

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



Iuliia Gurieva

Železo a regulace jeho metabolismu při zánětu a poruchách erythropoézy

Iron and regulation of its metabolism in inflammation and disorders of erythropoiesis

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Martin Vokurka, CSc.

Konzultant: ing. Jan Krijt, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 20.3.2019

Iuliia Gurieva

Identifikační záznam

GURIEVA, Iuliia. *Železo a regulace jeho metabolismu při zánětu a poruchách erythropoézy. [Iron and regulation of its metabolism in inflammation and disorders of erythropoiesis]*. Praha, 2019. 91 s., 2 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav patologické fyziologie, 1. LF UK 2019. Školitel: doc. MUDr. Martin Vokurka, CSc.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda upřímně poděkovala doc. MUDr. Martinovi Vokurkovi, CSc. za velkou trpělivost, odborné vedení, stálou pomoc během studia a při sepisování disertační práce.

Chtěla bych také poděkovat ing. Janovi Krijtovi, Ph.D. za pomoc při plánování a provádění pokusů, pečlivé čtení práce a cenné komentáře.

Dále chci poděkovat RNDr. Janě Frýdlové, Ph.D. za projevený zájem a všestrannou pomoc zejména v oblasti proteinových analýz a RNDr. Petrovi Příkrylovi, Ph.D. za vyvinutí metody izolace frakce plazmatických membrán.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem kolegyním a kolegům z Ústavu patologické fyziologie I. LF UK za příjemné pracovní prostředí.

Můj velký dík také patří celé mé rodině za podporu, trpělivost a lásku!

Хотела бы также выразить свою благодарность всей своей семье за поддержку, проявленное терпение и любовь. Спасибо Вам дорогие!

Práce vznikla za podpory grantů:

- Grantová agentura UK v Praze, grant GAUK IG 186315 (Iuliia Gurieva)
- Grantová agentura České republiky, grant 15-16803S (Jan Krijt)
- PRVOUK P24 a Progres Q26 (institucionální podpora UK)
- Specifický vysokoškolský výzkum UK, SVV 260157

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	7
ABSTRAKT (česky)	9
ABSTRACT (anglicky).....	11
1. ÚVOD.....	13
1.1 Železo.....	13
1.1.1 Přehled metabolismu a funkcí železa.....	13
1.1.1.1 Vstřebávání železa.....	15
1.1.1.2 Distribuce železa.....	16
1.1.1.3 Recyklace železa.....	16
1.1.1.4 Ztráty a výdej železa.....	16
1.1.1.5 Kvantitativní pohled na systémový metabolismus železa	17
1.1.2 Regulace metabolismu železa	18
1.1.2.1 Buněčná regulace.....	18
1.1.2.2 Systémová regulace	19
1.2 Erytropoéza.....	19
1.2.1 Erythropoetin (EPO)	21
1.2.2 Hemoglobinizace.....	22
1.2.3 Typy erytropoézy z klinického i experimentálního pohledu.....	23
1.3 Hepcidin.....	24
1.3.1 Funkce hepcidinu a mechanismus účinku.....	25
1.3.2 Hepcidin v patogenezi onemocnění	26
1.3.3 Regulace exprese hepcidinu	27
1.3.3.1 Signalizační dráha regulující expresi hepcidinu při změnách železa	29
1.3.3.2 Matriptáza-2 (MT-2, TMPRSS6).....	30
1.3.3.3 Zánět a zánětová dráha regulující expresi hepcidinu.....	31
1.3.3.4 Erytroidní regulace exprese hepcidinu	32
1.3.3.5 Erytroferron (ERFE).....	33
1.3.3.6 Vliv hypoxie na expresi hepcidinu	35
1.3.4 Vztahy signálních drah regulace hepcidinu a hierarchie regulačních faktorů	35
2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZA	38
3. MATERIÁLY A METODY.....	39
3.1 Materiály.....	39
3.1.1 Materiálové vybavení.....	39

3.1.2	Rozpouštědla a chemikálie.....	39
3.1.3	Protilátky	39
3.2	Použitá zvířata.....	40
3.3	Aplikace	41
3.4	Hematologické parametry.....	41
3.5	Měření koncentrace železa.....	42
3.5.1	Koncentrace nehemového železa v játrech (liver iron concentration, LIC).....	42
3.5.2	Měření koncentrace železa v plazmě	42
3.6	Izolace RNA a měření její koncentrace	42
3.7	Reverzní transkripce	43
3.8	Real-time PCR	44
3.9	Western blot analýza.....	45
3.9.1	Příprava vzorků	45
3.9.2	Stanovení koncentrace proteinů	45
3.9.3	Postup Western blot analýzy	46
3.9.4	Odstranění vázaných protilátek z PVDF membrány.....	46
3.10	Statistické hodnocení	47
4.	VÝSLEDKY.....	48
4.1	Studium exprese <i>Tmprss6</i> (TMPRSS6) na modelech myší a potkanů (příloha I).....	48
4.1.1	Hematologické parametry	48
4.1.1.1	Nízkoželezná dieta snižuje hematologické parametry.....	48
4.1.1.2	Podání EPO zvyšuje hematologické parametry.....	48
4.1.2	Koncentrace nehemového železa v játrech	49
4.1.3	Vliv podání EPO na expresi <i>Hamp</i> a <i>Tmprss6</i> (TMPRSS6) v játrech.....	50
4.1.4	Vliv nedostatku železa na expresi <i>Hamp</i> a <i>Tmprss6</i> (TMPRSS6) v játrech.....	53
4.1.5	Vliv podání železa na expresi <i>Hamp</i> , <i>Bmp6</i> , <i>Tmprss6</i> (TMPRSS6) a HJV v játrech...	56
4.2	Vliv erythropoetinu na expresi erytroferronu a matriptázy-2 u potkanů (příloha II)	60
4.2.1	Hematologické parametry a hmotnost sleziny	60
4.2.2	Koncentrace železa v tkáních a v plazmě.....	60
4.2.2.1	Množství železa v játrech bylo zvýšené jak po podání samotného železa, tak i při jeho kombinaci s EPO	60
4.2.2.2	Množství železa v plazmě bylo sníženo po podání samotného EPO i po jeho podání v kombinaci se železem	61
4.2.3	Expres vybraných genů regulační dráhy BMP/ SMAD	61

4.2.3.1 Podání EPO snižuje expresi Hamp v játrech, ale předchozí podání železa tomuto poklesu zabraňuje	61
4.2.3.2 Podání EPO snižuje expresi Smad7 a Id1 v játrech na úrovni mRNA i množství proteinu pSMADs, ale nemění expresi Bmp6 a množství proteinu HJV	62
4.2.4 Expres a množství proteinů regulačních genů pro erytoferron a matriptázu-2.....	65
4.2.4.1 Podávání EPO zvyšuje expresi Fam132b na úrovni mRNA i na úrovni proteinu ERFE ve slezině bez ohledu na předchozí podání železa.....	65
4.2.4.2 Podání EPO nemění expresi Tmprss6 na úrovni mRNA, ale zvýší množství proteinu TMPRSS6, přičemž podání železa toto zvýšení potlačuje.....	66
5. DISKUSE	68
6. ZÁVĚRY	77
7. LITERATURA	78
8. PŘEHLED VLASTNÍCH PUBLIKACÍ A PŘÍLOHY	89

SEZNAM ZKRATEK

ACD – anemia of chronic disease (anémie chronických chorob)

ALAS – syntáza kyseliny delta-aminolevulové

ATP1A – Na⁺/K⁺ATPase α

BMP/ BMP-R – bone morphogenetic protein / receptor

CP – ceruloplasmin

DcytB – duodenální cytochrom B

DMT-1 – divalent metal transporter 1

EPO – erythropoetin

EPO-R – erythropoetinový receptor

ERFE – erytoferron

FPN – ferroportin

GDF 15 – growth differentiation factor 15

HAMP – hepatic antimicrobial peptide (hepcidin)

Hb – hemoglobin

HCT – hematokrit

HEPH – hephaestin

HFE – hemochromatosis (Fe) protein

HH – hereditární hemochromatóza

HIF – hypoxií indukovaný faktor

HJV (HFE2) – hemojuvelin

HSC – hematopoetic stem cell (hematopoetická kmenová buňka)

Id1 – DNA-binding protein inhibitor

IDA – iron deficiency anemia (anémie z nedostatku železa)

IL-6 – interleukin 6

i.p. – intraperitoneálně

IRE – iron responsive elements

IRP – iron regulatory proteins

IRIDA – iron refractory iron deficiency anemia

JAK-2 – Janus kinase 2

KD – kostní dřev

LIC – liver iron concentration (jaterní obsah železa)

MT-2 – matriptáza-2

NTBI – non transferrin bound iron (železo nevázané na transferin)

PHZ – fenyhydrazin

PPIX – protoporfyrin IX

pSMAD 1, 5, 8 – phosphorylated mothers against decapentaplegic 1, 5, 8

RT-PCR – real-time polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce v reálném čase)

SMAD – mothers against decapentaplegic

STAT3 – signal transducer and activator of transcription 3

Tf – transferin

TfR 1/2 – transferinový receptor 1/2

TGF- β – transforming growth factor beta

TMPRSS6 – transmembrane serine protease 6 (matriptáza-2)

TNF- α – tumor necrosis factor alfa

TSAT – transferrin saturation (saturace transferinu)

TWSG1 – twisted gastrulation protein homolog 1

ABSTRAKT

Železo je kovový prvek, který hraje v lidském organismu zásadní roli, ale jeho nedostatek i nadbytek jsou spojeny se závažnými chorobnými stavy. Hlavním regulátorem metabolismu železa je hepcidin, peptid tvořený v játrech. Nadbytek železa a zánět expresi hepcidinu zvyšují, nedostatek železa a aktivovaná erythropoéza ji snižují. Molekulární mechanismy regulace exprese hepcidinu a jejich hierarchie a propojení jsou poznány jen částečně. Hlavní regulační dráhou je BMP/ SMAD, která reaguje na množství železa v organismu. Její součástí tvoří řada molekul včetně hemojuvelinu a HFE a jejich mutace jsou spojeny s neadekvátně nízkou produkcí hepcidinu, nadbytkem železa a hereditární hemochromatózou. Erytroidní regulace, která musí mít na expresi hepcidinu negativní působení, je známa jen částečně, stejně jako její propojení s dráhou BMP/ SMAD. V nedávné době byly popsány dva nové negativní regulátory exprese hepcidinu. Membránový enzym přítomný v hepatocytech – matriptáza-2 (MT-2, TMPRSS6) a solubilní faktor tvořený erytroblasty – erytoferron (ERFE).

Cílem naší práce bylo zjistit, jak je MT-2 zapojena do erytroidní dráhy a zdali nemůže být místem, kde se protínají jednotlivé regulační dráhy. Stanovovali jsme expresi genů na úrovni mRNA pomocí real-time PCR a na úrovni proteinů pomocí imunoblotů. K pokusům jsme nejprve použili samce myši a samice potkanů, kterým byl podáván erythropoetin (EPO), železo či byli na nízkoželezné dietě. Prokázali jsme, že železo ani EPO neovlivňují expresi MT-2 na úrovni mRNA, ale že je množství MT-2 ovlivněno na úrovni proteinu. EPO a nedostatek železa navozený nízkoželeznou dietou ji zvyšují, podání železa ji naopak snižuje. Změny byly výraznější u potkanů. V dalších experimentech jsme proto u potkanů podali kombinaci podávání železa a EPO a sledovali jejich vliv na MT-2 a ERFE. Potvrdili jsme předešlé pozorování na myších, že při předchozím podání vysokých dávek železa nedochází po podání EPO k snížení exprese hepcidinu, a to přesto, že exprese ERFE ve slezině zůstává zvýšena. Protože podání železa zabránilo vzestupu množství proteinu MT-2 po EPO, domníváme se, že MT-2 přispívá k omezení poklesu hepcidinu.

Z našich výsledků dále vyplývá, že zvýšené ERFE i snížené množství fosforylovaných SMAD proteinů nedokážou v případě předchozího podání železa dostatečně snížit expresi hepcidinu. Exprese hepcidinu zůstává vysoká (normální) i v přítomnosti vysokého množství ERFE v plazmě a aktivaci dráhy BMP/ SMAD. Podání železa přitom zabraňuje zvýšení množství

MT-2, což by mohlo být molekulární příčinou toho, že exprese hepcidinu není snížena, a to i při současné výrazné erytroidní stimulaci. To by nasvědčovalo tomu, že MT-2 může mít roli v dlouhodobější erytroidní regulaci hepcidinu a může být místem, kde se erytroidní i zásobní regulační systém setkávají a že mechanismy regulace hepcidinu a metabolismu železa jsou zřejmě výrazně ovlivněny časovým průběhem a mohou se lišit podle akutnosti či dlouhodobosti změn v erytropoéze.

Klíčová slova: železo, hepcidin, erythropoetin, matriptáza-2, erytoferron, zánět

ABSTRACT

Iron is a metal element with crucial roles in human organism. Both iron deficiency and iron overload are important pathologies. Hepcidin, a peptide synthesized in the liver, is a key iron regulatory hormone. Increased amount of iron and inflammation stimulate its expression while iron deficiency and activated erythropoiesis cause hepcidin downregulation. The regulation of hepcidin expression on the molecular level and its hierarchy and interactions are not completely known. The main regulatory pathway is BMP/ SMAD which reacts to the iron amount in the organism. Several molecules, including hemojuvelin and HFE, are involved in this pathway and their mutations are linked to inappropriately low hepcidin production, iron overload and hereditary hemochromatosis. Erythroid regulation with suppressive action on hepcidin expression is known only partially as well as its connection to the BMP/ SMAD pathway. Recently, two new negative regulators of hepcidin expression have been described. Membrane enzyme present in hepatocytes – matriptase-2 (MT-2, TMPRSS6) and soluble factor secreted by erythroblasts – erythroferrone (ERFE).

The aim of our work was to investigate how MT-2 is involved in the erythroid regulatory pathway, and whether it can represent the molecule where various regulatory pathways interact. We determined gene expression as the amount of mRNA by real-time PCR and as protein level by immunoblots. Firstly, we used male mice and female rats which were given erythropoietin (EPO), iron or were kept on low iron diet. We proved that neither iron nor EPO influenced MT-2 expression on the mRNA level but that MT-2 reacted to both on protein level. EPO and iron deficiency induced by low iron diet increased the amount of MT-2 protein while iron administration decreased it. The changes were more pronounced in rats. In next experiments we therefore administered the combination of iron and EPO and studied their influence on MT-2 and ERFE in rats. We confirmed previous data in mice that the previous administration of high iron doses blocks the EPO mediated downregulation of hepcidin expression despite the increased ERFE expression in the spleen. As iron administration prevented the increase of MT-2 protein amount observed after EPO, we suppose that MT-2 plays role in the limitation of hepcidin downregulation.

Our results show that both increased ERFE and decreased amount of phosphorylated SMADs are not able to sufficiently decrease hepcidin expression if iron was previously

administered. Hepcidin expression remains high (i.e. normal) even in the presence of high amount of ERFE in the plasma and activated BMP/ SMAD pathway. Iron administration restraint the increase of MT-2 protein amount which could be the molecular cause of the fact that hepcidin expression is not increased despite enhanced erythroid stimulation. It could indicate that MT-2 could have a role in long term erythroid hepcidin regulation and could be one of the points where erythroid and store regulatory systems interact. Moreover, the mechanisms of hepcidin regulation and iron metabolism are probably strongly influenced by time course and can differ in acute and long term changes in erythropoiesis.

Key words: iron, hepcidin, erythropoietin, matriptase-2, erythroferrone, inflammation

1. ÚVOD

Poruchy metabolismu železa jsou významnou oblastí lidské medicíny a patofyziologie. Asi třetina obyvatel planety trpí anémií (Kassebaum, 2014), přičemž nejčastější jsou anémie z nedostatku železa (sideropenická) a anémie chronických chorob, u níž je metabolismus železa vlivem zánětlivých procesů rovněž postižen. Nedostatek železa v organismu může být zapříčiněn sníženým příjmem, poruchou vstřebávání nebo jeho nadměrnými ztrátami, zejm. krvácením. Na opačném pólu je pak přetížení železem, které je život ohrožující a postihuje nemocné s genetickými chorobami, k nimž patří hereditární hemochromatóza a některé hemolytické anémie (zejm. talasémie) či v důsledku podávání krevních transfuzí při útlumu kostní dřeně.

Poznání regulace metabolismu železa, zejména ve vztahu k erythropoéze a k zánětu, je proto důležité a může mít význam nejen k poznání (pato)fyziologických dějů, ale i jako podklad pro diagnostické či terapeutické postupy.

1.1 Železo

Železo (lat. *ferrum*, ${}_{26}\text{Fe}$, VIIB skupina) je přechodný kovový prvek, druhý nejrozšířenější kov na Zemi a nejhojněji zastoupený kov v lidském těle. Jeho biologický význam spočívá v jeho schopnosti měnit svůj oxidační stav (počet elektronů, $\text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+}$) a vázat a přenášet kyslík, čímž se nachází v samém centru zásadních biologických a energetických dějů živých organismů. Tyto vlastnosti jej však zároveň činí i z hlediska organismu potenciálně nebezpečným s ohledem na toxicitu volného železa. Celé „zakomponování“ tohoto reaktivního kovu do organických sloučenin organismu, tj. jeho příjem, chemické zpracování, využití, ochrana před jeho potenciálně toxickým působením a regulace těchto dějů jsou nesmírně důmyslnými a důležitými ději, které souvisí s mnoha fyziologickými a patologickými ději, a několika z těchto souvislostí a procesů se zabývá i tato práce.

1.1.1 Přehled metabolismu a funkcí železa

Metabolismus železa v lidském organismu je tvořen několika navzájem propojenými a regulovanými ději (obr. 1) – resorpcí, distribucí a recyklací (Ganz, 2013). V těle jsou obsaženy 3 až 4 gramy železa, větší množství je obecně u mužů. Zhruba dvě třetiny železa jsou obsaženy

v erytronu – to znamená v *hemoglobinu* (Hb) červených krvinek a jejich prekurzorů (erytroblastů) v kostní dřeni (KD). Molekula Hb je tvořena 4 řetězci aminokyselin, každá ze kterých obsahuje vlastní atom dvojmocného železa (Fe^{2+}), na který se pak má schopnost reverzibilně vázat kyslík. To znamená, že jedna molekula Hb schopna navázat až 4 atomy kyslíku (oxyhemoglobin, oxyHb).

Přibližně čtvrtina železa se nachází v zásobárnách, kterými jsou játra a makrofágový systém (RES). Zbývající železo je v ostatních tkáních a buňkách těla, protože každá buňka železo obsahuje. Ze specializovaných buněk jde zejména o svalové buňky, které obsahují *myoglobin*.

K aktivním formám železa patří železo obsažené v hemu, resp. v hemoproteinech. Mimo zmíněný *Hb* a *myoglobin* jde o velkou skupinu cytochromů, a to jak v dýchacím řetězci, tak rozsáhlou rodinu *cytochromů P450* (CYP), které mají velký význam v metabolických a detoxikačních dějích. Dalšími hemoproteiny jsou např. *peroxidáza*, *kataláza*, *NO syntáza* a desítky dalších proteinů. K významným nehemovým proteinům patří *ribonukleotid reduktáza*, která je klíčovým enzymem syntézy DNA.

Zásobní železo je „nefunkční“, netoxické a nachází se ve *feritinu*, který objevil v 30. letech 20. století český fyziolog profesor Vilém Laufberger. Může obsahovat až 4000 atomů železa. Molekula, neobsahující železo se nazývá apoferritin. Nejvíce je ferritin zastoupen v játrech, makrofázích (slezině, kostní dřeni) a střevním epitelu. Sérový ferritin pochází z makrofágů a je ukazatelem zásob železa v těle. Při nadbytku železa se ferritin mění na *hemosiderin*, ve které se železo nachází v nerozpustné formě, a proto je méně dostupné.

Transportní železo se nachází v plazmě a je vázáno na transportní protein *transferrin* (Tf).

Železo v organismu může se tak nacházet ve třech stavech: aktivní, zásobní a transportní. Volné dvojmocné železo je velmi toxické a způsobuje vznik volných radikálů Fentonovou reakcí. Železo zásobní je méně reaktivní a méně rozpustné, nachází se ve *feri* formě (Fe^{3+}), zatímco železo funkční je ve formě *fero* (Fe^{2+} , jako v Hb) či mezi oběma formami přechází (jako v cytochROMEch).

1.1.1.1 Vstřebávání železa

Železo se vstřebává v duodenu, popř. v proximální části jejunu. Z fyziologického hlediska je pro jeho správné vstřebávání nutné kyselé prostředí v žaludku (kyselina chlorovodíková, HCl). Organické kyseliny ve stravě, jako je kyselina citrónová a kyselina askorbová (vitamín C), také usnadňují redukci a rozpustnost nehemového železa. Naopak resekce žaludku či achlorhydrie vstřebávání železa zhoršují. Snižovat vstřebávání železa může i strava bohatá na vlákninu – zelenina, ovoce, luštěniny (jsou bohaté na oxaláty, fytáty, taniny), vytvářející s ním nerozpustné nebo chelátové komplexy, které se pak těžko vstřebávají. Proto za nejlépe vstřebatelné se považuje hemové železo.

Z molekulárního hlediska je vstřebávání prozkoumáno pouze částečně. V lidském organismu se většina železa vstřebává v hemové formě, ale dosud tento transport není přesně popsán. Z nehemového železa se vstřebává železo dvojmocné, které je přenášeno molekulou v apikální membráně enterocyту – *divalent metal transporter 1* (DMT1, je kódován genem *SLC11A2*). DMT1 je transmembránový protein, který má schopnost přenášet železo i jiné dvojmocné kovy, například Zn^{2+} . Kromě enterocytů je přítomen i v endosomech erytroidních prekurzorů a v dalších buňkách. Mutací DMT1 vzniká hypochromní mikrocytární anémie v kombinaci s přetížením železem (Mims and Prchal, 2005). Spolu s DMT1 na apikální straně enterocyту se nachází rovněž i ferrireduktáza – *duodenální cytochrom B* (DcytB, je kódován genem *CYBRD1*), která redukuje trojmocné železo (v potravě hojnější) na dvojmocné. Exprese obou těchto molekul je zvýšena při nedostatku železa.

O přesunech železa v rámci enterocyту není mnoho známo, železo vystupuje na bazolaterální straně enterocyту pomocí jediného známého buněčného exportéru železa – *ferroportinu* (FPN, který je kódován genem *SLC40A1*). Následně je železo oxidováno ferroxidázou ($Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$) - *hephaestin* (HEPH, blízký ceruloplasminu) a vázáno na transferin. FPN je přítomen i v dalších tkáních, zejm. je důležitý při recyklaci železa z retikuloendotelových buněk a hepatocytů (Pietrangelo, 2004).

Dospělý zdravý člověk vstřebá pouze cca 10 % železa přijatého v potravě, tj. cca 1 až 2 mg. Vstřebávání železa je však klíčovým dějem, kterým je řízeno jeho množství v těle.

1.1.1.2 Distribuce železa

V plasmě je železo přenášeno ve feri formě (Fe^{3+}) vázané na Tf (*apoTf*). Molekula Tf je schopna vázat dva atomy železa (*holoTf*), za fyziologických okolností saturace Tf železem (TSAT) představuje 25 až 40 %. Při nadbytku železa je železo v plazmě přítomno i vázané nespecificky na jiné molekuly, jako je albumin či citrát (tzv. netransferinové železo, NTBI – non transferrin bound iron). Tf distribuuje železo do všech buněk. Buňky dle potřeby železa vystaví na své membráně *transferinové receptory 1* (TfR1), kterých může být na erytroblastech řádově až 100 tisíc. Na ně se váže holoTf, který je procesem zvaným receptorem mediovaná endocytóza pohlcen do buněk. V endosomu, po jeho okyselení, je železo z vazby na Tf uvolněno, redukováno a vystupuje molekulou DMT1 do vnitřku buňky, zatímco TfR1 a Tf jsou recyklovány zpět na membránu (jde o značnou úsporu těchto molekul). Nitrobuněčné železo je dále využito (např. k syntéze hemu v mitochondriích) či je uloženo do feritinu.

1.1.1.3 Recyklace železa

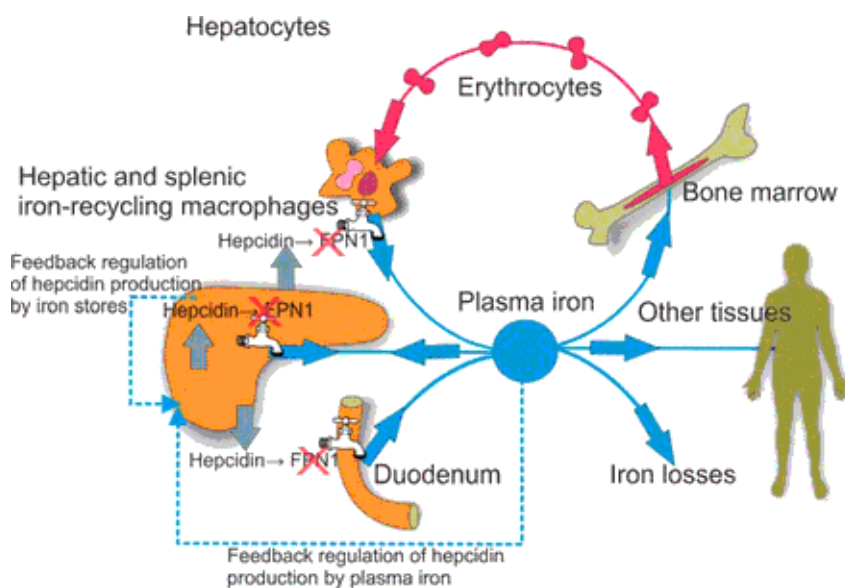
Naprostá většina železa v lidském organismu je recyklována. Zaniklé buňky jsou fagocytovány makrofágy, které dále skladují či uvolňují železo. Kvantitativně nejvýznamnější je fagocytóza erytrocytů (erytrocytofagocytóza), která představuje denní odstranění cca 1 % cirkulujících červených krvinek. Pomocí neustálé recyklace je udržovaná stálá úroveň erytropoézy, protože ta potřebuje kontinuální dodávku železa. Hem je degradován enzymem *hemoxygénázou*, železo je následně skladováno ve feritinu a dle potřeby (a regulace) je uvolněno z makrofágů – vystupuje opět molekulou FPN, je oxidováno plazmatickým proteinem *ceruloplasminem* (CP) a je navázáno na Tf.

1.1.1.4 Ztráty a výdej železa

Lidský organismus nemá schopnost výdeje (exkrece) železa, neexistuje žádný regulovaný a specifický způsob, jak železo z organismu vyloučit. Existují pouze ztráty železa – fyziologické (běžné odlupování buněk, menstruace) nebo patologické (zejména krvácení).

1.1.1.5 Kvantitativní pohled na systémový metabolismus železa

Z celkových 3 až 4 gramů železa v dospělém organismu představují denní ztráty a resorpce pouze 1 až 2 mg. Resorpce železa v duodenu je zvýšena při jeho zvýšené spotřebě (růst, krvácení, těhotenství apod.). Naopak recyklace železa představuje denně asi 25 mg, především jde o přesuny mezi zaniklými erytrocyty a nově vznikajícími červenými krvinkami v KD. V plasmě je při normální TSAT přítomno asi 3 mg železa. Znamená to, že plazmatické železo se během dne cca 6× vymění. Koncentrace železa v plasmě je mnohem rychleji regulována právě recyklací, zatímco resorpce je klíčová z hlediska dlouhodobého udržení celkového množství železa v těle (obr. 1).



Obr. 1: Schéma metabolismu železa (Coffey, 2017)

1.1.2 Regulace metabolismu železa

Množství železa jako prvku důležitého pro klíčové funkce organismu, ale zároveň potenciálně toxického, musí být na úrovni organismu i buněk pečlivě regulováno.

Organismus musí být schopen získat velké množství železa k růstu a vývoji (včetně těhotenství), ale zároveň musí zabránit vzniku přetížení. Základní regulace celkového množství železa v organismu probíhá na úrovni resorpce železa; protože se za fyziologických okolností vstřebává jen cca desetina množství v potravě, má tato regulace spíše inhibiční charakter, ale zároveň musí být schopna vstřebávání železa v závažných situacích rychle zvýšit, např. po masivním krvácení. To do jisté míry odpovídá i nastavení regulace hlavním „spotřebitelem“ železa, kterým je erythropoéza. Ta je rovněž velmi rychle schopna zvýšit produkci červených krvinek, jejichž tvorba vyžaduje velký přísun železa. Proto jsou oba tyto děje a jejich regulace vzájemně provázány a její mechanismy studovány současně.

1.1.2.1 Buněčná regulace

Buněčná regulace se odehrává na úrovni regulace proteinů, které jsou důležité pro zisk, využití a skladování železa. Probíhá prostřednictvím posttranskripční regulace mRNA, které obsahují ve své molekule tzv. *iron responsive elements* (IRE). Na tyto IRE se váží *iron regulatory proteins* (IRP), čímž ovlivní stabilitu daných mRNA (Zhang et al., 2014).

Systém je důmyslný v tom smyslu, že o efektu na danou mRNA rozhoduje umístění daných IRE, množství železa, efekt vazby IRP na IRE a akonitázová aktivita. V případě mRNA důležitých pro zisk železa (např. TfR1), kde je IRE na 3' konci, vazba IRP vzniká při nedostatku železa a touto vazbou dochází ke stabilizaci mRNA pro TfR1 a tudíž přepisu bílkoviny. Buňka tak získává železo a využívá ho k syntéze hemu. Pokud jsou IRE na 5' konci (např. feritin), vazba IRP vede k inhibici translace.

