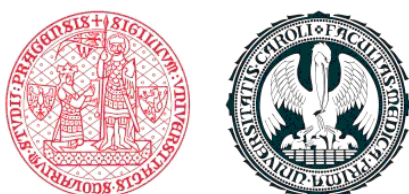


UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



ŽELEZO A REGULACE JEHO METABOLISMU PŘI ZÁNĚTU A
PORUCHÁCH ERYTROPOÉZY

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

Iuliia Gurieva

2019

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav patologické fyziologie 1. LF UK

Školitel: doc. MUDr. Martin Vokurka, CSc.

Konzultant: ing. Jan Krijt, Ph.D.

OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	5
1. ÚVOD	6
2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE.....	9
3. MATERIÁLY A METODIKA.....	10
3.1. Kity	10
3.2 Protilátky	10
3.3 Použitá zvířata a aplikace.....	10
3.5 Metodiky	11
3.6 Statistické hodnocení.....	11
4. VÝSLEDKY	12
4.1 Studium exprese <i>Tmprss6</i> (TMPRSS6) na modelech myši a potkanů.....	12
4.1.1 Vliv podání EPO na expresi <i>Hamp</i> a <i>Tmprss6</i> (TMPRSS6) v játrech.....	12
4.1.2 Vliv nedostatku železa na expresi <i>Hamp</i> a <i>Tmprss6</i> (TMPRSS6) v játrech	15
4.1.3 Vliv podání železa na expresi <i>Hamp</i> , <i>Bmp6</i> , <i>Tmprss6</i> (TMPRSS6) a <i>HJV</i> v játrech	17
4.2 Vliv erythropoetinu na expresi erytoferronu a matriptázy-2 u potkanů	19
4.2.1 Expres vybraných genů regulační dráhy BMP/ SMAD.....	19
4.2.2 Expres a množství proteinů regulačních genů pro erytoferron a matriptázu-2	22
5. DISKUSE.....	26
6. ZÁVĚRY.....	29
7. POUŽITÁ LITERATURA	30

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 drahou 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 drahou 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 snižena, 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 erythropoéze.

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

Železo (lat. *ferrum*, ${}_{26}\text{Fe}$, VIIIB 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. Lidský organismus nemá schopnost výdeje (exkrece) železa.

Železo v organismu se může nacházet ve třech stavech: aktivní, zásobní a transportní. K aktivním formám železa (Fe^{2+}) patří železo obsažené v hemu (*hemoglobin*, *myoglobin*), resp. v hemoproteinech (*cytochromy*, *peroxidáza*, *kataláza*, *NO syntáza* aj.). Zásobní železo (Fe^{3+}) je „nefunkční“, netoxické a nachází se ve *ferritinu*, který objevil v 30. letech 20. století český fyziolog profesor Vilém Laufberger. Může obsahovat až 4000 atomů železa. Při nadbytku železa se ferritin mění na *hemosiderin*, ve které se železo nachází v nerozpustné formě, a proto je méně dostupné. Transportní železo (Fe^{3+}) se nachází v plazmě a je vázáno na transportní protein *transferrin* (Tf). Volné dvojmocné železo je velmi toxické a způsobuje vznik volných radikálů Fentonovou reakcí.

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. Organismus musí být schopen získat velké množství železa k růstu a vývoji (včetně těhotenství), ale zároveň musí zabránit vzniku přetížení.

Hlavním „spotřebitelem“ železa je erytropoéza. Ta je rovněž velmi rychle schopna zvýšit produkci červených krvinek, jejichž tvorba vyžaduje velký přísun železa. Erytropoéza je vznik a vyzrávání červených krvinek (Vokurka, 2011). U člověka po narození je místem erytropoézy kostní dřeň, prenatálně 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.

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

Erythropoetin je klíčový hormon regulující erythropoézu. Důležitým mechanismem působení EPO je potlačení apoptózy erytroidních prekursorů. 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. Erythropoetin se váže na *erythropoetinový receptor* (EPO-R), přítomný zejména na CFU-E, proerytroblastech a už jen v malé míře na časných bazofilních erytroblastech.

V roce 1994 byla postulována existence tzv. zásobního (angl. *store*) a erytroidního regulátoru (Finch, 1994).

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 (nyní typ 1). Nadbytečná akumulace železa ve tkáních může vést k jejich poškození, což se projeví zejména jako jaterní fibróza až cirhóza, diabetes mellitus, artopatie, endokrinní dysfunkce a v závažných případech i jako kardiomyopatie (Niederau et al., 1996). Zásadní objev v této oblasti pak bylo popsání *hepcidinu* (je kódován genem *Hamp*, **h**epatic **antimicrobial peptide**) v roce 2001 jako hlavního systémového regulátoru (hormonu) metabolismu železa. Jedná se o peptid, který je převážně syntetizován v játrech v hepatocytech. 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). Klíčová je regulace hepcidinu signální drahou BMP/ SMAD v játrech (Babitt et al., 2006; Kautz et al., 2008; Wang et al., 2005).

Dalších více jak 15 let je věnováno studiu regulace hepcidinu a jeho vztahu k dalším nemocem. Byly objeveny další molekuly a regulační dráhy, ale kompletní síť (network) této regulace není dosud zcela objasněna.

Již při prvních experimentálních studiích na myších a objevu hepcidinu bylo prokázáno, že jeho nedostatek způsobuje přetížení železem, což je analogie hereditární hemochromatózy („bronzový diabetes“). U ní byla snížená exprese hepcidinu popsána jako první (Bridle et al., 2003). Mutace proteinů – HFE, TfR2 a HJV jsou hlavními příčinami porušené regulace hepcidinu u HH (Brissot et al., 2017).

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), což je membránová

serinová proteáza. 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).

Mnohem častější je zvýšená exprese hepcidinu vlivem zánětu. Zánětové procesy zasahují v organismu do mnoha dějů, zejména prostřednictvím zánětových cytokinů interleukin-1 (IL-1), IL-6 a nádor nekrotizujícího faktoru α (TNF α , tumor necrosis factor α). Ovlivňují rovněž erytropoézu a metabolismus železa. Hepcidin se chová jako reaktant akutní fáze stimulovaný 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). Signální drahou regulace je JAK/ STAT3 (Wrighting and Andrews 2006).

S ohledem na úzký vztah železa a erytropoézy je zřejmé, že tyto děje musí mít propojenou regulaci (Rishi and Subramaniam, 2017). V roce 2014 byl objeven ERFE, kódovaný genem *Fam132b* (Kautz et al., 2014b; Kim and Nemeth, 2015) jako eryteroidní regulátor (supresor) transkripce hepcidinu. Původně byl známý jako myonectin (Seldin et al., 2012). 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 kostní dřeni a ve slezině.

Hlavní regulující faktory exprese hepcidinu jsou - železo, erytropoéza 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).

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. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

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 účastníci 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 METODIKA

3.1. Kity

RNA RNeasy Plus Mini Kit (*QIAGEN*); RevertAid First Strand cDNA synthesis Kit (*Thermo Fischer*); BIO-LA-TEST, Železo Liquid 200 (*PLIVA-Lachema Diagnostika*); BIO-LA-TEST, Železo 70 (*PLIVA-Lachema Diagnostika*).

3.2 Protilátky

Primární:

TMPRSS6: polyklonální králičí protilátka anti-Matriptáza 2 – proti katalytické doméně: *ab56182* (*Abcam*), zředěná 1 : 750; HJV: polyklonální kozí protilátka anti-RGM-C: *AF3634* (*R&D Systems*), zředěná 1 : 1000; pSmad 1,5,8: polyklonální králičí protilátka anti-pSMADs: *9511* (*Cell Signaling Technology*), zředěná 1 : 600; ERFE: polyklonální kozí protilátka anti-myonectin: *SC-246567* (*Santa Cruz Biotechnology*), zředěná 1 : 200 (byla validována v naší laboratoři); ATP1A: králičí polyklonální protilátka anti-Na⁺/ K⁺ ATPáza α , H-300: *SC-28800* (*Santa Cruz Biotechnology*), zředěná 1 : 10000; 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.

3.3 Použitá zvířata a aplikace

Potkani – outbrední samice *Wistar* (170 – 195 g). 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.

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*.

