

003

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BIOCHEMIE



# DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Praha 2006**

**Kamila Balušíková**

Přírodovědecká fakulta UK  
KNIHOVNA CHEMIE



323326956

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BIOCHEMIE

**Vliv dostupnosti sloučenin železa na expresi molekul  
zúčastněných v transportu netransferinových iontů železa:  
*In vitro* studie na lidských buněčných liniích  
K562 a Caco-2.**

Diplomová práce

**Kamila Balušíková**

**Školitel: Doc. RNDr. Jan Kovář, DrSc.**

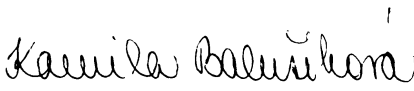
Oddělení buněčné a molekulární biologie ÚCBO  
3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova

Praha 2006

## Prohlášení

**Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Doc. RNDr. Jana Kováře, DrSc. a MUDr. Markéty Čimburové, PhD. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.**

V Praze dne 3. 5. 2006

  
Kamila Balušíková

## **Poděkování**

**Ráda bych poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Janu Kovářovi, DrSc. za možnost vypracování této práce a odborné vedení, MUDr. Markétě Čimburové, PhD. za všestrannou pomoc, a to především s metodickou částí mé práce.**

**Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Pavlíně Čejkové a dalším kolegům z laboratoře, kteří byli vždy ochotni mi poradit a předat své zkušenosti.**

**Mé díky patří nejenom kolegům, ale celému oddělení za vytvoření velice přátelského prostředí a trpělivost, kterou se mnou při mé práci, a nejenom při ní, měli.**

**V neposlední řadě chci poděkovat svým rodičům za podporu, kterou mi během celého studia poskytovali.**

## Obsah

<b>Seznam zkratk</b> .....	8
<b>1. Úvod</b> .....	9
<b>2. Literární přehled</b> .....	12
<b>2.1. Metabolismus a transport iontů železa v lidském organismu a jeho buňkách</b> .....	12
<b>2.1.1. Biologický a biochemický význam iontů železa</b> .....	12
<b>2.1.2. Absorpce iontů železa ve střevě</b> .....	13
2.1.2.1. Regulace absorpce iontů železa ze střeva .....	14
<b>2.1.3. Transport iontů železa</b> .....	15
2.1.3.1. Transpor transferrinových iontů železa .....	15
2.1.3.2. Transport netransferrinových iontů železa .....	16
<b>2.1.4. Uskladňování iontů železa v buňkách</b> .....	17
2.1.4.1. Volné ionty železa .....	17
2.1.4.2. Hemoglobin .....	18
2.1.4.3. Fe-S bílkoviny .....	18
2.2.4.4. Ferritin .....	18
2.2.4.5. Hemosiderin .....	19
<b>2.2. Molekuly transportu netransferrinových iontů železa přes plazmatickou membránu</b> .....	19
<b>2.2.1. DMT1</b> .....	19
<b>2.2.2. Dcytb</b> .....	20
<b>2.2.3. Ferroportin 1</b> .....	20
<b>2.2.4. Hefestin</b> .....	20
<b>2.2.5. Ceruloplasmin</b> .....	21
<b>2.2.6. Úloha molekul transportu iontů železa v jednotlivých typech buněk</b> .....	21
2.2.6.1. Buněčná linie Caco-2 jako model střevních enterocytů .....	21
2.2.6.2. Buněčná linie K562 jako model neenterocytárních buněk .....	21
<b>2.3. Regulace exprese molekul transportu iontů železa</b> .....	21
<b>2.4. Poruchy metabolismu a transportu iontů železa</b> .....	23

2.4.1. Deficit iontů železa v organismu .....	23
2.4.2. Přetížení organismu ionty železa .....	24
<b>3. Cíl práce .....</b>	<b>26</b>
<b>4. Materiál a metody .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1. Použitý materiál a chemikálie .....</b>	<b>27</b>
4.1.1. Buněčné linie .....	27
4.1.2. Použité sondy .....	27
4.1.3. Použité primery .....	27
4.1.4. Použité soupravy .....	28
4.1.5. Další chemikálie a materiál .....	28
4.1.6. Tkáňová voda, roztoky a media .....	29
4.1.6.1. Tkáňová voda .....	29
4.1.6.2. Roztoky .....	29
4.1.6.3. Media .....	30
<b>4.2. Použité přístroje .....</b>	<b>32</b>
<b>4.3. Metody .....</b>	<b>33</b>
<b>4.3.1. Kultivace buněk .....</b>	<b>33</b>
4.3.1.1. Kultivace adherentních buněk .....	33
4.3.1.2. Kultivace suspenzních buněk .....	34
4.3.1.3. Detekce mykoplasmy .....	34
<b>4.3.2. Experimentální podmínky .....</b>	<b>35</b>
4.3.2.1. Počítání buněk .....	35
4.3.2.2. Vysetí buněk .....	35
<b>4.3.3. Izolace RNA .....</b>	<b>36</b>
<b>4.3.4. Reverzní transkripce (RT) .....</b>	<b>37</b>
<b>4.3.5. „Real-Time“ PCR (PCR – polymerázová řetězová reakce) .....</b>	<b>37</b>
4.3.5.1. PCR .....	38
4.3.5.2. „Real-Time“ PCR .....	38
<b>5. Výsledky .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1. Vliv deprivace iontů železa na expresi molekul zúčastněných v transportu iontů železa .....</b>	<b>44</b>

<b>5.1.1. Vliv deprivace iontů železa na expresi molekul zúčastněných v transportu iontů železa u buněk lidské erytroleukemické linie K562 .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1.2. Vliv deprivace iontů železa na expresi molekul zúčastněných v transportu iontů železa u buněk lidské linie kolorektálního karcinomu Caco-2 .....</b>	<b>47</b>
<b>5.2. Vliv vysokých hladin netransferinových iontů železa na expresi molekul zúčastněných v transportu iontů železa .....</b>	<b>55</b>
<b>5.2.1. Vliv vysokých hladin netransferinových iontů železa na expresi molekul zúčastněných v transportu iontů železa u buněk lidské erytroleukemické linie K562 .....</b>	<b>55</b>
<b>5.2.2. Vliv vysokých hladin netransferinových iontů železa na expresi molekul zúčastněných v transportu iontů železa u buněk lidské linie kolorektálního karcinomu Caco-2 .....</b>	<b>59</b>
<b>5.3. Vliv ethanolu na expresi molekul zúčastněných v transportu iontů železa .....</b>	<b>66</b>
<b>5.3.1. Vliv ethanolu na expresi molekul zúčastněných v transportu iontů železa u buněk lidské linie kolorektálního karcinomu Caco-2 .....</b>	<b>66</b>
<b>6. Diskuse .....</b>	<b>71</b>
<b>6.1. Experimentální model .....</b>	<b>71</b>
<b>6.2. Vliv deprivace iontů železa na expresi molekul účastnících se transportu iontů železa .....</b>	<b>72</b>
<b>6.2.1. Vliv deprivace iontů železa na expresi molekul účastnících se transportu iontů železa u buněk K562 .....</b>	<b>72</b>
<b>6.2.2. Vliv deprivace iontů železa na expresi molekul účastnících se transportu iontů železa u buněk Caco-2 .....</b>	<b>73</b>
<b>6.3. Vliv vysokých hladin netransferinových iontů železa na expresi molekul transportu iontů železa .....</b>	<b>74</b>
<b>6.3.1. Vliv vysokých hladin netransferinových iontů železa na expresi molekul transportu iontů železa u buněk K562 .....</b>	<b>74</b>
<b>6.3.2. Vliv vysokých hladin netransferinových iontů železa na expresi molekul transportu iontů železa u buněk Caco-2 .....</b>	<b>74</b>