Situace je obrácená při nadbytku železa – zde se IRP na IRE nevážou, v případě TfR1 dochází k štěpení příslušné mRNA, zatím co u feritinu probíhá translace.

Podobně jako mRNA pro feritin se chová i mRNA pro erytroidně specifickou syntázu kyseliny 5-aminolevulové (ALAS-2), která je v erytroblastech klíčovým enzymem syntézy porfyrinů a tudíž hemu. Stabilita její mRNA stoupá při dostatku železa.

1.1.2.2 Systémová regulace

Buněčné procesy se sice v dílčích dějích zapojují i do dějů systémových, ale ty vyžadují specifickou regulaci. V roce 1994 byla postulována existence tzv. zásobního (angl. *store*) a erytroidního regulátoru (Finch, 1994). Významné poznání těchto mechanismů vychází ze studia mechanismů vzniku onemocnění s přetížením železem (hereditární hemochromatóza, některé hemolytické anémie).

První molekulou, která byla spojena se systémovou regulací železa, je *HFE*, objevená v roce 1996 (Feder et al., 1996) a spojená s nejčastější formou hereditární hemochromatózy (HH, nyní typ 1). Zásadní objev v této oblasti pak bylo popsání *hepcidinu* v roce 2001 jako hlavního systémového regulátoru (hormonu) metabolismu železa, přičemž dalších více jak 15 let je věnováno studiu jeho regulace a vztahu k dalším nemocem, přičemž byly takto objeveny další molekuly a dosud není zcela jasná síť (network) této příslušné regulace.

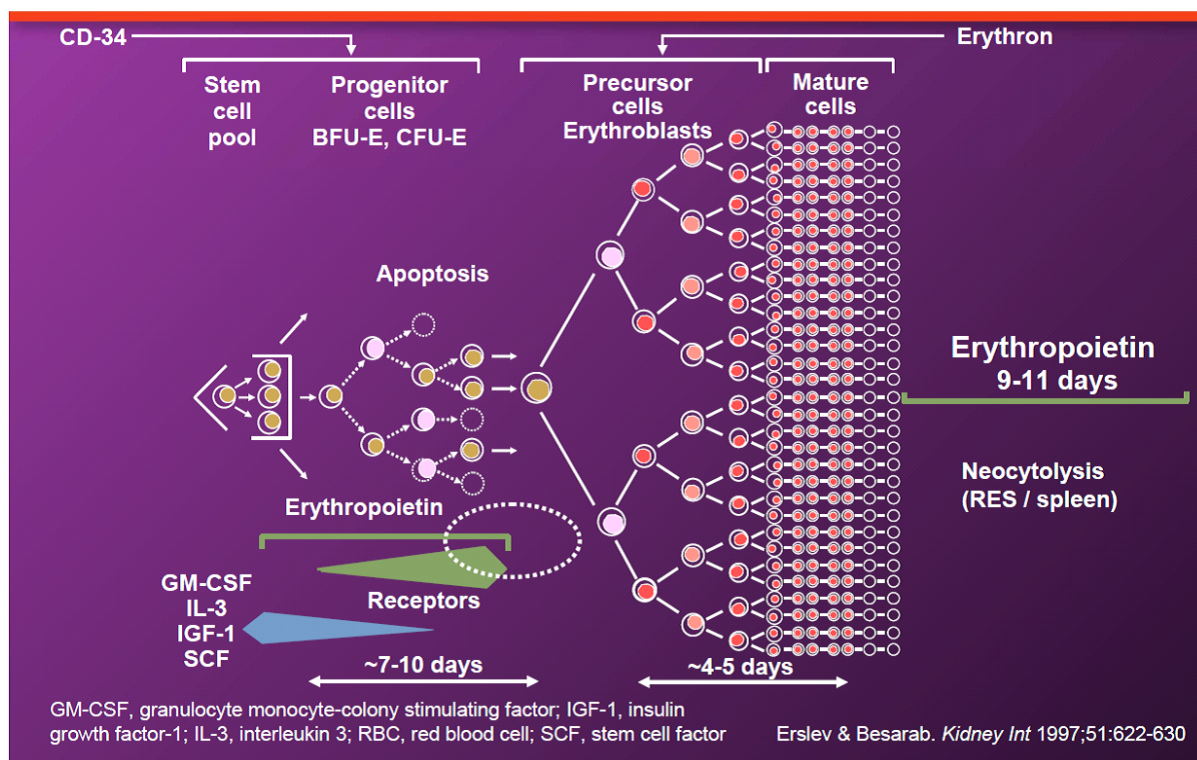
1.2 Erytropoéza

Erytropoéza je vznik a vyžívání červených krvinek (Vokurka, 2011). U člověka po narození je místem erytropoézy kostní dřev, prenatalně se uplatňují též játra a slezina. Vzácně tyto orgány mohou být místem erytropoézy i u dospělých lidí, ale pouze za patologických stavů (extramedulární hematopoéza např. při myelofibróze), nicméně u myši a potkanů je slezina místem erytropoézy i za fyziologických okolností. Slezina proto v experimentálních studiích může sloužit spolu s KD ke studiu erytropoézy a jejích vlivů na metabolismus železa.

Funkční kostní dřev je nezbytná k správné erytropoéze. Nezbytná je přítomnost kmenových buněk – hematopoetické kmenové buňky (HSC), stromatu, regulujících faktorů a dále všech součástí, které jsou nezbytné obecně pro množení buněk a syntézu Hb (Tsiftoglou et al., 2009). Kmenové buňky se postupně vyvíjejí v pluripotentní a multipotentní progenitorové buňky, z nichž vznikají liniové buňky. Ve vývoji červené řady vznikají BFU-E (burst forming unit – erythroid), z nichž dále vznikne 5-100 CFU-E (colony forming unit – erythroid). Z nich dále vzniká až několik desítek proerytoblastů (Gregory and Eaves, 1977). Další fází jsou bazofilní, polychromní a ortochromní erytroblasty, ve kterých probíhá syntéza hemoglobinu

(hemoglobinizace), následně pyknotizace jádra a jeho enukleace. Takto vzniklý retikulocyt je vyplaven do periferní krve, kde záhy dozrává do normocyty, který obsahuje zbytky organel a v membráně má ještě TfR1. Normocyt lze prokázat speciálním barvením v nátěru (brilantkresylovou modří) nebo průtokovou cytometrií. Celková doba vyžívání trvá u člověka cca 21 dnů od pluripotentní kmenové buňky k retikulocytu. Fáze od CFU-E k retikulocytu trvá asi týden a zahrnuje 4 až 6 buněčných dělení (obr. 2). U myši je kinetika procesu poněkud odlišná a odpověď na stresovou erytropoézu je rychlejší (Koulnis et al., 2011; Liu et al., 2006).

K vývoji červených krvinek je třeba řady humorálních faktorů. V časně fázi erytropoézy to jsou stem cell factor (SCF) a insulin-like growth factor 1 (IGF1), zásadní regulační roli však hraje v pozdějších fázích vývoje červených krvinek erythropoetin.



Obr 2. Schéma erytropoézy (Erslev and Besarab 1997)

1.2.1 Erythropoetin (EPO)

Erythropoetin je klíčový hormon regulující erythropoézu. Byl purifikován v roce 1977 (Miyake et al., 1977) z moči pacientů s aplastickou anémií, ač jeho existence byla předpokládána již od počátku 20. století a jeho aktivita prokazována a studována již od konce 40. let. Gen pro EPO byl klonován v roce 1985 (Erslev and Caro 1986) a od přelomu 80. a 90. let začal být rekombinantní lidský erythropoetin (rhEPO) používán léčebně, zejm. u anémie při renálním selhání. Jde o glykoprotein o molekulové hmotnosti 30,4 kDa, tvořený 165 aminokyselinami; aminokyselinová sekvence je důležitá pro vazbu na receptor, kromě toho jsou přítomny 4 karbohydrátové řetězce důležité pro metabolismus a kinetiku. Předpokládaný biologický poločas EPO je 6 až 12 hodin; rekombinantní erythropoetiny (rEPO) mají modifikované sacharidové řetězce, čímž může být značně prodloužen poločas, což je výhodné při jejich podávání. Tvořen je v ledvinách (v malém procentu a embryonálně též v játrech a do určité míry i v dalších tkáních), a to v buňkách podobných peritubulárním intersticiálním fibroblastům. Není v buňkách skladován. Za normálních okolností je koncentrace EPO v plazmě poměrně nízká a stabilní (cca 10-30 U/l), ale při stimulaci (hypoxie, krvácení) stoupne toto množství řádově (až přes 1000 U/l).

EPO se váže na *erythropoetinový receptor* (EPO-R), přítomný zejména na CFU-E, proerythroblastech a už jen v malé míře na časných bazofilních erythroblastech. EPO-R je membránový receptor existující jako homodimer (D'Andrea and Zon, 1990). Po vazbě EPO dochází ke konformačním změnám a přenosu signálu do buňky (sám receptor nemá enzymovou aktivitu). V signální dráze EPO hraje roli *Janus kináza-2* (JAK-2), jejíž autofosforylace a následná fosforylace cytoplasmatické části EPO-R vede k další signalizaci – STAT5, RAS-RAF-MAP kináza a PI3/AKT kináza (proteinkináza B) (Remy, 1999). Kaskáda *JAK-2/ STAT5* řídí buněčnou proliferaci a maturaci hematopoetických buněk. Exprese genu pro EPO je řízená hladinou kyslíku, hlavními regulátory v kaskádě jsou transkripční faktory - *HIF1*, *HIF2*, *HIF3*. Pozitivní regulátory exprese – *HIF1* a *HIF2*, negativní regulátory exprese – *HIF3*, *GATA-2* a další (Jelkmann, 2004).

Na membráně erythroblastů EPO-R interaguje s TfR2 (Forejtnikova et al. 2010), přičemž na základě experimentálních dat se předpokládá, že v nepřítomnosti TfR2 je EPO-R nadměrně aktivní, takže TfR2 působí jako jakási brzda nadměrné erytroidní expanze (Nai et al., 2015).

Důležitým mechanismem působení EPO je potlačení apoptózy erytroidních prekurzorů. Jedním z mechanismů je ovlivnění (snížení) množství Fas (CD95) na membráně prekurzorů. Fas patří do skupiny receptorů pro ligandy indukující zevní cestu apoptózy. Ligandem je FasL, který je produkován přímo v kostní dřeni, a to rovněž erytroidními prekurzory, což představuje určitou zpětnou vazbu v celém systému (De Maria et al., 1999). Jiným mechanismem působení EPO je antiapoptotické působení na vnitřní (mitochondriální) cestě ovlivněním proteinů z Bcl rodiny (Koulnis et al., 2011).

Role EPO v jiných orgánech je rovněž studována. Regulace jaterního EPO je poněkud odlišná a jeho role z dalších orgánů není zcela jasná. Obecně by se extrarenální EPO mohl částečně podílet za určitých situací, např. stresové erytropoéze. V každém případě jaterní EPO není schopen nahradit EPO z ledvin při jejich selhání, resp. není schopen kompenzovat takto vzniklou anémii.

1.2.2 Hemoglobinizace

Syntéza hemoglobinu vyžaduje syntézu proteinové části (globinů), tetrapyrolu protoporphyrinu IX (PPIX) a následné vložení Fe^{2+} do něj pomocí *ferrochelatázy* (hemsyntáza), čímž vzniká hem. Jeho syntéza se začíná a končí v mitochondriích (Kafina and Paw, 2017). Z celkového množství hemu v organismu je 85 % syntetizováno v KD v erytroidních prekurzorech, zbytek převážně v játrech (cytochromy P450), ale jeho tvorby jsou schopny téměř všechny buňky těla.

Hemoglobinizace začíná od pozdních bazofilních erytroblastů, které již ztrácí citlivost na EPO, a pokračuje až do stádia retikulocyty. Je to fáze, která vyžaduje masivní přísun železa do buněk a regulaci tohoto přísunu (na buněčné i systémové úrovni), jakož i jeho koordinaci se syntézou hemu.

Železo jako součást hemu v hemoglobinu je zásadní pro správný průběh erytropoézy (Camaschella and Pagani, 2011; Papanikolaou and Pantopoulos, 2017). Denně se vytvoří 240 miliard červených krvinek, hemoglobin tvoří 90 % hmotnosti sušiny červených krvinek. Každá červená krvinka obsahuje cca 300 miliónů molekul hemoglobinu, z nichž každá obsahuje 4 hemy, tedy i čtyři atomy železa dvojmocného (Fe^{2+}). V jednom erytrocytu je tedy přítomno přes

1 miliardu atomů železa (asi 1,5 fmol). Jeden ml hmoty červených krvinek obsahuje cca 1 mg železa, což je nejvyšší obsah ze všech buněk v těle.

Železo vstupuje do erytroblastů ve formě holoTf, který se váže na TfR1, jehož exprese je řízena pomocí IRE/IRP. Podobným mechanismem, ale zrcadlově, je řízena exprese klíčového enzymu syntézy porfyrinů, tedy ALAS-2. Nedostatek, resp. potřeba železa tak stimuluje syntézu TfR1, při jeho dostatku se naopak více stimuluje syntéza ALAS-2, čili dochází k syntéze PPIX, do něhož je toto železo enzymem ferrochelatazou inkorporováno.

Zásadní, nicméně dosud nikoliv zcela probádanou, je schopnost erytroblastů regulovat přísun železa na úrovni systémové a tím zvýšit přísunu železa do KD (zvýšit vstřebávání železa a jeho uvolňování z makrofágů).

Naopak kontroverzní je existence hemového exportéru FLVCR1 (Keel et al., 2008), který by podle některých teorií uvolňoval nadbytečný hem z buněk. Samotný hem je toxický, ale jeho případný nadbytek je možné odstranit i enzymem hemoxygenázou, která je základním enzymem degradace hemu a je rovněž v erytroblastech prokázán a mohl by hrát protektivní roli při přetížení železem u talasémie, jak bylo demonstrováno na myším modelu (Garcia-Santos et al., 2018).

1.2.3 Typy erytropoézy z klinického i experimentálního pohledu

Erytropoézu lze i s ohledem na význam pro studium metabolismu železa a jeho regulaci dělit na fyziologickou, stresovou a inefektivní.

Fyziologická erytropoéza probíhá nepřetržitě za klidových podmínek, při délce života erytrocytu cca 120 dnů se přibližně 1 % červených krvinek denně obměňuje. Tomuto stavu odpovídá i denní množství recyklovaného železa – cca 25 mg a denní resorpce cca 1 mg.

Stresová erytropoéza je erytropoéza vystupňovaná stimulací EPO, a to po větším krvácení (a následné anémii), výrazné neanemické hypoxii či extramedulární hemolýze. Tuto erytropoézu lze experimentálně navodit podáním EPO či krvácením (flebotomií). V této situaci je třeba zabezpečit pro KD vyšší přísun železa, a to jak ze zásob, tak zvýšením jeho resorpce.

Inefektivní erytropoéza je specifickou patologickou situací, která odpovídá intramedulární hemolýze, tj. dochází k rozpadu ještě nezralých elementů erytroidní řady ještě v kostní dřeni (Gupta et al. 2018). Inefektivní erytropoéza provází některá hematologická

onemocnění, typicky talasémii (Rivella, 2019), v menší míře je přítomna i u perniciózní anémie. Tuto situaci nelze experimentálně jednoduše navodit, modelem mohou být např. myší modely talasémie.

Z uvedeného je zřejmé, že v těchto případech liší i požadavky na metabolismus železa a rovněž jsou přítomny i jiné mechanismy, které do něj mohou zasahovat, resp. jej regulovat.

1.3 Hepcidin

Hepcidin je kódován genem *Hamp* (*hepatic antimicrobial peptide*) a je hlavním regulátorem systémového metabolismu železa. Jedná se o peptid, který je převážně syntetizován v játrech v hepatocytech. Hlavní forma má 25 aminokyselin, z toho je 8 cysteinů tvořících u aktivní molekuly 4 cystinové můstky, které dávají hepcidinu vlásenkovitou (*angl.* hair-pin) strukturu. Aktivní hepcidin vzniká z větších prekurzorů – preprohepcidinu a prohepcidinu. V krvi je přenášen na α 2-makroglobulinu (Peslova et al., 2009), volný hepcidin může být filtrován do moči, kde se vyskytují i jeho další izoformy (20, 22 a 24 aminokyselin).

Hepcidin byl objeven v moči při studiu antibakteriálních peptidů nespecifické imunity – defenzinů (Park et al., 2001). Sám má rovněž malou antibakteriální a antimykotickou aktivitu, která však přinejmenším systémově nehraje významnou roli, jak o tom svědčí i jeho chybění, jak u lidí, tak experimentální.

Hlavní rolí hepcidinu je regulace metabolismu železa, jak o tom svědčí i paralelní experimentální práce, které vedly k jeho objevu. Jeho (náhodné) vyřazení vedlo ke vzniku fenotypu přetížením železa (Nicolas et al., 2001), při exogenním přetížení železem stoupla jeho exprese (Pigeon et al., 2001) a naopak jeho zvýšená exprese vedla k nedostatku železa (Nicolas et al., 2002a).

U myši (nikoliv u člověka) byl popsán ještě hepcidin 2, který sice reaguje na změny železa (Ilyin et al., 2003), ale přesto nepůsobí na jeho metabolismus – transgenní myši netrpěly anémií (Lou et al., 2004). Funkce hepcidinu 2 není známá a není mu v současnosti věnována větší pozornost. V naší laboratoři bylo prokázáno, že ačkoliv reaguje na změny železa, na rozdíl od

hepcidinu 1 nereaguje na zánět (Krijt et al., 2004a), takže u myši by měření obou hepcidinů mohlo pomoci rozlišit tyto stavy (Vokurka et al., 2011).

1.3.1 Funkce hepcidinu a mechanismus účinku

Hepcidin zabraňuje výstupu železa z buněk. V případě buněk střevních (enterocytů) snižuje přechod železa z enterocytů do krve, a tudíž snižuje i resorpci železa ve střevě, tím kontroluje i jeho přísun do organismu. Protože neexistuje regulovaný výdej železa, je toto klíčový mechanismus, jak zabránit přetížení organismu železem. Při nedostatku železa zvýší výstup železa z enterocytů, při dostatku či nadbytku jej naopak zbrzdí. Dalšími buňkami, z nichž snižuje hepcidin uvolňování železa, jsou především makrofágy, které železo recyklují. Protože recyklace výrazně převyšuje resorpci (25 mg vs 1 mg za 24 hodin), je tento děj klíčový zejména pro rychlou kontrolu koncentrace železa v plazmě (obsah je zde cca 3 mg a za den se několikrát obrátí) a tudíž i pro jeho aktuální dostupnost pro buňky. V případě infekce může ovlivnit též dostupnost železa pro bakterie, které jsou na jeho přísunu závislé pro své množení a metabolické funkce, potažmo s tím souvisí jejich patogenita.

Mechanismem účinku je vazba hepcidinu na molekulu ferroportinu, který je jediným známým exportérem železa z buňky (Nemeth et al., 2004b). Dochází k jeho internalizaci a následné destrukci. Buňky ovlivněné hepcidinem proto mají ve své membráně menší množství ferroportinu a železo je pro v nich zadržováno (sekvestrováno). Protože funkční spojení obou molekul v regulaci metabolismu železa je zásadní, hovoří se o *ose hepcidin-ferroportin*.

Hlavním místem produkce hepcidinu jsou játra, nicméně exprese hepcidinu na úrovni mRNA byla prokázána i v dalších orgánech (extrahepatální hepcidin). Na úrovni exprese je o několik řádů nižší, kvantitativně nebyla měřena a význam je nejasný. Mohl by ovlivňovat lokální metabolismus železa či uplatňovat své jinak systémově nevýznamné účinky antimikrobiální. Byl prokázán v myokardu (Merle et al., 2007), tukové tkáni (Bekri et al., 2006), ledvinách (Kulaksiz et al., 2005) aj. Rovněž regulace jeho exprese není podrobně známa, bylo však prokázáno, že reaguje m.j. na zánětové podněty, což bylo v naší laboratoři prokázáno u lidské tukové tkáně během kardiochirurgických operací (Vokurka et al., 2010).

1.3.2 Hepcidin v patogenezi onemocnění

Již při prvních experimentálních studiích na myších a objevu hepcidinu bylo prokázáno, že jeho nedostatek způsobuje přetížení železem, což je analogie hereditární hemochromatózy (HH, „bronzový diabetes“). Nadbytečná akumulace železa ve tkáních může vést k jejich poškození, což se projeví zejména jako jaterní fibróza až cirhóza, diabetes mellitus, artropatie, endokrinní dysfunkce a v závažných případech i jako kardiomyopatie (Niederau et al., 1996). Ukázalo se, že jen velmi vzácně jde přímo o mutaci genu pro hepcidin (Majore et al., 2002), ale většinou jde o různé formy poruchy regulace jeho exprese. Nejčastější HH je typ 1 způsobený mutací HFE (Feder et al., 1996), u níž byla snižená exprese hepcidinu popsána jako první (Bridle et al., 2003). Dalším, vzácným typem je tzv. juvenilní HH 2. typu s velmi těžkým průběhem (Roetto et al., 2003) – ta je způsobena velmi vzácně mutací genu hepcidinu (typ 2B) nebo častěji mutací *hemojuvelinu* (HJV, kódovaného genem HFE2, HH typ 2A) (Papanikolaou et al., 2004). V obou případech hepcidin prakticky chybí, a proto jsou příznaky HH a přetížení železem klinicky nejtěžší a nastupují už ve 2. deceniu. Dále bylo snížení hepcidinu popsáno u HH typu 3 způsobené mutací TfR2 – transferinového receptoru 2 (Nemeth et al., 2005) s mírnějším průběhem podobným HH 1. typu. Další skupinou chorob s přetížením železa jsou hereditární hemolytické anémie, zejm. beta talasémie a některé další, u nichž byla prokázána výrazně snížená exprese hepcidinu, neodpovídající množství železa v organismu (Kattamis et al., 2006; Mojzikova et al., 2018; Mojzikova et al., 2014; Pospisilova et al., 2014). Přetížení železem je u nich závažným, až život ohrožujícím stavem. Oba tyto stavy reflektují oba zmíněné typy regulace, dané obsahem železa i erytroidní aktivitou, resp. jejich poruchy.

Nadměrná produkce hepcidinu naopak způsobuje nedostatek železa. Geneticky je přítomna u vzácné anémie, tzv. *iron refractory iron deficiency anemia* (IRIDA), která má sideropenický charakter (Finberg et al., 2008), přičemž podávání preparátů železa ji není schopno zlepšit (Heeney and Finberg, 2014). Má svůj experimentální myší model (tzv. *mask* myš). Bylo prokázáno, že mutovaným genem je gen *Tmprss6* pro *matriptázu-2* (MT-2), která za fyziologických okolností je negativním inhibítoem exprese hepcidinu.

Mnohem častější je zvýšená exprese hepcidinu vlivem zánětu. Hepcidin se chová jako reaktant akutní fáze stimulovaný interleukinem-6 (IL-6) či lipopolysacharidem (LPS) (Nemeth et al., 2004a; Nemeth et al., 2003). Tento stav je jedním z hlavních patogenetických faktorů anémie

chronických chorob (ACD) neboli anémie zánětů (Nemeth and Ganz, 2014; Weiss and Goodnough, 2005).

Je zřejmé, že geny, které jsou u lidských nemocí mutovány, a tato mutace způsobuje poruchu exprese hepcidinu a následnou změnu fenotypu (onemocnění), mají za fyziologických stavů roli v jeho regulaci. Podle závažnosti fenotypu lze pak usoudit, že ty, jejichž mutace mají největší důsledek (tj. HJV), budou v hierarchii regulace výše. Tyto geny a jejich produkty tvoří základní schéma regulace hepcidinu, a tudíž řízení metabolismu železa.

Hepcidin je zkoumán i v klinické medicíně jako možný marker chorobných stavů, zejména těch, kde se kombinuje zánět a změny železa anebo erytropoézy (Hare 2017; Miseta et al., 2015). Klinicky je hepcidin měřen převážně imunologicky pomocí ELISA, přesné rozlišení jeho izoform je možné hmotnostní spektrometrií. V naší laboratoři jsme zkoumali hepcidin jako možný marker zánětlivých chorob typu ANCA vaskulitid (Prikryl et al., 2018). Další oblastí výzkumu je jeho využití léčebné, resp. použití malých analogů („minihepcidinů“) k léčbě přetížení železem (Katsarou and Pantopoulos, 2018; Nemeth, 2010; Vyoral and Petrak, 2017).

1.3.3 Regulace exprese hepcidinu

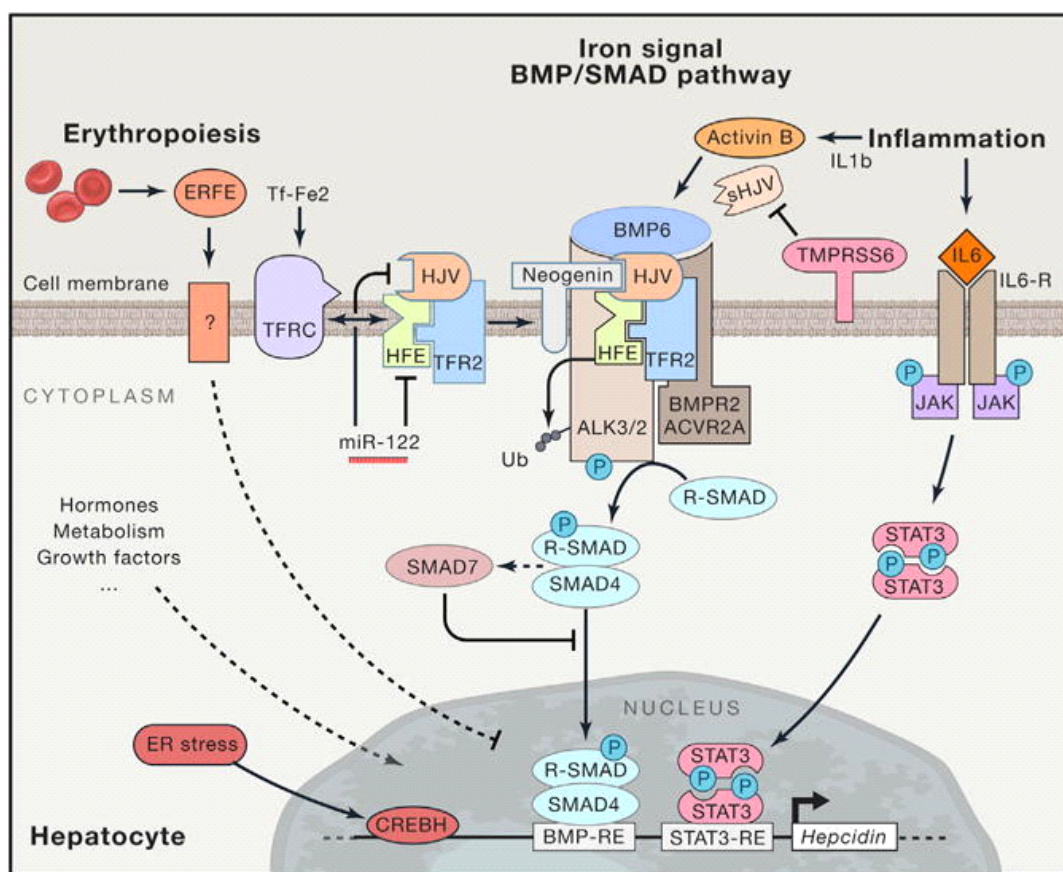
Jednotlivé fyziologické a patologické situace, jako je erytropoéza, zánět a HH tvoří hlavní rámec fyziologické a molekulární regulace exprese hepcidinu (obr. 3), jejímuž výzkumu je věnována velká pozornost.

Regulace hepcidinu probíhá na úrovni transkripční regulace, a proto k jeho studiu v experimentu (zejm. na zvířecích modelech) bylo a dosud je úspěšně využíváno měření množství na úrovni mRNA pomocí semikvantitativní real-time polymerázové řetězové reakce (RT-PCR). Pomocí těchto experimentů byly prokázány hlavní regulující faktory exprese hepcidinu. Jde o železo, erytropoézu a zánět (Nicolas et al., 2002b; Nicolas et al., 2002c; Vokurka et al., 2006). Stále je diskutovaná role hypoxie, resp. jejího přímého či nepřímého účinku (Ravasi et al. 2018).

Základní regulační dráhy reagují na železo (a poruchy této regulační dráhy souvisí s HH), zánět (souvislost s anémií chronických chorob) a erytropoézu (kromě zásadních fyziologických funkcí včetně nutnosti rychle zvýšit dodávku železa při krvácení existuje souvislost s některými

hereditárními hemolytickými anémiemi prováženými přetížením železem). Poznávání molekulárních mechanismů je klíčové pro poznání fyziologie i patofyziologie regulace metabolismu železa. Protože mnohé chorobné stavy se navzájem kombinují, jako zásadní se ukazuje i otázka hierarchie a propojení mezi působením těchto regulačních faktorů (Coffey and Ganz, 2017).

Dalším faktorem, který se může na regulaci hepcidinu v jaterních buňkách podílet, mohou být mikroRNA (miR). Bylo prokázáno, že u myši miR-122 se přímo váže na oblasti genů významných regulátorů hepcidinu, a to HFE a HJV (Castoldi and Muckenthaler, 2012; Castoldi et al., 2011), nicméně aktuální výzkum se této oblasti příliš nevěnuje.