Nedostatek železa byl navozen podáváním nízkoželezné diety (10 ppm železa) v peletované formě Altromin C1038 (*Altromin*) byla podávána po odstavení po dobu třech (potkani) či čtyř týdnů (myši).

Erythropoetin – epoetin beta (NeoRecormon, *Roche*) v dávce 500 IU/ den potkanům a 50 IU/ den myším intraperitoneálně (i. p.). 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.

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.

3.5 Metodiky

- stanovení hematologických parametrů
- stanovení koncentrace nehemového železa v tkáních (játrech)
- stanovení koncentrace železa v plazmě
- izolace RNA
- měření koncentrace RNA
- reverzní transkripce
- real-time PCR
- imunobloty (Western bloty)

3.6 Statistické hodnocení

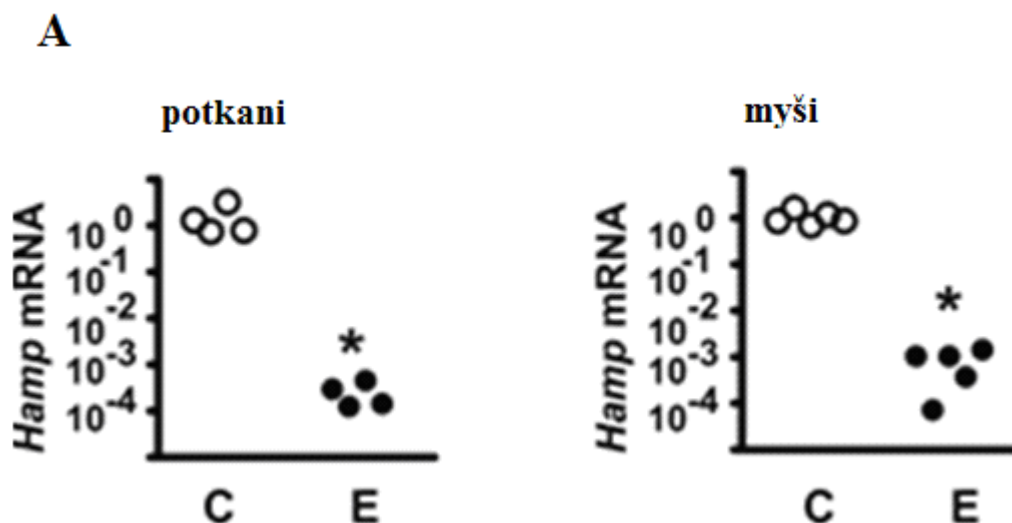
K statistickému hodnocení byl použit program *GraphPad Prism 4*, popř. Microsoft Excel pro jednoduché testy. K analýze hematologických parametrů mezi dvěma skupinami hodnot byl použit Studentův t-test. K výsledkům RT-PCR byly použity neparametrické testy – Mann-Whitneyův test při srovnání dvou hodnot (skupin) a ANOVA test s následným Newman-Keulovým 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 $p < 0,05$.

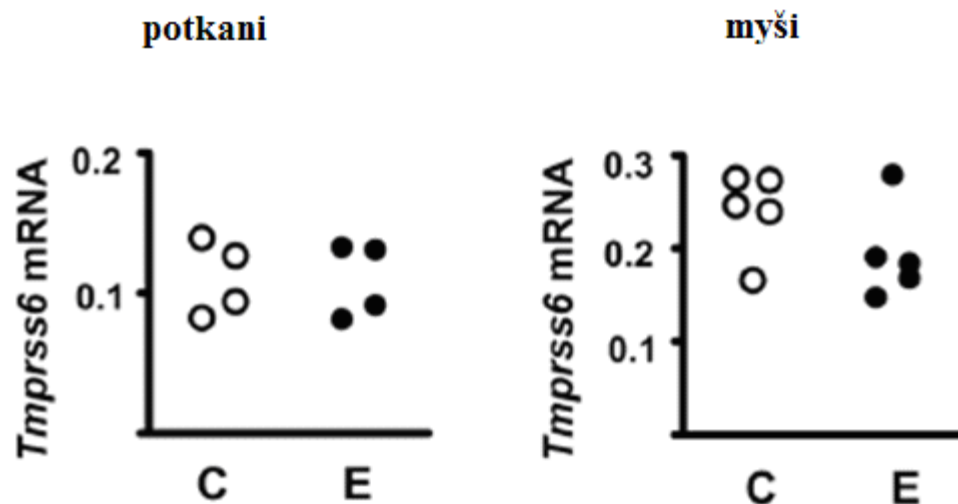
4. VÝSLEDKY

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

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

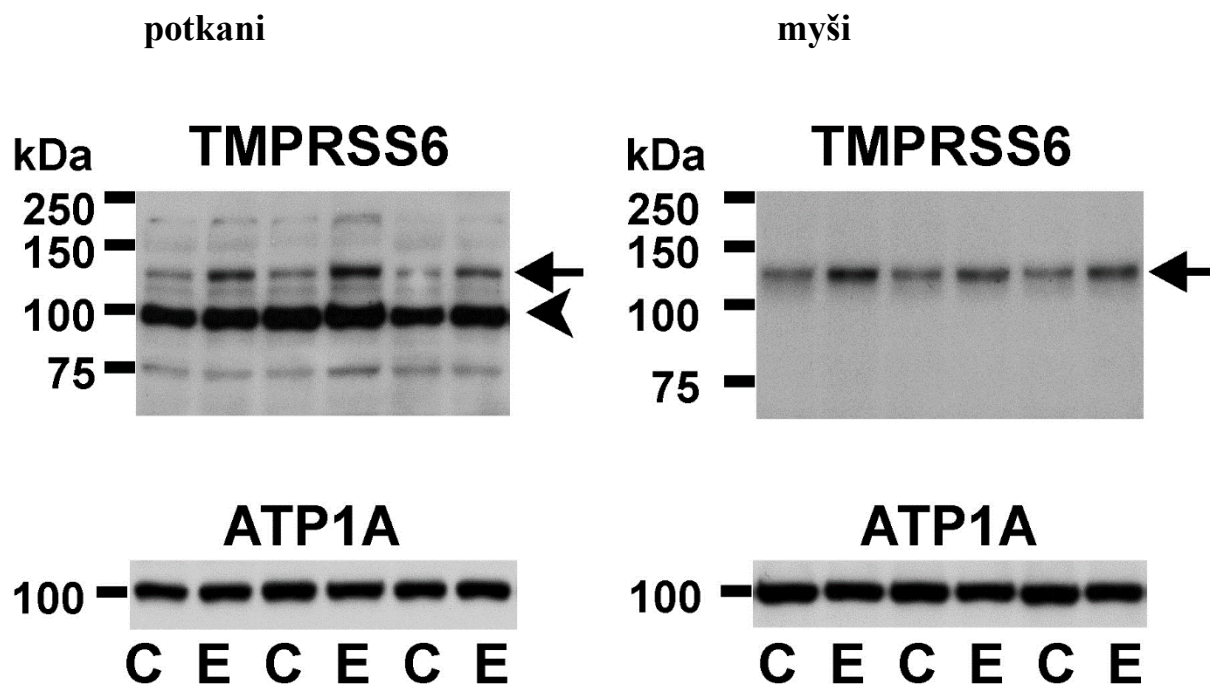
Expres *Hamp* a *Tmprss6* byla měřena v játrech na úrovni mRNA pomocí real-time PCR, TMPRSS6 byla měřená i na úrovni proteinů pomocí imunoblotů v jaterním homegenátu obohaceném o frakce plazmatických membrán. Po podání EPO výsledky prokázaly pokles exprese *Hamp* u myši i potkanů na úrovni mRNA (obr. 1A), množství mRNA pro *Tmprss6* nebylo ovlivněno (obr. 1B), ale byl prokázán statisticky významný vzestup TMPRSS6 na úrovni proteinu (obr. 2A,B), který byl výraznější u potkanů. Jednorázové podání EPO (500 IU/ potkan) 24 hodin před usmrcením však množství proteinu TMPRSS6 (obr. 2C) neovlivnilo, ačkoliv exprese *Hamp* byla signifikantně snížena (obr. 2C). 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. 2A). Vzhledem k tomu, že tento proužek nereagoval na podání EPO a nebyl pozorován u myších modelů, považujeme je za nespecifický.