---

<b>6.4. Vliv ethanolu na expresi molekul účastnících se transportu iontů železa</b> .....	75
<b>6.4.1. Vliv ethanolu na expresi molekul účastnících se transportu iontů železa u buněk Caco-2</b> .....	75
<b>6.5. Pokračování studie</b> .....	76
<b>7. Závěr</b> .....	77
<b>8. Seznam použité literatury</b> .....	79



**Seznam zkratek**

ATP	Adenosintrifosfát
cDNA	Komplementární deoxyribonukleová kyselina („complementary DNA“)
DAPI	4,6-diamidino-2-fenylindol
DCT1	„Divalent cation transporter 1“
Dcytb	„Duodenal cytochrom b-like“
DMT1	„Divalent metal transporter 1“
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	Dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina („doublestrand DNA“)
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
EtOH	Ethanol
FBS	Fetální bovinní sérum
FeC	Medium obsahující citrát železitý
HCP1	„Heme carrier protein 1“
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
HHC	Hereditární hemochromatóza
IRE	„Iron responsive element“
Ireg1	„Iron regulated transporter 1“
IRP	„Iron regulatory protein“
JH	Juvenilní hemochromatóza
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina („messenger RNA“)
MTP1	„Metal transporter protein 1“
NRAMP	„natural resistance-associated macrophage protein“
PBS	Fosfátový pufr („phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerázová řetězová reakce („polymerase chain reaction“)
RNA	Ribonukleová kyselina
RT	Reverzní transkripce
SDS	Sekvenční detekční systém
Tf	Transferin
TfR	Transferinový receptor

## 1. Úvod

Železo patří mezi mikroelementy neboli stopové prvky. V těle dospělého člověka je ho přítomno necelých 5 g jako součást různých sloučenin. Ionty železa jsou nezbytné pro všechny buňky našeho organismu. Jejich hlavní funkcí je přenos kyslíku (jako hemový kofaktor v hemoglobinu a myoglobinu) a enzymatický transport elektronů díky schopnosti přecházet z trojmocného stavu  $\text{Fe}^{3+}$  na dvojmocný  $\text{Fe}^{2+}$ , a naopak (v cytochromech, jako součást ribonukleotid reduktasy a enzymů pracujících s oxidovými radikály). Stejná vlastnost je však příčinou i jejich toxicity. Ionty železa katalyzují tzv. Fentonovu reakci, během které je  $\text{H}_2\text{O}_2$  přeměňován na nebezpečný volný radikál OH. Volné radikály vzniklé touto cestou poškozují buněčné membrány, proteiny a DNA [1], [2].

Udržování rovnováhy iontů železa je důležité pro správné fungování organismu. V organismu se nevyskytují žádné regulační mechanismy zajišťující vylučování iontů železa játry nebo ledvinami. Ionty železa jsou vylučovány především krvácením a odlupováním odumřelých epiteliálních a kožních buněk. Proto je přísně kontrolována absorpce iontů železa. Pouze malá část iontů železa obsažených ve stravě je absorbována.

Ionty železa přijímané z potravy nacházíme v hemové a nehemové formě. Jejich absorpce probíhá přes apikální povrch duodenálních enterocytů odlišnými mechanismy. Hemové ionty železa jsou absorbovány do enterocytů pomocí specifického hemového receptoru. Nehemové ionty železa se primárně vyskytují v oxidované  $\text{Fe}^{3+}$  formě, která musí být před transportem přes epiteliální membránu nejprve redukována na  $\text{Fe}^{2+}$  formu. Zde působící ferrireduktasa je v membráně vázaný protein Dcytb („duodenal cytochrom b-like“).  $\text{Fe}^{2+}$  je poté transportován do buněk membránovým přenašečem označovaným DMT1 („divalent metal transporter 1“), který dovede transportovat  $\text{Fe}^{2+}$  pouze z kyselého prostředí. Transport iontů železa z buňky do krevního řečiště zajišťuje ferroportin 1, což je opět transmembránový protein nacházející se v bazolaterální membráně enterocytů. Železnaté ionty transportované ferroportinem 1 jsou následně zpětně oxidovány membránovou ferroxidasou hefestinem případně plazmatickou ferroxidasou ceruloplasminem. Železité ionty se nyní mohou navázat na plazmatický transferin, který zajišťuje jejich další transport [3].

Díky novým poznatkům v mechanismu vstřebávání a transportu iontů železa můžeme alespoň částečně poznat příčiny poruch regulace hladiny iontů železa v organismu.

Nedostatek iontů železa v organismu může být způsoben zvýšenými ztrátami, nadměrnými požadavky organismu nebo neadekvátním množstvím iontů ve stravě. Na druhé straně přetížení organismu ionty železa nastává obvykle v důsledku genetické poruchy a vede k chronickému zvýšení absorpce iontů železa z potravy. Typickým příkladem genetické predispozice k přetížení organismu ionty železa je onemocnění zvané hereditární hemochromatóza, jež může vést až k orgánové dysfunkci, jako je cirrhóza, artritida, hypogonadismus, diabetes mellitus a kardiomyopatie. Zvýšené množství iontů železa v těle může být také způsobeno intenzivní terapií, obvykle velmi častými krevními transfuzemi [2].

Předmětem našeho zájmu je transportní mechanismus nehemových iontů železa zprostředkovaný molekulami DMT1, Dcytb, ferroportinem 1, hefestinem a ceruloplasminem, který umožňuje příjem iontů železa z potravy až po jeho navázání na cytoplazmatický transferin.

Zaměřili jsme se na zmíněných pět molekul účastnících se transportu netransferinových iontů železa. Cílem bylo zjistit, jak při nefyziologických hladinách iontů železa v organismu dochází k regulaci jejich příjmu těmito proteiny, konkrétně na základě změny exprese těchto proteinů. V případě, že se exprese těchto proteinů výrazně změní v závislosti na dostupnosti iontů železa v organismu, nabízela by se možnost využití těchto poznatků v diagnostice a terapii onemocnění spojených s poruchou metabolismu iontů železa.

Náš projekt byl proto zaměřen na sledování vlivu dostupnosti iontů železa na expresi molekul zúčastněných v transportu netransferinových iontů železa. Expresi jsme sledovali na úrovni mRNA pomocí metody „Real-Time“ PCR (polymerázová řetězová reakce) s reverzní transkripcí v *in vitro* studii na lidských buněčných liniích K562 a Caco-2. K562 jsou buňky lidské erytroleukemie. Jsou modelem neenterocytárních buněk a představují významné utilizátory iontů železa. Caco-2 jsou buňky lidského kolorektálního karcinomu. Představují model enterocytárních buněk s odlišnou apikální a bazální membránou. Hladinu exprimované mRNA jsme ovlivňovali množstvím iontů železa přítomných v mediu, což mělo alespoň částečně simulovat zvýšení či snížení hladiny těchto iontů v organismu při nemocech spojených s poruchou jejich metabolismu.

Tato práce byla vypracována v laboratořích Oddělení buněčné a molekulární biologie ÚCBO na 3. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze v letech 2004 – 2006.