Obr. 3. Regulační dráhy exprese hepcidinu (Muckenthaler et al. 2017)

1.3.3.1 Signalizační dráha regulující expresi hepcidinu při změnách železa

Jde o relativně dobře popsanou dráhu, kde klíčovou roli v této regulaci hrají hepatocyty, které produkují hepcidin, a jejich souhra s dalšími jaterními buňkami. Hepatocyty získávají informaci o množství železa v organismu dvěma způsoby – jednak reflektují na množství železa v játrech (což představuje určitou dlouhodobou informaci), jednak reflektují aktuální množství železa v plazmě.

Klíčová je regulace hepcidinu signální drahou BMP/ SMAD v játrech (Babitt et al., 2006; Kautz et al., 2008; Wang et al., 2005). BMP proteiny patří do rodiny *transformujícího růstového faktoru β* (TGF- β) a jsou transkripčně zvýšeny při přetížení železem. BMP2 a BMP6 jsou tvořeny sinusoidálními jaterními buňkami (Rausa et al., 2015) a jsou schopny stimulovat expresi hepcidinu, a to nezávisle na sobě (Canali et al., 2017). BMP2 a BMP6 jako dimery či heterodimery se váží na BMP-R typu I (ALK2 a ALK3) a typu II (ActR2a a Bmpr2) na povrchu hepatocytů. Následně dochází k fosfosforylaci intracelulárních proteinů SMAD 1/5/8 (mothers against decapentaplegic 1/5/8) v cytoplasmě hepatocytu a následně tyto pSMADs proteiny tvoří heterodimerické komplexy se SMAD 4, který je následně translokován do jádra, kde indukuje genovou transkripci hepcidinu na úrovni mRNA, vazbou na BMP-responzivní elementy. Poruchy v signální dráze BMP/ SMAD mají za následek nižší hladiny hepcidinu a následně přetížení organismu železem. Mutace uvedených proteinů – HFE, TfR2 a HJV jsou hlavními příčinami porušené regulace hepcidinu u HH (Brissot et al., 2017).

Výzkum myších modelů ukázal, že BMP6 hraje zásadní roli při udržování metabolismu železa, který nemůže být zcela kompenzován jinými BMP. Mutace BMP6 způsobuje těžké přetížení železem u myši (Andriopoulos et al., 2009; Meynard et al., 2009) i lidí (Daher et al., 2016).

V membráně hepatocytu se dále nacházejí molekuly, které mezi sebou mají výrazné interakce – jde o HFE, TfR1 a TfR2. Pro registraci akutních změn v metabolismu železa, které jsou reflektovány saturací transferinu, je důležitá vazba holoTf na transferinové receptory. Při velkém množství holoTf (vysokém množství železa v plazmě) dochází v membráně hepatocytu k disociaci HFE od TfR1 a následně jeho vazbě k TfR2 a jejich interakci komplexem BMP receptoru – BMP-R (Core et al., 2014) s následnou stimulací exprese hepcidinu; existuje

však zřejmě i jejich schopnost regulovat hepcidin nezávisle (Schmidt and Fleming, 2012; Wallace et al., 2009).

HJV je koreceptorem, který vytváří s BMP-R komplex, který usnadňuje vlastní signalizaci (Babitt et al., 2006). HJV je membránový protein vázaný glycosyl phosphate inositol (GPI) kotvou v membráně hepatocytu. Kromě formy membránové existuje i ve formě solubilní (sHJV). V naší laboratoři jsme prokázali, že HJV není transkripčně regulován EPO a železem, ale reaguje na zánět (Krijt et al., 2004b); podobně bylo v naší laboratoři prokázáno, že nereaguje na železo ani na úroveň proteinu (Krijt et al., 2012). Existence sHJV předpokládá proteolytické štěpení membránového HJV. Jednou z hypotéz, která řeší původ sHJV i negativní ovlivnění této dráhy, je štěpení matriptázou-2.

1.3.3.2 Matriptáza-2 (MT-2, TMPRSS6)

MT-2 je proteolytický enzym kódovaný genem *Tmprss6*, jedná se o membránovou serinovou proteázu. Je syntetizována hlavně v játrech a nachází se na povrchu hepatocytu. MT-2 je klíčovou molekulou, která tvoří součást kaskády regulace hepcidinu (Du et al. 2008; Folgueras et al., 2008). Jde o hlavní a nejsilnější negativní regulátor jeho exprese (Finberg et al., 2008). Mutace MT-2 způsobuje nadměrně vysokou koncentraci hepcidinu a nedostatek železa a je podstatou vzácné anémie IRIDA. U lidí byly popsány různé mutace (Guillem et al., 2008; Melis et al., 2008). Experimentálním korelátem je tzv. *mask* myš, u níž chybí katalytická doména. Má obdobné projevy jako IRIDA, nápadné je chybění srsti na hlavě (vzhled masky).

Protože jde o enzym – proteázu, předpokládá se, že základním mechanismem negativní regulace exprese hepcidinu je štěpení proteinů, které jsou pro ni nezbytné. Jednou z možností je, že MT-2 štěpí HJV a odštěpuje z něj jeho solubilní formu sHJV (Silvestri et al., 2008). Z experimentálních dat vyplývá, že u myši s mutací MT-2 je zesílena regulace cestou HJV (Finberg et al., 2010; Nai et al., 2012). Pokud MT-2 štěpí HJV, dá se předpokládat, že při jejím nedostatku se množství HJV zvyšuje a signalizace aktivující expresi hepcidinu bude rovněž zvýšena. V naší laboratoři vznikly publikace, které s uvedenou hypotézou o štěpení HJV polemizují – prokázali jsme, že snížení exprese hepcidinu po krvácení nebylo způsobeno sHJV. Dále bylo v naší laboratoři prokázáno, že u *mask* myši s mutací MT-2 bylo množství HJV sníženo, ačkoliv mRNA pro *Id1*, který je markerem aktivace HJV regulační cesty, byla zvýšena

(Frydlova et al., 2013). U těchto myší byla aktivována tato dráha, ačkoliv samotný jaterní HJV byl snížen. Rovněž některé novější práce prokazují, že tato proteáza může zřejmě štěpit i některé z dalších uvedených zúčastněných proteinů a že tato regulace pomocí MT-2 je zřejmě komplexnější proces – MT2 $-/-$ myši nemají více, ale naopak méně membránového HJV (Wahedi et al., 2017).

Výsledky studia změn MT-2 v experimentu zatím nepřinesly zcela jednoznačné výsledky. U potkanů bylo prokázáno, že po krátkodobém podávání nízkoželezné diety došlo k vzestupu MT-2, což by následně snížilo expresi hepcidinu, díky čemuž by se zvýšila resorpce železa (Zhang et al., 2011). Podobně došlo k vzestupu MT-2 po vystavení hypoxii (Lakhal et al., 2011; Maurer et al., 2012). Na druhou stranu podání železa myším množstvím MT-2 zvýšilo (Meynard et al., 2011). Lze předpokládat, že mohou existovat i mezidruhové rozdíly. Studie na myších prokázaly, že mRNA není regulována signalizací BMP6, což vede k předpokladům, že regulace MT2 probíhá na úrovni proteinové degradace spíše než transkripčními či translačními mechanismy a že cytoplasmatická doména je nezbytná pro její regulaci (Zhao et al., 2015).

1.3.3.3 Zánět a zánětová dráha regulující expresi hepcidinu

Zánětové procesy zasahují v organismu do mnoha dějů, zejména prostřednictvím zánětových cytokinů IL-1, IL-6 a nádor nekrotizujícího faktoru α (TNF α , tumor necrosis factor α). Ovlivňují rovněž erytropoézu a metabolismus železa. Metabolismus železa je zánětem ovlivněn na různých úrovních. Klíčové je ovlivnění exprese hepcidinu, ale existují i další mechanismy. Jedním z nich je syntéza oxidu dusnatého (NOS) a oxid dusnatý v makrofázích, který zvyšuje syntézu feritinu a způsobuje tak retenci železa (Kim and Ponka, 2002).

IL-6 je nejdůležitější cytokin zprostředkovávající patogenezi ACD. IL-6 zvyšuje expresi hepcidinu na transkripční úrovni. Signální drahou je zvýšení JAK/ STAT3 (Wrighting and Andrews 2006), která podporuje fosforylaci STAT3, který se následně translokuje do jádra, kde vazbou na proximální část promotoru aktivuje transkripci hepcidinu (Gkouvatsos et al., 2012). Tato subcelulární signalizační dráha může kompetovat s regulací přes BMP/ SMAD, resp. STAT3 a SMAD4 regulují hepcidin v opačném smyslu (Huang et al., 2009).

Zánětové změny vyvolávají pokles sérového železa v řádu hodin po experimentálním podání LPS (Nemeth et al., 2004a), což se považuje za jeden z biologicky důležitých faktorů

obrany proti mikroorganismům (Armitage et al., 2011; Ganz, 2018). Tento pokles je způsoben retencí (sekvestrací) železa v makrofázích snížením jeho exportu (snížením množství FPN); je výrazně snížena recyklace železa. Dochází tak k relativnímu nedostatku železa, který je jedním z významných faktorů, které přispívají ke vzniku ACD. Ta je charakterizována sníženou plasmatickou koncentrací železa – podobně jako při skutečném nedostatku železa, ale na rozdíl od ní je snížena TSAT, je zvýšena koncentrace sérového feritinu a v KD je železo prokazatelné v dostatečném množství. Měření hepcidinu (které se ovšem rutinně klinicky neprovádí) prokazuje jeho vysokou koncentraci na rozdíl od nízké až neměřitelné koncentrace při závažném nedostatku železa.

1.3.3.4 Erytroidní regulace exprese hepcidinu

S ohledem na úzký vztah železa a erytropoézy je zřejmé, že tyto děje musí mít propojenou regulaci (Rishi and Subramaniam, 2017). Po objevu hepcidinu jako regulátoru metabolismu železa vznikla otázka, jak se erytropoéza podílí na jeho regulaci.

Nejprve byla za regulující faktor považována anémie (Nicolas et al., 2002b), nicméně pozdější práce prokázaly, že klíčovým faktorem není samotná anémie, ale aktivita či suprese erytropoézy. Původní práce totiž studovaly pouze anémie posthemoragické či hemolytické navozené fenylyhydrazinem (PHZ). V experimentech v naší laboratoři byla anémie vyvolána ozářením, které utlumilo erytropoézu, přičemž navzdory vzniklé anémii se exprese hepcidinu nesnížila (Vokurka et al., 2006). Snížení exprese hepcidinu proto nezáviselo na samotné anémii, ale na aktivitě erytropoézy. Podobné pozorování s použitím cytostatik popsala skupina Tomase Ganze, která erytropoézu utlumila pomocí cytostatik (Pak et al., 2006). Dalším našim pokusem bylo podávání EPO ozářeným myším. Podání EPO, který velmi silně hepcidin snižuje, v tomto případě nevedlo k poklesu exprese hepcidinu. To vedlo k závěrům, že efekt EPO na expresi hepcidinu v hepatocytu je nepřímý a zprostředkovaný právě aktivovanou erytropoézou.

Tato pozorování zahájila intenzivní výzkum vlivu erytropoézy na expresi hepcidinu. Tento efekt by mohl být nepřímo zprostředkovaný železem – zvýšená potřeba železa pro KD snižuje jeho množství v krvi a tím i saturaci transferinu (Frazer et al., 2002), nebo přímý – zprostředkovaný neznámým či neznámými humorálními faktory produkovanými v KD po aktivaci erytropoézy.

Hlavní výzkumné úsilí se soustředilo na humorální faktory z KD. Předpokládané regulátory byly sledovány v primárních erytroblastech pomocí RNA-arrayů. Nejprve byly popsány dva faktory – *growth differentiation factor 15* (GDF 15) a *twisted gastrulation protein homolog 1* (TWSG1), které by mohly být hledanými regulátory. Jsou produkty erytroblastů, přičemž první z nich je z vyzrálějších, druhý z méně zralých forem. GDF 15 a TWSG1 jsou členy rodiny BMP, které byly navrženy jako patologické supresory hepcidinu při talasémii.

GDF15 je secernovaný protein z rodiny TGF- β . Řada klinických prací prokázala jeho význam zejména u inefektivní erytropoézy a talasémie (Tanno et al., 2007), kde se předpokládá, že by mohl přispět k přetížením železem (Casanovas et al., 2011; Tanno et al., 2010). Nicméně pokusy na GDF15 *-/-* myších, u nichž byla prováděna flebotomie, která je klasickým postupem, jak stimulací erytropoézy snížit expresi hepcidinu, neprokázaly rozdíl od *wild type* myši (Casanovas et al., 2012). Chybění GDF15 u stresové erytropoézy nijak neovlivnilo pokles hepcidinu, k němuž u těchto myši rovněž došlo.

TWSG1 se ve studiích prokázal ještě méně významný než GDF15 (Tanno et al., 2009). Jeho exprese vůbec nereagovala na flebotomie a na pokles hematokritu s následným vzestupem EPO. Tyto faktory tak nejsou hledanými supresory hepcidinu při stresové erytropoéze (Mirciov et al., 2017).

1.3.3.5 Erytoferron (ERFE)

ERFE, kódovaný genem *Fam132b*, byl prokázán v roce 2014 (Kautz et al., 2014b; Kim and Nemeth, 2015) jako erytroidní regulátor (supresor) transkripce hepcidinu. Původně byl známý jako myonectin (Seldin et al., 2012) a jeho postulovanou rolí byla účast v glukózovém a lipidovém metabolismu. Patří do rodiny C1q/ TNF related protein (CTRP). Exprese ERFE je přítomna v různých orgánech, nicméně její vzestup je patrný pouze v tkáních, které reagují na stresovou erytropoézu (Lenox et al., 2009), tedy v KD a ve slezině. Bylo prokázáno, že myši reagují na podání EPO vzestupem ERFE a že myši s deficitem ERFE nebyli schopni snížit expresi hepcidinu při podání EPO (Kautz et al., 2014a). Byly podávány poměrně vysoké (farmakologické) dávky EPO, což stimuluje převážně stresovou erytropoézu s intenzivní produkcí erytroblastů a s masivní syntézou hemoglobinu, tudíž i potřebou železa.

Podání EPO či hemolýza navozená PHZ byly schopny zvýšit expresi mRNA pro ERFE v krvetvorných orgánech myši (Jiang et al., 2016; Kautz et al., 2014a). Na rozdíl od myši GDF15 *-/-*, myši ERFE *-/-* po podání EPO měly sníženou expresi hepcidinu (Kautz et al., 2014b). Na druhou stranu ovšem tyto myši mají sníženou koncentraci Hb krátce po odstavení a v této době intenzivního růstu (a vysoké potřeby železa) nedokázaly snížit expresi hepcidinu po navození krvácení, což prodlužovalo zotavení z krvácení. Nicméně tyto myši s postupným růstem vyrovnaly svůj nedostatek hemoglobinu. Bylo tak prokázáno, že ERFE není vyžadován pro normální erytropoézu u dospělých myši.

ERFE byl studován rovněž u inefektivní erytropoézy a zánětů. Klinicky nejvýznamnějším stavem s inefektivní erytropoézou je thalassemia major, kde byla prokázána výrazně snížená exprese hepcidinu (Kattamis et al., 2006). V myším modelu talasémie bylo prokázáno, že delece ERFE zvýšila expresi hepcidinu na úroveň *wild type* myši a snížila i přetížení železem (Kautz et al., 2015). Dá se tedy předpokládat, že ERFE hraje roli nejen u stresové, ale i u inefektivní erytropoézy. Následně byl tento význam potvrzen i měřením ERFE u pacientů s talasémií, kde koncentrace ERFE je zvýšena, může být přechodně utlumena po podání transfúze erytrocytů a nepřímě úměrně koreluje s koncentrací hepcidinu (Ganz et al., 2017). Zásah do interakce ERFE a hepatocytu a příslušné signální regulační dráhy je jedním z možných přístupů k zvýšení exprese hepcidinu u těchto anémií, a tak zabránění další akumulaci železa.

Role ERFE u ACD a zánětů je méně jednoznačná. V modelu infekce malárií bylo prokázáno u myši, že anemizace při infekci stimuluje produkci EPO v ledvině a následně dochází k vzestupu ERFE, nicméně následná suprese hepcidinu může do jisté míry narušovat vlastní „ochranný“ efekt hepcidinu, kterým je snížena dostupnost železa pro mikroorganismy (Latour et al., 2016). Na druhou stranu po likvidaci infekce může naopak ERFE zrychlovat obnovení tvorby červených krvinek a zkracovat tak dobu anémie (Kautz et al., 2015). Exprese ERFE na úrovni mRNA v KD nereaguje na železo (Nai et al., 2016).

Mechanismus, jakým ERFE způsobuje pokles exprese hepcidinu v hepatocytu, byl nedávno popsán (Arezes et al., 2018). Bylo prokázáno, že ERFE vyvazuje BMP5,6 a 7; nikoliv však BMP2, který rovněž stimuluje expresi hepcidinu.

1.3.3.6 Vliv hypoxie na expresi hepcidinu

Hypoxie je klíčový fyziologický i patogenetický faktor v mnoha dějích v organismu, a to i v erythropoéze a v metabolismu železa. Gen pro EPO je regulován hypoxií (Kapitsinou et al., 2010), čímž dochází k stimulaci KD. Aktivovaná erythropoéza potřebuje k své efektivnosti zvýšený přísun železa. Regulace genů regulujících metabolismus železa je proto významnou otázkou (Ravasi et al., 2018).

Exprese hepcidinu je při hypoxii snížena (Nicolas et al. 2002b). Mechanismus této regulace ani přímý efekt na expresi hepcidinu nebyly jednoznačně prokázány. Některé práce tento efekt popisovaly jako zprostředkovaný von Hippel-Lindau faktorem (VHL) a hypoxia inducibilním faktorem (HIF) (Peyssonnaud et al., 2007). Kromě přímého efektu na hepcidin může hypoxie působit přes zvýšení exprese genů, jejichž produkty expresi hepcidinu snižují, jako je MT-2 (Lakhal et al., 2011), furin (McMahon et al., 2005) či PDGF (Sonnweber et al., 2014).

Další možnost je nepřímé působení hypoxie přes zvýšení EPO a erythropoézy. Hypoxie však hraje roli i na expresi dalších proteinů účastnících se vstřebávání a metabolismu železa (Xu et al., 2017). Jde o regulaci, která je na hepcidinu nezávislá a nemůže tak být potlačena faktory, které by do osy hepcidin-ferroportin zasahovaly. Hypoxie provází i výraznější anémii. Experimentálním průkazem může být fakt, že talasemické myši nadále akumulují železo i v situaci, kdy dojde k vzestupu koncentrace hepcidinu na úroveň zdravé myši (Gardenghi et al., 2007; Kautz et al., 2015).

1.3.4 Vztahy signálních drah regulace hepcidinu a hierarchie regulačních faktorů

Erythropoéza působí snížení exprese hepcidinu působením na jeho hlavní negativní regulátory – ERFE a MT-2 – přičemž myši s chyběním těchto proteinů nereagují na krátkodobé podání EPO poklesem hepcidinu.

Dlouhodobý výzkum regulace hepcidinu pomocí manipulace s železem, erythropoézou a zánětem usiluje o detailní prozkoumání signálních drah, jejich propojení a stanovení určité „hierarchie“ zúčastněných regulačních faktorů a molekul. V naší laboratoři bylo prokázáno, že k masivnímu poklesu hepcidinu po podání EPO nedochází při předchozím podání železa (Krijt

et al., 2010b), stejně jako byly popsány další výsledky studované kombinace stimulované erythropoézy a přetížení železem (Frazer et al., 2012).

Dosud zcela nevyřešenou otázkou jsou vztahy mezi novějšími regulačními faktory – ERFE, MT-2 a jejich propojení v regulaci hepcidinu, nevyjasněné jsou i přesné mechanismy jejich účinků.

Je známo, že snížení exprese hepcidinu po krátkodobém podání EPO vyžaduje funkční jak MT-2, tak ERFE (Willemetz et al., 2014). Snížení hepcidinu po *opakovaném* podání EPO vyžaduje funkční MT-2, přítomnost ERFE při opakované aplikaci EPO ale není podmínkou, neboť hepcidin klesá po opakovaném podání EPO i u myši s vyřazeným ERFE (Coffey et al., 2018). Myši s chybějícím genem *Tmprss6* nejsou schopny po podání EPO snížit expresi hepcidinu (Nai et al., 2016; Nicolas et al., 2011), podobně jako pacienti s IRIDA (Lehmberg et al., 2012). ERFE je na úrovni mRNA v KD a ve slezině vysoce zvýšené. Odstranění ERFE u myši s mutací MT-2 neovlivnilo nijak její parametry krevního obrazu ani železa (Aschemeyer et al., 2017). Podání kultivačního séra buněk exprimujících rekombinantní ERFE myším hepatocytům bez MT-2 dokázalo expresi hepcidinu snížit, přičemž byly pozorovány i příslušné změny i v aktivitě dráhy BMP, což ukazuje na určitou interakci mezi ní a ERFE. Toto pozorování je zajímavé i z pohledu recentně publikovaného mechanismu působení ERFE, tj. inaktivace cirkulujícího BMP6 *in vivo* – BMP6 není syntetizován v hepatocytu, takže ERFE by na hepatocyty v kultuře teoreticky neměl mít vliv. Předpokládá se, že vysoce aktivovaná dráha BMP u MT-2 *-/-* myši zvyšuje expresi hepcidinu, přičemž ani vysoké koncentrace ERFE nedokážou tuto expresi potlačit (Aschemeyer et al., 2017), což je podobné jako při podávání EPO myším, kterým bylo podáno velké množství železa (Krijt et al., 2010b). Z tohoto pohledu by se role erytroidního regulátoru jevila slabší než regulace drahou BMP/ SMAD. U myši s mutací MT-2 i BMP6 byl pozorován pokles hepcidinu, což také svědčí pro hypotézu, že vysoký hepcidin v nepřítomnosti MT-2 je výsledkem excesivní signalizace přes BMP6/ HJV dráhu (Lenoir et al., 2011). Podání železa myším s dlouhodobou stimulací erythropoézy konstitutivně zvýšenou expresí EPO dokázalo aktivovat dráhu BMP/ SMAD a vedlo k zvýšení exprese hepcidinu (Diaz et al., 2013).

Podle jiných pozorování však EPO dokázal snížit expresi hepcidinu i po stimulaci LPS či dietně navozeným přetížením železem. Podle těchto závěrů je spíše než konkrétní hierarchie

důležitá i síla jednotlivých podnětů (Huang et al., 2009). Poslední výsledky získané v naší laboratoři potvrzují, že společná aplikace železa i EPO vrací hodnoty hepcidinu víceméně do oblasti normálních hodnot (Frýdlová et al, 2019, v recenzním řízení).

Při hodnocení jednotlivých závěrů je nutné si uvědomit různorodost jednotlivých experimentálních uspořádání, tj. dávek železa či EPO, délky příslušné stimulace, ale i druhu a věku zvířat stejně jako metod detekce cílových parametrů, a to zejména konkrétních regulačních proteinů (úroveň mRNA či proteinu), což je dáno i konkrétní dostupností spolehlivých protilátek. Dá se konstatovat, že univerzální model dosud nebyl jednoznačně vytvořen. Téměř všechny pokusy sledující snížení exprese (downregulaci) hepcidinu nedostatkem železa u myší v minulosti používaly standardní model podávání nízkoželezné diety po dobu několika týdnů právě odstaveným (čtyřtýdenním) myším; tento postup prakticky vždy vede i k anémii z nedostatku železa. Teprve recentně se jednoznačně prokázalo, že nízkoželezná dieta snižuje hepcidin i za situace, kdy ještě nedochází k anémii a zvýšené expresi erytroferronu ve slezině (Frydlova et al., 2018).

Na základě literárních údajů i našich předchozích experimentů a publikací, byly formulovány hypotézy o možných vztazích a hierarchii regulačních faktorů a jejich mechanismů včetně v té době nově objevených faktorů, a tyto hypotézy byly zkoumány v předložené práci a publikacích.

2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZA

Jednou ze základních otázek regulace exprese hepcidinu je hierarchie jednotlivých regulačních mechanismů, tudíž jejich síly při působení na dané mechanismy. Významný je zejména vztah mezi regulací železem a regulací erytroidní. Naše skupina (Krijt et al., 2010b) prokázala, že předchozí podání železa tlumí expresi hepcidinu po erytroidní stimulaci.

V roce 2008 byla objevena matriptáza-2 (Du et al., 2008; Folgueras et al., 2008) jako další významný – negativní – regulátor exprese hepcidinu. Na základě toho jsme formulovali hypotézu, že je tento enzym součástí erytroidní regulační dráhy a může hrát roli ve vzájemném působení železa a erytropoézy. Následně po objevu erytoferronu (Kautz et al., 2014b) jsme formulovali hypotézu, že matriptáza-2 je součástí erytroidní regulační dráhy.

Ověření těchto hypotéz je cílem této disertační práce a zároveň publikovaných článků (v příloze).

Hypotéza:

Matriptáza-2 se účastní erytroidní regulace hepcidinu, je ovlivněna stimulovanou erytropoézou (erytropoetinem) a může být rovněž ovlivněna železem. Matriptáza-2 tak může propojovat regulační dráhy erytroidní a regulaci železem.

Dílčí cíle práce:

- studovat, jakým způsobem erytroidní regulace (erytropoéza/erytropoetin) a železo jako protichůdné stimuly ovlivňují klíčové proteiny účastnící se na regulaci metabolismu železa, studovat jejich vzájemné regulace a hierarchii
- určit vliv železa, erytropoetinu a jejich kombinovaného podání na expresi dvou regulačních proteinů regulujících hepcidin – matriptázy-2 a erytoferronu a porovnat tento vliv na úrovni mRNA a proteinu
- porovnat výsledky získané na myších s výsledky na potkanech
- přispět k objasnění mechanismu působení matriptázy-2 na regulaci exprese hepcidinu

3. MATERIÁLY A METODY

3.1 Materiály

3.1.1 Materiálové vybavení

běžný laboratorní plastik od firmy *Eppendorf* (pro analýzy RNA - PCR clean)

3.1.2 Rozpouštědla a chemikálie

Pierce™ BCA Protein Assay reagent A (*ThermoFischer Scientific*)

Complete Mini, EDTA-free Tablets (*Roche*)

Albumin Standart, 2 mg/ml (*ThermoFischer Scientific*)

koncentrát vývojky LP-T (*FOMA BOHEMIA s.r.o.*)

koncentrát rychloustalovače LP-T (*FOMA BOHEMIA s.r.o.*)

odtučněné sušené mléko (*Nutristar*)

PCR water (*TopBio*)

Phosphatase Inhibitor Cocktail 3 (*Sigma-Aldrich*)

Precision Plus Protein Dual Color Standard (*BIO-RAD*)

Ostatní používané chemikálie byly od firmy *Sigma-Aldrich*.

Další materiály a přístroje jsou zmíněny v popisu metod.

3.1.3 Protilátky

Primární:

Pro stanovení matriptázy-2 (TMPRSS6): polyklonální králičí protilátka anti-Matriptáza 2 – proti katalytické doméně: *ab56182 (Abcam)*, zředěná 1 : 750.

Pro stanovení HJV: polyklonální kozí protilátka anti-RGM-C: *AF3634 (R&D Systems)*, zředěná 1 : 1000.

Pro stanovení pSmad 1,5,8: polyklonální králičí protilátka anti-pSMADs: *9511 (Cell Signaling Technology)*, zředěná 1 : 600.

Pro stanovení erytoferronu (ERFE): polyklonální kozí protilátka anti-myonectin: SC-246567 (*Santa Cruz Biotechnology*), zředěna 1 : 200. Tato protilátka byla v naší laboratoři validována (Příloha II).

Pro stanovení ATP1A: králičí polyklonální protilátka anti-Na⁺/ K⁺ ATPáza α , H-300: SC-28800 (*Santa Cruz Biotechnology*), zředěná 1 : 10000.

Pro stanovení GAPDH: králičí polyklonální protilátka anti-GAPDH: G9545 (*Sigma-Aldrich*), zředěná 1 : 30000.

Sekundární:

Polyklonální anti-králičí protilátka Peroxidase AffiniPure F(ab')₂ Fragment Donkey (H+L): 711-036-152 (*Jackson Immunoresearch*), zředěná 1 : 40000.

Polyklonální anti-kozí protilátka Peroxidase AffiniPure F(ab')₂ Fragment Donkey (H+L): 705-036-147 (*Jackson Immunoresearch*), zředěná 1 : 40000.

3.2 Použitá zvířata

K experimentům byli použiti potkani – outbrední samice *Wistar* (170 – 195 g) a myši – inbrední samci *C57BL/6* (25 – 30 g) ve věku 8 až 12 týdnů. Pro navození nedostatku železa nízkoželeznou dietou byla použita mladá zvířata – samice potkanů *Wistar* o hmotnosti 45 – 55 g a myši samci *C57BL/6* (14 – 17 g) ve věku 4 týdnů po odstavení. Experimenty studující vztah matriptázy-2 a erytoferronu byly prováděny na outbredních samicích potkanů *Wistar* (200 – 225 g). Zvířata byla získána z firmy *Anlab*.

Zvířata byla chována ve standardních laboratorních podmínkách v Centru experimentálních biomodelů 1. LF UK při konstantní teplotě (22 ± 1 °C), vlhkosti (60 ± 5 %) a byl u nich dodržován dvanácti hodinový světelný cyklus (7:00 do 19:00 hod). Zvířata měla volný přístup k vodě a potravě po dobu trvání experimentu. Krmena byla komerční komplexní krmnou směsí pro myši a potkani v peletované formě a obsahující přibližně 200 ppm železa – ST-1 (*VELAZ*). Nízkoželezná dieta (10 ppm železa) v peletované formě *Altromin C1038* (*Altromin*) byla podávána mladým potkanům a mladým myším hned po odstavení.