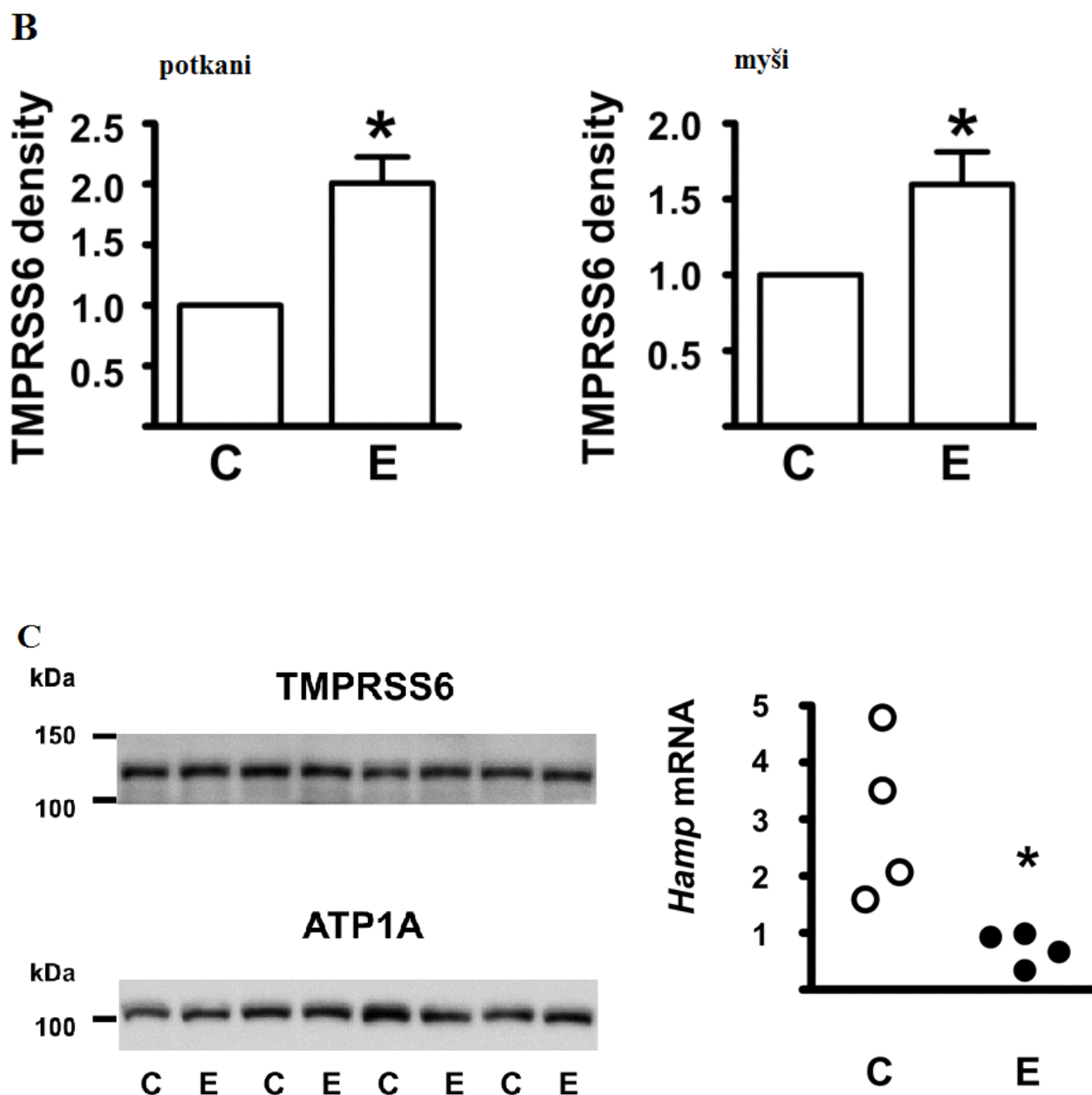


B

Obr. 1 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



Obr. 2 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.

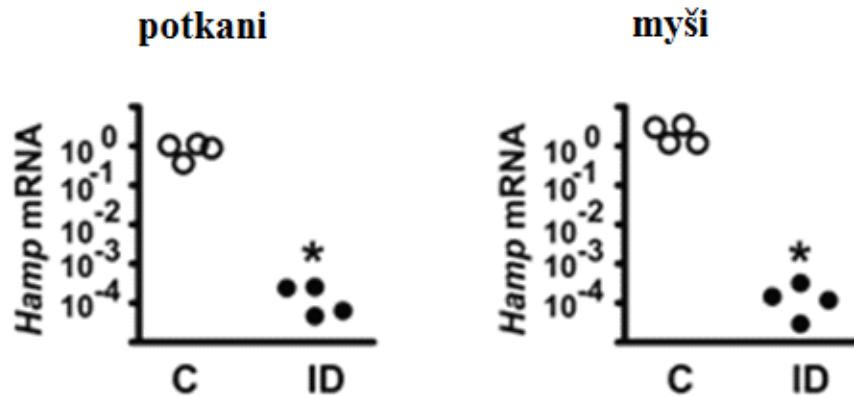
Šipka (**A**) označuje specifický proužek proteinu TMPRSS6. Konec šipky (**A**) nespecifický proužek proteinu TMPRSS6. Jako kontrola nanášení byl použit protein ATP1A. Expres *Hamp* vyjádřena jako relativní exprese k *Actb*.

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

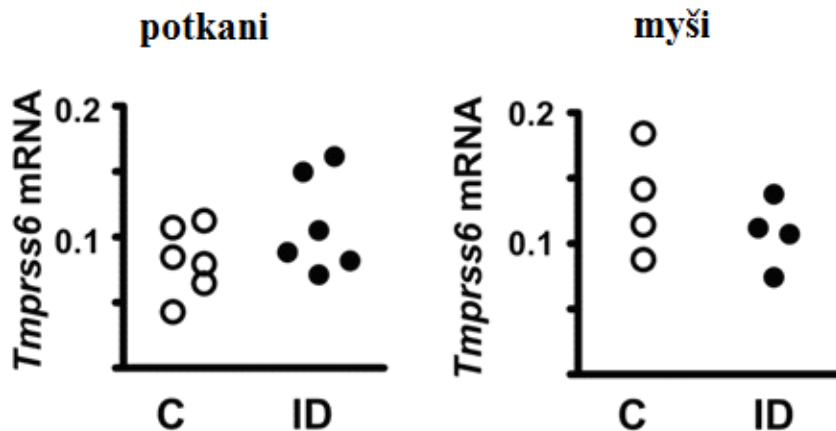
4.1.2 Vliv nedostatku železa na expresi *Hamp* a *Tmprss6* (TMPRSS6) v játrech

Nízkoželezná dieta snížila expresi *Hamp* (obr. 3A), zatímco nezměnila signifikantně expresi *Tmprss6* na úrovni mRNA (obr. 3B). Při stanovení proteinu TMPRSS6 byl pozorován statisticky významný vzestup (obr. 4) 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. 4A). Vzhledem k tomu, že tento proužek nereagoval na nedostatek železa a nebyl pozorován u myších modelů, považujeme je za nespecifický.