Práce byla částečně financována z výzkumného záměru 3. lékařské fakulty VZ MSM0021620814.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Metabolismus a transport iontů železa v lidském organismu a jeho buňkách

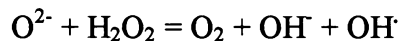
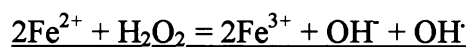
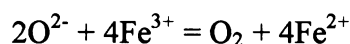
#### 2.1.1. Biologický a biochemický význam iontů železa

Železo je biogenní prvek, který se v biologických systémech nachází ve dvou stabilních oxidačních stavech, jako iont železitý ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a železnatý ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Jako nestabilní meziprodukt v průběhu některých reakcí se také může vyskytovat ve formě čtyřmocné ( $\text{Fe}^{4+}$ ) a šestimocné ( $\text{Fe}^{6+}$ ). Z faktorů ovlivňujících redoxní rovnováhu železa ve vodném roztoku jsou nejdůležitější především pH, saturace kyslíkem, iontové složení roztoku a přítomnost ligandů se snahou vytvářet komplexy s dvojmocnými či trojmocnými ionty železa. Za fyziologických podmínek podléhá dvojmocné železo rychlé oxidaci a trojmocné železo vytváří nerozpustné, biologicky nedostupné hydroxidy. Rovnovážná koncentrace volného trojmocného železa je za těchto podmínek vlivem tvorby a polymerace těchto hydroxidů extrémně nízká, což znamená prakticky nepřítomnost volného  $\text{Fe}^{3+}$  v biologických systémech. Buňka nebo organismus tak musí udržovat ionty železa v rozpustné podobě vytvářením komplexů se specifickými nízkomolekulárními či vysokomolekulárními ligandy.

Pravděpodobně nejdůležitější vlastností železa jako biokatalyzátoru je jeho schopnost existence ve dvou stabilních oxidačních stavech, a tedy schopnost fungovat jako donor nebo akceptor elektronu, tedy jako redoxní činidlo. Redoxní síla je závislá na typu ligandu, se kterým je iont železa v komplexu [4]. Železo se účastní přenosu kyslíku (hemoglobin, myoglobin), je aktivní součástí bílkovin elektrontransportního řetězce (Fe-S bílkoviny a cytochromy), podílí se na procesech oxidativní fosforylace (mitochondriální akonitasa, sukcinát dehydrogenasa), syntézy DNA (ribonukleotidreduktasa), katalýzy oxidací (oxidasy) a na druhé straně rozkladu kyslíkových derivátů (superoxid dismutasa). Podílí se rovněž na fixaci dusíku a vodíku (nitrogenasy, hydroxylasy) a na mnoha dalších reakcích.

Stejné vlastnosti iontů železa, které jsou pro organismus výhodné, mohou být na druhé straně zdrojem jeho poškození. Redoxní reakce iontů železa se podílí na tvorbě volných vysoce reaktivních toxických radikálů, z nichž nejtoxičtější je hydroxylový radikál  $\text{OH}^{\cdot}$ ,

který vzniká reakcí mezi superoxidovým aniontem a peroxidem vodíku, tzv. Fentonova reakce:



Tuto reakci ionty železa mnohonásobně urychlují jako katalyzátor. Hydroxylový radikál může způsobovat peroxidaci lipidů s následným poškozením buněčných membrán a rovněž poškození DNA. Peroxidace lipidů volnými radikály je považována za hlavní příčinu poškození organismu při přetížení ionty železa [5], [6].

### 2.1.2. Absorpce iontů železa ve střevě

Pro získávání nerozpustných forem železa z prostředí vyvinuly organismy různé mechanismy, jejichž podstata vždy spočívá v některém ze tří fyzikálně-chemických přístupů nebo v jejich kombinaci. Jde o okyselení prostředí, redukci iontů železa a tvorbu specifických ligandů s velmi vysokou afinitou pro ionty železa a receptorů či transportérů pro jejich komplexy s ionty železa [7].

Savci získávají ionty železa vstřebáváním z potravy přes střevní enterocyty. Existují dva hlavní molekulární mechanismy vstřebávání iontů železa ze střeva. Jedná se o vstřebávání ve formě anorganických sloučenin nebo hemu. Absorpci netransferinových iontů železa do enterocytů předchází jejich redukce z železitých na ionty železnaté. Tuto redukci zajišťuje membránová ferrireduktasa Dcytb („duodenal cytochrome b-like“) [8]. Jakmile jsou železité ionty zredukovány na železnaté, jsou transportovány do buněk pomocí transportní molekuly DMT1 („divalent metal transporter 1“), dříve NRAMP2 nebo DCT1 [9], [10]. Redukce iontů železa může probíhat současně s translokací. Na rozdíl od hemových iontů železa je absorpce netransferinových iontů železa ovlivněna přítomností řady faktorů, které mohou absorpci ovlivnit jak pozitivně, tak i negativně, takže může kolísat až desetinásobně [11]. Hlavními faktory usnadňujícími absorpci iontů železa jsou kyselina askorbová a bílkoviny nacházející se v mase. S absorpcí železa výrazně interferují např. vaječný bílek, kravské mléko a hlavně fytáty (organické soli fosforu), obsažené v rostlinné stravě. Polyfenoly obsažené v kávě, čaji a víně rovněž inhibují vstřebávání iontů železa [12].

Hem je transportován do enterocytů odlišným mechanismem. Absorpce hemu byla zpočátku přisuzována pouze pasivní difuzi, nicméně pozdější studie poukazují na možnou přítomnost hemového receptoru na apikální buněčné membráně [13]. Nejnovější práce tuto teorii potvrzují. Při studii na myším duodenu byla potvrzena přítomnost intestinálního hemového transportéru, jenž byl označen jako HCP1 („heme carrier protein 1“) [14]. Dále byl identifikován hemový transportér FLVCR („human feline leukemia virus subgroup C receptor“). Jeho role v transportu hemu ve střevě však zůstává nejasná [15]. Jakmile se hem dostane do enterocytů, je metabolizován pomocí hemové oxygenasy, která spolupracuje s cytochrom p450 reduktasou a biliverdin reduktasou. Hem je degradován na volný oxid uhelnatý (CO), ionty železnaté a biliverdin, který je dále redukován na bilirubin [16]. Ionty železnaté zůstávají v enterocytu jako intracelulární zásoba [17].

Přenos iontů železa přes bazální membránu zajišťuje membránový transportér ferroportin 1 [18]. Jedná se opět o přenašeč železnatých iontů. Reoxidaci na železité ionty poté zajišťují membránová ferroxidasa hefeštin [19] a cytoplasmatický plazmatický homolog hefeštinu ceruloplasmin [19]. Reoxidované ionty železité se váží na plazmatický transferin.

#### 2.1.2.1. Regulace absorpce iontů železa ze střeva

Absorpce iontů železa ze střeva je kontrolována několika molekulami včetně DMT1 [9], [10], [20], hepcidinu [21], hemojuvelinu [22] a genu pro hemochromatózu (HFE) [23]. Exprese DMT1 na apikální membráně enterocytů je regulována prostřednictvím specifických vazebných sekvencí nazývaných IRE („iron-responsive element“) lokalizovaných v 3'-nepřekládané oblasti molekuly RNA, na které se váží regulační molekuly označované jako IRPs („iron regulatory proteins“) (viz kapitola regulace exprese) [24]. Další úroveň regulace absorpce iontů železa je hepcidin, což je peptid, který bývá označován jako „železo regulující hormon“ [25]. Zvýšená hladina hepcidinu snižuje intestinální absorpci iontů železa, transport iontů železa přes placentu a uvolňování iontů železa z makrofágů a jaterních zásob [25]. Hemojuvelin je protein kódovaný HFE genem a jeho funkce není doposud přesně známa. Předpokládá se však, že by mohl hrát roli v regulaci funkce hepcidinu [22].