Zákroky včetně i. p. injekcí byly prováděny v anestézii. Zvířata byla usmrcena dekapitací v anestézii halotanem.

Experimenty byly schváleny etickou komisí 1. LF UK, protokol *MŠMT-1461/2015-5*.

3.3 Aplikace

Erythropoetin byl podáván jako lidský rekombinantní erythropoetin (rhEPO), Epoetin beta (NeoRecormon, *Roche*) v dávce 500 IU/ den potkanům a 50 IU/ den myším intraperitoneálně (i. p.), a to dle typu pokusu během čtyř následujících dnů nebo jednorázově; zvířata byla usmrcena za 24 hod po poslední aplikaci.

Železo bylo podáváno i. p. jako dextran železa (Iron dextran, *Sigma-Aldrich*). Dávky dle typu pokusu byly: jednorázově velká dávka (1000 mg/kg) s následným usmrcením za 24 hodin; v dalším typu pokusu byly aplikovány jednorázově různé dávky (200, 350, 700 mg/kg a 50, 100, 150 mg/kg), zvířata byla usmrcena za týden.

Nedostatek železa byl navozen podáváním nízkoželezné diety mladým zvířatům po odstavení po dobu třech (potkani) či čtyř týdnů (myši).

V pokusech kombinujících podávání železa a EPO potkanům bylo nejprve podáno železo v první dávce 100 mg/kg dva týdny a poté v dávce 50 mg/kg jeden týden před podáním erythropoetinu; EPO byl aplikován ve čtyřech dávkách po 600 IU/ potkan ve čtyřech následujících dnech s analýzou 24 hodin po poslední dávce.

Kontrolním skupinám byl aplikován fyziologický roztok.

3.4 Hematologické parametry

Vzorky krve byly odebrány u myší retrobulbární punkcí, u potkanů srdeční punkcí. Krev byla odebrána do zkumavek s roztokem heparinu (20 μ l). Krevní obraz byl změřen pomocí BC-5300 Vet Auto Hematology Analyzer (*Mindray*). Byly stanoveny počty červených krvinek, hemoglobin (*Hb*, g/l), hematokrit (*HCT*, %) a střední objem erytrocytu (*MCV*, fl) automatickým počítadlem buněk kalibrovaným pro myši, resp. potkani vzorky.

Pro kontrolu hematokrit byl také stanoven centrifugací ve skleněných kapilárách při pokojové teplotě, 25 min, 4500 ot/min.

3.5 Měření koncentrace železa

3.5.1 Koncentrace nehemového železa v játrech (liver iron concentration, LIC)

Vzorek jater byl po odběru uložen v tekutém dusíku. Měření bylo provedeno metodou dle Torrance and Bothwell (Torrance and Bothwell, 1980) pomocí kitu BIO-LA-TEST, Železo 70 (*PLIVA-Lachema Diagnostika*). Principem metody je deproteinace tkáně pomocí směsi kyselin (činidlo 1: kyselina trichloroctová 0,15 mol/l, kyselina chlorovodíková 0,50 mol/l). Cca 50 mg tkáně je v desetinásobku tohoto roztoku ponecháno 20 hodin za stálého třepání při 65 °C na Termomixer comfort (*Eppendorf*). Kvantifikace železa byla provedena v eluátu přidáním betafenantrolinu (činidlo 2: kyselina 4,7-difenyl-1,10-fenantrolin-3,6-disulfonová 0,23 mmol/l, octan sodný 1,0 mol/l) a kyseliny thioglykolové (činidlo 3: kyselina thioglykolová 95,5 mmol/l) s následným vznikem červeného komplexu s ionty dvojmocného železa. Měření absorbance bylo provedeno spektrofotometricky na Uvicon Spectrophotometer 932 (*Kontron Instruments*), při vlnové délce 540 nm proti deionizované vodě (UV Water Purification systém, *Synergy*) pomocí kalibrační křivky a standardu. Intenzita zbarvení byla přímo úměrná množství železa ve vzorku. Výsledky byly vyjádřeny jako mikrogram na gram vlhké tkáně ($\mu\text{g/g}$).

3.5.2 Měření koncentrace železa v plazmě

Plazma byla získána centrifugací nesrážlivé krve. Měření bylo provedeno pomocí kitu BIO-LA-TEST, Železo Liquid 200 (*PLIVA-Lachema Diagnostika*) kolorimetrickou analýzou. Železo bylo v kyselém pufru uvolněno z vazeb na transferin (Fe^{3+}) a redukováno na železnaté ionty (Fe^{2+}). Uvolněné ionty tvořily s činidlem Ferene S stabilní barevný komplex. Absorbance byla změřena analogicky jako v kap. 3.5.1. Výsledky byly vyjádřeny jako $\mu\text{mol/l}$.

3.6 Izolace RNA a měření její koncentrace

Celková RNA byla izolována pomocí kitu RNeasy Plus Mini Kit (*QIAGEN*). Veškeré manipulace s RNA (izolace, měření koncentrace a reverzní transkripce) byly prováděny na ledu speciálními filtrovanými špičkami a dalším materiálem prostým RNáz.

Vzorky tkání (cca 50 μg) byly ihned po odběru uloženy v 1 ml roztoku RNAlater, Stabilization Solution (*Sigma-Aldrich*) za teploty 4 °C. Vzorky byly homogenizovány pomocí

kolonky s keramickými kuličkami MagNA Lyser Green Beads (*Roche*) v homogenizačním pufru (600 μ l RNasy Plus lysis buffer a 6 μ l β -mercaptoethanolu) na homogenizátoru MagNA Lyser (*Roche*), při 6500 g po dobu 20 až 40 s. Následně byl lyzát centrifugován 3 min při 16000 g.

Supernatant z homogenizované tkáně byl nanesen na gDNA Eliminator spin kolonku, která byla centrifugována 30 s při 6500 g. K filtrátu bylo přidáno 350 μ l etanolu (50 % při izolaci jater). Následně byl roztok nanesen na RNeasy spin kolonku umístěné ve 2 ml zkumavce. Kolonka byla centrifugována 15 s při 8000 g a potom postupně promyta 700 μ l Buffer RW1 (Wash buffer) 15 s při 8 000 g, 500 μ l Buffer RPE (Wash buffer) 15 s při 8000 g, 500 μ l RPE (2 min při 8000 g).

Eluce byla provedena 40 μ l RNase-Free Water do nové zkumavky, centrifugací 1 min při 8000 g, následně byla ihned uložena na led.

Koncentrace a čistota RNA byla měřena spektrofotometrem pro malé objemy (1 μ l) Spectrophotometer ND 1000 (*NanoDrop*). Koncentrace byla vyjádřena v ng/ μ l. Čistota byla stanovena jako poměr absorbancí při vlnové délce A260/ A280 nm (N = 1,9 až 2,1). Izolovaná RNA byla skladována v mrazicím boxu při -80 °C.

3.7 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce byla prováděna kitem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (*ThermoFischer Scientific*) na MasterCycler personal (*Eppendorf*). Principem metody je přepis mRNA na cDNA (která je na rozdíl od RNA velmi stabilní). K přepisu bylo použito 250 až 1000 ng celkové RNA. Přepis se uskutečnil ve směsi s 11 μ l DEPC vodou, 1 μ l Oligo(dT)₁₈ Primer, po inkubaci 5 min při teplotě 65 °C a poté po ochlazení na 4 °C bylo ke každému vzorku přidáno 8 μ l master mix (4 μ l 5 \times Reaction Buffer, 2 μ l 10 mM dNTP, 1 μ l RiboLock RNase Inhibitor, 1 μ l RevertAid Reverse Transcriptase). Reakce probíhala při teplotě 42 °C po dobu 60 min, poté 5 min při teplotě 70 °C a následně byla reakce ochlazená na 4 °C. Po dokončení analýzy vzorky cDNA byly zředěny PCR vodou (*TopBio*) a následně skladovány v mrazáku při -20 °C.

3.8 Real-time PCR

Expresse genu na úrovni mRNA byla měřena pomocí RT-PCR na přístroji IQ5 170-9780 (*BIO-RAD*) za použití protokolu IQ SYBR Green Supermix (*BIO-RAD*).

K reakci byl použit 1 μ l templátu cDNA, 1,5 μ l páru specifických primerů, 5,0 μ l PCR vody (*TopBio*) a 7,5 μ l SYBR Green Supermix obsahujícího nukleotidy, pufr a enzym. Protokol reakcí byl následující: preinkubace při teplotě 95 °C po dobu 10 min, následovaná 40 cykly s teplotním profilem 95 °C po dobu 10 s, 60 °C po dobu 1 min, 55 °C po dobu 5 s a následné ohlazení na 21 °C. Vzorky byly měřeny v tripletech. Jako referenční (house-keeping) gen byl užíván beta-aktin (*Actb*).

Sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce 1 (A,B) a byly získány pomocí programu „Primer 3“ a syntetizovány firmou *Generi Biotech*. Pro každý amplifikační produkt s danými primery byla následně zaznamenaná křivka tání (tzv. melting analýza) k potvrzení specifity fluorescenčních amplifikačních produktů.

Tab. 1A: Sekvence použitých primerů u potkanů (forward and reverse)

<i>Actb</i> : 5'-TGT CAC CAA CTG GGA CGA TA-3' a 5'-AAC ACA GCC TGG ATG GCT AC-3'
<i>Hamp</i> : 5'-GAA GGC AAG ATG GCA CTA AGC A-3' a 5'-TCT CGT CTG TTG CCG GAG ATA G-3'
<i>Tmprss6</i> : 5'-GAA GAA GGG CTT GCA TAG CTT-3' a 5'-CCA TAG TCC AGA GAG GGA ACC-3'
<i>Id1</i> : 5'-ATG AAG GTC GCC AGT AGC AGT-3' a 5'-GTG AGT AGC AGC CGT TCA TGT-3'
<i>Bmp6</i> : 5'-AAA AGG AGA TCC TGT CGG TGT-3' a 5'-GGG AGT TGT AGA GAT CCA GCA-3'
<i>Smad7</i> : 5'-CGA TGG ATT TTC TCA AAC CAA-3' a 5'-CTC GAG TCT TCT CCT CCC AGT-3'
<i>Fam132b</i> : 5'-AGA AGA GGA GCA GGA CCA AAG-3' a 5'-TAG TGA GA TCC CTG GTG CAG T-3'

Tab. 1B: Sekvenci použitých primerů u myši (forward and reverse)

<i>Actb</i> : 5'-GAC ATG GAG AAG ATC TGG CA-3' a 5'-GGT CTT TAC GGA TGT CAA CG-3'
<i>Hamp</i> : 5'-CTG AGC AGC ACC ACC TAT CTC-3' a 5'-TGG CTC TAG GCT ATG T TT TGC-3'
<i>Tmprss6</i> : 5'-GGT ACC CTC TCT GGA CTA CGG-3' a 5'-CAG AGC AGA GGA ACT CAC CA-3'
<i>Bmp6</i> : 5'-GAA CCT GGT GGA GTA CGA CAA-3' a 5'-ATG CTC CTG CAA GAC TTG GTA-3'

Výsledky byly vyjádřeny jako rozdíl v cyklech PCR (Δ CT) relativně k mRNA referenčního genu (Δ CT = CT₁ mRNA referenčního genu - CT₂ mRNA cílového genu). Čím

vyšší bylo ΔCT , tím vyšší byla koncentrace příslušné mRNA. Pro analýzu dat byl použit referenční gen pro beta-aktin (*Actb*).

3.9 Western blot analýza

3.9.1 Příprava vzorků

Pro Western blot analýzu byl použit celkový homogenát, frakce plazmatických membrán nebo mikrozomů z jater a sleziny myši nebo potkanů. Pro izolaci proteinů bylo použito 100 až 250 mg tkáně. Celkový homogenát byl získán homogenizací tkáně v homogenizačním pufru (2 ml) 6 mm Ultra Turrax homogenizátorem na maximální rychlost po dobu 3×10 s. Následně byl homogenát třepán 1 h při 4 °C. Nakonec byl odstředěn (12000 g, 20 min, 4 °C). Supernatant byl skladován při -80 °C.

Frakce mikrozomů byla získána odstředěním homogenizované tkáně při 8 000 g (20 min, 4 °C) s následným odstředěním při 4 °C, 1 h a 100000 g (Optima™ LE-80K Preparative Ultracentrifuge, Beckman Coulter). Výsledná peleta byla resuspendována ve 2 % SDS (w/v) v 25 mM hydrogenuhličitanu amonném a skladována při teplotě -80 °C.

Postup izolace frakce plazmatických membrán byl vyvinut v naší laboratoři (detailně popsáno v metodice článku viz Příloha I). Účelem je zkoncentrování membránových proteinů a odstranění nespecificky vázaných cytoplasmatických a jiných proteinů. V principu jde o opakované centrifugace s použitím různé iontové síly roztoků, přidavku močoviny a SDS. Následuje sonikace pelety a finální centrifugace k odstranění nerozpustného materiálu. Získaný homogenát je uchováván při -80 °C.

3.9.2 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena metodou BCA – bicinchoninová kyselina¹. Principem BCA metody je kolorimetrická reakce, která je založena na reakci Cu^{2+} s peptidovou vazbou v alkalickém prostředí za vzniku Cu^+ iontů, které poté vytváří s BCA purpurově zbarvené komplexy. K sestrojení kalibrační přímky byly použity roztoky hovězího sérového albuminu o

¹ Walker J. M., v knize: The Protein Protocols Handbook, Second Edition (Walker J. M., ed.), kap. 3. Humana Press, Totowa 2002.)

známé koncentraci. Stanovení bylo děláno v duplikátech. Absorbance byla změřena spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm na BioPhotometer 8,5 mm (*Eppendorf*).

3.9.3 Postup Western blot analýzy

Vzorky (celkový homogenát, frakce plazmatických membrán nebo mikrozomů) byly smíchány s Laemli Sample Buffer, 2x (*BIO-RAD*) vzorkovým pufrém obsahující 2-mercaptoethanol (*BIO-RAD*) a uvařeny 10 min při 90 °C. Poté byly proteiny separovány SDS-PAGE (vertikální elektroforéza Mini-PROTEAN 3 Cell, *BIO-RAD*); skla o tloušťce 1 mm; 125 V, 60 - 75 min). Pro separaci byl použit polyakrylamidový zaostřovací gel (T 4 %, C 3,4 %) a separační gely (T 8 %, C 3,4 %) nebo (T 10 %, C 3,4 %). Separované proteiny byly následně přeneseny na PVDF membránu, Amersham Hybond P 0,45 μm (*GE Healthcare Life Sciences*) při 25 V 2 h na XCell IITM Blot Module (*Invitrogen*). Membrána byla inkubována 1 h v blokovacím roztoku – 5 % (w/v) odtučněné mléko v promývacím roztoku – 0,1 % (v/v) Tween 20 v TBS pH 7,6 při 4 °C. Inkubace membrány v primární protilátce v blokovacím roztoku probíhala přes noc při 4 °C. Druhý den byla membrána promyta promývacím roztokem, následně inkubována v sekundární protilátce v blokovacím roztoku (2 h, laboratorní teplota) a opět promyta promývacím roztokem. Vizualizace proteinů proběhla za použití chemiluminiscentního substrátu pro křenuvou peroxidasu (20X LumiGLO® Reagent and 20X Peroxide, *Cell Signaling Technology*) na papír CP-BU, 13x18 cm (*AGFA HealthCare*), doba expozice byla od 5 min do 1 hodiny.

K denzitometrické kvantifikaci byl použit Calibrated Imaging Densitometer GS 800 (*BIO-RAD*), kontrolní hodnoty byly nastaveny jako 100 %. K výpočtu denzity bylo obvykle použito více blotů.

3.9.4 Odstranění vázaných protilátek z PVDF membrány

Vázané protilátky byly z PVDF membrány odstraněny promýváním membrány v následujících roztocích – 2 × 7 min stripovací roztok (200 mM glycinový pufr pH 2,2, obsahující 1 % (w/v) SDS a 1 % (v/v) Tween 20; 2 × 10 min PBS; 2 x 10 min; 0,1 % (v/v) Tween 20 v TBS pH 7,6. Stripování probíhalo za mírného míchání při laboratorní teplotě.

3.10 Statistické hodnocení

K statistickému hodnocení byl použit program *GraphPad Prism 4*, popř. Microsoft Excel pro jednoduché testy.

K analýze hematologických parametrů mezi dvěma skupinami hodnot byl použit Studentův t-test.

K výsledkům RT-PCR byly použity neparametrické testy – Mann-Whitneyův test při srovnání dvou hodnot (skupin) a ANOVA test s následným Newman-Keulsovým testem při hodnocení více hodnot (skupin), a to i v případě hodnocení denzity imunoblotů.

Výsledky jsou uvedeny jako průměr \pm směrodatná odchylka (SD). Výsledky všech testů byly považovány za statistické významné, pokud byla hladina pravděpodobnosti menší než $p < 0,05$.

4. VÝSLEDKY

4.1 Studium exprese *Tmprss6* (TMPRSS6) na modelech myši a potkanů (příloha I)

4.1.1 Hematologické parametry

4.1.1.1 Nízkoželezná dieta snižuje hematologické parametry

Dieta se sníženým obsahem železa statisticky významně snižuje hodnoty hemoglobinu oproti kontrolní skupině, výrazněji u potkanů. Snížené hodnoty hematokritu můžeme považovat za signifikantní jen u potkanů. Výsledky jsou uvedené v tabulce 2.

4.1.1.2 Podání EPO zvyšuje hematologické parametry

Podání EPO aktivuje erythropoézu, která u myši a potkanů probíhá nejen v kostní dřeni, ale i ve slezině. Zvířata, která dostávala EPO (50 IU/ myš, 500 IU/ potkan po dobu 4 následných dnů), měla statisticky významně zvýšené hodnoty hemoglobinu a hematokritu oproti kontrolní skupině. Výsledky jsou uvedené v tabulce 2.

Tab. 2 Hematologické parametry myši a potkanů

Myši	Hemoglobin, g/l	Hematokrit, %
Kontroly	141 ± 12	40 ± 3
Nedostatek železa	110 ± 8 *	37 ± 2
EPO	162 ± 17 *	48 ± 4 *
Potkani	Hemoglobin, g/l	Hematokrit, %
Kontroly	140 ± 1	42 ± 1
Nedostatek železa	53 ± 5 *	17 ± 3 *
EPO	161 ± 5 *	53 ± 3 *

Vyjádřeno jako průměr ± SD.

*) statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolám ($p < 0,05$; $n = 4$ potkani, 5 myši)

4.1.2 Koncentrace nehemového železa v játrech

Množství železa v játrech zvířat bylo snižené jak po podání EPO, tak i při nedostatku železa.

Stanovení množství nehemového železa (LIC) v játrech se považuje za „zlatý standard“ pro určení celkových zásob železa v organismu. Zvířata, která dostávala EPO a byla na nízkoželezné dietě, měla statisticky významně snižené množství jaterního železa oproti kontrolní skupině. Výsledky jsou znázorněny v tabulce 3.

Tab. 3 Množství jaterního železa u myší a potkanů ($\mu\text{g/g}$ vlhké tkáně)

Skupina	Myši			Potkani		
	Kontroly	Nedostatek železa	EPO	Kontrola	Nedostatek železa	EPO
Množství železa	46 ± 13	$20 \pm 2^*$	$33 \pm 9^*$	157 ± 12	$19 \pm 2^*$	$111 \pm 26^*$

Vyjádřeno jako průměr \pm SD.

*) statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolám ($p < 0,05$; $n = 4$ potkani, 5 myší)

Statisticky významné jsou i změny v množství železa v játrech, které v našich pokusech několikanásobně stouplu ve skupině myší, které dostávaly jednorázově různé dávky samotného železa (Fe: 200, 350, 700 a 1000 mg/kg) s odběrem orgánů 7 dnů (7 d), resp. 24 hodin (24 h) po aplikaci, ve srovnání s kontrolní skupinou. Vzestup byl závislý na dávce. Výsledky jsou uvedené v tabulce 4.

Tab. 4 Množství jaterního železa u myší s podáním železa ($\mu\text{g/g}$ vlhké tkáně)

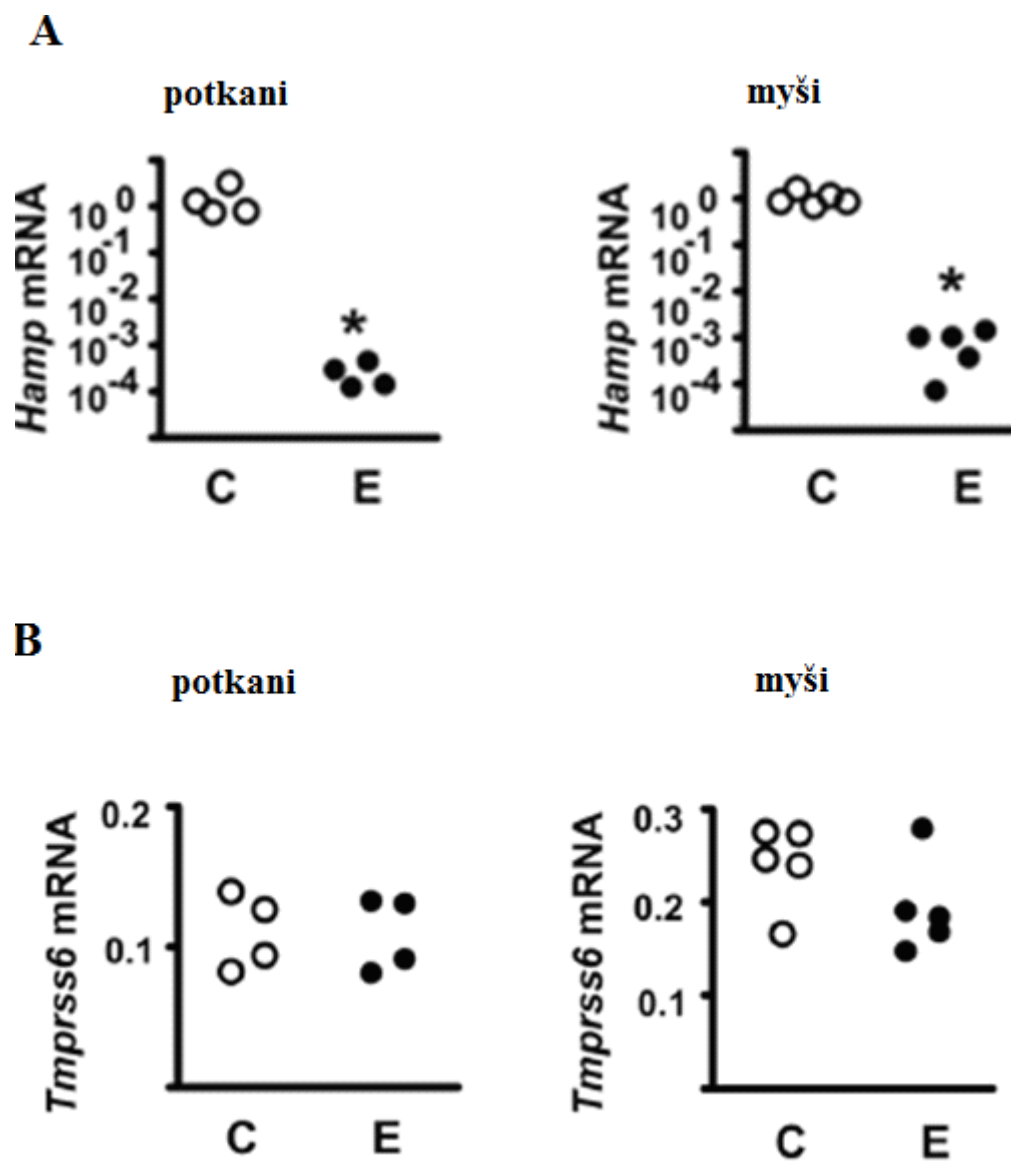
Skupiny	Kontroly	200 mg/kg, 7 d	350 mg/kg, 7 d	700 mg/kg, 7 d	1000 mg/kg, 24 h
Množství železa	38 ± 2	$1788 \pm 83^*$	$2697 \pm 125^*$	$3567 \pm 114^*$	$6630 \pm 470^*$

Vyjádřeno jako průměr \pm SD.

*) statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolám ($p < 0,05$; $n = 3$)

4.1.3 Vliv podání EPO na expresi *Hamp* a *Tmprss6* (TMPRSS6) v játrech

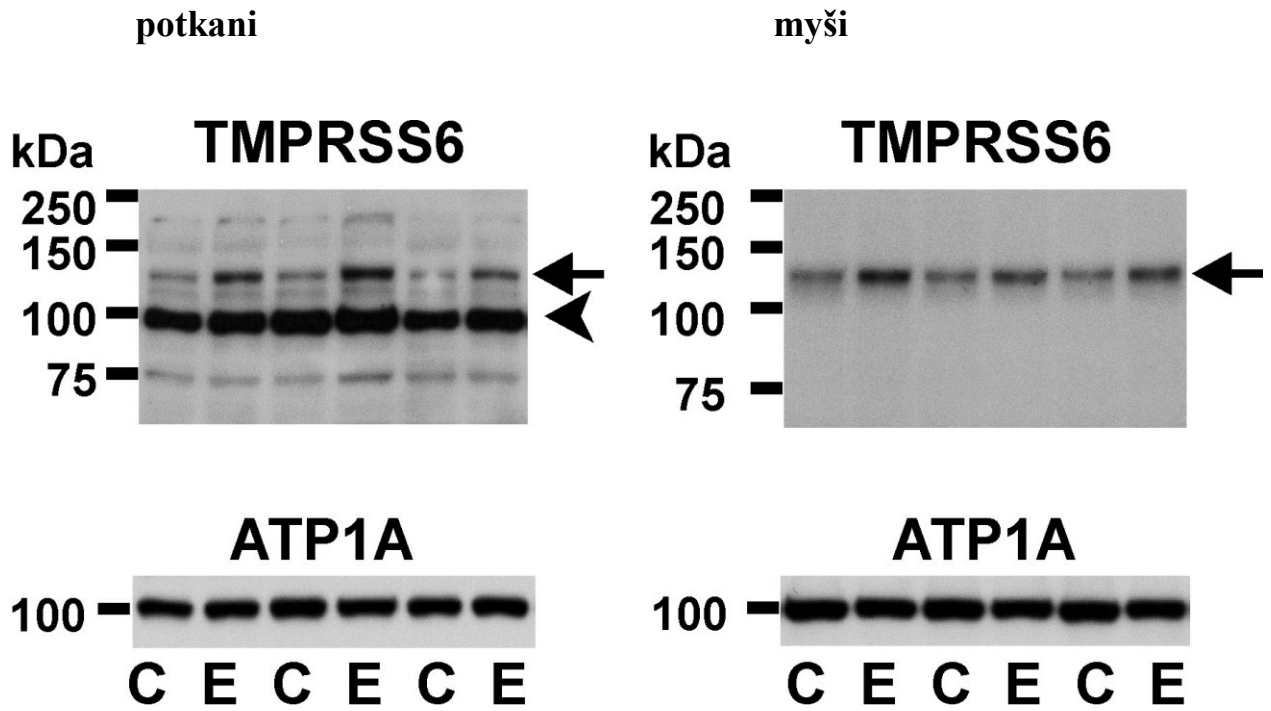
Expres *Hamp* a *Tmprss6* byla měřena v játrech na úrovni mRNA pomocí real-time PCR, TMPRSS6 byla měřena i na úrovni proteinů pomocí imunoblotů v jaterním homegenátu obohaceném o frakce plazmatických membrán. Po podání EPO výsledky prokázaly pokles exprese *Hamp* u myši i potkanů na úrovni mRNA (obr. 4A), množství mRNA pro *Tmprss6* nebylo ovlivněno (obr. 4B), ale byl prokázán statisticky významný vzestup TMPRSS6 na úrovni proteinu (obr. 5A,B), který byl výraznější u potkanů. Jednorázové podání EPO (500 IU/ potkan) 24 hodin před usmrcením však množství proteinu TMPRSS6 (obr. 5C) neovlivnilo, ačkoliv exprese *Hamp* byla signifikantně snížena (obr. 5C). V myších a potkaních vzorcích jaterních homogenátů byl pozorován specifický proužek proteinu TMPRSS6 na 120 kDa. Vzorky potkaních jaterních homogenátů vykazovaly kromě specifického proužku 120 kDa poměrně silný proužek proteinu TMPRSS6 na úrovni 100 kDa (obr. 5A). Vzhledem k tomu, že tento proužek nereagoval na podání EPO a nebyl pozorován u myších modelů, považujeme je za nespecifický.