A



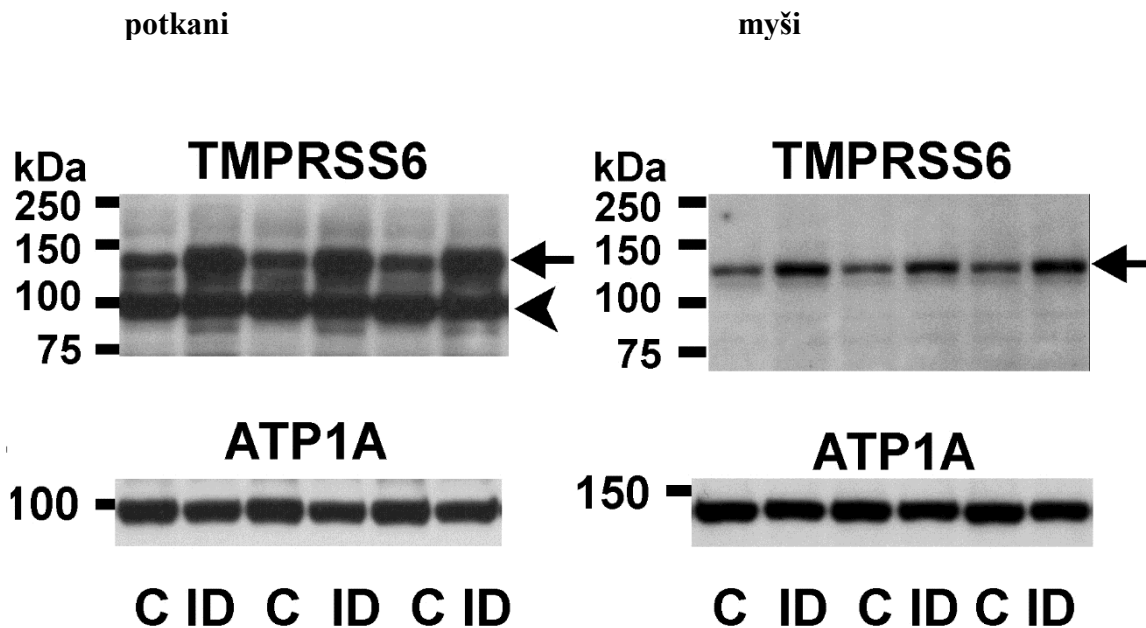
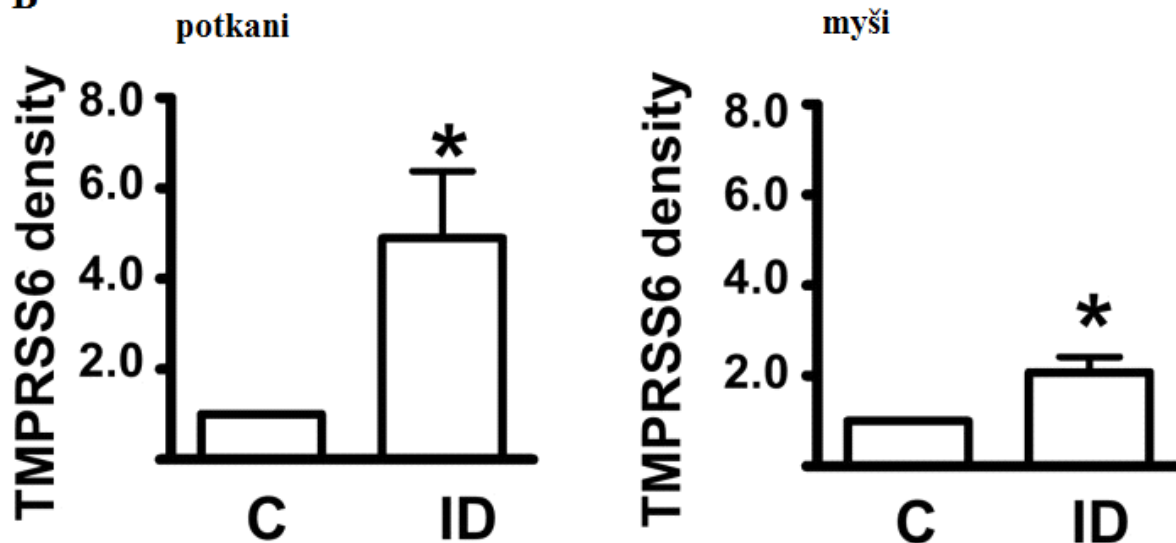
B



Obr. 3 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**

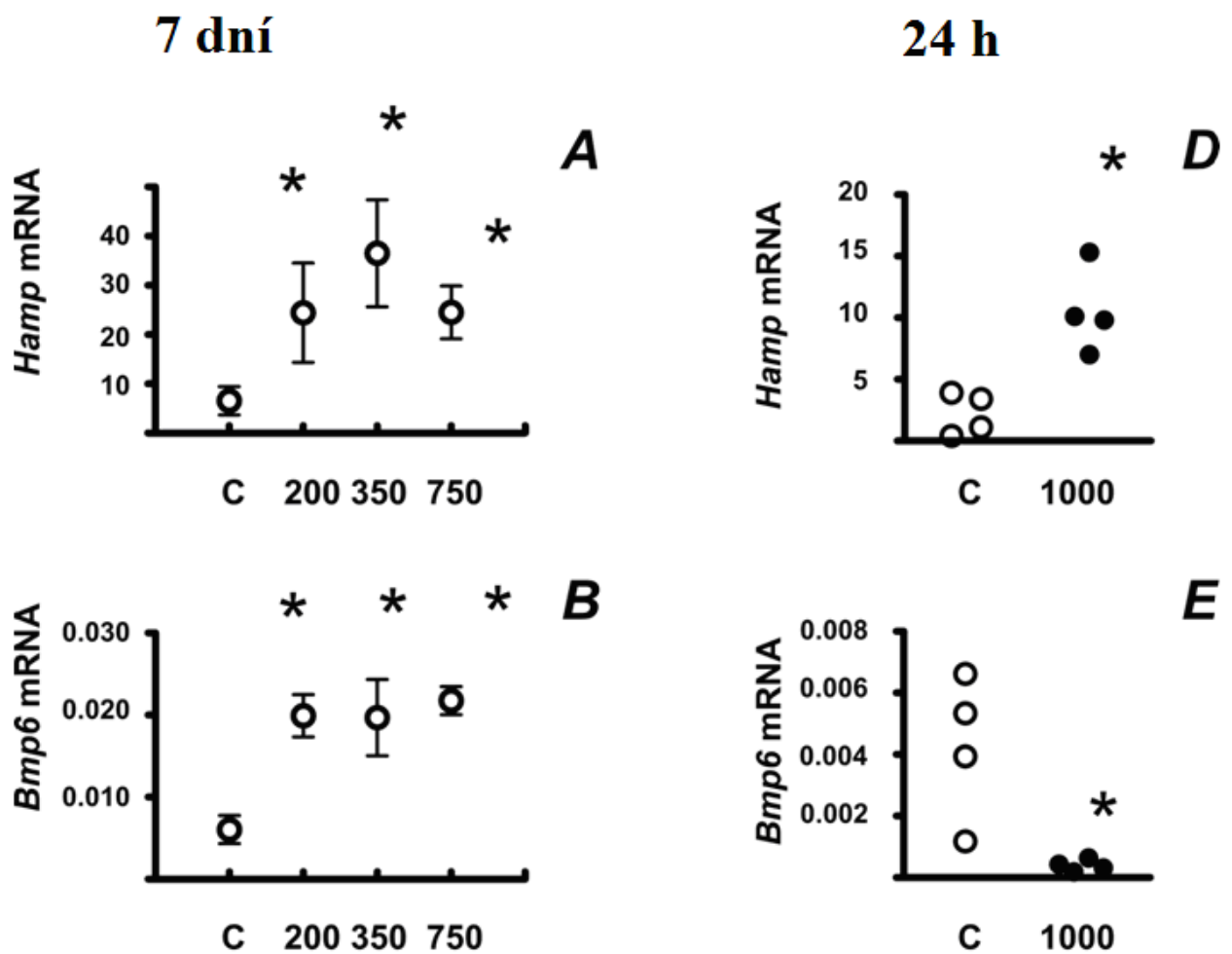
Obr. 4 Vliv nízkoželezné diety na množství proteinu TMPRSS6 v játrech myši a potkanů, stanovený imunoblotem (A) a vyjádřený denzitometrií (B). C - kontroly; ID – nízkoželezná dieta. Šipka (A) označuje specifický proužek proteinu TMPRSS6. Konec šipky (A) označuje nespecifický proužek proteinu TMPRSS6. Jako kontrola nanášení byl použit protein ATP1A.