### 2.1.3. Transport iontů železa

Hlavním transportním proteinem pro ionty železa v rámci organismu je u obratlovců transferin, jehož koncentrace v plazmě se pohybuje v rozmezí 22-35  $\mu\text{M}$  [26]. Za fyziologických podmínek je na něj v krvi vázáno 10-30  $\mu\text{mol}$  iontů  $\text{Fe}/\text{l}$ . V menší míře se na transportu iontů železa podílí proteiny jako je ferritin, laktoferin, hemopexin, haptoglobin a albumin.

Netransferinové ionty železa se v organismu vyskytují především ve formě citrátu a ke zvýšení jejich hladiny dochází za patologických stavů. Řada studií *in vivo* a *in vitro* prokázala schopnost buněk získávat ionty železa na transferinu nezávislým transportním mechanismem [27], [28], [29], [30]. Primární funkcí tohoto na transferinu nezávislého transportu iontů železa se zdá být odstraňování netransferinových iontů železa z plazmy při stavech projevujících se přetížením organismu ionty železa, kdy koncentrace iontů železa v plazmě přesáhne vazebnou kapacitu transferinu [31].

#### 2.1.3.1. Transport transferinových iontů železa

Nejrozšířenějším způsobem příjmu železa u většiny buněk obratlovců je příjem prostřednictvím endocytózy komplexu transferin-transferinový receptor. Při extracelulárním pH 7,4 dochází ke zvýhodněné vazbě transferinu na transferinový receptor a shromáždění komplexů pro internalizaci v endosomech. Po internalizaci dochází uvnitř vzniklých endosomů k uvolnění iontů železitých z transferinu, který však zůstává vázán k receptoru. Z něj se uvolní až za neutrálního pH po recyklaci na buněčný povrch [32]. K uvolnění iontů železitých z transferinu dochází díky snížení endosomálního pH pomocí ATP-dependentní protonové pumpy v endosomální membráně. Před dalším transportem uvolněných iontů železa (přes endozomální membránu do cytozolu pomocí DMT1) dochází k jejich redukci z  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$  [33], [34]. Endosomální ferrireduktasa zatím nebyla identifikována, i když se předpokládá, že by se mohlo jednat o Dcytb nebo jemu podobnou molekulu [8].

Transferin (Tf) je plazmatický glykoprotein o molekulové hmotnosti 80 kDa, který s vysokou afinitou váže dva ionty železité [35], [36]. Navázání iontů železitých na transferin může být usnadněno díky ferroxidasové aktivitě ceruloplasminu, přestože apotransferin má vlastní ferroxidasovou aktivitu [37]. Transferin s navázanými ionty



železitými může být vázán buňkami exprimujícími transferinový receptor 1 (TfR1) v plazmatické membráně. Na transferinový receptor 1 se může vázat i transferin s jedním iontem železitým, avšak s mnohem menší afinitou. Vstřebávání iontů železitých z transferinu je kontrolováno expresí TfR1, která je regulována intracelulární hladinou iontů železa přes IRP1 a IRP2.

Kromě TfR1 byl identifikován transferinový receptor 2 (TfR2), který má však nižší afinitu k transferinu [38], [39]. Funkce TfR2 zatím zůstává nejasná. Přesto je známo, že na rozdíl od TfR1 exprese TfR2 není regulována intracelulární hladinou iontů železa [38], [39].

### 2.1.3.2. Transport netransferinových iontů železa

Transport netransferinových iontů železa je využíván především pro absorpci iontů železa intestinálními buňkami a pro transport iontů železa z endozomů do cytoplazmy. Účastní se redistribuce iontů železa do tkání, které nejsou přístupné pro transferin [31]. U neenterocytárních buněk, jež mají na svém povrchu transferinový receptor, funguje transport netransferinových iontů železa vedle transportu endocytózou transferin-transferinového receptoru.

Mechanismus transportu netransferinových iontů železa byl studován u mnoha typů buněk *in vitro*. Přenašeče iontů železa, stejně jako další molekuly podílející se na transportu netransferinových iontů železa byly identifikovány jak v případě enterocytů, tak v případě neenterocytárních buněk.

Ionty železa jsou před transportem přes plazmatickou membránu do buněk nejprve redukovány z trojmocné na dvojmocnou formu membránovou ferireduktasou Dcytb (u enterocytárních buněk se nachází v apikální membráně). Transport přes plazmatickou membránu je uskutečněn pomocí přenašeče DMT1. Transportu iontů železa ven z buněk se účastní transmembránový protein ferroportin 1 (u enterocytů na bazální straně membrány). Transportované dvojmocné ionty železa jsou dále oxidovány na trojmocné transmembránovou ferroxidasou hefestinem, popř. jeho cytoplazmatickým analogem ceruloplasminem. Trojmocné ionty železa jsou pak následně vázány na transferin.

Existují však dobré důvody domnívat se, že kromě DMT1 se na absorpci iontů železa podílí i další molekuly [40], [41]. Jednou z těchto molekul je melanotransferin. Melanotransferin je transferinový homolog, který obsahuje jedno vazebné místo pro ionty

železa. Je zakotven do buněčné membrány pomocí glykosylfosfatidylinozitolové kotvy [42]. Molekula je zvýšeně exprimována v buňkách melanomu. Vyvazuje ionty železa z komplexů citrátu železitého. Studie *in vitro* však jeho roli v internalizaci iontů železa nepotvrdily [43], [44]. Dále laktoferin, další člen transferinové rodiny, může hrát roli v usnadnění absorpce iontů železa [45]. Jako další možnost byla popsána absorpce iontů železa z lumen tenkého střeva, které se účastní řetězec mucin,  $\beta 3$  integrin, mobilferin [46], [47], [48]. Nově zvažované je zapojení myšího lipokalinu/lidského NGAL („neutrophil gelatinase-associated lipocalin“) a jejich receptorů [40], [49].

V případě endosomů, po internalizaci iontů železa endocytózou komplexu transferin-transferinový receptor a po jejich uvolnění díky okyselení prostředí, je dvojmocné železo transportováno do cytoplazmy pomocí transmembránového přenašeče DMT1 [50], [20]. Tomuto transportu předchází redukce železitých iontů na železnaté pomocí endosomální ferrireduktasy.

#### 2.1.4. Uskladňování iontů železa v buňkách

Ionty železa se ze všech stopových biogenních iontů kovů vyskytují v organizmu v nejvyšším množství, což znamená asi 35 mg/kg u žen a 45 mg/kg u mužů. Největší podíl celkového množství iontů železa v organizmu je obsažen v hemoglobinu (60 – 70%), asi 10% je součástí myoglobinu, cytochromů a jiných enzymů, asi 20 – 30% tvoří zásobu v podobě vazby na ferritiny, méně než 1% je obsaženo v krvi.