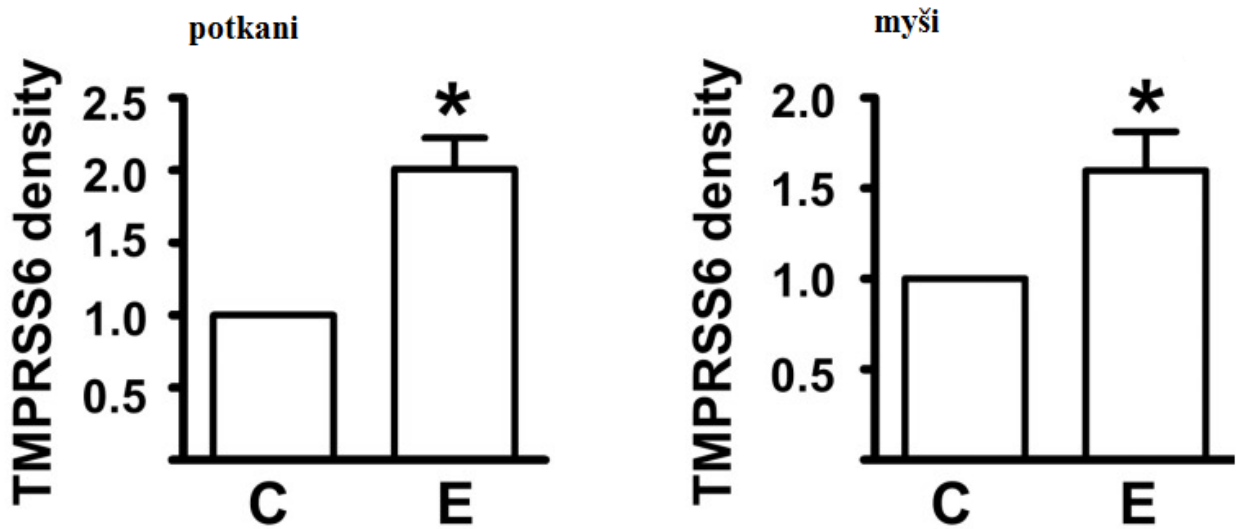
Obr. 4 Vliv podání erythropoetinu (50 IU/ myš, 500 IU/ potkan po dobu 4 následných dnů) na expresi *Hamp* (A) a *Tmprss6* (B) v játrech myši a potkanů na úrovni mRNA. C – kontroly; E – podání EPO. Vyjádřeno jako relativní exprese k *Actb*.

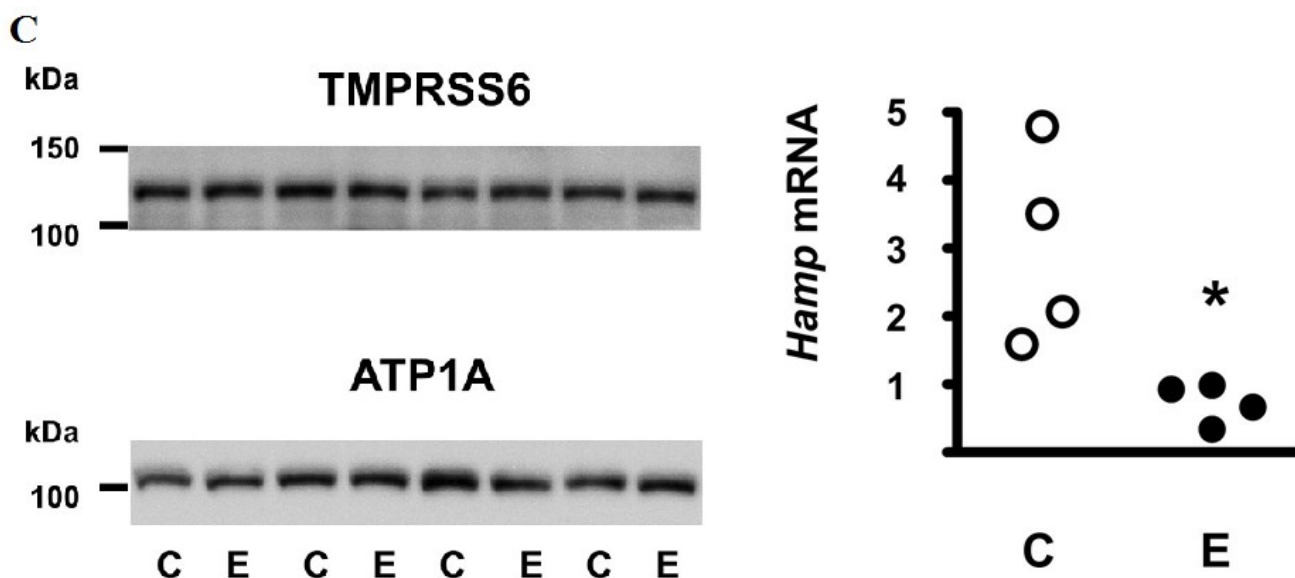
*) statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolám ($p < 0,05$; $n = 4$ potkani, 5 myši)

A



B





Obr. 5 Vliv podání erythropoetinu na množství proteinu TMPRSS6 v játrech myši a potkanů, stanovené imunoblotem. **A, B** – opakované podání EPO 50 IU/ myš, 500 IU/ potkan po dobu 4 následujících dnů, imunoblot (**A**) a denzitometrie (**B**). **C** – jednorázové podání EPO (500 IU/ potkan) se stanovením po 24 hodinách. **C** – kontroly, **E** – erythropoetin.

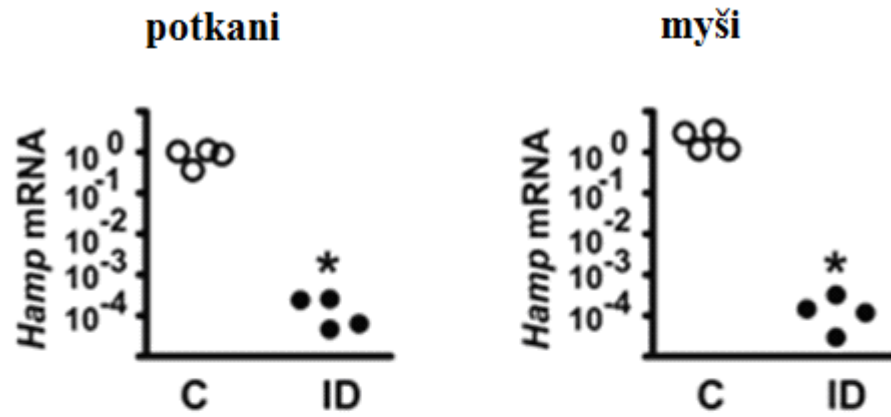
Šipka (**A**) označuje specifický proužek proteinu TMPRSS6. Konec šipky (**A**) nespecifický proužek proteinu TMPRSS6. Jako kontrola nanášení byl použit protein ATP1A. Expres *Hamp* vyjádřena jako relativní exprese k *Actb*.

*) statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolám ($p < 0,05$; $n = 4$ potkani, 6 myši)

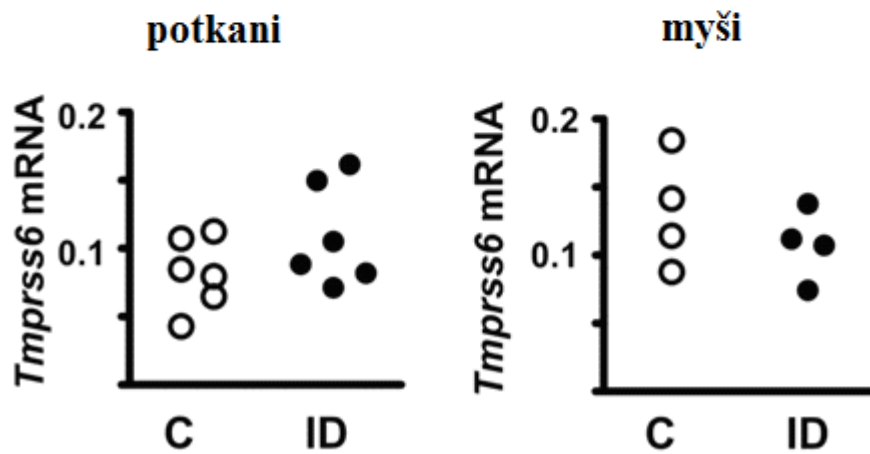
4.1.4 Vliv nedostatku železa na expresi *Hamp* a *Tmprss6* (TMPRSS6) v játrech

Nízkoželezná dieta snížila expresi *Hamp* (obr. 6A), zatímco nezměnila signifikantně expresi *Tmprss6* na úrovni mRNA (obr. 6B). Při stanovení proteinu TMPRSS6 byl pozorován statisticky významný vzestup (obr. 7) ve srovnání s kontrolní skupinou. U potkanů byl tento vzestup výraznější. V myších a potkaních vzorcích jaterních homogenátů byl pozorován specifický proužek proteinu TMPRSS6 na úrovni 120 kDa. Vzorky potkaních jaterních homogenátů vykazovaly kromě specifického proužku proteinu TMPRSS6 na 120 kDa poměrně silný proužek na úrovni 100 kDa (obr. 7A). Vzhledem k tomu, že tento proužek nereagoval na nedostatek železa a nebyl pozorován u myších modelů, považujeme je za nespecifický.

A



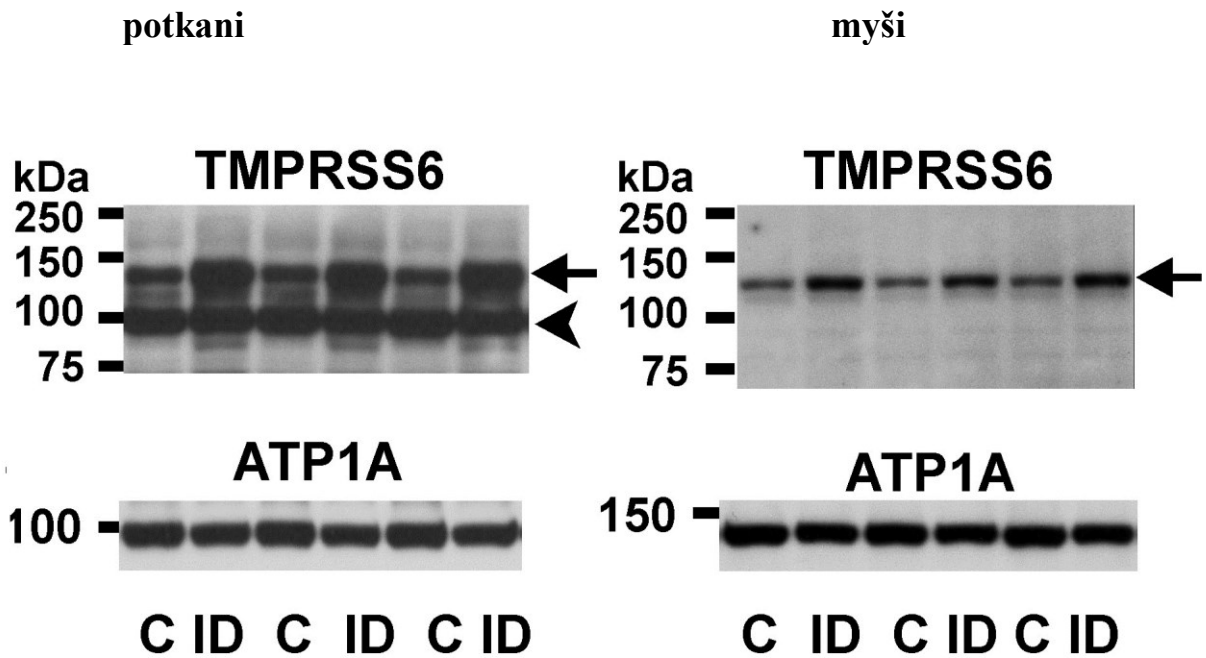
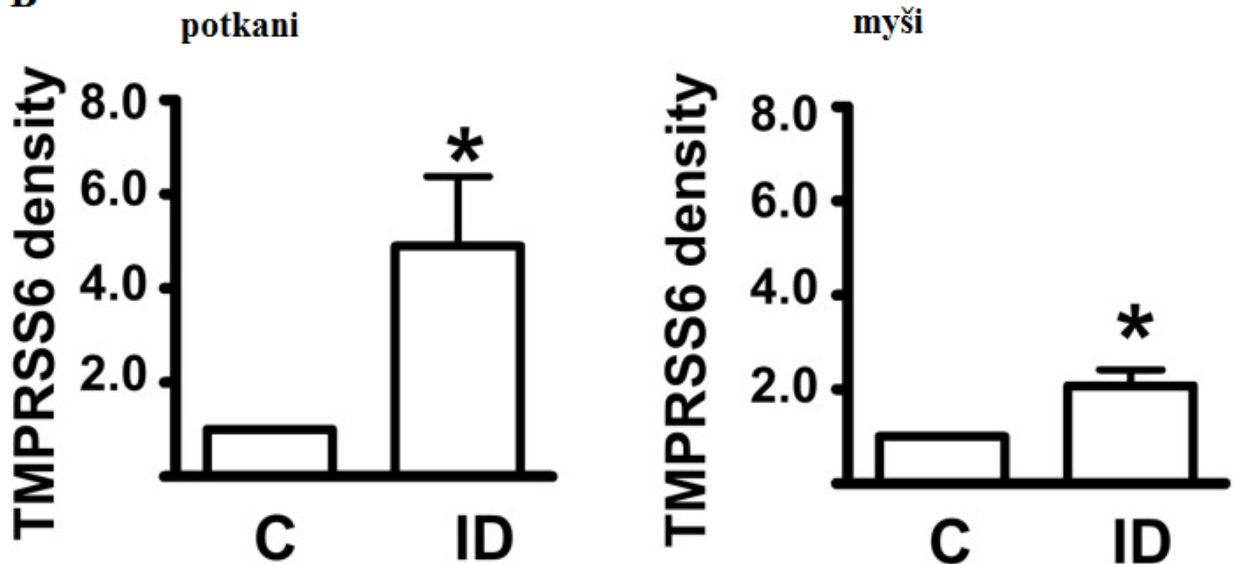
B



Obr. 6 Vliv nízkoželezné diety na expresi *Hamp* (A) a *Tmprss6* (B) v játrech myši a potkanů na úrovni mRNA.

C – kontroly, ID – nízkoželezná dieta. Vyjádřeno jako relativní exprese k *Actb*.

*) statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolám ($p < 0,05$; $n = 6$ potkanů, 4 myši)

A**B**

Obr. 7 Vliv nízkoželezné diety na množství proteinu TMPRSS6 v játrech myši a potkanů, stanovený imunoblotem (A) a vyjádřený denzitometrií (B). C - kontroly; ID – nízkoželezná dieta. Šipka (A) označuje specifický proužek proteinu TMPRSS6. Konec šipky (A) označuje nespecifický proužek proteinu TMPRSS6. Jako kontrola nanášení byl použit protein ATP1A.

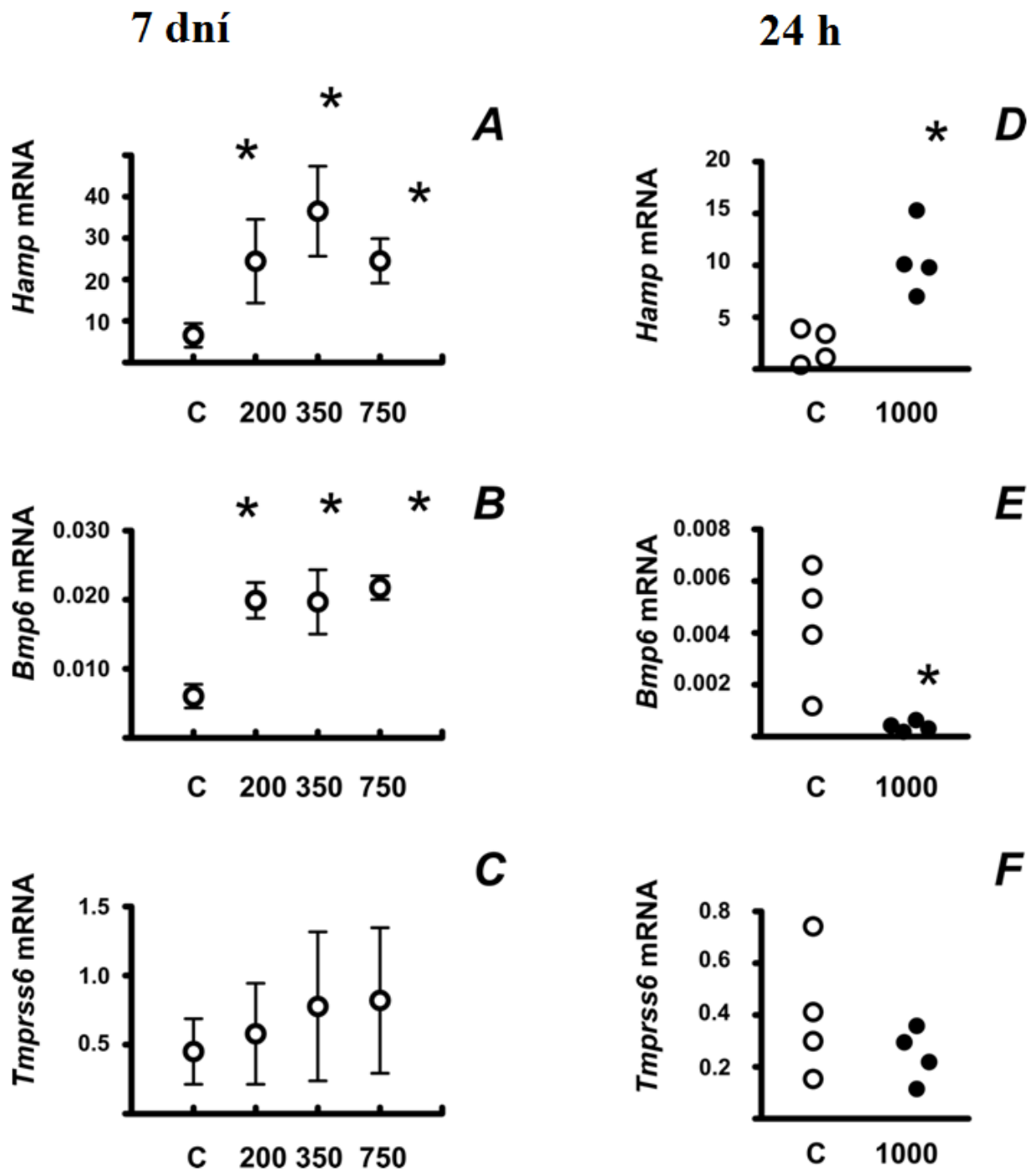
*) statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolám ($p < 0,05$; $n = 4$)

4.1.5 Vliv podání železa na expresi *Hamp*, *Bmp6*, *Tmprss6* (TMPRSS6) a HJV v játrech

Podání železa v dávkách 200, 350 a 750 mg/kg i.p. jeden týden před usmrcením statisticky významně zvýšilo expresi *Hamp*, *Bmp6* na úrovni mRNA, nikoliv však *Tmprss6* (obr. 8 A-C). Množství proteinu TMPRSS6 však bylo při všech těchto dávkách signifikantně sníženo, přičemž mezi jednotlivými dávkami nebyl žádný rozdíl. Množství proteinu HJV se nezměnilo (obr. 9A). Vzorky myších jaterních homogenátů vykazovaly kromě specifického proužku proteinu TMPRSS6 na úrovni 120 kDa poměrně silný nespecifický proužek na úrovni 75 kDa (obr. 9A).

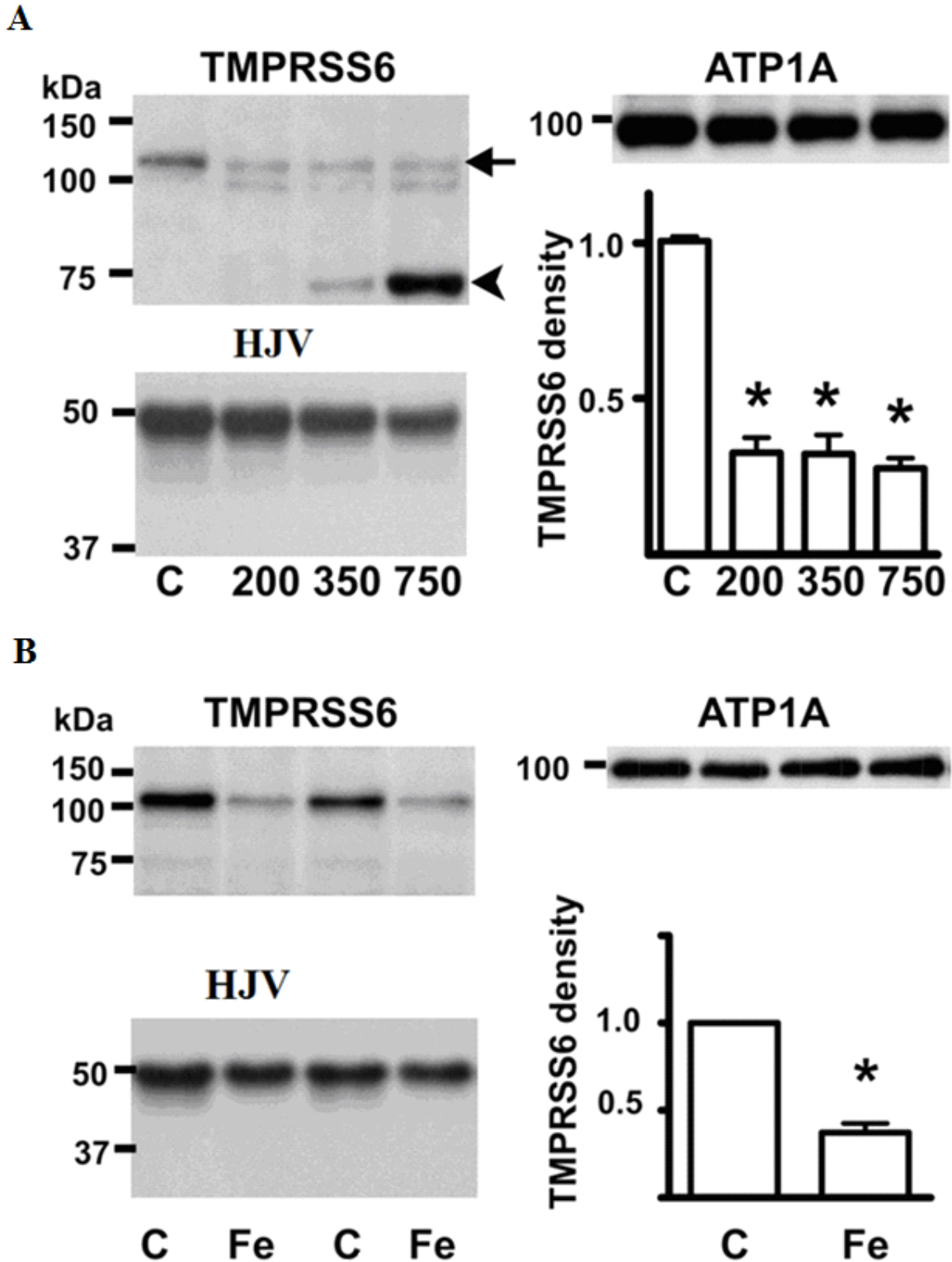
Dále byla podána jednorázově vysoká dávka železa 1000 mg/kg 24 hodin před analýzou. Na úrovni mRNA statisticky významně stoupla pouze exprese *Hamp* (obr. 8D). Naopak exprese *Bmp6* byla signifikantně snižena (obr. 8E). Exprese *Tmprss6* byla podobně jako v předchozím uspořádání nezměněna na úrovni mRNA (obr. 8F), ale snížena na úrovni proteinu (obr. 9B).

Nízké dávky železa (50, 100 a 150 mg/kg) podané myším týden před usmrcením nezměnily množství proteinů TMPRSS6 (obr. 10).



Obr. 8 Efekt podání železa na expresi *Hamp*, *Bmp6* a *Tmprss6* v játrech u myši na úrovni mRNA. C – kontroly; 200, 350, 750 – dávky železa (mg/kg), podání týden před analýzou; 1000 – dávka železa (mg/kg), analýza po 24 h. Vyjádřeno jako relativní exprese k *Actb*.

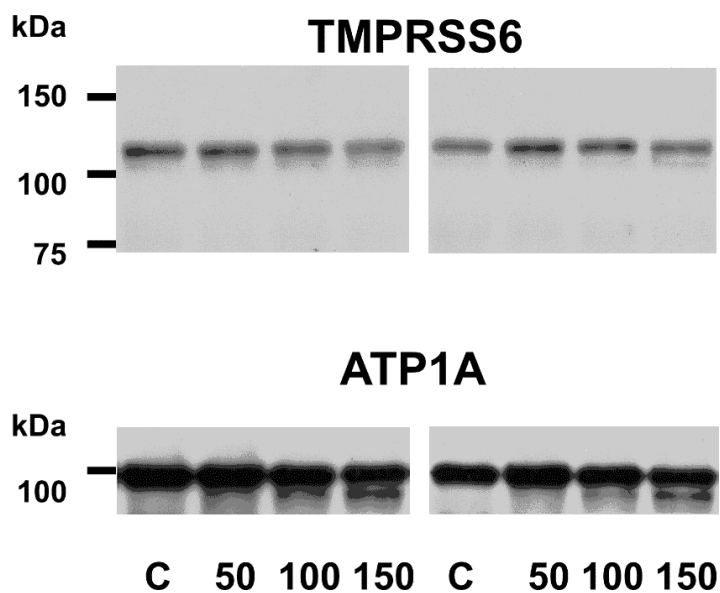
*) statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolám ($p < 0,05$; $n = 4$)



Obr. 9 (A) Vliv podávání železa (200, 350 a 750 mg/kg) na množství proteinu TMPRSS6 a HJV v játrech u myši, stanovený imunoblotem a vyjádřený denzitometrií. C – kontroly; Fe,200,350,750 – dávky železa. Šipka (A) označuje

specifický proužek proteinu TMPRSS6. Konec šipky (A) označuje nespecifický proužek proteinu TMPRSS6. **B** Vliv podávání železa (1000 mg/kg) na množství proteinu TMPRSS6 v játrech u myši, stanovený imunoblotem. Jako kontrola nanášení byl použit protein ATP1A.

*) statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolám ($p < 0,05$; $n = 4$)



Obr. 10 Vliv podávání nižších dávek železa (50, 100 a 150 mg/kg) na množství proteinu TMPRSS6 v játrech u myši, stanovený imunoblotem. C - kontroly; 50,100,150 – dávky železa. Jako kontrola nanášení byl použit protein ATP1A.

4.2 Vliv erythropoetinu na expresi erytroferronu a matriptázy-2 u potkanů (příloha II)

4.2.1 Hematologické parametry a hmotnost sleziny

Ve skupině, která dostávala EPO, byly statisticky významně zvýšeny hmotnosti slezin, dále hodnoty hemoglobinu a hematokritu. Kombinace podání železa a EPO u potkanů měla v zásadě podobné statistické významné výsledky. Naopak ve skupině, která dostávala samotné železo, se sledované parametry nezměnily. Výsledky jsou uvedené v tabulce 5.

Tab. 5 Hematologické parametry potkanů

	Kontroly	EPO	Fe+EPO	Fe
Hmotnost sleziny (% t.h.)	0,22 ± 0,03	0,83 ± 0,07*	0,98 ± 0,12*	0,24 ± 0,05
Erytrocyty (10⁶/mm³)	7,18 ± 0,29	7,72 ± 0,20*	7,54 ± 0,08	6,93 ± 0,13
Hemoglobin (g/l)	144,6 ± 7,0	164,6 ± 6,1*	167,4 ± 5,4*	143,8 ± 4,4
Hematokrit (%)	32,6 ± 1,5	39,8 ± 0,9	40,4 ± 1,2	32,00 ± 0,71
MCV (fl)	45,2 ± 0,9	51,7 ± 2,5*	53,4 ± 1,7*	46,5 ± 0,9

Vyjádřeno jako průměr ± SD. t.h. – tělesná hmotnost; MCV – mean cell volume.

*) statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolám ($p < 0,05$; $n = 4$)

4.2.2 Koncentrace železa v tkáních a v plazmě

4.2.2.1 Množství železa v játrech bylo zvýšené jak po podání samotného železa, tak i při jeho kombinaci s EPO

Množství nehemového železa v játrech (LIC) signifikantně stoupl ve skupině, která dostávala samotné železo, ale i železo v kombinaci s EPO ve srovnání s kontrolní skupinou. Ve

skupině, která dostávala samotný EPO, se množství jaterního železa statisticky významně nezměnilo. Výsledky jsou uvedené v tabulce 6.

Tab. 6 Množství jaterního a sérového železa u potkanů

	Kontroly	EPO	Fe+EPO	Fe
LIC (µg/g)	244 ± 22	213 ± 75	4902 ± 1138*	6501 ± 174*
Sérové železo (µmol/l)	51,4 ± 10,0	7,8 ± 4,9*	15,7 ± 7,2*	69,9 ± 10,7

Vyjádřeno jako průměr ± SD.

*) statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolám ($p < 0,05$; $n = 4$)

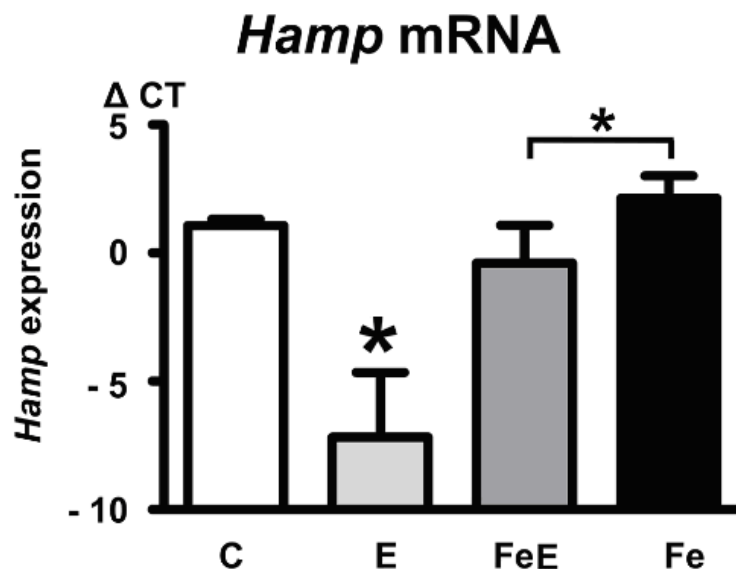
4.2.2.2 Množství železa v plazmě bylo sníženo po podání samotného EPO i po jeho podání v kombinaci se železem

Množství plazmatického železa kleslo ve skupině, která dostávala EPO ve srovnání s kontrolní skupinou. Ve skupině, která dostávala železo v kombinaci s EPO, bylo železo signifikantně nižší, nicméně vyšší ve srovnání se skupinou, která dostávala samotný EPO. Ve skupině, která dostávala samotné železo, byla koncentrace železa nesignifikantně vyšší ve srovnání s kontrolní skupinou. Výsledky jsou uvedené v tabulce 6.