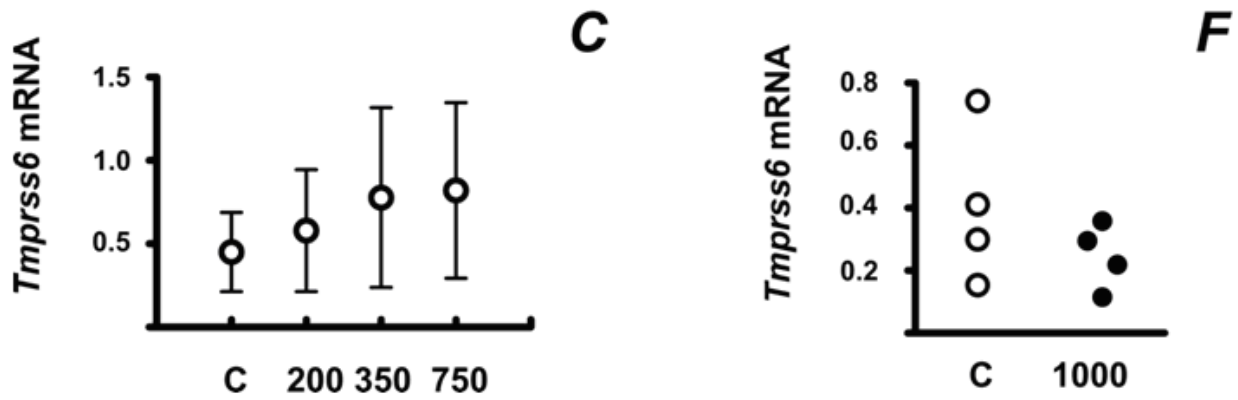
*) statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolám ($p < 0,05$; $n = 4$)

4.1.3 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. 5 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. 6A). Vzorke myších jaterních homogenátů vykazovaly kromě specifického proužku proteinu TMPRSS6 na úrovni 120 kDa poměrně silný nespecifický proužek na úrovni 75 kDa (obr. 6A).

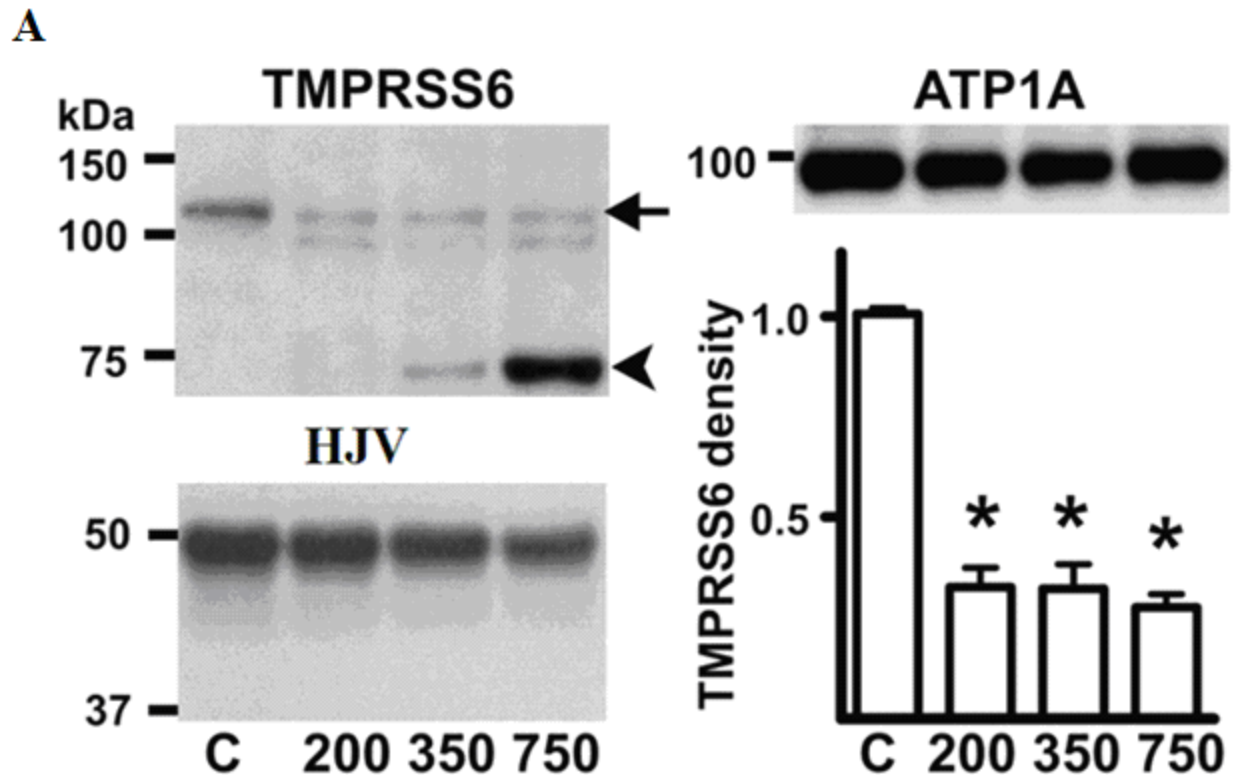
Dále byla podána jednorázově vysoká dávka železa 1000 mg/kg 24 hodin před analýzou. Na úrovni mRNA statisticky významně stoupla pouze exprese *Hamp* (obr. 5D). Naopak exprese *Bmp6* byla signifikantně snížena (obr. 5E). Exprese *Tmprss6* byla podobně jako v předchozím uspořádání nezměněna na úrovni mRNA (obr. 5F), ale snížena na úrovni proteinu (obr. 6B).



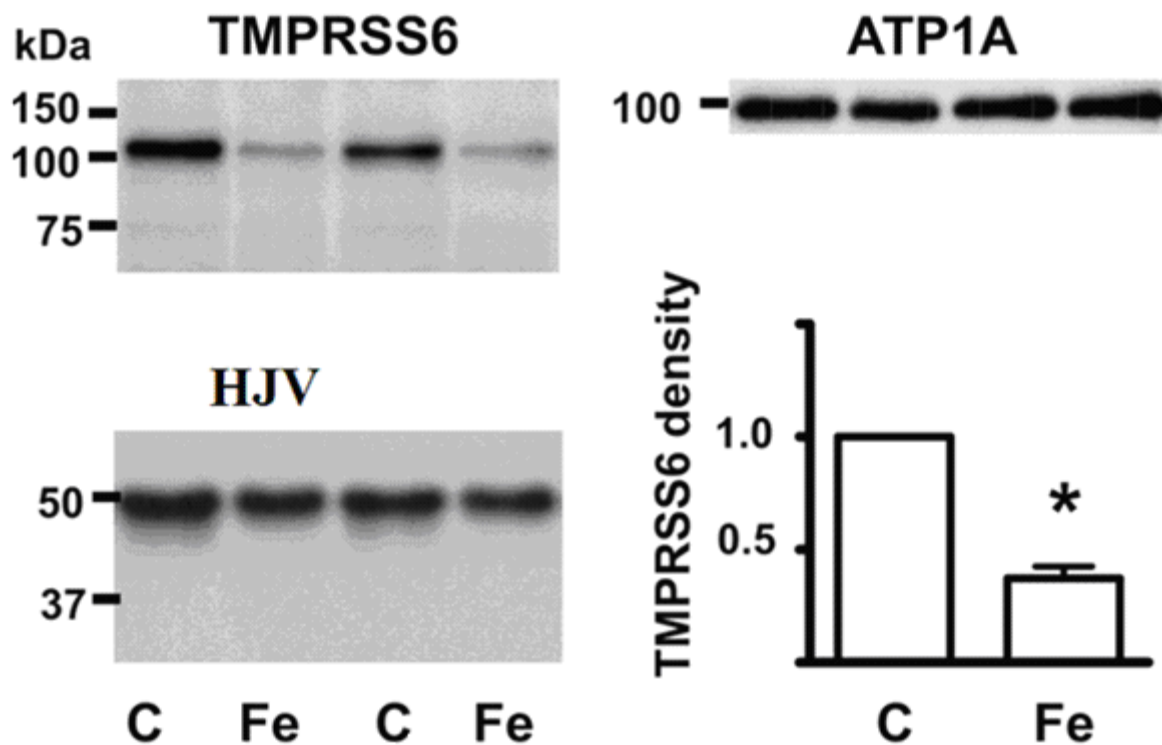


Obr. 5 Efekt podání železa na expresi *Hamp*, *Bmp6* a *Tmprss6* v játrech u myši na úrovni mRNA. C – kontroly; 200, 350, 750 – dávky železa (mg/kg), podání týden před analýzou; 1000 – dávka železa (mg/kg), analýza po 24 h. Vyjádřeno jako relativní exprese k *Actb*.