##### 2.1.4.1. Volné ionty železa

Volné ionty železa v cytoplazmě jsou potenciálně toxické. Buňky mohou tuto toxicitu eliminovat v podstatě třemi způsoby [51]:

1. volné ionty železa jsou distribuovány do různých kompartmentů, kde je dále využíváno k syntéze důležitých proteinů, ovlivňujících získávání energie, detoxikaci volných radikálů, proliferaci, diferenciaci a řadu dalších buněčných funkcí. Velmi důležitými kompartmenty utilizace nitrobuněčných iontů železa jsou například mitochondrie, kde probíhají reakce Krebsova cyklu se syntézou ATP, dále buněčné jádro, lysosomy s ionty železa obsahujícími enzymy aj.;

2. volné cytoplazmatické ionty železa jsou exportovány z buňky, tento pochod je relativně dobře prozkoumán u enterocytů, existence mechanismů exportu iontů železa se však předpokládá ve všech buňkách;
3. nevyužité nebo nevyložené ionty železa jsou uloženy do depotů.

#### 2.1.4.2. Hemoglobin

Hemoglobin je nejhojněji se vyskytující protein vázající železo v lidském těle. Jeho nejvyšší koncentrace nalezneme v červených krvinkách. Zralá červená krvinka obsahuje přibližně 640 milionů molekul hemoglobinu. Lidský hemoglobin je složen ze čtyř polypeptidických globinových řetězců, na každý z řetězců je navázána prostetická hemová skupina. V průběhu ontogeneze dochází k expresi celkem 6 typů podjednotek. Většina hemoglobinu u dospělých se skládá ze dvou podjednotek  $\alpha$  a dvou  $\beta$ . Některé genetické poruchy syntézy hemoglobinu mají za následek vznik těžkých hemoglobinopatií, jako jsou talasemie nebo srpkovitá anemie. Syntéza hemu probíhá zčásti v mitochondriích a zčásti v cytoplazmě. Jedná se o sérii reakcí, která začíná kondenzací glycinu se sukcinylCoA a končí vestavěním iontu železa do molekuly protoporfyrinu IX.

#### 2.1.4.3. Fe-S bílkoviny

Další velmi významnou skupinou bílkovin obsahujících ionty železa jsou Fe-S proteiny. Tyto bílkoviny obsahují ve své molekule prostetickou skupinu složenou ze železa a síry – tzv. Fe-S klastr. Fe-S bílkoviny hrají roli v mnoha metabolických drahách např. v Krebsově cyklu, při opravách DNA nebo se podobně jako cytochromy účastní elektron transportního řetězce [7].

#### 2.1.4.4. Ferritin

Zásobní železo je v eukaryotických buňkách uloženo ve formě ferritinu. Jejich funkcí je pravděpodobně uchovávat potenciálně škodlivé železo v bezpečné formě. U většiny obratlovců je ferritin tvořen dvěma typy podjednotek, označených jako L- („light, liver“) a H- („heavy, heart“) ferritin. Tyto podjednotky se organizují do schránek, z nichž každá je složena z 24 molekul L- nebo H-ferritinu. Každá ferritinová schránka je schopna pojmout

do své dutiny o průměru 80 nm několik tisíc iontů  $\text{Fe}^{3+}$  [52], [53]. Jednotlivé ferritiny se od sebe liší zastoupením L- a H- podjednotek a jsou označovány jako izoferritiny. H-ferritin je ferroxidasa a jeho aktivita usnadňuje rychlé začlenění iontů železa do ferritinových komplexů a na druhé straně jsou tyto ionty rychleji z ferritinu uvolňovány. Izoferritiny bohaté na L- podjednotky přijímají ionty železa pomaleji a déle je skladují. Jednotlivé tkáně a orgány se liší zastoupením exprese pro L- a H-podjednotky ferritinu. Malou část ferritinu lze nalézt i v plazmě [54]. Hladina sérového ferritinu je úměrná k celkovým zásobám iontů železa a je užívána jako klinický indikátor množství iontů železa v těle [55].

#### 2.1.4.5. Hemosiderin

Další zásobní formou iontů železa v buňce je jejich vazba na hemosiderin. Jde o makromolekulární komplex ferritinu s lipidovými strukturami, přesné chemické složení není zatím objasněno. Hemosiderin se fyziologicky vyskytuje především v Kupfferových buňkách jater. Při chronickém přetížení ionty železa ho nacházíme i v buňkách poškozených orgánů. Ionty železa vázané na hemosiderin vykazují větší redoxní aktivitu než byla nalezena u ferritinu. Můžeme jej tak spojovat s toxickým vlivem iontů železa v postižených orgánech [56].

## 2.2. Molekuly transportu netransferinových iontů železa přes plazmatickou membránu

V popředí našeho zájmu jsou známé molekuly transportu netransferinových iontů železa. Jedná se tedy o molekuly DMT1 („divalent metal transporter 1“), Dcytb („duodenal cytochrom b-like“), ferroportin 1, hefestin a ceruloplasmin.

### 2.2.1. DMT1

Velmi dobře je prostudován transport dvojmocného iontu železa zprostředkovaný molekulou DMT1 („divalent metal transporter 1“, dříve rovněž NRAMP2 nebo DCT1). Exprese DMT1 je regulována vlivem dostupných iontů železa v buňkách organismu,

koncentrací iontů železa v potravě nebo posttranslačně přes IRP1 a IRP2 [57]. Tento transportér vedle dvojmocných iontů železa váže a přenáší přes buněčnou membránu enterocytů i další dvojmocné ionty kovů, např.  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  a  $Pb^{2+}$ . DMT1 je transportní protein s 12 transmembránovými doménami a vykazuje homologii s Nramp rodinou membránových proteinů. Vykazuje vysokou afinitu k dvojmocnému železu, nemá afinitu k  $Fe^{3+}$ . Jde o ubikvitární protein se silnou expresí v apikálních membránách enterálních buněk duodena a v oblasti membrán časných endosomů, vytvářených při endocytóze transferinových iontů železa.

### 2.2.2. Dcytb

Dcytb („duodenal cytochrome b-like“) je transmembránový protein. Jde o ferrireduktasu, exprimovanou na apikální membráně enterocytů. Tento enzym redukuje trojmocné ionty železa na dvojmocné, které se pak stává substrátem pro DMT1 [58], [59]. Svůj název dostal dle homologie s cytochromem b.

### 2.2.3. Ferroportin 1

Ferroportin 1 nebo také Ireg1 či MTP1 („iron regulated transporter-1“, „metal transporter protein-1“) je jednořetězcový transmembránový glykoprotein (62 kDa). Exprimují jej zralé enterocyty enterálních klků a to v oblasti bazolaterální membrány, dále Kupfferovy buňky a nižší exprese je prokázána i v hepatocytech. Jeho funkcí je transport dvojmocných iontů železa z buněk do oběhu [60].

### 2.2.4. Hefestin

Molekula hefestinu vykazuje homologii s molekulou ceruloplasminu (155 kDa). Je exprimován zralými enterocyty. Jelikož je hefestin exprimován vezikulárně, může hrát roli v blokování iontů železa, určených k extracelulárnímu transportu, od metabolismu v cytoplazmě. Z hlediska enzymatické aktivity představuje hefestin feroxidasu bohatou na atomy Cu. V oblasti bazolaterálních membrán oxiduje dvojmocné ionty železa transportované ferroportinem na trojmocné a tím umožňuje jejich vazbu na transferin [57].