4.2.3 Expres vybraných genů regulační dráhy BMP/ SMAD

4.2.3.1 Podání EPO snižuje expresi *Hamp* v játrech, ale předchozí podání železa tomuto poklesu zabraňuje

Množství *Hamp* bylo statisticky významně sníženo ve skupině, která dostávala samotný EPO. Nicméně ve skupině, která dostávala kombinaci obou látek – železo a EPO, množství *Hamp* nebylo signifikantně sníženo. Rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou, která dostávala samotné železo, nedosáhl statistické významnosti. Byl však statisticky významný rozdíl mezi touto skupinou a skupinou, která dostávala kombinaci obou látek (obr. 11).

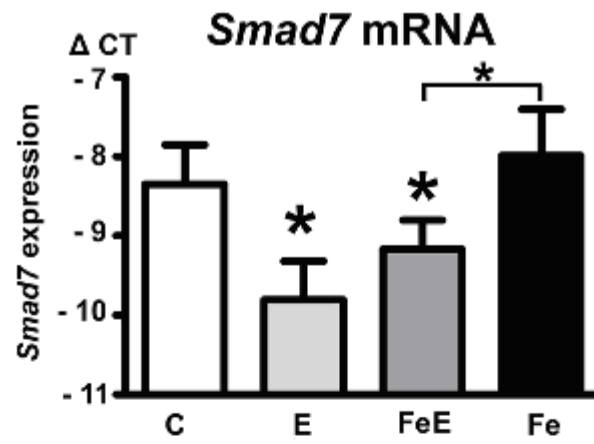
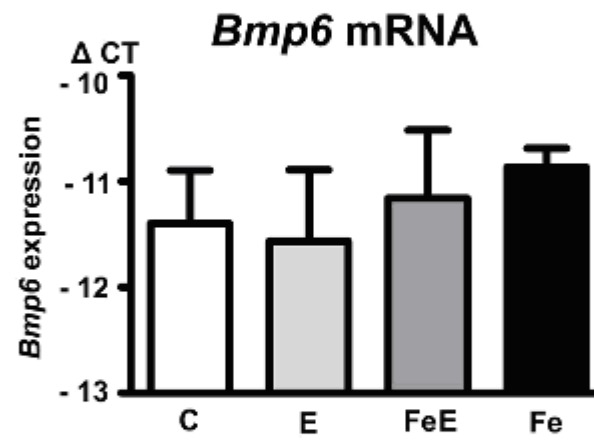
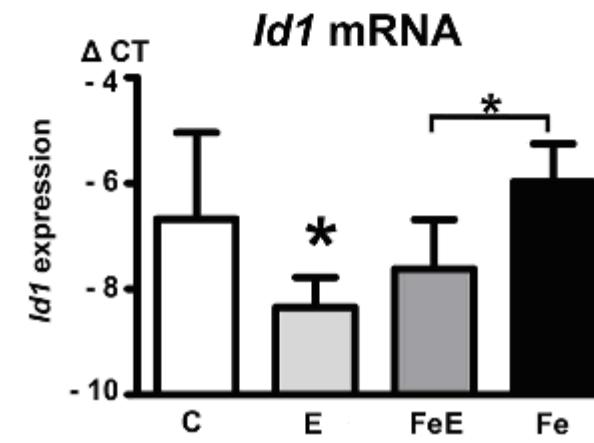


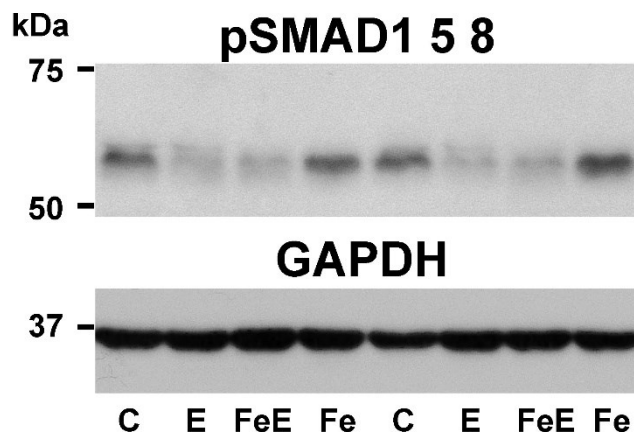
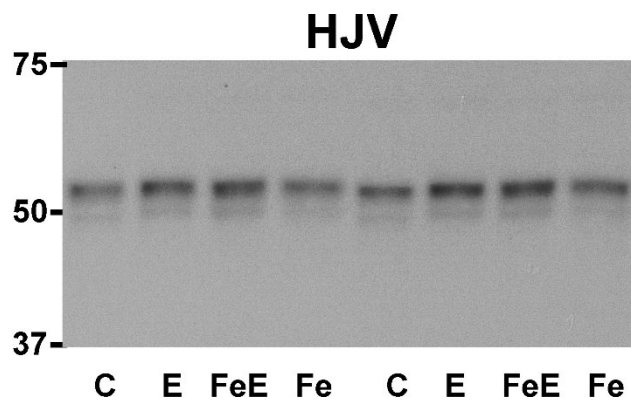
Obr. 11 Změny exprese *Hamp* po aplikaci EPO (E), jeho kombinaci s železem (FeE) a samotného železa (Fe) ve srovnání s kontrolami (C). Vyjádřeno jako průměr ± SD pro Δ CT (rozdíl CT pro referenční gen *Actb* a CT cílového genu).

*) statisticky signifikantní rozdíl ($p < 0,05$; $n = 6$)

4.2.3.2 Podání EPO snižuje expresi *Smad7* a *Id1* v játrech na úrovni mRNA i množství proteinu pSMADs, ale nemění expresi *Bmp6* a množství proteinu HJV

Expresce cílových genů regulační dráhy BMP/ SMAD *Smad7* a *Id1* statisticky významně klesla ve skupině, která dostávala samotný EPO, a v případě *Smad7* po podání EPO v kombinaci se železem. U této skupiny byla významně snížena exprese obou genů *Smad7* a *Id1* ve srovnání se skupinou, která dostávala samotné železo (obr. 12A,C). Expresce *Bmp6* však nebyla statisticky změněna v žádné skupině (obr. 12B). Množství fosforylovaných SMAD 1,5,8 bylo stanoveno na úrovni proteinů v jaterním homogenátu. U skupiny potkanů, která dostávala samotný EPO a jeho kombinací s železem, došlo k statisticky významnému poklesu pSMAD 1,5,8 ve srovnání jak s kontrolní, tak i se skupinou, která dostávala samotné železo (obr. 12D), což korespondovalo s výsledky RT-PCR. Množství proteinu HJV se nezměnilo (obr. 12E).

A**B****C**

D**E**

Obr. 12 Změny exprese *Smad7* (A), *Bmp6* (B), *Id1* (C) a množství proteinu pSMAD 1,5,8 (D) a HJV (E) po aplikaci EPO (E), železa a EPO (FeE) a samotného železa (Fe) ve srovnání s kontrolami (C). Expres vyjádřeny jako průměr \pm SD pro Δ CT (rozdíl CT pro referenční gen *Actb* a CT cílového genu). Jako kontrola nanášení byl použit protein GAPDH.

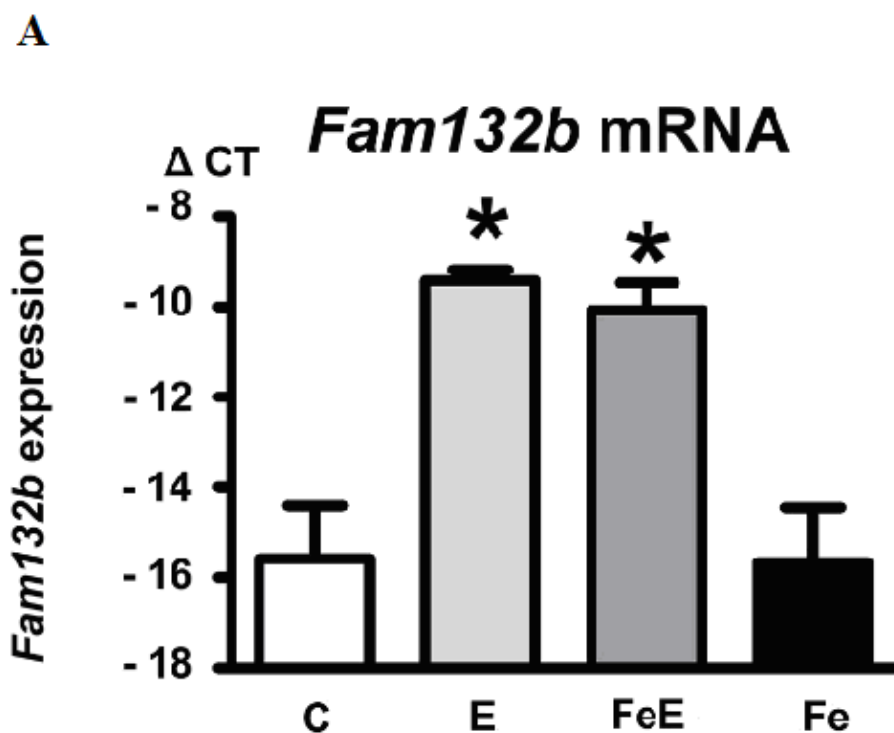
*) statisticky signifikantní rozdíl ($p < 0,05$; $n = 6$)

4.2.4 Exprese a množství proteinů regulačních genů pro erytroferron a matriptázu-2

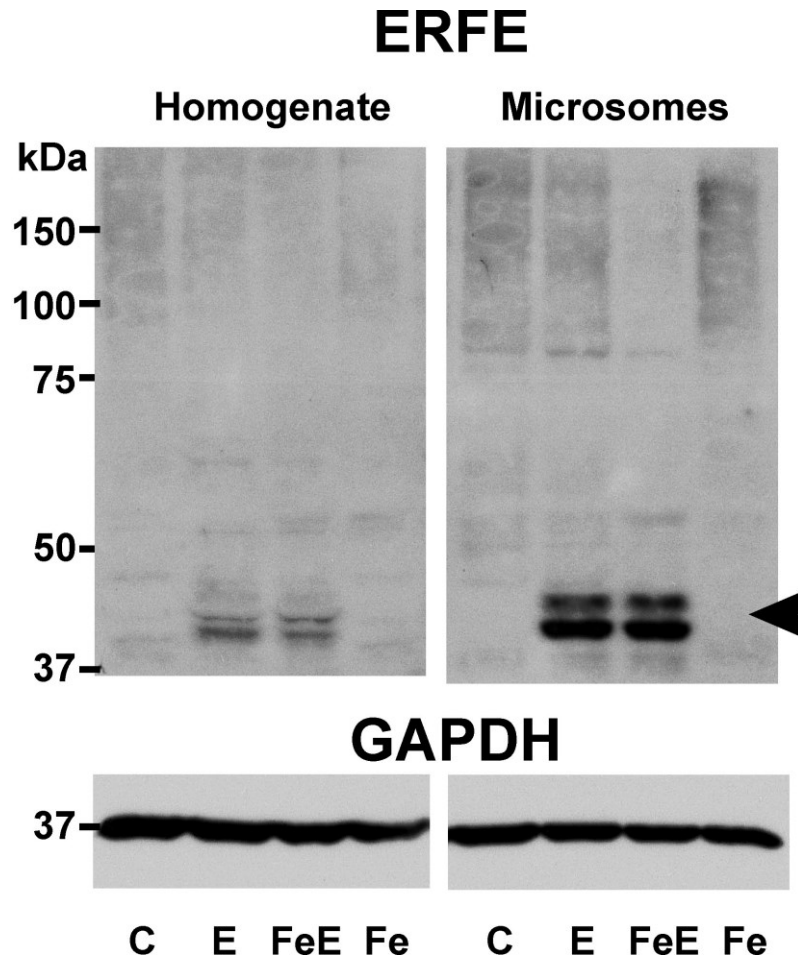
4.2.4.1 Podávání EPO zvyšuje expresi *Fam132b* na úrovni mRNA i na úrovni proteinu ERFE ve slezině bez ohledu na předchozí podání železa

Podávání samotného EPO a v kombinaci se železem statisticky významně zvýšilo expresi *Fam132b* na úrovni mRNA i proteinu (obr. 13).

Na imunoblotech nebyly zjištěny žádné proužky, odpovídající proteinu ERFE ani v kontrolní skupině, ani ve skupině, která dostávala železo; proužky proteinu ERFE byly přítomny jen ve skupinách, které dostávaly EPO, a to buď samotné, nebo v kombinaci se železem. Tyto výsledky korespondovaly s nálezem genové exprese pomocí RT-PCR. ERFE byl imunobloty stanoven ve slezině jak v homogenátu, tak na úrovni mikrosomů. Detekce proteinových proužků, odpovídajících ERFE, byla zřetelnější na úrovni mikrosomů.



B

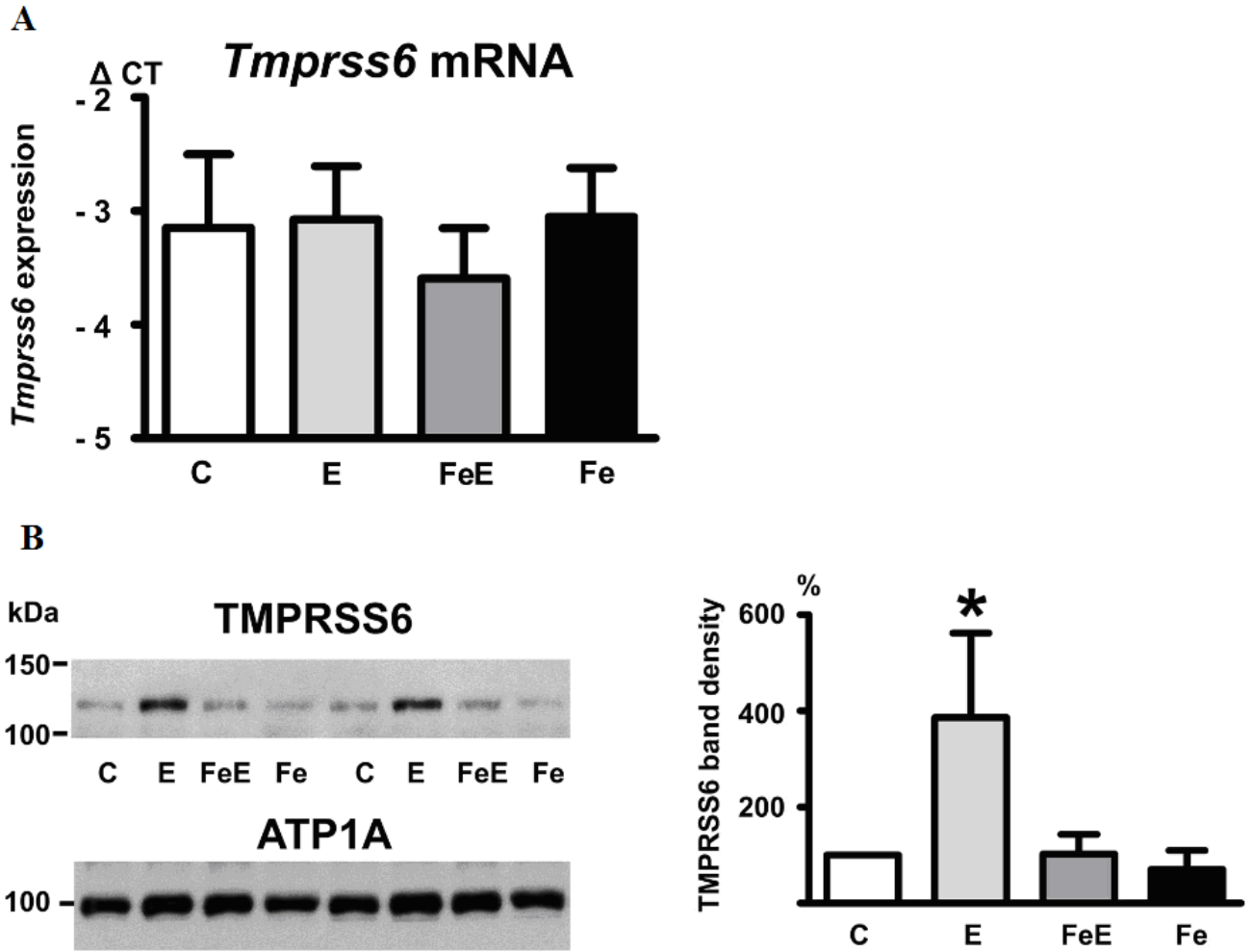


Obr. 13 Změny exprese *Fam132b* na úrovni mRNA (A) a na úrovni proteinu ERFE (B) po aplikaci erythropoetinu (E), jeho kombinaci se železem (FeE) a samotného železa (Fe) ve srovnání s kontrolami (C). Šipka (B) označuje specifický proužek proteinu ERFE. Expres vyjádřeny jako průměr ± SD pro Δ CT (rozdíl CT pro referenční gen *Actb* a CT cílového genu). Jako kontrola nanášení byl použit protein GAPDH.

*) statisticky signifikantní rozdíl ($p < 0,05$; $n = 4$)

4.2.4.2 Podání EPO nemění expresi *Tmprss6* na úrovni mRNA, ale zvýší množství proteinu *TMPRSS6*, přičemž podání železa toto zvýšení potlačuje

Expres *Tmprss6* v játrech nebyla na úrovni mRNA ovlivněna podáním EPO, železa ani jejich kombinací (obr. 14A). Nicméně množství proteinů *TMPRSS6* ve skupině, která dostávala samotný EPO, bylo statisticky významně zvýšené. Podání samotného železa množství proteinu *TMPRSS6* nezměnilo, ale zcela potlačilo jeho vzestup navozený EPO (obr. 14B).



Obr. 14 Změny exprese *Tmprss6* na úrovni mRNA (**A**) a na úrovni proteinu TMPRSS6 (**B**, vyjádřený denzitometrií) po aplikaci EPO (E), jeho kombinaci se železem (FeE) a samotného železa (Fe) ve srovnání s kontrolami (C). Expresse vyjádřeny jako průměr ± SD pro Δ CT (rozdíl CT pro referenční gen *Actb* a CT cílového genu). Jako kontrola nanášení byl použit protein ATP1A.

*) statisticky signifikantní rozdíl ($p < 0,05$; $n = 6$)

5. DISKUSE

Regulace metabolismu železa je důležitý proces, který umožňuje získat a distribuovat v organismu přiměřené množství železa a zároveň ho chránit před jeho toxicitou. Význam přesnosti této regulace je o to větší, že organismus nemá schopnost železo vylučovat. Klíčovým regulátorem – hormonem je hepcidin, peptid tvořený v játrech, který inhibuje výstup železa z buněk, čímž snižuje vstřebávání železa ve střevě i jeho recyklaci v makrofázích (Nicolas et al., 2001). Signální dráhy, které řídí expresi hepcidinu, jsou nadbytek či nedostatek železa, zánět a erythropoéza. Jejich prostřednictvím a vzájemnou interakcí jsou exprese hepcidinu a následně metabolismus železa ovlivněny mnoha fyziologickými i patologickými faktory (Muckenthaler et al. 2017).

Kvantitativně nejvýznamnější využití železa v organismu je erythropoéza, která navíc musí být schopna poměrně rychlé reakce (např. při velkém krvácení), a proto i regulace a aktivace této signální dráhy musí být rovněž dostatečně rychlá a citlivá. Existence erytroidního regulátoru, stejně jako regulátoru „zásobního“ (angl. *store*), byla postulována v 90. letech (Finch, 1994), kdy v podstatě žádná z regulačních molekul nebyla dosud známa. Tyto regulační dráhy, resp. jejich části, jsou však v organismu určitým způsobem navzájem propojeny, a proto metabolismus železa je výsledkem řady fyziologických dějů a nemocí.

V předložené práci jsem se zabývala studiem erytroidní regulační dráhy, zejména nových regulátorů exprese hepcidinu, a to matriptázy-2 a erytroferronu, a jejich propojení s dalšími regulačními dráhami, zejm. obsahem železa a s ním spojenou a poměrně dobře popsanou drahou BMP/ SMAD, která zřejmě tvoří centrální regulační dráhu transkripce hepcidinu. Vzájemné propojení obou regulátorů a jejich hierarchie je jednou z důležitých otázek regulace metabolismu železa je intenzivně studována v různých experimentálních systémech a má význam i klinický, např. u talasémie (Wang and Babitt, 2019), kde se kombinuje přetížení železem i výrazná erythropoetická stimulace. V našich experimentech jsme využívali kombinace stimulace erythropoézy erythropoetinem v kombinaci s podáváním železa experimentálním zvířatům (myším a potkanům).

Erythropoéza výrazně snižuje expresi hepcidinu (Nicolas et al., 2002c), v našich experimentech jsme používali klasicky 4denní podávání 50 U EPO na myš (Vokurka et al., 2006). Mechanismy této regulace nejsou dosud jednoznačně probádány, z našich pokusů i

z pokusů dalších skupin (Pak et al., 2006) vyplývá, že nejde o přímý účinek EPO. V zásadě mohou být ve hře dva mechanismy: specifická erytroidní regulace nebo sekundární regulace přes ovlivnění metabolismu železa – stimulace erythropoézy snižuje obsah železa v plazmě (saturaci transferinu) i v játrech (obsah nehemového železa) a železo se přesouvá do kostní dřeně, jak bylo prokázáno i v našich experimentech. Při podání EPO musíme mít proto na zřeteli i jím navozené změny v metabolismu železa způsobené zvýšeným využitím železa v erythropoéze, které je patrné poklesem jeho množství v plazmě i v játrech, což samo o sobě ovlivňuje regulační dráhy (Diaz et al., 2013). Vyloučena není ani kombinace obou faktorů a určitá odlišnost jejich uplatnění v závislosti na typu stimulace erythropoézy v experimentu či v klinických situacích.

V roce 2008 byl zcela nečekaně popsán nový protein, který se významně podílí na regulaci exprese hepcidinu. Zatímco dosud popsané proteiny regulující jeho expresi jsou pozitivními regulátory a jejich mutace vede k nedostatku hepcidinu a hemochromatóze, matriptáza-2 je negativním regulátorem a její mutace způsobuje nadprodukcí hepcidinu a anémii. Je to transmembránová serinová proteáza typu II kódovaná u lidí genem *TMPRSS6* (u myši *Tmprss6*) a exprimovaná v játrech dominantně v hepatocytech (Finberg et al., 2008). Představuje výrazný negativní regulátor exprese hepcidinu, což by z ní mohlo tvořit klíčové místo, na kterém by se regulace pomocí jednotlivých drah mohly setkávat.

Zásadním poznatkem ve studiu funkce matriptázy-2 bylo zjištění, že myši s mutací genu *Tmprss6* nereagují na aplikaci EPO (Nicolas et al., 2011). Zatímco EPO snižuje expresi hepcidinu nejen ve *wild type* myších, ale i u myši s mutacemi dalších proteinů v regulační dráze železem, tj. *HJV -/-* (Kautz et al. 2014b; Krijt et al., 2010a) a *BMP6 -/-* (Frydlova et al., 2016; Nai et al., 2016), není tomu tak u myši s mutací matriptázy-2 (*Tmprss6 -/-*) (Lehmborg et al., 2012; Nai et al., 2016). Významné je rovněž pozorování, že podání EPO u těchto myši nezlepšilo anémii (Lee et al., 2012; Nicolas et al., 2011). To nastolilo otázku, do jaké míry a jakým způsobem je MT-2 zapojena do erytroidní regulace hepcidinu.

Regulace MT-2, zejména na proteinové úrovni, nebyly dostatečně prostudovány. Nedostatek železa neměnil množství mRNA pro MT-2, nicméně na úrovni proteinu byla MT-2 stabilizována (Zhang et al., 2011; Zhao et al., 2015), což vedlo k předpokladu, že regulace MT-2 se odehrává na posttranskripční úrovni. V naší laboratoři byla vyvinutá technika, umožňující získat vzorky obohacené buněčnými membránami jater experimentálních zvířat, pomáhající studovat MT-2 a hemojuvelin na úrovni proteinu.

Podání EPO po dobu 4 dnů nezměnilo v našich experimentech expresi MT-2 na úrovni mRNA, a to ani u myši, ani u potkana, podobně jako ho nezměnila ani nízkoželezná dieta, což bylo již v literatuře popsáno (Zhang et al., 2011). Naopak jsme u obou stimulů pozorovali výrazný vzestup proteinu MT-2. Zvýšení MT-2 na úrovni proteinu po aplikaci nízkoželezné diety u potkana již sice bylo popsáno na základě experimentu s nekomerční protilátkou, naše práce však identifikovaly spolehlivou komerčně dostupnou protilátku, která je schopna detekovat MT-2 u potkanů i myši. Podávání vysokých dávek železa ve formě dextranu naopak snížilo množství MT-2, a to jak do 24 hodin při vysoké dávce, tak toto snížení bylo patrné i po týdnu i při podání dávek nižších. Předpokládáme proto v souladu s dalšími pozorováními, že EPO neovlivňuje expresi MT-2 na transkripční úrovni, ale že tato regulace se děje až na úrovni posttranskripční. Jednorázové podání EPO potkanům však množství proteinu MT-2 nezvýšilo, ačkoliv již došlo k poklesu exprese hepcidinu. V této fázi nebyl snížen ani obsah jaterního železa.

Z uvedených výsledků je pravděpodobné, že MT-2 se podílí na erytroidní regulaci (poklesu) hepcidinu, což by bylo v souladu s pozorováním, že *Tmprss6* ^{-/-} myši na EPO nedokážou adekvátně zareagovat.

Dostupnost spolehlivé metody pro stanovení s MT-2 nás vedly k úvaze, jak se MT-2 zapojuje do hierarchie regulace hepcidinu při současném působení železa a EPO. Jde o dva stimuly s opačným účinkem na expresi hepcidinu, proto je zásadní otázkou, který regulátor je silnější. V experimentech na myších v naší laboratoři bylo prokázáno, že předchozí podání velkých dávek železa je schopno zablokovat silný pokles hepcidinu po podání EPO (Krijt et al., 2010b). Naplánovali jsme proto novou sérii pokusů, tentokrát na potkanech, u nichž byla reakce proteinu MT-2 v našich minulých pokusech výraznější. Cílem bylo potvrdit, zdali i u potkanů předchozí podání železa rovněž zabrání poklesu exprese hepcidinu a zejména to, jak tato kombinace ovlivní expresi MT-2 a co z toho vyplývá pro obecnou regulaci hepcidinu.

V roce 2014 byl objeven nový erytroidní regulátor hepcidinu – erytroferron (Kautz et al., 2014b), což nás vedlo i ke studiu jeho možného vzájemného propojení s MT-2 v erytroidní regulaci hepcidinu. ERFE, kódovaný genem *Fam132b*, byl navržen jako erytroidní regulátor tvořený erytroblasty, který nevyjasněným způsobem výrazně snižuje expresi hepcidinu. Myši ERFE ^{-/-}, podobně jako myši s deficitem MT-2, nejsou schopny snížit expresi hepcidinu po erytroidní stimulaci.

MT-2 byla stanovena v játrech a ERFE, který je tvořen erytroblasty, ve slezině, kde rovněž stoupá po EPO podobně jako v kostní dřeni (Nai et al., 2016) a která je u hlodavců významným místem erythropoézy, a to zejména stresové. Testováním protilátek se v naší laboratoři a v laboratoři dr. Truksy z Biotechnologického ústavu Akademie věd ČR podařilo najít specifickou a citlivou protilátku, která tak umožnila stanovení ERFE jako proteinu v imunoblotech a prokázat, že množství ERFE proteinu a exprese na úrovni mRNA koreluje. Dosud byl ERFE stanoven pouze v séru ELISA metodou (Kautz et al., 2015), přičemž po podání EPO byl prokázán jeho vzestup, naše práce potvrdila vzestup ERFE metodou imunoblotu a kromě toho prokázala, že protein se *in vivo* vyskytuje ve dvou formách, které se liší glykosylací.

Podání EPO v našich experimentech zvýšilo expresi ERFE, podání železa ji však neovlivnilo, a to ani samostatně, ani v kombinaci s EPO, který nedokázal ovlivnit (snížit) jeho zvýšenou expresi. Na druhou stranu je exprese hepcidinu při předchozím podání železa a EPO signifikantně nižší než při podání samotného železa. To znamená, že ačkoliv v našem uspořádání předchozí podání železa utlumí výrazný pokles exprese hepcidinu, erytroidní stimulace dokáže částečně expresi hepcidinu ovlivnit.

Protože podání železa tlumí snížení exprese hepcidinu navozené podáním EPO, aniž však ve stejné kombinaci sníží výrazně zvýšenou expresi ERFE, dá se předpokládat, že železo nějakým způsobem interferuje nikoliv přímo s produkcí ERFE, nýbrž s jeho signalizací či dalšími zapojenými mechanismy.