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



B



Obr. 6 (A) Vliv podávání železa (200, 350 a 750 mg/kg) na množství proteinu TMPRSS6 a HJV v játrech u myší, 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 myší, stanovený imunoblotem. Jako kontrola nanášení byl použit protein ATP1A.

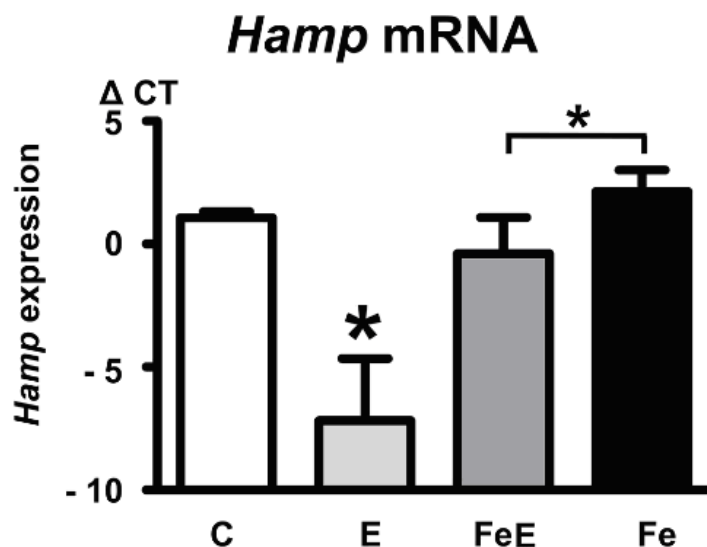
*) statisticky signifikantní rozdíl proti kontrolám ($p < 0,05$; $n = 4$)

4.2 Vliv erythropoetinu na expresi erytoferronu a matriptázy-2 u potkanů

4.2.1 Exprese vybraných genů regulační dráhy BMP/ SMAD

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. 5).



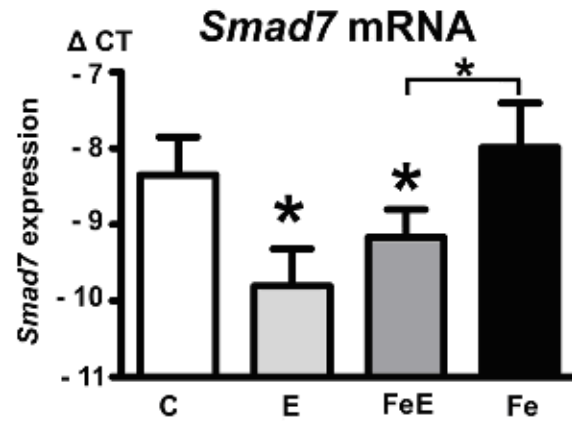
Obr. 5 Změny exprese *Hamp* po aplikaci EPO (E), jeho kombinaci s železem (FeE) a samotného železa (Fe) ve srovnání s kontrolami (C). Vyjádřeno jako průměr ± SD pro Δ CT (rozdíl CT pro referenční gen *Actb* a CT cílového genu).

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

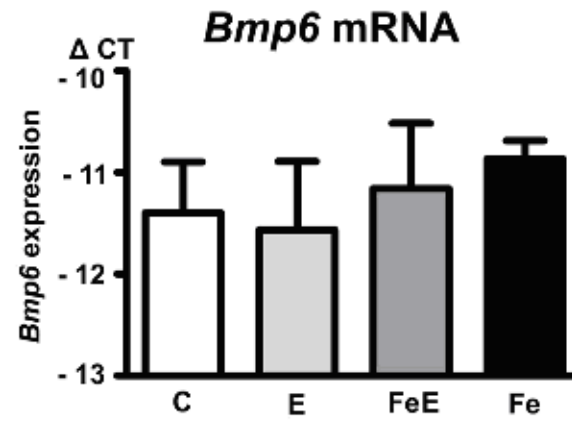
Podání EPO snižuje expresi *Smad7* a *Id1* v játrech na úrovni mRNA i množství proteinu pSMADs, ale nemění expresi *Bmp6* a množství proteinu HJV

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. 6A,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. 6D), což korespondovalo s výsledky RT-PCR. Množství proteinu HJV se nezměnilo (obr. 6E).

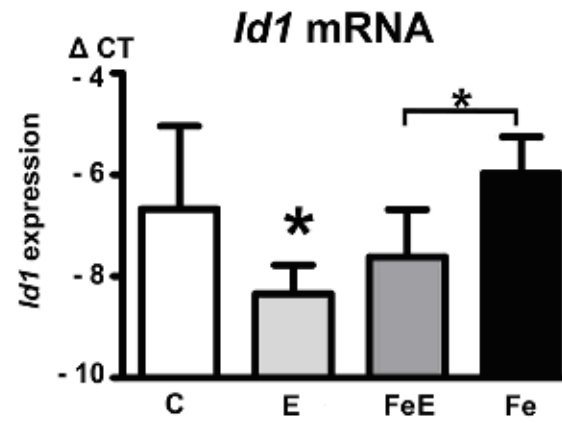
A

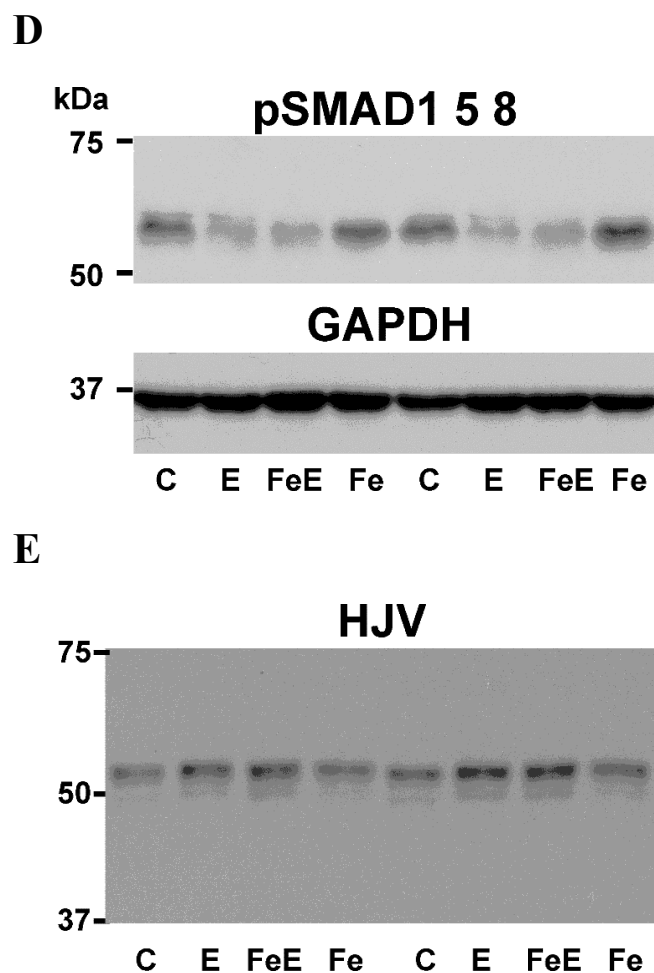


B



C





Obr. 6 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 ($p < 0,05$; $n = 6$)

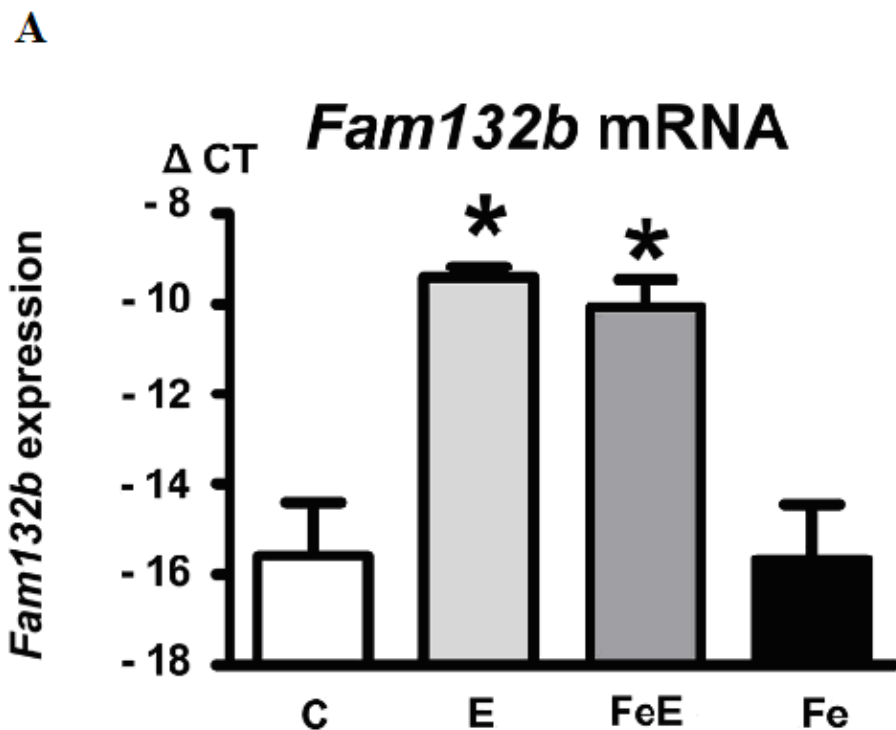
4.2.2 Expres a množství proteinů regulačních genů pro erytoferron a matriptázu-2