### 2.2.5. Ceruloplasmin

Ceruloplasmin je monomerní sérová oxidasa známá spíše svou rolí v metabolismu mědi [61], [62]. Je však známo, že *in vitro* je tento protein schopen katalyzovat oxidaci nejen mědi, ale také dvojmocného železa. Tento glykoprotein se 6 atomy mědi (132 kDa) oxiduje v plazmě se nacházející železnaté ionty transportované ferroportinem na železité, schopné vazby na transferin. Hlavním místem vzniku jsou hepatocyty, z nichž je uvolňován do krve, kde je schopen zastoupit protein hefeštin.

### 2.2.6. Úloha molekul transportu iontů železa v jednotlivých typech buněk

#### 2.2.6.1. Buněčná linie Caco-2 jako model střevních enterocytů

Buněčná linie Caco-2 (lidský kolorektální karcinom) je linie adherentní. Buňky rostou orientovaně. Díky této skutečnosti jsou vhodným modelem střevních enterocytů s odlišnou apikální a bazální membránou. Hlavní rolí enterocytů je transportovat ionty železa ze střeva do krevního řečiště.

#### 2.2.6.2. Buněčná linie K562 jako model neenterocytárních buněk

Buňky linie K562 (lidská erytroleukemie) na rozdíl od buněk Caco-2 nejsou orientované. Cytoplazmatická membrána je tudíž rovnocenná po celém povrchu buněk. Buňky K562, jako model neenterocytárních a erytroidních buněk, reprezentují především významného uživatele iontů železa.

## 2.3. Regulace exprese molekul transportu iontů železa

Metabolismus a transport iontů železa na buněčné úrovni je regulován na transkripční, posttranskripční a posttranslační úrovni.

Messenger RNA mnoha ferotropních proteinů obsahuje ve své molekule specifické sekvence, schopné vázat regulační molekuly, které takto mohou modulovat translaci

mRNA. Tyto molekuly nazýváme IRP („Iron Regulatory Protein“) a jejich specifické vazebné sekvence v mRNA označujeme jako IREs („Iron Regulatory Elements“). Po vazbě IRPs na IRE se translace mRNA buď blokuje, nebo zvyšuje, což je dáno lokalizací IRE v molekule mRNA. Vazba IRP na IRE v 5' nepřekládané oblasti molekuly mRNA zablokuje následnou translaci, zatímco vazba na IRE, lokalizovaný v 3' nepřekládané oblasti stabilizuje mRNA a zvyšuje tak její translaci [51].

Zajímavý je mechanismus regulace translace cílových mRNA přes IRP1 a IRP2 v souvislosti s koncentrací volně dostupných iontů železa v buňkách. IRP1 obsahuje ve své molekule úsek, kde jsou vázány atomy železa a čtyři atomy síry. Pokud jsou v této oblasti navázány tři atomy železa, vykazuje molekula IRP1 vysokou afinitu k IRE. Při navázání dalšího atomu železa ztrácí IRP1 afinitu k IRE a nabývá aktivitu cytoplazmatické akonitasy. Vidíme zde tedy změnu funkce IRP1 v závislosti na 3Fe-4Fe obsahu železa v Fe-S klastru [63]. Na rozdíl od IRP1 koncentrace iontů železa výrazně ovlivňuje stabilitu IRP2. IRP2 obsahuje vazebné místo pro ionty železa, které po navázání mění konformaci a/nebo oxidační stav molekuly IRP2 s její následnou urychlenou degradací. Nadbytek iontů železa tak způsobí rozdílnými mechanismy nedostatek IRP1 a IRP2 pro vazbu na IRE s následnou zvýšenou transkripcí mRNA s IRE v 5' nepřekládané oblasti (ferritin) nebo degradací mRNA s IRE v 3' nepřekládané oblasti (transferinový receptor).

Enterocyturní transportéry iontů železa DMT1 a ferroportin 1 obsahují ve svých mRNA IRE, které jsou lokalizovány u DMT1 v 3' nepřekládané oblasti a u ferroportinu 1 v 5' nepřekládané oblasti. Při zvýšené koncentraci iontů železa v buňce se proto translace DMT1 může snižovat a naopak translace ferroportinu 1 zvyšovat. V experimentech zaměřených na regulaci exprese těchto transportérů bylo zjištěno, že vedle IRP je tato regulace ovlivňována i dalšími faktory [57]. Na posttranslační úrovni je funkce proteinů metabolismu iontů železa regulována např. fosforylací, změnou terciální struktury, ovlivněním jejich metabolismu a/nebo lokalizací v buňce (cytoplazma, mitochondrie, endosomy, buněčná membrána aj.) [51]. U některých proteinů zapojených do metabolismu iontů železa dochází vlivem hladiny iontů železa k regulaci jejich exprese i na transkripční úrovni [64], [65].

Můžeme shrnout, že řízení metabolismu iontů železa na buněčné i orgánové úrovni se děje na mnoha stupních genové regulace, do níž zasahují vedle iontů železa i další faktory. Řada otázek však není ještě zcela objasněna.

## 2.4. Poruchy metabolismu a transportu iontů železa

Poruchy metabolismu iontů železa patří mezi velmi časté patologické stavy. V zásadě je lze rozdělit na onemocnění zapříčiněná absolutním nebo relativním nedostatkem těchto iontů, na stavy související s přetížením organismu ionty železa a na poruchy utilizace iontů železa. Tyto poruchy mohou být jak vrozené, tak získané, mnohdy však jde o kombinaci obou příčin [66].

Savčí organismus nemá mechanismy, kterými by z těla vylučoval nadbytečné ionty železa. Regulace zásob se tedy děje na úrovni absorpce. Ztráty iontů železa z organismu jsou způsobovány především odlupováním buněk epitelii do lumen střeva či z povrchu těla, část odchází močí a potem. Tyto ztráty je nezbytné nahrazovat absorpcí iontů kovu z potravy. Denní potřeba, která se rovná denní ztrátě, odpovídá 0,5-1 mg denně pro dospělého muže nebo postmenopauzální ženu, 1-2 mg pro ženu ve fertilním věku, 1,5-3 mg pro těhotnou a asi 1 mg pro dítě [67]. Vzhledem k nízké účinnosti střevní absorpce je však nutné přijímat v potravě nejméně desetkrát větší množství iontů železa, než je třeba k doplnění jeho denních ztrát.

### 2.4.1. Deficit iontů železa

Nedostatek iontů železa je nejběžnější příčinou mikrocytární hypochromní anemie. V časných stádiích je onemocnění obvykle bez příznaků, později se začínou u nemocných obecné projevy anemií. Pravděpodobná souvislost je sledována mezi inhibicí enzymů obsahujících ionty železa a příčinami epiteliálních projevů anemií.

Mezi nejčastější příčiny nedostatku iontů železa patří chronická krvácení, fyziologicky zvýšené požadavky, nedostatečná absorpce, nedostatečná či nekvalitní výživa (je spíše přispívajícím faktorem než jedinou příčinou deficitu železa).

Aceruloplasminemie, nedostatek ceruloplasminu, je onemocnění spojené s porušenou rovnováhou iontů železa v organismu, charakterizované neurodegenerací, jaterní fibrózou a diabetem [68]. Funkcí ceruloplasminu je oxidace iontů železa po jejich transportu z buněk. Mutace snižuje hladinu ceruloplasminu nebo jeho aktivitu. Relativně je omezena produkce červených krvinek. Přesto je absorpce iontů železa z intestinálního traktu



normální nebo pouze mírně snížená a to díky hefestinu, což je membránový homolog ceruloplasminu.