Signalizační dráha ERFE, resp. mechanismus jeho působení, nebyly známy, zkoumali jsme tedy vztah ERFE a hlavní signální dráhy BMP/ SMAD. Aktivitu této dráhy lze stanovit detekcí fosforylovaných SMAD proteinů (SMAD 1,5,8) či expresí na úrovni mRNA jiných cílových genů této dráhy, a to *Id1* či *Smad7*. EPO výrazně snižuje tyto cílové geny, přičemž u ERFE *-/-* myší je tento pokles méně výrazný. Tento na ERFE nezávislý pokles může do jisté míry vyplývat i ze změn metabolismu železa navozeného stimulovanou erythropoézou, který se uplatňuje přes BMP proteiny (Arezes et al., 2018). Podávání EPO po dobu čtyř dnů v našem experimentu na potkanech snížilo jak fosforylované SMAD, tak expresi *Id1* a *Smad7*, a to i při předchozím podávání železa, které tento pokles nedokázalo zvrátit. Expese vlastního BMP6 na úrovni mRNA nebyla signifikantně změněna při žádné z aplikací. Tyto výsledky byly odlišné od popsanych v literatuře (Nai et al., 2016), kde však byly jiné intervaly podávané dávky a intervaly EPO (byla podána pouze jedna dávka 200 U a analýza byla provedena za 15 hodin).

Z našich výsledků vyplývá, že zvýšené množství proteinů ERFE i snížené množství fosforylovaných SMAD proteinů nedokážou v případě předchozího podání železa dostatečně snížit expresi hepcidinu. Expresce hepcidinu zůstává vysoká (normální) i v přítomnosti vysokého množství ERFE v plazmě. Předchozí podání železa přitom zabraňuje zvýšení množství MT-2, což by mohlo být molekulární příčinou toho, že expresce hepcidinu není snižena, a to i při současné výrazné erytroidní stimulaci.

Literární údaje týkající se zapojení MT-2 do ERFE signalizace nejsou jednoznačné. Krátce po objevení ERFE byla navržena atraktivní hypotéza, která předpokládala, že MT-2 by svojí proteolytickou aktivitou umožňovala fungování ERFE (Willemetz et al., 2014). To by elegantně vysvětlovalo, proč jak inaktivace genu pro MT-2 (*Tmprss6*), tak i inaktivace genu pro ERFE (*Fam132b*) ruší odpověď hepcidinu na EPO. Tento předpoklad však zřejmě neplatí, neboť později bylo prokázáno, že v buněčné kultuře Huh7 po vyřazení MT-2 byl ERFE stále schopen potlačovat expresi hepcidinu stejně jako u buněk kontrolních (Arezes et al., 2018). Ve světle nových poznatků je velmi pravděpodobné, že proteolytická aktivita matriptázy-2 expresi ERFE neovlivňuje – recentní práce v naší laboratoři totiž prokázaly, že ERFE detekovaný ve slezině *mask* myši s mutací *Tmprss6* se velikostí ani glykosylací výrazně neliší od ERFE *wild-type* myši (Frydlova et al., 2017); pokud by se MT-2 na posttranslačním zpracování ERFE podílela, měl by rozdíl mezi erytroferonem *mask* myši a *wild-type* myši patrný na imunoblotu.

Další otázkou je, jakým mechanismem MT-2 expresi hepcidinu ovlivňuje a co je substrátem jejího proteolytického působení.

BMP signalizace je zahájena vazbou příslušných proteinů na jejich receptory, a to typu I (ALK2, ALK3) a typu II (ActRIIA a Bmpr2), což následně vede k fosforylaci SMAD proteinů. Tento proces je facilitován dalšími membránovými molekulami, a to HJV, HFE a Tfr2, jejichž mutace jsou spojeny s různě těžkými formami hereditární hemochromatózy (Brissot et al. 2017). Jedna z hypotéz vysvětluje účinek MT-2 štěpením hemojuvelinu (Silvestri et al., 2008). HJV je naprosto nezbytný pro expresi hepcidinu, což je známo i z klinických případů tzv. juvenilní hemochromatózy, kdy postižení mají závažné a brzké přetížení železem (Papanikolaou et al., 2004). Hemochromatóza způsobená mutací *HJV* je klinicky stejně těžká jako hemochromatóza způsobená mutací samotného hepcidinu, což svědčí o klíčové roli hemojuvelinu v regulaci hepcidinu. Není proto překvapivé, že krátce po objevu MT-2 bylo na základě *in vitro* pokusů

postulováno, že fyziologickým substrátem pro MT-2 je hemojuvelin, a tento pohled byl až donedávna všeobecně přijímán.

V našich experimentech v roce 2011 bylo ukázáno, že *Tmprss6* *-/-* myši mají nižší, spíše než očekávané vyšší množství HJV (Krijt et al., 2011), toto pozorování bylo později potvrzeno i u geneticky poněkud odlišných *mask* myší, u nichž je mutována proteolytická doména MT-2 (Frydlova et al., 2013). Další práce prokázaly, že HJV *-/-* myši mají stále zachovaný poměrně robustní mechanismus k snížení exprese hepcidinu při snížení množství železa v těle (Gkouvatsos et al., 2014). Recentní studie se zabývaly i vztahem MT-2 k dalším složkám BMP-regulační dráhy a došly k závěru, že MT-2 pravděpodobně snižuje hepcidin štěpením a inaktivací více složek cesty, která indukuje expresi hepcidinu, a to převážně přímo receptorů pro BMPs a částečně též HFE, a méně HJV a TfR2 (Mao et al., 2018; Wahedi et al., 2017). *In vivo* pokusy prokázaly, že zvýšená exprese MT-2 dokázala snížit expresi hepcidinu u HJV *-/-* myší; naopak zvýšená exprese HJV nezpůsobila zvýšení exprese hepcidinu – obě pozorování svědčí spíše proti předpokladu štěpení hemojuvelinu matriptázou-2. Jako zajímavé se jeví pozorování těchto autorů, že holotransferin zabránil MT-2 ve štěpení TfR2, což naznačuje značnou komplexnost regulačních dějů. BMP6 jako takový přitom nemá na proteolytickou aktivitu MT-2 žádný efekt. Jako jeden z důvodů, proč se rozhodli kriticky přezkoumat roli hemojuvelinu jako substrátu pro MT-2, uvádějí autoři (Wahedi et al. 2017) i pozorování prezentovaná v této disertaci a publikovaná (Gurieva et al., 2017).

Dalším proteinem, který zásadně zasahuje do regulace exprese hepcidinu, je ERFE. Původně byl popsán jako protein snižující expresi hepcidinu při stresové erytropoéze (Kautz et al., 2014b), postupně se však na ERFE začalo nahlížet jako na nejvýznamnější faktor spojující metabolismus železa a aktivovanou erytropoézu (Ganz, 2019).

Klíčová role ERFE jako erytroidního impulsu snižujícího expresi hepcidinu po podání EPO či flebotomiích (tj. při stresové erytropoéze) je zřejmá. Na druhou stranu však myši s chyběním ERFE mají stejnou bazální expresi hepcidinu. To znamená, že ERFE není nezbytný pro udržení základního přísunu železa k erytroblastům v normální erytropoéze, ale může být klíčový v situacích stresové erytropoézy, což může být např. situace po krvácení, kdy je nutné urychlit dodání železa do kostní dřeně. Bylo popsáno, že myši ERFE *-/-* po flebotomii nedokážou efektivně snížit expresi hepcidinu a vykazují opožděné zotavení z této krevní ztráty (Kautz et al.,

2014b). Existence takového „urychlujícího“ regulátoru by tudíž měla i evoluční smysl. Heparin klesá po opakovaném podání EPO i u myši s vyřazeným ERFE (Coffey et al., 2018).

Novější poznatky v literatuře popisují mechanismus působení ERFE, který by mohl zasahovat do dráhy BMP/ SMAD. ERFE snížil fosforylaci SMAD proteinů, přičemž však nejde o přímé působení na (ne)známý receptor, nýbrž bylo popsáno, že ERFE váže solubilní cytokiny BMP5, BMP6 a BMP7, čímž zabraňuje aktivaci klasické stimulační dráhy pro expresi hepcidinu (Arezes et al., 2018). Nicméně není schopen vázat BMP2, který rovněž stimuluje expresi hepcidinu, což by mohlo vysvětlovat, že ERFE není schopen hepcidin zcela potlačit. EPO přitom neovlivňuje expresi BMP2 u myši a je schopen potlačit expresi hepcidinu i u myši *Bmp2* *-/-*, podobně jako zánět a železo jsou jí schopni naopak zvýšit, i když tato reakce je oslabena (Wang et al., 2019), což svědčí o částečně redundantní roli BMP2, která ovšem může odpovídat za část pozorovaných změn.

Některé dosud protichůdné výsledky v literatuře mohou mít různé důvody. Jednak některé experimenty jsou prováděny *in vitro* na buňkách (např. na HuH7 nádorových hepatocytárních liniích), které však mohou mít změněné vlastnosti od nenádorových buněk, navíc v rámci celého organismu (*in vivo* pokusy na myších či potkanech). Na druhou stranu i jednotlivé myší kmeny, potažmo pohlaví, mohou být zodpovědné za některé rozdíly. Nevýznamné není ani uspořádání pokusů – tj. dávky a intervaly podávání příslušných stimulů (např. EPO), což může navodit i paralelní změny v jiných systémech než sledovaných drahách (např. v obsahu železa, saturaci transferinu, dynamice erythropoézy). Bylo prokázáno, že je odlišná regulace na akutní a chronické změny v množství železa, kdy akutní změny působí především zvýšením saturace transferinu a působí nezávisle na regulaci exprese hepcidinu (Corradini et al., 2011; Ramos et al., 2011) a na formě podání železa – perorální vs. parenterální (Wang et al., 2019). V neposlední řadě nelze vyloučit, že stále nejsou známy všechny molekulární faktory, které jsou na regulaci metabolismu železa zúčastněny. Přestože bylo v posledních letech objasněno mnoho z regulace metabolismu železa, dosud zůstává řada věcí, které nejsou zcela vyjasněny (Ganz, 2019).

Přestože současná data naší skupiny ani data literární nedokážou vytvořit jednoznačný model erytroidní regulace exprese hepcidinu, pokusím se o shrnutí poznatků a jejich možné vysvětlení.

Podání EPO nedokáže rychle snížit expresi hepcidinu u ERFE *-/-* myši, protože chybí prvotní stimul („upstream“ faktor) této regulace, erytoferron. Naopak chybění TfR2,

hemojuvelinu ani BMP6 tomuto snížení exprese hepcidinu nezabrání. Dalším faktorem, který zabraňuje poklesu hepcidinu po EPO, je chybění matripázy-2; podobnou roli pak hraje MT-2 v případě, že bylo předem podáno vysoké množství železa, které zabránilo jejímu vzestupu. Nicméně u jednorázového podání EPO hepcidin klesá i bez zvýšení MT-2 a beze změny obsahu železa v játrech. To by nasvědčovalo tomu, že MT-2 může mít roli i v dlouhodobější erytroidní regulaci hepcidinu a může být místem či jedním z míst, kde se erytroidní i zásobní regulační systém setkávají.

Při stimulované (stresové) erytropoéze podáním EPO se totiž výrazně stimuluje ERFE, ale zároveň se mění metabolismus železa, což je patrné na ovlivnění klíčové dráhy BMP/ SMAD, která je v tomto případě rovněž inhibována. Také je patrné, že hepcidin po delší stimulaci může klesat i bez přítomnosti ERFE (Coffey et al., 2018) a naopak při krátké stimulaci bez zvýšení MT-2. Podle novějších poznatků a hypotéz se na rychlé supresi hepcidinu po erytroidní stimulaci podílí vazba ERFE na solubilní BMP6 (též 5 a 7, ale nikoliv 2). Při delší stimulaci podávaným EPO je MT-2 zároveň na proteinové úrovni zvýšena. Tyto faktory působí výrazné snížení exprese hepcidinu. Nicméně je patrné, že regulace se částečně může lišit při krátkodobé a dlouhodobé stimulaci erytropoézy, což z biologického hlediska (např. zvládnutí závažnějšího krvácení) může dávat smysl.

Pokud je však před stimulací erytropoézy EPO podáno velké množství železa (což může do jisté míry sloužit jako model čistě erytroidní regulace), produkce ERFE sice zůstává zvýšena a produkty stimulace dráhy BMP/ SMAD (*Id1*, *Smad7*) jsou rovněž sníženy, takže jediným rozdílem, který by vysvětloval, že exprese hepcidinu není v této situaci tak výrazně snížena, je MT-2, jejíž množství se na rozdíl od samotného podání EPO nezvyšuje. Velké množství železa pravděpodobně brání neznámým způsobem zvýšení MT-2 vyvolané podáním samotného EPO a hepcidin není proto suprimován. Svědčí pro to i fakt, že myši MT2^{-/-} po podání EPO hepcidin nesnižují. Není zcela zřejmé, jakým způsobem EPO a Fe/ EPO na MT-2 působí; je pouze zřejmé, že nejde o úroveň transkripční, nýbrž posttranskripční.

O matriptáze-2 zřejmě platí, že působí snížení exprese hepcidinu inaktivací (štěpením) více faktorů aktivační dráhy BMP/ SMAD. Teoreticky mohou být jejími substráty HJV, proteiny BMP nebo jejich receptory, případně další proteiny jako HFE nebo např. Tfr2, přičemž do tohoto procesu ještě zasahuje diferický transferin, který jeho štěpení tlumí. Objasnění role MT-2 v regulaci hepcidinu proto v první řadě vyžaduje jednoznačnou identifikaci jejího substrátu; na

tomto výzkumu naše laboratoř ve spolupráci s laboratoří Mgr. Jaroslava Truksy, Ph.D z Biotechnologického ústavu AV ČR BIOCEV intenzivně pracuje.

Naše pokusy ukázaly, že exprese hepcidinu je při současném podání železa a EPO signifikantně nižší než při podání samotného železa. To znamená, že ačkoliv v našem uspořádání předchozí podání železa utlumí výrazný pokles exprese hepcidinu, přesto erytroidní stimulus dokáže částečně expresi hepcidinu ovlivnit. Mohlo by to svědčit pro fakt, že část poklesu hepcidinu při erytroidní stimulaci nemusí záviset jen na MT-2, resp. může být její funkce určitým způsobem obejita.

To může být v souladu s naším pozorováním, že přes podání Fe/ EPO jsou fosforylované proteiny SMAD sníženy, stejně jako *Id1* a *Smad7*, a hepcidin nikoliv, to znamená, že existuje ona kolaterální cesta, kterou se erytroidní stimulus uplatňuje, a tou by mohla být akutní změna saturace transferinu při vystupňované erytropoéze i při nadbytku zásobního železa (například zvýšené štěpení TfR2 při poklesu holotransferinu či dosud neznámý mechanismus). Vliv akutních změn metabolismu železa a saturace transferinu jsme předpokládali i v našich starších pracích (Vokurka et al., 2006).

Otázka hierarchie regulačních faktorů hepcidinu a zejména jejich vzájemného propojení, není dosud jednoznačně vyřešena. Kromě genově upravených zvířat je jednou z metod výzkumu pečlivá patofyziologická analýza jednotlivých podnětů, jejich kvantita, časové uspořádání a dynamika výsledků na molekulární (mRNA či proteinové) úrovni i na úrovni fenotypické (množství hemoglobinu, aktivace kostní dřeně, množství zásobního železa, saturace transferinu apod.). Časový faktor se může jevit jako významný a může odpovídat různým biologickým situacím (Artuso et al., 2019). V tomto směru pokračuje i výzkum nejen v naší laboratoři.

6. ZÁVĚRY

- Matriptáza-2 reaguje na železo a na erythropoetin na úrovni proteinu, nikoliv na úrovni mRNA.
- Efekt na matriptázu-2 je výraznější u potkanů než u myší.
- Podání vysoké dávky železa u potkanů před erytroidní stimulací podáním erythropoetinu
 - zabraňuje, stejně jako u myší, dramatickému poklesu exprese hepcidinu; nicméně i přes toto přetížení železem je erytroidní stimulace schopna aspoň částečného snížení exprese hepcidinu, což svědčí o silné erytroidní regulaci
 - nesnižuje produkci erytroferronu, nemění aktivaci dráhy BMP/ SMAD, ale naopak tlumí vzestup proteinu matriptázy-2
- Matriptáza-2 je zřejmě zapojena do erytroidní regulace hepcidinu, ale zároveň může být místem, kde je erytroidní efekt na pokles exprese hepcidinu výrazně (ale nikoliv kompletně) blokován předchozím přetížením železem.
- Matriptáza-2 působí zřejmě štěpením a inaktivací více molekul signální dráhy BMP/ SMAD na snížení exprese hepcidinu.
- Erytroidní regulace hepcidinu je zřejmě výrazně ovlivněna i časovým průběhem dějů, tj. akutností či dlouhodobostí změn v erythropoéze včetně dalších navazujících změn v metabolismu železa a s dalšími faktory jako je zánět či hypoxie.

7. LITERATURA

1. ANDRIOPOULOS B, JR., CORRADINI E, XIA Y, FAASSE SA, CHEN S, GRGUREVIC L, KNUTSON MD, PIETRANGELO A, VUKICEVIC S, LIN HY, BABITT JL: BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet.* **41**: 482-487, 2009.
2. AREZES J, FOY N, MCHUGH K, SAWANT A, QUINKERT D, TERRAUBE V, BRINTH A, TAM M, LAVALLIE ER, TAYLOR S, ARMITAGE AE, PASRICHA SR, CUNNINGHAM O, LAMBERT M, DRAPER SJ, JASUJA R, DRAKESMITH H: Erythroferrone inhibits the induction of hepcidin by BMP6. *Blood.* **132**: 1473-1477, 2018.
3. ARMITAGE AE, EDDOWES LA, GILEADI U, COLE S, SPOTTISWOODE N, SELVAKUMAR TA, HO LP, TOWNSEND AR, DRAKESMITH H: Hepcidin regulation by innate immune and infectious stimuli. *Blood.* **118**: 4129-4139, 2011.
4. ARTUSO I, PETTINATO M, NAI A, PAGANI A, SARDO U, BILLORE B, LIDONNICI MR, BENNETT C, MANDELLI G, PASRICHA SR, FERRARI G, CAMASCHELLA C, KAUTZ L, SILVESTRI L: Transient decrease of serum iron after acute erythropoietin treatment contributes to hepcidin inhibition by ERFE in mice. *Haematologica.* **104**: e87-e90, 2019.
5. ASCHEMEYER S, GABAYAN V, GANZ T, NEMETH E, KAUTZ L: Erythroferrone and matriptase-2 independently regulate hepcidin expression. *Am J Hematol.* **92**: E61-E63, 2017.
6. BABITT JL, HUANG FW, WRIGHTING DM, XIA Y, SIDIS Y, SAMAD TA, CAMPAGNA JA, CHUNG RT, SCHNEYER AL, WOOLF CJ, ANDREWS NC, LIN HY: Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet.* **38**: 531-539, 2006.
7. BEKRI S, GUAL P, ANTY R, LUCIANI N, DAHMAN M, RAMESH B, IANNELLI A, STACCINI-MYX A, CASANOVA D, BEN AMOR I, SAINT-PAUL MC, HUET PM, SADOUL JL, GUGENHEIM J, SRAI SK, TRAN A, LE MARCHAND-BRUSTEL Y: Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology.* **131**: 788-796, 2006.
8. BRIDLE KR, FRAZER DM, WILKINS SJ, DIXON JL, PURDIE DM, CRAWFORD DH, SUBRAMANIAM VN, POWELL LW, ANDERSON GJ, RAMM GA: Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet.* **361**: 669-673, 2003.
9. BRISSOT P, CAVEY T, ROPERT M, GUGGENBUHL P, LOREAL O: Genetic hemochromatosis: Pathophysiology, diagnostic and therapeutic management. *Presse Med.* **46**: e288-e295, 2017.
10. CAMASCHELLA C, PAGANI A: Iron and erythropoiesis: a dual relationship. *Int J Hematol.* **93**: 21-26, 2011.
11. CANALI S, WANG CY, ZUMBRENNEN-BULLOUGH KB, BAYER A, BABITT JL: Bone morphogenetic protein 2 controls iron homeostasis in mice independent of Bmp6. *Am J Hematol.* **92**: 1204-1213, 2017.
12. CASANOVAS G, SWINKELS DW, ALTAMURA S, SCHWARZ K, LAARAKKERS CM, GROSS HJ, WIESNETH M, HEIMPEL H, MUCKENTHALER MU: Growth

- differentiation factor 15 in patients with congenital dyserythropoietic anaemia (CDA) type II. *J Mol Med (Berl)*. **89**: 811-816, 2011.
13. CASANOVAS G, VUJIC SPASIC M, CASU C, RIVELLA S, STRELAU J, UNSICKER K, MUCKENTHALER MU: The murine growth differentiation factor 15 is not essential for systemic iron homeostasis in phlebotomized mice. *Haematologica*. **98**: 444-447, 2012.
 14. CASTOLDI M, MUCKENTHALER MU: Regulation of iron homeostasis by microRNAs. *Cell Mol Life Sci*. **69**: 3945-3952, 2012.
 15. CASTOLDI M, VUJIC SPASIC M, ALTAMURA S, ELMEN J, LINDOW M, KISS J, STOLTE J, SPARLA R, D'ALESSANDRO LA, KLINGMULLER U, FLEMING RE, LONGERICH T, GRONE HJ, BENES V, KAUPPINEN S, HENTZE MW, MUCKENTHALER MU: The liver-specific microRNA miR-122 controls systemic iron homeostasis in mice. *J Clin Invest*. **121**: 1386-1396, 2011.
 16. COFFEY R, GANZ T: Iron homeostasis: An anthropocentric perspective. *J Biol Chem*. **292**: 12727-12734, 2017.
 17. COFFEY R, SARDO U, KAUTZ L, GABAYAN V, NEMETH E, GANZ T: Erythroferrone is not required for the glucoregulatory and hematologic effects of chronic erythropoietin treatment in mice. *Physiol Rep*. **6**: e13890, 2018.
 18. CORE AB, CANALI S, BABITT JL: Hemojuvelin and bone morphogenetic protein (BMP) signaling in iron homeostasis. *Front Pharmacol*. **5**: 104, 2014.
 19. CORRADINI E, ROZIER M, MEYNARD D, ODHIAMBO A, LIN HY, FENG Q, MIGAS MC, BRITTON RS, BABITT JL, FLEMING RE: Iron regulation of hepcidin despite attenuated Smad1,5,8 signaling in mice without transferrin receptor 2 or Hfe. *Gastroenterology*. **141**: 1907-1914, 2011.
 20. D'ANDREA AD, ZON LI: Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation. *J Clin Invest*. **86**: 681-687, 1990.
 21. DAHER R, KANNENGIESSER C, HOUAMEL D, LEFEBVRE T, BARDOU-JACQUET E, DUCROT N, DE KERGUENEC C, JOUANOLLE AM, ROBREAU AM, OUDIN C, LE GAC G, MOULOUEL B, LOUSTAUD-RATTI V, BEDOSSA P, VALLA D, GOUYA L, BEAUMONT C, BRISSOT P, PUY H, KARIM Z, TCHERNITCHKO D: Heterozygous Mutations in BMP6 Pro-peptide Lead to Inappropriate Hepcidin Synthesis and Moderate Iron Overload in Humans. *Gastroenterology*. **150**: 672-683 e674, 2016.
 22. DE MARIA R, TESTA U, LUCHETTI L, ZEUNER A, STASSI G, PELOSI E, RICCIONI R, FELLI N, SAMOGGIA P, PESCHLE C: Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood*. **93**: 796-803, 1999.
 23. DIAZ V, GAMMELLA E, RECALCATI S, SANTAMBROGIO P, NALDI AM, VOGEL J, GASSMANN M, CAIRO G: Liver iron modulates hepcidin expression during chronically elevated erythropoiesis in mice. *Hepatology*. **58**: 2122-2132, 2013.
 24. DU X, SHE E, GELBART T, TRUKSA J, LEE P, XIA Y, KHOVANANTH K, MUDD S, MANN N, MORESCO EM, BEUTLER E, BEUTLER B: The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. *Science*. **320**: 1088-1092, 2008.
 25. ERSLEV AJ, BESARAB A: Erythropoietin in the pathogenesis and treatment of the anemia of chronic renal failure. *Kidney Int*. **51**: 622-630, 1997.
 26. ERSLEV AJ, CARO J: Physiologic and molecular biology of erythropoietin. *Med Oncol Tumor Pharmacother*. **3**: 159-164, 1986.
 27. FEDER JN, GNIRKE A, THOMAS W, TSUCHIHASHI Z, RUDDY DA, BASAVA A, DORMISHIAN F, DOMINGO R, JR., ELLIS MC, FULLAN A, HINTON LM, JONES NL, KIMMEL BE, KRONMAL GS, LAUER P, LEE VK, LOEB DB, MAPA FA,

- MCCLELLAND E, MEYER NC, MINTIER GA, MOELLER N, MOORE T, MORIKANG E, PRASS CE, QUINTANA L, STARNES SM, SCHATZMAN RC, BRUNKE KJ, DRAYNA DT, RISCH NJ, BACON BR, WOLFF RK: A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet.* **13**: 399-408, 1996.
28. FINBERG KE, HEENEY MM, CAMPAGNA DR, AYDINOK Y, PEARSON HA, HARTMAN KR, MAYO MM, SAMUEL SM, STROUSE JJ, MARKIANOS K, ANDREWS NC, FLEMING MD: Mutations in *TMPRSS6* cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat Genet.* **40**: 569-571, 2008.
29. FINBERG KE, WHITTLESEY RL, FLEMING MD, ANDREWS NC: Down-regulation of Bmp/Smad signaling by *Tmprss6* is required for maintenance of systemic iron homeostasis. *Blood.* **115**: 3817-3826, 2010.
30. FINCH C: Regulators of iron balance in humans. *Blood.* **84**: 1697-1702, 1994.
31. FOLGUERAS AR, DE LARA FM, PENDAS AM, GARABAYA C, RODRIGUEZ F, ASTUDILLO A, BERNAL T, CABANILLAS R, LOPEZ-OTIN C, VELASCO G: Membrane-bound serine protease matriptase-2 (*Tmprss6*) is an essential regulator of iron homeostasis. *Blood.* **112**: 2539-2545, 2008.
32. FOREJTNIKOVA H, VIEILLEVOYE M, ZERMATI Y, LAMBERT M, PELLEGRINO RM, GUIHARD S, GAUDRY M, CAMASCHELLA C, LACOMBE C, ROETTO A, MAYEUX P, VERDIER F: Transferrin receptor 2 is a component of the erythropoietin receptor complex and is required for efficient erythropoiesis. *Blood.* **116**: 5357-5367, 2010.
33. FRAZER DM, WILKINS SJ, BECKER EM, VULPE CD, MCKIE AT, TRINDER D, ANDERSON GJ: Hepcidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology.* **123**: 835-844, 2002.
34. FRAZER DM, WILKINS SJ, DARSHAN D, BADRICK AC, MCLAREN GD, ANDERSON GJ: Stimulated erythropoiesis with secondary iron loading leads to a decrease in hepcidin despite an increase in bone morphogenetic protein 6 expression. *Br J Haematol.* **157**: 615-626, 2012.
35. FRYDLOVA J, FUJIKURA Y, VOKURKA M, NECAS E, KRIJT J: Decreased hemojuvelin protein levels in *mask* mice lacking matriptase-2-dependent proteolytic activity. *Physiol Res.* **62**: 405-411, 2013.
36. FRYDLOVA J, PRIKRYL P, TRUKSA J, FALKE LL, DU X, GURIEVA I, VOKURKA M, KRIJT J: Effect of Erythropoietin, Iron Deficiency and Iron Overload on Liver Matriptase-2 (*TMPRSS6*) Protein Content in Mice and Rats. *PLoS One.* **11**: e0148540, 2016.
37. FRYDLOVA J, ROGALSKY DW, TRUKSA J, TRAEGER L, STEINBICKER AU, VOKURKA M, KRIJT J: Liver HFE protein content is posttranscriptionally decreased in iron-deficient mice and rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **315**: G560-G568, 2018.
38. FRYDLOVA J, RYCHTARCIKOVA Z, GURIEVA I, VOKURKA M, TRUKSA J, KRIJT J: Effect of erythropoietin administration on proteins participating in iron homeostasis in *Tmprss6*-mutated *mask* mice. *PLoS One.* **12**: e0186844, 2017.
39. GANZ T: Systemic iron homeostasis. *Physiol Rev.* **93**: 1721-1741, 2013.
40. GANZ T: Iron and infection. *Int J Hematol.* **107**: 7-15, 2018.