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

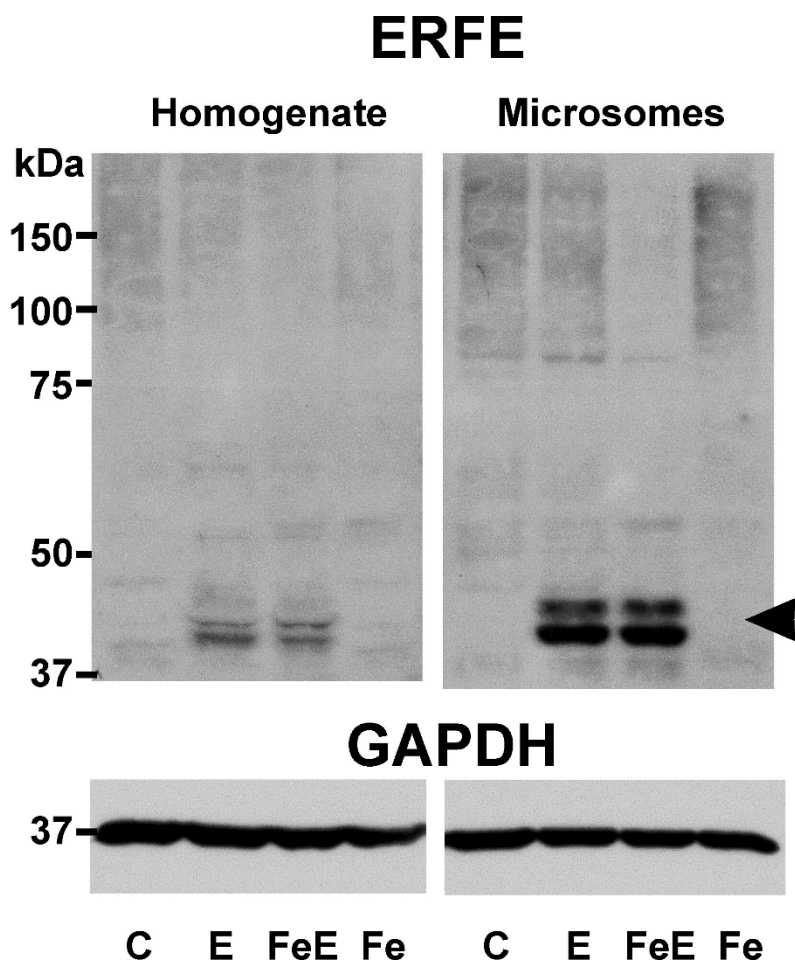
Podávání samotného EPO a v kombinaci se železem statisticky významně zvýšilo expresi *Fam132b* na úrovni mRNA i proteinu (obr. 7).

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

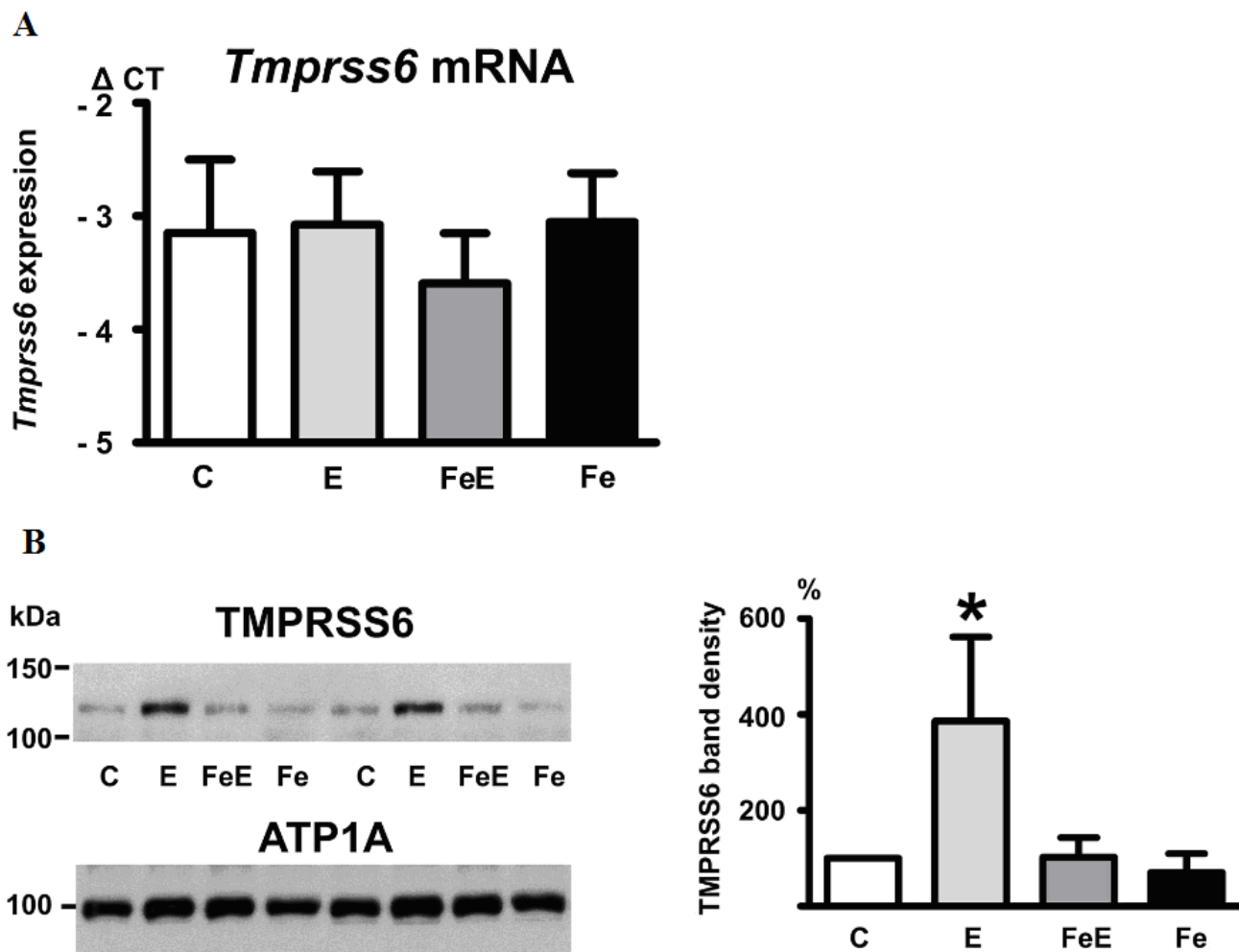


Obr. 7 Změny exprese *Fam132b* na úrovni mRNA (A) a na úrovni proteinu ERFE (B) po aplikaci erythropoetinu (E), jeho kombinaci se železem (FeE) a samotného železa (Fe) ve srovnání s kontrolami (C). Šipka (B) označuje specifický proužek proteinu ERFE. Expres vyjádřeny jako průměr ± SD pro Δ CT (rozdíl CT pro referenční gen *Actb* a CT cílového genu). Jako kontrola nanášení byl použit protein GAPDH.

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

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

Expres *Tmprss6* v játrech nebyla na úrovni mRNA ovlivněna podáním EPO, železa ani jejich kombinací (obr. 8A). 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. 8B).