Atransferinemie je charakterizována částečnou deficiencí v plazmatickém transferinu [69]. Způsobuje ji mutace v genu pro transferin [70]. Pro erytropoézu je dostupné jen velmi malé množství iontů železa, jako důsledek stimulace absorpce intestinálních iontů železa a masivního ukládání iontů železa v nehematopoetických tkáních. Důsledkem je těžká anemie z nedostatku iontů železa v kontrastu k totálnímu přetížení organismu ionty železa (hypotransferinemie) [71].

#### 2.4.2. Přetížení ionty železa

Přetížení ionty železa nejvíce postihuje játra (fibróza a cirrhóza), myokard a žlázy s vnitřní sekrecí. V poškození těchto orgánů hraje roli vliv iontů železa na vznik volných radikálů a následná peroxidace lipidů, která kvalitativně postihuje buněčné membrány. Patologická přetížení lze rozdělit podle příčin na primární a sekundární.

Hereditární hemochromatóza (HHC) 1. typu je onemocnění charakterizované zvýšením intestinální absorpce iontů železa a jejich ukládáním v játrech, srdci, slinivce a pokožce [72]. Po určité době vede nadbytek iontů železa ve tkáních k jaterní fibróze a cirrhóze, k poškození srdeční svaloviny a k diabetu. Toto autosomální recesivní onemocnění však není způsobeno defektem v proteinu transportujícím ionty železa, ale spíše v regulaci tohoto transportu [71]. V roce 1996 byl identifikován gen, jehož mutace je příčinou tohoto onemocnění. Produktem tohoto genu je protein označovaný jako HFE, který nekovalentně asociuje s transferinovým receptorem. Většina (80 – 90%) pacientů s HHC jsou homozygoti pro mutaci, kde tyrozin nahrazuje cystein v pozici 282 (C282Y) v genu pro HFE [23], [72], [73]. Přesný mechanismus, kterým HFE reguluje intestinální absorpci iontů železa není znám, ale dosavadní zjištění nasvědčují tomu, že v případě HHC se duodenální enterocyty chovají stejně jako při nedostatku iontů železa. Toto tvrzení je podporováno studii, které ukazují, že u pacientů s HHC je relativně nízká hladina mRNA i samotného proteinu ferritin, zatímco hladina genu pro transferinový receptor a exprese proteinu je relativně vysoká.

Hemochromatóza 2. typu (juvenilní hemochromatóza) je vzácné autosomální recesivní onemocnění způsobené přetížením ionty železa [74]. Juvenilní hemochromatóza je spojena s mutací v genu pro hepcidin. Důležitým regulátorem absorpce iontů železa je zde protein

nazvaný hemojuvelin, jež může být součástí hepcidinem regulované metabolické dráhy nebo klíčovou molekulou v paralelním regulačním mechanismu [75].

Hemochromatóza 3. typu je dědičné autosomálně recesivní onemocnění způsobené mutací v genu kódující transferinový receptor 2. Je to pomalé progresivní onemocnění projevující se u dospělých přetížením organismu ionty železa [76].

Hemochromatóza 4. typu se projevuje přetížením organismu ionty železa, které však není spojeno s mutací v HFE genu [77]. Je to dědičné autosomálně dominantní onemocnění způsobené mutací v genu kódující ferroportin 1 [78], [79].

Hemochromatóza 5. typu je autosomálně dominantní mutace v genu kódující H-podjednotku ferritinu a projevuje se zvýšením hladiny iontů železa v séru společně s nadměrným ukládáním iontů železa v hepatocytech a Kupfferových buňkách [80].

Aceruloplasminemie (viz kap. 3.4.1.1.). V důsledku nedostatku ceruloplasminu se neoxidované ionty železa akumulují v jaterních buňkách a makrofázích. Je zajímavé, že absence ceruloplasminu vede i k akumulaci iontů železa v centrálním nervovém systému. Důvody této akumulace nejsou dosud známy [81].

Hypotransferinemie (viz atransferinemie, kap. 3.4.1.1.).

Zvýšení jaterních zásob iontů železa bylo zjištěno i v asociaci s chronickými jaterními onemocněními. Nejčastěji se jedná o alkoholická jaterní onemocnění, chronické virové hepatitidy a nealkoholické steatohepatitidy [82]. Mechanismus akumulace iontů železa v játrech za těchto podmínek není dosud dobře znám.

Friedrichova ataxie je letální dědičné onemocnění charakterizované spinocerebrální degenerací, kardiomyopatií a diabetem mellitus. Onemocnění vzniká v důsledku mutace v genu pro frataxin. Přesná úloha frataxinu zůstává neznámá. Přesto se předpokládá jeho role v metabolismu Fe-S klastrů či v regulaci intramitochondriálního transportu iontů železa [83].

### 3. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo stanovit:

1. Vliv deprivace iontů železa na expresi molekul, které se účastní transportu netransferinových iontů železa (DMT1, Dcytb, ferroportin 1, hefestin a ceruloplasmin), u buněk lidské linie K562 (erytroleukemie) a buněk lidské linie Caco-2 (kolorektální karcinom) *in vitro*. Vliv na expresi jsme stanovovali na úrovni mRNA pomocí „Real-Time“ PCR.
2. Vliv zvýšené hladiny iontů železa na expresi molekul, které se účastní transportu netransferinových iontů železa (DMT1, Dcytb, ferroportin 1, hefestin a ceruloplasmin), u buněk lidské linie K562 (erytroleukemie) a buněk lidské linie Caco-2 (kolorektální karcinom) *in vitro*. Vliv na expresi jsme stanovovali na úrovni mRNA pomocí „Real-Time“ PCR.
3. Vliv ethanolu na expresi molekul, které se účastní transportu netransferinových iontů železa (DMT1, Dcytb, ferroportin 1, hefestin a ceruloplasmin), u buněk lidské linie Caco-2 (kolorektální karcinom) *in vitro*. Vliv na expresi jsme stanovovali na úrovni mRNA pomocí „Real-Time“ PCR.

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Použitý materiál a chemikálie

#### 4.1.1. Buněčné linie

Buněčné linie K562 (lidská erytroleukemie) a Caco-2 (lidský kolorektální karcinom) byly poskytnuty laboratoří Doc. RNDr. Jana Kováře, DrSc. z Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky, Praha.

#### 4.1.2. Použité sondy

DMT1-sonda: 6FAM-TGT TCT ACT TGG GTT GGC AAT GTT TGA TTG C

ferroportin 1-sonda: 6FAM-CAC AAC CGC CAG AGA GGA TGC TGT G

#### 4.1.3. Použité primery

DMT1<sub>1</sub> („forward“ primer): 5' - GTG GTC AGC GTG GCT TAT CTG

DMT1<sub>2</sub> („reverse“ primer): 5' - GAT GCT TAC CGT ATG CCC ACA GT

Dcytb<sub>1</sub> („forward“ primer): 5' - GTC ACC GGC TTC GTC TTCA

Dcytb<sub>2</sub> („reverse“ primer): 5' - CAG GTC CAC GGC AGT CTG TA

ferroportin 1<sub>1</sub> („forward“ primer): 5' - TGA CCA GGG CGG GAG A

ferroportin 1<sub>2</sub> („reverse“ primer): 5' - GAG GTC AGG TAG TCG GCC AA

hefestin<sub>1</sub> („forward“ primer): 5' - GGG AAT GGC ACA ACC AGT CT

hefestin<sub>2</sub> („reverse“ primer): 5' - CCA GGA GCC CAT CCT TGT T

ceruloplasmin<sub>1</sub> (forward primer): 5' - AAC CCT GGA GAA TGG ATG CTC

ceruloplasmin<sub>2</sub> (reverse primer): 5' - TTG CAA ACC GGC TTT CAG A

kontrolní gen GAPDH<sub>1</sub> („forward“ primer): 5' - GTC GGA GTC AAC GGA TTT GG

kontrolní gen GAPDH<sub>2</sub> („reverse“ primer): 5' - AAA AGC AGC CCT GGT GAC C

