cells, while overexpression promoted proliferation. Scratch and Transwell experiments showed that knocking down Hepcidin-25 significantly weakened the migration and invasion ability of cells; On the contrary, overexpression significantly enhances these malignant phenotypes.

Hepcidin-25 promoted ESCC cell invasion by inducing epithelial-mesenchymal transitions (EMT) process. Western Blot detection of EMT markers revealed that in Hep25 knockdown cells, the expression of epithelial marker E-cadherin was upregulated, while the expression of stromal markers N-cadherin and Vimentin was downregulated. Overexpression of Hep25 resulted in the opposite outcome. This indicated that Hep25 was an effective inducer of EMT, which might be its core mechanism for promoting ESCC invasion and metastasis.

Conclusion

Hep is a signal peptide containing 4 pairs of disulfide bonds, which binds to the FPN receptor and results in internalization and degradation within the FPN. A strategy of using non reducing thioether bonds as substitutes to detect disulfide bond exchange between disulfide rich small proteins and their receptors was proposed. The diaminiodiacid synthons were embedded into the posi-

Zaproponowano strategię wykorzystania nieredukujących wiązań tioeterowych jako substytutów do wykrywania wymiany wiązań disiarczkowych między małymi białkami bogatymi w wiązania disiarczkowe a ich receptorami. Syntony diaminodikwasowe zostały osadzone w pozycjach 4 par wiązań disiarczkowych w białku Hep przy użyciu technologii SPPS, tworząc pochodne Hep zawierające substytucje wiązań tioeterowych.

tions of 4 pairs of disulfide bonds in Hep protein using SPPS technology, forming Hep derivatives containing thioether bond substitutions.

Received/Otrzymano:

08-09-2025

Accepted/Zaakceptowano:

26-09-2025

Reviewed/Zrecenzowano:

11-09-2025

Published/Opublikowano:

20-10-2025

REFERENCES/LITERATURA

- [1] L. Zhao, X. Yang, S. Zhang et al., *Ren. Fail.* 2023, **45**, No. 1, 1.
- [2] C. Albert, M. Haase, A. Albert et al., *Ann. Lab. Med.* 2021, **41**, No. 2, 357.
- [3] J. Ho, M. Reslerova, B. Gali et al., *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2011, **6**, No. 10, 2340.
- [4] J.R. Prowle, V. Ostland, P. Calzavacca et al., *Nephrol Dial Transplant.* 2012, **27**, No. 2, 595.
- [5] C. Albert, M. Haase, A. Albert et al., *Ann. Lab. Med.* 2020, **40**, No. 2, 131.
- [6] K. Mori, H.T. Lee, D. Rapoport et al., *J. Clin. Invest.* 2005, **115**, No. 3, 610.
- [7] M. Haase, R. Bellomo, A. Haase-Fielitz, *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010, **55**, No. 19, 2024.
- [8] K.M. Schmidt-Ott, K. Mori, J.Y. Li et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007, **18**, No. 2, 407.
- [9] S. Elitok, H. Kuppe, P. Devarajan et al., *Anesth. Analg.* 2021, **133**, No. 6, 1510.
- [10] A. Krause, S. Neitz, H.J. Magert et al., *FEBS Lett.* 2000, **480**, 147.
- [11] G. Nicolas, M. Bennoun, I. Devaux et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, **98**, 8780.
- [12] H.N. Hunter, D.B. Fulton, T. Ganz et al., *J. Biol. Chem.* 2000, **277**, 37597.
- [13] Anonym, *EP09 Measurement procedure comparison and bias estimation using patient samples*, Clinical and Laboratory Standards Institute, June 20, 2018.
- [14] R.L. Wasserstein, N.A. Lazar, *Am. Statistician* 2016, **70**, 129.
- [15] A. Krause, S. Neitz, H.J. Magert et al., *FEBS Lett.* 2000, **480**, 147.
- [16] S. Chandrudu, P. Simerska, I. Toth, *Molecules* 2013, **18**, 4373; doi:10.3390/molecules18044373.



Międzynarodowa Konferencja PractiCORR

www.practicorr.org

25-27.11.2025, Warszawa



POLSKIE
STOWARZYSZENIE
KOROZYJNE



EFCO
EUROPEAN FEDERATION OF CORROSION

SPONSORZY



PATRONAT HONOROWY



PATRONAT MEDIALNY