Obr. 8 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 \pm 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 v organismu je důležitý proces, který umožňuje získávat a distribuovat přiměřené množství železa a zároveň chránit organismus před jeho toxicitou. Klíčovým regulátorem je hepcidin, peptid tvořený v játrech, který inhibuje výstup železa z buněk, snižuje vstřebávání železa ve střevě i jeho recyklaci v makrofázích (Nicolas et al., 2001). Expresi hepcidinu ovlivňují nadbytek či nedostatek železa, zánět a erytropoéza. Jejich prostřednictvím a vzájemnou interakcí jejich signálních drah jsou exprese hepcidinu a následně metabolismus železa ovlivněny mnoha fyziologickými i patologickými faktory (Muckenthaler et al. 2017).

V předložené práci jsem se zabývala studiem erytroidní regulační dráhy, zejména nových regulátorů exprese hepcidinu – matriptázy-2 a erytroferronu – a jejich propojením s dalšími regulačními drahami, zejm. drahou BMP/ SMAD, která tvoří centrální regulační dráhu zvyšující transkripci hepcidinu železem. Erytropoéza výrazně snižuje expresi hepcidinu, mechanismy této regulace nejsou jednoznačně probádány, z našich pokusů i z pokusů dalších skupin vyplývá (Vokurka et al., 2006; Pak et al., 2006), že nejde o přímý účinek erythropoetinu (EPO).

Matriptáza-2 (MT-2) je transmembránová serinová proteáza typu II kódovaná u lidí genem *TMPRSS6* (u myši *Tmprss6*) a exprimovaná v játrech převážně v hepatocytech (Finberg et al., 2008). Svou proteolytickou aktivitou představuje výrazný negativní regulátor exprese hepcidinu, což by z ní mohlo tvořit klíčové místo, na kterém by se regulace pomocí jednotlivých drah včetně erytroidní mohly setkávat. Erytroferron (ERFE) je solubilní negativní regulátor hepcidinu kódovaný genem *Fam132b* (Kautz et al., 2014b) a produkován erytroblasty. Myši ERFE^{-/-}, podobně jako myši s deficitem MT-2, nejsou schopny snížit expresi hepcidinu po erytroidní stimulaci.

Dostupnost spolehlivé metody pro stanovení MT-2 a validace protilátky proti ERFE nám umožnily studovat, jak se MT-2 zapojuje do hierarchie regulace hepcidinu a jaké je možné vzájemného propojení a role MT-2 a ERFE v erytroidní regulaci 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).

V našich experimentech jsme podávali experimentálním zvířatům (myším a potkanům) železo, erythropoetin, jejich kombinaci a nízkoželeznou dietu. Studovali jsme expresi hepcidinu, MT-2 a ERFE a další regulačních molekul (BMP6, HJV) pomocí real-time PCR a imunoblotů.

Podání EPO, železa ani nízkoželezná dieta nezměnilo v našich experimentech expresi MT-2 na úrovni mRNA, a to ani u myši, ani u potkana, ale pozorovali jsme změny MT-2 na úrovni proteinu. Po nízkoželezná dietě a podání EPO došlo k zvýšení proteinu. Podání vysokých dávek železa naopak množství MT-2 snížilo. Předpokládáme proto, že EPO neovlivňuje expresi MT-2 na transkripční úrovni, ale že tato regulace se děje až na úrovni posttranskripční.

V dalších pokusech jsme se pokusili potvrdit, zdali i u potkanů předchozí podání železa rovněž zabrání poklesu exprese hepcidinu a zejména to, jak tato kombinace ovlivní expresi MT-2 a ERFE, a co z toho vyplývá pro regulaci hepcidinu. Podání EPO v našich experimentech zvýšilo expresi ERFE, podání železa ji však neovlivnilo, a to ani samostatně, ani v kombinaci s EPO. Na druhou stranu předchozí podání železa zablokovalo výrazný pokles exprese hepcidinu po podání EPO, i když tato exprese je signifikantně nižší než při podání samotného železa, které expresi zvyšuje. To znamená, že ačkoliv v našem uspořádání předchozí podání železa utlumí výrazný pokles exprese hepcidinu, přesto erytroidní stimulace dokáže částečně expresi hepcidinu ovlivnit. Dá se předpokládat, že železo nějakým způsobem interferuje nikoliv přímo s produkcí ERFE, nýbrž s jeho signalizací či dalšími zapojenými mechanismy.

Podání EPO nedokáže rychle snížit expresi hepcidinu u ERFE +/- myši, protože chybí prvotní stimul („upstream“ faktor) této regulace, erytroferron. Dalším faktorem, který zabraňuje poklesu hepcidinu po EPO, je chybění matripázy-2 (Nicolas et al., 2011); 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 v našich experimentech klesl i bez zvýšení MT-2 a beze změny obsahu železa v játrech. To by nasvědčovalo tomu, že MT-2 může mít roli v dlouhodobější erytroidní regulaci hepcidinu a může být místem či jedním z míst, kde se erytroidní i zásobní regulační systém setkávají.

Pokud je před stimulací erythropoézy EPO podáno velké množství železa, produkce ERFE zůstává zvýšena a produkty stimulace dráhy BMP/ SMAD 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.

Při stimulované (stresové) erythropoéze podáním EPO se výrazně stimuluje ERFE, ale zároveň se mění metabolismus železa, což je patrné na množství železa v játrech i na ovlivnění klíčové dráhy BMP/ SMAD, která je v tomto případě rovněž inhibována. Mechanismus působení ERFE je dán zásahem do dráhy BMP/ SMAD. 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. 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. Je tedy patrné, že regulace se částečně může lišit při krátkodobé a dlouhodobé stimulaci erythropoézy, což z biologického hlediska (např. zvládnání závažnějšího krvácení) může dávat smysl. 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 erytoferronu, 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. POUŽITÁ LITERATURA

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. BRISSOT P, CAVEY T, ROPERT M, GUGGENBUHL P, LOREAL O: Genetic hemochromatosis: Pathophysiology, diagnostic and therapeutic management. *Presse Med*. **46**: e288-e295, 2017.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. FINCH C: Regulators of iron balance in humans. *Blood*. **84**: 1697-1702, 1994.
11. 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.
12. HEENEY MM, FINBERG KE: Iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Hematol Oncol Clin North Am*. **28**: 637-652, v, 2014.

13. 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.
14. 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.
15. KIM A, NEMETH E: New insights into iron regulation and erythropoiesis. *Curr Opin Hematol.* **22**: 199-205, 2015.
16. 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.
17. 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.
18. MIYAKE T, KUNG CK, GOLDWASSER E: Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem.* **252**: 5558-5564, 1977.
19. MUCKENTHALER MU, RIVELLA S, HENTZE MW, GALY B: A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell.* **168**: 344-361, 2017.
20. NEMETH E, GANZ T: Anemia of inflammation. *Hematol Oncol Clin North Am.* **28**: 671-681, vi, 2014.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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 matrilysin-2 deficiency? *Br J Haematol.* **152**: 498-500, 2011.
28. 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.
29. PAK M, LOPEZ MA, GABAYAN V, GANZ T, RIVERA S: Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood.* **108**: 3730-3735, 2006.

30. 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 hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem.* **276**: 7811-7819, 2001.
31. RAVASI G, PELUCCHI S, BUOLI COMANI G, GRENI F, MARIANI R, PELLONI I, BOMBELLI S, PEREGO R, BARISANI D, PIPERNO A: Hepcidin regulation in a mouse model of acute hypoxia. *Eur J Haematol.* **100**: 636-643, 2018.
32. RISHI G, SUBRAMANIAM VN: The relationship between systemic iron homeostasis and erythropoiesis. *Biosci Rep.* **37**, 2017.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. WEISS G, GOODNOUGH LT: Anemia of chronic disease. *N Engl J Med.* **352**: 1011-1023, 2005.
38. WRIGHTING DM, ANDREWS NC: Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood.* **108**: 3204-3209, 2006.

8. Seznam publikací

1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace:

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.bcmd.2017.02.007. Epub 2017. IF = 1.836 (2017)

2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace:

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 mice.*” PLoS One. 2017 Oct 26; 12(10):e0186844. doi:10.1371/journal.pone.0186844. eCollection 2017. IF = 2.766 (2017)