41. GANZ T: Erythropoietic regulators of iron metabolism. *Free Radic Biol Med.* **133**: 69-74, 2019.
42. GANZ T, JUNG G, NAEIM A, GINZBURG Y, PAKBAZ Z, WALTER PB, KAUTZ L, NEMETH E: Immunoassay for human serum erythroferrone. *Blood.* **130**: 1243-1246, 2017.
43. GARCIA-SANTOS D, HAMDY A, SAXOVA Z, FILLEBEEN C, PANTOPOULOS K, HORVATHOVA M, PONKA P: Inhibition of heme oxygenase ameliorates anemia and reduces iron overload in a beta-thalassemia mouse model. *Blood.* **131**: 236-246, 2018.
44. GARDENGI S, MARONGIU MF, RAMOS P, GUY E, BREDA L, CHADBURN A, LIU Y, AMARIGLIO N, REHAVI G, RACHMILEWITZ EA, BREUER W, CABANTCHIK ZI, WRIGHTING DM, ANDREWS NC, DE SOUSA M, GIARDINA PJ, GRADY RW, RIVELLA S: Ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by down-regulation of hepcidin and up-regulation of ferroportin. *Blood.* **109**: 5027-5035, 2007.
45. GKOUVATSOS K, FILLEBEEN C, DABA A, WAGNER J, SEBASTIANI G, PANTOPOULOS K: Iron-dependent regulation of hepcidin in HJV^{-/-} mice: evidence that hemojuvelin is dispensable for sensing body iron levels. *PLoS One.* **9**: e85530, 2014.
46. GKOUVATSOS K, PAPANIKOLAOU G, PANTOPOULOS K: Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta.* **1820**: 188-202, 2012.
47. GREGORY CJ, EAVES AC: Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses. *Blood.* **49**: 855-864, 1977.
48. GUILLEM F, LAWSON S, KANNENGIESSER C, WESTERMAN M, BEAUMONT C, GRANDCHAMP B: Two nonsense mutations in the Tmprss6 gene in a patient with microcytic anemia and iron deficiency. *Blood.* **112**: 2089-2091, 2008.
49. GUPTA R, MUSALLAM KM, TAHER AT, RIVELLA S: Ineffective Erythropoiesis: Anemia and Iron Overload. *Hematol Oncol Clin North Am.* **32**: 213-221, 2018.
50. GURIEVA I, FRYDLOVA J, RYCHTARCIKOVA Z, VOKURKA M, TRUKSA J, KRIJT J: Erythropoietin administration increases splenic erythroferrone protein content and liver Tmprss6 protein content in rats. *Blood Cells Mol Dis.* **64**: 1-7, 2017.
51. HARE DJ: Hepcidin: a real-time biomarker of iron need. *Metallomics.* **9**: 606-618, 2017.
52. HEENEY MM, FINBERG KE: Iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Hematol Oncol Clin North Am.* **28**: 637-652, v, 2014.
53. HUANG H, CONSTANTE M, LAYOUN A, SANTOS MM: Contribution of STAT3 and SMAD4 pathways to the regulation of hepcidin by opposing stimuli. *Blood.* **113**: 3593-3599, 2009.
54. ILYIN G, COURSELAUD B, TROADEC MB, PIGEON C, ALIZADEH M, LEROYER P, BRISSOT P, LOREAL O: Comparative analysis of mouse hepcidin 1 and 2 genes: evidence for different patterns of expression and co-inducibility during iron overload. *FEBS Lett.* **542**: 22-26, 2003.
55. JELKMANN W: Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med.* **43**: 649-659, 2004.
56. JIANG X, GAO M, CHEN Y, LIU J, QI S, MA J, ZHANG Z, XU Y: EPO-dependent induction of erythroferrone drives hepcidin suppression and systematic iron absorption under phenylhydrazine-induced hemolytic anemia. *Blood Cells Mol Dis.* **58**: 45-51, 2016.
57. KAFINA MD, PAW BH: Intracellular iron and heme trafficking and metabolism in developing erythroblasts. *Metallomics.* **9**: 1193-1203, 2017.

58. KAPITSINOVA PP, LIU Q, UNGER TL, RHA J, DAVIDOFF O, KEITH B, EPSTEIN JA, MOORES SL, ERICKSON-MILLER CL, HAASE VH: Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia. *Blood*. **116**: 3039-3048, 2010.
59. KATSAROU A, PANTOPOULOS K: Hepcidin Therapeutics. *Pharmaceuticals (Basel)*. **11**, 2018.
60. KATTAMIS A, PAPASSOTIRIOU I, PALAIOLOGOU D, APOSTOLAKOU F, GALANI A, LADIS V, SAKELLAROPOULOS N, PAPANIKOLAOU G: The effects of erythropoietic activity and iron burden on hepcidin expression in patients with thalassemia major. *Haematologica*. **91**: 809-812, 2006.
61. KAUTZ L, JUNG G, DU X, GABAYAN V, CHAPMAN J, NASOFF M, NEMETH E, GANZ T: Erythroferrone contributes to hepcidin suppression and iron overload in a mouse model of beta-thalassemia. *Blood*. **126**: 2031-2037, 2015.
62. KAUTZ L, JUNG G, NEMETH E, GANZ T: Erythroferrone contributes to recovery from anemia of inflammation. *Blood*. **124**: 2569-2574, 2014a.
63. KAUTZ L, JUNG G, VALORE EV, RIVELLA S, NEMETH E, GANZ T: Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet*. **46**: 678-684, 2014b.
64. KAUTZ L, MEYNARD D, MONNIER A, DARNAUD V, BOUVET R, WANG RH, DENG C, VAULONT S, MOSSER J, COPPIN H, ROTH MP: Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood*. **112**: 1503-1509, 2008.
65. KEEL SB, DOTY RT, YANG Z, QUIGLEY JG, CHEN J, KNOBLAUGH S, KINGSLEY PD, DE DOMENICO I, VAUGHN MB, KAPLAN J, PALIS J, ABKOWITZ JL: A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science*. **319**: 825-828, 2008.
66. KIM A, NEMETH E: New insights into iron regulation and erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*. **22**: 199-205, 2015.
67. KIM S, PONKA P: Nitric oxide-mediated modulation of iron regulatory proteins: implication for cellular iron homeostasis. *Blood Cells Mol Dis*. **29**: 400-410, 2002.
68. KOULNIS M, LIU Y, HALLSTROM K, SOCOLOVSKY M: Negative autoregulation by Fas stabilizes adult erythropoiesis and accelerates its stress response. *PLoS One*. **6**: e21192, 2011.
69. KRIJT J, CMEJLA R, SYKORA V, VOKURKA M, VYORAL D, NECAS E: Different expression pattern of hepcidin genes in the liver and pancreas of C57BL/6N and DBA/2N mice. *J Hepatol*. **40**: 891-896, 2004a.
70. KRIJT J, FRYDLOVA J, KUKACKOVA L, FUJIKURA Y, PRIKRYL P, VOKURKA M, NECAS E: Effect of iron overload and iron deficiency on liver hemojuvelin protein. *PLoS One*. **7**: e37391, 2012.
71. KRIJT J, FUJIKURA Y, RAMSAY AJ, VELASCO G, NECAS E: Liver hemojuvelin protein levels in mice deficient in matriptase-2 (Tmprss6). *Blood Cells Mol Dis*. **47**: 133-137, 2011.
72. KRIJT J, FUJIKURA Y, SEFC L, VOKURKA M, HLOBENOVA T, NECAS E: Hepcidin downregulation by repeated bleeding is not mediated by soluble hemojuvelin. *Physiol Res*. **59**: 53-59, 2010a.
73. KRIJT J, JONASOVA A, NEUWIRTOVA R, NECAS E: Effect of erythropoietin on hepcidin expression in hemojuvelin-mutant mice. *Blood Cells Mol Dis*. **44**: 257-261, 2010b.

74. KRIJT J, VOKURKA M, CHANG KT, NECAS E: Expression of Rgmc, the murine ortholog of hemojuvelin gene, is modulated by development and inflammation, but not by iron status or erythropoietin. *Blood*. **104**: 4308-4310, 2004b.
75. KULAKSIZ H, THEILIG F, BACHMANN S, GEHRKE SG, ROST D, JANETZKO A, CETIN Y, STREMMEL W: The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. *J Endocrinol*. **184**: 361-370, 2005.
76. LAKHAL S, SCHODEL J, TOWNSEND AR, PUGH CW, RATCLIFFE PJ, MOLE DR: Regulation of type II transmembrane serine proteinase TMPRSS6 by hypoxia-inducible factors: new link between hypoxia signaling and iron homeostasis. *J Biol Chem*. **286**: 4090-4097, 2011.
77. LATOUR C, WLODARCZYK MF, JUNG G, GINESTE A, BLANCHARD N, GANZ T, ROTH MP, COPPIN H, KAUTZ L: Erythroferrone contributes to hepcidin repression in a mouse model of malarial anemia. *Haematologica*. **102**: 60-68, 2016.
78. LEE P, HSU MH, WELSER-ALVES J, PENG H: Severe microcytic anemia but increased erythropoiesis in mice lacking Hfe or Tfr2 and Tmprss6. *Blood Cells Mol Dis*. **48**: 173-178, 2012.
79. LEHMBERG K, GROSSE R, MUCKENTHALER MU, ALTAMURA S, NIELSEN P, SCHMID H, GRAUBNER U, OYEN F, ZELLER W, SCHNEPPENHEIM R, JANKA GE: Administration of recombinant erythropoietin alone does not improve the phenotype in iron refractory iron deficiency anemia patients. *Ann Hematol*. **92**: 387-394, 2012.
80. LENOIR A, DESCHEMIN JC, KAUTZ L, RAMSAY AJ, ROTH MP, LOPEZ-OTIN C, VAULONT S, NICOLAS G: Iron-deficiency anemia from matriptase-2 inactivation is dependent on the presence of functional Bmp6. *Blood*. **117**: 647-650, 2011.
81. LENOX LE, SHI L, HEGDE S, PAULSON RF: Extramedullary erythropoiesis in the adult liver requires BMP-4/Smad5-dependent signaling. *Exp Hematol*. **37**: 549-558, 2009.
82. LIU Y, POP R, SADEGH C, BRUGNARA C, HAASE VH, SOCOLOVSKY M: Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response *in vivo*. *Blood*. **108**: 123-133, 2006.
83. LOU DQ, NICOLAS G, LESBORDES JC, VIATTE L, GRIMBER G, SZAJNERT MF, KAHN A, VAULONT S: Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice. *Blood*. **103**: 2816-2821, 2004.
84. MAJORE S, BINNI F, RICERCA BM, BRIOLI G, GRAMMATICO P: Absence of hepcidin gene mutations in 10 Italian patients with primary iron overload. *Haematologica*. **87**: 221-222, 2002.
85. MAO P, WORTHAM AM, ENNS CA, ZHANG AS: The catalytic, stem, and transmembrane portions of matriptase-2 are required for suppressing the expression of the iron-regulatory hormone hepcidin. *J Biol Chem*. **294**: 2060-2073, 2018.
86. MAURER E, GUTSCHOW M, STIRNBERG M: Matriptase-2 (TMPRSS6) is directly up-regulated by hypoxia inducible factor-1: identification of a hypoxia-responsive element in the TMPRSS6 promoter region. *Biol Chem*. **393**: 535-540, 2012.
87. MCMAHON S, GRONDIN F, MCDONALD PP, RICHARD DE, DUBOIS CM: Hypoxia-enhanced expression of the proprotein convertase furin is mediated by hypoxia-inducible factor-1: impact on the bioactivation of proproteins. *J Biol Chem*. **280**: 6561-6569, 2005.
88. MELIS MA, CAU M, CONGIU R, SOLE G, BARELLA S, CAO A, WESTERMAN M, CAZZOLA M, GALANELLO R: A mutation in the TMPRSS6 gene, encoding a

- transmembrane serine protease that suppresses hepcidin production, in familial iron deficiency anemia refractory to oral iron. *Haematologica*. **93**: 1473-1479, 2008.
89. MERLE U, FEIN E, GEHRKE SG, STREMMEL W, KULAKSIZ H: The iron regulatory peptide hepcidin is expressed in the heart and regulated by hypoxia and inflammation. *Endocrinology*. **148**: 2663-2668, 2007.
 90. MEYNARD D, KAUTZ L, DARNAUD V, CANONNE-HERGAUX F, COPPIN H, ROTH MP: Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet*. **41**: 478-481, 2009.
 91. MEYNARD D, VAJA V, SUN CC, CORRADINI E, CHEN S, LOPEZ-OTIN C, GRGUREVIC L, HONG CC, STIRNBERG M, GUTSCHOW M, VUKICEVIC S, BABITT JL, LIN HY: Regulation of TMPRSS6 by BMP6 and iron in human cells and mice. *Blood*. **118**: 747-756, 2011.
 92. MIMS MP, PRCHAL JT: Divalent metal transporter 1. *Hematology*. **10**: 339-345, 2005.
 93. MIRCIOV CS, WILKINS SJ, DUNN LA, ANDERSON GJ, FRAZER DM: Characterization of Putative Erythroid Regulators of Hepcidin in Mouse Models of Anemia. *PLoS One*. **12**: e0171054, 2017.
 94. MISETA A, NAGY J, NAGY T, POOR VS, FEKETE Z, SIPOS K: Hepcidin and its potential clinical utility. *Cell Biol Int*. **39**: 1191-1202, 2015.
 95. MIYAKE T, KUNG CK, GOLDWASSER E: Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem*. **252**: 5558-5564, 1977.
 96. MOJZIKOVA R, KORALKOVA P, HOLUB D, SAXOVA Z, POSPISILOVA D, PROCHAZKOVA D, DZUBAK P, HORVATHOVA M, DIVOKY V: Two novel mutations (p.(Ser160Pro) and p.(Arg472Cys)) causing glucose-6-phosphate isomerase deficiency are associated with erythroid dysplasia and inappropriately suppressed hepcidin. *Blood Cells Mol Dis*. **69**: 23-29, 2018.
 97. MOJZIKOVA R, KORALKOVA P, HOLUB D, ZIDOVA Z, POSPISILOVA D, CERMAK J, STRIEZENCOVA LALUHOVA Z, INDRAK K, SUKOVA M, PARTSCHOVA M, KUCEROVA J, HORVATHOVA M, DIVOKY V: Iron status in patients with pyruvate kinase deficiency: neonatal hyperferritinaemia associated with a novel frameshift deletion in the PKLR gene (p.Arg518fs), and low hepcidin to ferritin ratios. *Br J Haematol*. **165**: 556-563, 2014.
 98. MUCKENTHALER MU, RIVELLA S, HENTZE MW, GALY B: A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell*. **168**: 344-361, 2017.
 99. NAI A, LIDONNICI MR, RAUSA M, MANDELLI G, PAGANI A, SILVESTRI L, FERRARI G, CAMASCHELLA C: The second transferrin receptor regulates red blood cell production in mice. *Blood*. **125**: 1170-1179, 2015.
 100. NAI A, PAGANI A, MANDELLI G, LIDONNICI MR, SILVESTRI L, FERRARI G, CAMASCHELLA C: Deletion of *Tmprss6* attenuates the phenotype in a mouse model of beta-thalassemia. *Blood*. **119**: 5021-5029, 2012.
 101. NAI A, RUBIO A, CAMPANELLA A, GOURBEYRE O, ARTUSO I, BORDINI J, GINESTE A, LATOUR C, BESSON-FOURNIER C, LIN HY, COPPIN H, ROTH MP, CAMASCHELLA C, SILVESTRI L, MEYNARD D: Limiting hepatic *Bmp-Smad* signaling by *matriptase-2* is required for erythropoietin-mediated hepcidin suppression in mice. *Blood*. **127**: 2327-2336, 2016.
 102. NEMETH E: Targeting the hepcidin-ferroportin axis in the diagnosis and treatment of anemias. *Adv Hematol*. **2010**: 750643, 2010.

103. NEMETH E, GANZ T: Anemia of inflammation. *Hematol Oncol Clin North Am.* **28**: 671-681, vi, 2014.
104. NEMETH E, RIVERA S, GABAYAN V, KELLER C, TAUDORF S, PEDERSEN BK, GANZ T: IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest.* **113**: 1271-1276, 2004a.
105. NEMETH E, ROETTO A, GAROZZO G, GANZ T, CAMASCHELLA C: Hepcidin is decreased in TFR2 hemochromatosis. *Blood.* **105**: 1803-1806, 2005.
106. NEMETH E, TUTTLE MS, POWELSON J, VAUGHN MB, DONOVAN A, WARD DM, GANZ T, KAPLAN J: Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* **306**: 2090-2093, 2004b.
107. NEMETH E, VALORE EV, TERRITO M, SCHILLER G, LICHTENSTEIN A, GANZ T: Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood.* **101**: 2461-2463, 2003.
108. NICOLAS G, BENNOUN M, DEVAUX I, BEAUMONT C, GRANDCHAMP B, KAHN A, VAULONT S: Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**: 8780-8785, 2001.
109. NICOLAS G, BENNOUN M, PORTEU A, MATIVET S, BEAUMONT C, GRANDCHAMP B, SIRITO M, SAWADOGO M, KAHN A, VAULONT S: Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**: 4596-4601, 2002a.
110. NICOLAS G, DESCHEMIN JC, RAMSAY AJ, MAYEUX P, GRANDCHAMP B, BEAUMONT C, VELASCO G, VAULONT S: Is EPO therapy able to correct iron deficiency anaemia caused by matriptase-2 deficiency? *Br J Haematol.* **152**: 498-500, 2011.
111. NICOLAS G, CHAUVET C, VIATTE L, DANAN JL, BIGARD X, DEVAUX I, BEAUMONT C, KAHN A, VAULONT S: The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest.* **110**: 1037-1044, 2002b.
112. NICOLAS G, VIATTE L, BENNOUN M, BEAUMONT C, KAHN A, VAULONT S: Hepcidin, a new iron regulatory peptide. *Blood Cells Mol Dis.* **29**: 327-335, 2002c.
113. NIEDERAU C, FISCHER R, PURSCHEL A, STREMMEL W, HAUSSINGER D, STROHMEYER G: Long-term survival in patients with hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology.* **110**: 1107-1119, 1996.
114. PAK M, LOPEZ MA, GABAYAN V, GANZ T, RIVERA S: Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood.* **108**: 3730-3735, 2006.
115. PAPANIKOLAOU G, PANTOPOULOS K: Systemic iron homeostasis and erythropoiesis. *IUBMB Life.* **69**: 399-413, 2017.
116. PAPANIKOLAOU G, SAMUELS ME, LUDWIG EH, MACDONALD ML, FRANCHINI PL, DUBE MP, ANDRES L, MACFARLANE J, SAKELLAROPOULOS N, POLITOU M, NEMETH E, THOMPSON J, RISLER JK, ZABOROWSKA C, BABAKAUFF R, RADOMSKI CC, PAPE TD, DAVIDAS O, CHRISTAKIS J, BRISSOT P, LOCKITCH G, GANZ T, HAYDEN MR, GOLDBERG YP: Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet.* **36**: 77-82, 2004.

117. PARK CH, VALORE EV, WARING AJ, GANZ T: Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem.* **276**: 7806-7810, 2001.
118. PESLOVA G, PETRAK J, KUZELOVA K, HRDY I, HALADA P, KUCHEL PW, SOE-LIN S, PONKA P, SUTAK R, BECKER E, HUANG ML, SURYO RAHMANTO Y, RICHARDSON DR, VYORAL D: Heparin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to alpha-2-macroglobulin in blood. *Blood.* **113**: 6225-6236, 2009.
119. PEYSSONNAUX C, ZINKERNAGEL AS, SCHUEPBACH RA, RANKIN E, VAULONT S, HAASE VH, NIZET V, JOHNSON RS: Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest.* **117**: 1926-1932, 2007.
120. PIETRANGELO A: The ferroportin disease. *Blood Cells Mol Dis.* **32**: 131-138, 2004.
121. PIGEON C, ILYIN G, COURSELAUD B, LEROYER P, TURLIN B, BRISSOT P, LOREAL O: A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide heparin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem.* **276**: 7811-7819, 2001.
122. POSPISILOVA D, HOLUB D, ZIDOVA Z, SULOVSKA L, HOUDA J, MIHAL V, HADACOVA I, RADOVA L, DZUBAK P, HAJDUCH M, DIVOKY V, HORVATHOVA M: Heparin levels in Diamond-Blackfan anemia reflect erythropoietic activity and transfusion dependency. *Haematologica.* **99**: e118-121, 2014.
123. PRIKRYL P, HRUSKOVA Z, KONOPASEK P, HLADINOVA Z, TESAR V, VOKURKA M: Serum heparin is increased in ANCA-associated vasculitis and correlates with activity markers. *Physiol Res.* **67**: 945-954, 2018.
124. RAMOS P, GUY E, CHEN N, PROENCA CC, GARDENGHI S, CASU C, FOLLENZI A, VAN ROOIJEN N, GRADY RW, DE SOUSA M, RIVELLA S: Enhanced erythropoiesis in Hfe-KO mice indicates a role for Hfe in the modulation of erythroid iron homeostasis. *Blood.* **117**: 1379-1389, 2011.
125. RAUSA M, PAGANI A, NAI A, CAMPANELLA A, GILBERTI ME, APOSTOLI P, CAMASCHELLA C, SILVESTRI L: Bmp6 expression in murine liver non parenchymal cells: a mechanism to control their high iron exporter activity and protect hepatocytes from iron overload? *PLoS One.* **10**: e0122696, 2015.
126. RAVASI G, PELUCCHI S, BUOLI COMANI G, GRENI F, MARIANI R, PELLONI I, BOMBELLI S, PEREGO R, BARISANI D, PIPERNO A: Heparin regulation in a mouse model of acute hypoxia. *Eur J Haematol.* **100**: 636-643, 2018.
127. RISHI G, SUBRAMANIAM VN: The relationship between systemic iron homeostasis and erythropoiesis. *Biosci Rep.* **37**, 2017.
128. RIVELLA S: Iron metabolism under conditions of ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia. *Blood.* **133**: 51-58, 2019.
129. ROETTO A, PAPANIKOLAOU G, POLITOU M, ALBERTI F, GIRELLI D, CHRISTAKIS J, LOUKOPOULOS D, CAMASCHELLA C: Mutant antimicrobial peptide heparin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet.* **33**: 21-22, 2003.
130. SELDIN MM, PETERSON JM, BYERLY MS, WEI Z, WONG GW: Myonectin (CTRP15), a novel myokine that links skeletal muscle to systemic lipid homeostasis. *J Biol Chem.* **287**: 11968-11980, 2012.

131. SCHMIDT PJ, FLEMING MD: Transgenic HFE-dependent induction of hepcidin in mice does not require transferrin receptor-2. *Am J Hematol.* **87**: 588-595, 2012.
132. SILVESTRI L, PAGANI A, NAI A, DE DOMENICO I, KAPLAN J, CAMASCHELLA C: The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab.* **8**: 502-511, 2008.
133. SONNWEBER T, NACHBAUR D, SCHROLL A, NAIRZ M, SEIFERT M, DEMETZ E, HASCHKA D, MITTERSTILLER AM, KLEINSASSER A, BURTSCHER M, TRUBSBACH S, MURPHY AT, WROBLEWSKI V, WITCHER DR, MLECZKO-SANECKA K, VECCHI C, MUCKENTHALER MU, PIETRANGELO A, THEURL I, WEISS G: Hypoxia induced downregulation of hepcidin is mediated by platelet derived growth factor BB. *Gut.* **63**: 1951-1959, 2014.
134. TANNO T, BHANU NV, ONEAL PA, GOH SH, STAKER P, LEE YT, MORONEY JW, REED CH, LUBAN NL, WANG RH, ELING TE, CHILDS R, GANZ T, LEITMAN SF, FUCHAROEN S, MILLER JL: High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med.* **13**: 1096-1101, 2007.
135. TANNO T, NOEL P, MILLER JL: Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease. *Curr Opin Hematol.* **17**: 184-190, 2010.
136. TANNO T, PORAYETTE P, SRIPICHAJ O, NOH SJ, BYRNES C, BHUPATIRAJU A, LEE YT, GOODNOUGH JB, HARANDI O, GANZ T, PAULSON RF, MILLER JL: Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood.* **114**: 181-186, 2009.
137. TORRANCE JD, BOTHWELL T.H. 1980. Tissue Iron Stores. *In Methods Hematol.* Vol. 1. 90-115.
138. TSIFTSOGLU AS, VIZIRIANAKIS IS, STROUBOULIS J: Erythropoiesis: model systems, molecular regulators, and developmental programs. *IUBMB Life.* **61**: 800-830, 2009.
139. VOKURKA M: Fyziologie a patofyziologie erytropoezy: regulace a erytropoetin. *Aktuality v nefrologii.* **17**: 93-99, 2011.
140. VOKURKA M, KRIJT J, SULC K, NECAS E: Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol Res.* **55**: 667-674, 2006.
141. VOKURKA M, KRIJT J, VAVROVA J, NECAS E: Hepcidin expression in the liver of mice with implanted tumour reacts to iron deficiency, inflammation and erythropoietin administration. *Folia Biol (Praha).* **57**: 248-254, 2011.
142. VOKURKA M, LACINOVA Z, KREMEN J, KOPECKY P, BLAHA J, PELINKOVA K, HALUZIK M, NECAS E: Hepcidin expression in adipose tissue increases during cardiac surgery. *Physiol Res.* **59**: 393-400, 2010.
143. VYORAL D, PETRAK J: Therapeutic potential of hepcidin - the master regulator of iron metabolism. *Pharmacol Res.* **115**: 242-254, 2017.
144. WAHEDI M, WORTHAM AW, KLEVEN MD, ZHAO N, JUE S, ENNS CA, ZHANG AS: Matriptase-2 Suppresses Hepcidin Expression by Cleaving Multiple Components of the Hepcidin Induction Pathway. *J Biol Chem.* **292**: 18354-18371, 2017.
145. WALLACE DF, TRINDER D, SUBRAMANIAM VN: Hepcidin regulation by HFE and TFR2: is it enough to give a hepatocyte a complex? *Gastroenterology.* **137**: 1173-1175; discussion 1175, 2009.
146. WANG CY, BABITT JL: Liver iron sensing and body iron homeostasis. *Blood.* **133**: 18-29, 2019.

147. WANG CY, CANALI S, BAYER A, DEV S, AGARWAL A, BABITT JL: Iron, erythropoietin, and inflammation regulate hepcidin in Bmp2-deficient mice, but serum iron fails to induce hepcidin in Bmp6-deficient mice. *Am J Hematol.* **94**: 240-248, 2019.
148. WANG RH, LI C, XU X, ZHENG Y, XIAO C, ZERFAS P, COOPERMAN S, ECKHAUS M, ROUAULT T, MISHRA L, DENG CX: A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab.* **2**: 399-409, 2005.
149. WEISS G, GOODNOUGH LT: Anemia of chronic disease. *N Engl J Med.* **352**: 1011-1023, 2005.
150. WILLEMETZ A, LENOIR A, DESCHEMIN JC, LOPEZ-OTIN C, RAMSAY AJ, VAULONT S, NICOLAS G: Matriptase-2 is essential for hepcidin repression during fetal life and postnatal development in mice to maintain iron homeostasis. *Blood.* **124**: 441-444, 2014.
151. WRIGHTING DM, ANDREWS NC: Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood.* **108**: 3204-3209, 2006.
152. XU MM, WANG J, XIE JX: Regulation of iron metabolism by hypoxia-inducible factors. *Acta Physiologica Sinica.* **69**: 598-610, 2017.
153. ZHANG AS, ANDERSON SA, WANG J, YANG F, DEMASTER K, AHMED R, NIZZI CP, EISENSTEIN RS, TSUKAMOTO H, ENNS CA: Suppression of hepatic hepcidin expression in response to acute iron deprivation is associated with an increase of matriptase-2 protein. *Blood.* **117**: 1687-1699, 2011.
154. ZHANG DL, GHOSH MC, ROUAULT TA: The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis - an update. *Front Pharmacol.* **5**: 124, 2014.
155. ZHAO N, NIZZI CP, ANDERSON SA, WANG J, UENO A, TSUKAMOTO H, EISENSTEIN RS, ENNS CA, ZHANG AS: Low intracellular iron increases the stability of matriptase-2. *J Biol Chem.* **290**: 4432-4446, 2015.

8. PŘEHLED VLASTNÍCH PUBLIKACÍ A PŘÍLOHY

Seznam publikací autora vztahujících se k disertační práci:

Frýdlová J, Přikryl P, Truksa J, Falke LL, Du X, **Gurieva I**, Vokurka M, Krijt J: “*Effect of Erythropoietin, Iron Deficiency and Iron Overload on Liver Matriptase-2 (TMPRSS6) Protein Content in Mice and Rats.*” PLoS One. 2016 Feb 4; 11(2):e0148540. doi: 10.1371/journal.pone.0148540. eCollection 2016. **IF = 2.806 (2016)**

Gurieva I, Frýdlová J, Rychtarčíková Z, Vokurka M, Truksa J, Krijt J: “*Erythropoietin administration increases splenic erythroferrone protein content and liver TMPRSS6 protein content in rats.*” Blood Cells Mol Dis. 2017 May; 64:1-7. doi: 10.1016/j.bcmed.2017.02.007. Epub 2017 Feb 28. **IF = 1.836 (2017)**

Další publikace autora vztahující se k tématu:

Frýdlová J, Rychtarčíková Z, **Gurieva I**, Vokurka M, Truksa J, Krijt J: “*Effect of erythropoietin administration on proteins participating in iron homeostasis in Tmprss6-mutated mask mice.*” PLoS One. 2017 Oct 26; 12(10):e0186844. doi:10.1371/journal.pone.0186844. eCollection 2017. **IF = 2.766 (2017)**

Přílohy

Příloha I

Frýdlová J, Přikryl P, Truksa J, Falke LL, Du X, Gurieva I, Vokurka M, Krijt J: „*Effect of Erythropoietin, Iron Deficiency and Iron Overload on Liver Matriptase-2 (TMPRSS6) Protein Content in Mice and Rats.*“ PLoS One. 2016 Feb 4; 11(2):e0148540

Příloha II

Gurieva I, Frýdlová J, Rychtarčíková Z, Vokurka M, Truksa J, Krijt J: “*Erythropoietin administration increases splenic erythroferrone protein content and liver TMPRSS6 protein content in rats.*“ Blood Cells Mol Dis. 2017 May; 64:1-7