#### 4.1.4. Použité soupravy

Rneasy Mini Kit (Qiagen, Německo), Rnase-Free Dnase Set (Qiagen, Německo), Taq Man Reverse transcription Reagents (Applied Biosystems, USA), Taq Man Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA)

#### 4.1.5. Další chemikálie a materiál

2-merkaptoethanol, L-glutamin (GIBCO, Velká Británie)

apotransferin, CdSO<sub>4</sub>.8/3H<sub>2</sub>O, citrát železitý, CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub>.5 H<sub>2</sub>O, ethanolamin, FeCl<sub>3</sub>, HEPES, hydrokortizon, kyselina askorbová, kyselina citronová, kyselina listová, L-glutamin, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O, NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O, NiSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O, penicilin, pyruvát sodný, RPMI-1640 medium, SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, streptomycin, trypsin, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Sigma Aldrich, Německo)

agaróza (Biotechnology Grade, USA)

dialyzační střevo Spectra/Por 3 Membrane (Spectrum Laboratories, USA)

EDTA (lékárna FNKV)

fetální bovinní sérum (Biochrom AG, Německo)

kyselina boritá (Amnesco, USA)

„optical adhesive covers“, „optical reaction plate“ (Applied Biosystems)

PCR ultra H<sub>2</sub>O (TOP-Bio, Česká republika)

NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12 H<sub>2</sub>O, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Lachema, Česká republika)

NaHCO<sub>3</sub> 7,5 % (Sevapharma, Česká republika)

Tris (ROTH, Německo)

#### 4.1.6. Tkáňová voda, roztoky a media

##### 4.1.6.1. Tkáňová voda

Při přípravě roztoků a medií pro tkáňové kultury jsme používali vodu vysoké kvality, tzn. s minimálním obsahem anorganických a organických látek, označovanou jako tkáňová voda. Tkáňovou vodu jsme získali redestilací a následnou sterilizací autoklávováním (30 min. při 120°C a tlaku 1 atm)

##### 4.1.6.2. Roztoky

Pomocné roztoky jsme používali k oplachování nebo promývání buněk, k uvolňování buněk od substrátu, případně jednotlivých buněk od sebe.

PBS („phosphate buffered saline“): Slouží k oplachování buněčných kultur před výměnou media, před trypsinizací nebo k promývání buněk před jejich případným lyzováním. Příprava roztoku:

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12 H <sub>2</sub> O	2,89 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g
Celkový objem	1 l

Jednotlivé navážky jsme rozpustili v 1 l tkáňové vody. Po rozpuštění jsme pro kontrolu změřili pH. To by se mělo pohybovat v rozmezí 7,3 – 7,5 (konečné pH se autoklávováním o 0,1 – 0,2 jednotky pH sníží). V případě potřeby jsme upravili pH pomocí 1M HCl nebo 1M NaOH. Hotový roztok jsme sterilizovali v autoklávu po dobu 30 minut při 120°C a tlaku 1 atm.

Roztok trypsinu: Používali jsme jej při tzv. trypsinizaci, která je součástí pasážování buněk. Působení trypsinu má za následek narušení adhezních molekul plazmatické membrány, čímž dochází k oddělení buněk od pevného podkladu i vzájemně mezi sebou.

Příprava roztoku: V 200 ml PBS jsme rozpustili 0,4 g trypsinu a 0,04 g EDTY. Takto připravený roztok jsme přefiltrovali přes papírový filtr. V laminárním boxu jsme roztok znovu přefiltrovali přes miliporový filtr, tím jsme získali sterilní zásobní roztok o pH 7,4.

#### 4.1.6.3. Media

Základní medium (R0):

H <sub>2</sub> O („cell culture quality“)	82,2 ml
10x koncentrované RPMI-1640 medium	10,0 ml
L-glutamin (30 mg/ml = 200 mM)	2,0 ml
Pyruvat sodný (1,1% = 100 mM)	1,0 ml
Kyselina listová (1 mg/ml = 2,3 mM)	0,1 ml
Antibiotika (10 <sup>4</sup> U penicilinu a 10 mg streptomycinu/ml)	1,0 ml
NaHCO <sub>3</sub> (7,5%)	2,6 ml
HEPES (1,5 M; pH 7,2)	1,0 ml
merkapt ethanol	0,1 ml
Celkový objem	100,0 ml

Definovaná media (Tf, FeC, -Fe médium):

Definované medium	Tf medium	FeC medium	-Fe medium
10x Tf (zásobní koncentrát)	10 ml		
10x FeC (zásobní koncentrát)		10 ml	
10x -Fe (zásobní koncentrát)			10 ml
Základní medium(R0)	90 ml	90 ml	90 ml
Celkový objem	100 ml	100 ml	100 ml

Příprava koncentrátů (10x Tf, 10x FeC, 10x -Fe):

Koncentrát	10x Tf	10x FeC	10x -Fe
5 mg/ml železem saturovaný transferin	1,0 ml		
100 mM citrát železitý		5,0 ml	
20 mM ethanolamin	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
5 $\mu$ M hydrokortizon	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
20 mM kyselina askorbová	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
$5 \times 10^{-4}$ M $\text{CdSO}_4 \cdot 8/3 \text{H}_2\text{O}$	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
$1 \times 10^{-4}$ M $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
$1 \times 10^{-4}$ M $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
$5 \times 10^{-6}$ M $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
$5 \times 10^{-6}$ M $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
$2,5 \times 10^{-6}$ M $\text{NiSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
$5 \times 10^{-4}$ M $\text{Na}_2\text{SeO}_3$	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
$2 \times 10^{-3}$ M $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
$2,5 \times 10^{-6}$ M $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
$2,5 \times 10^{-5}$ M $\text{NH}_4\text{VO}_3$	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
$1 \times 10^{-2}$ M $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Základní medium (R0)	94,9 ml	90,9 ml	95,9 ml
Celkový objem	100,0 ml	100,0 ml	100,0 ml

Příprava 5 mg/ml saturovaného transferinu:

1. Navážili jsme 40 mg apotransferinu.
2. Přidali jsme 5,4 ml tkáňové  $\text{H}_2\text{O}$  a nechali jsme transferin zcela rozpustit.
3. Přidali jsme 2,0 ml mixu (1,0 ml  $500 \mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  + 1,0 ml 8 mM kyseliny citronové) a promíchali.
4. Přidali jsme 0,3 ml 10%  $\text{NaHCO}_3$  (0,05 g  $\text{NaHCO}_3$  jsme rozpustili v 0,45 ml tkáňové  $\text{H}_2\text{O}$ ), promíchali a změřili  $\text{pH} = 7$  (pH papírek). V případě potřeby jsme přidali další 10%  $\text{NaHCO}_3$ .
5. Přidali jsme 0,3 ml tkáňové  $\text{H}_2\text{O}$ , promíchali a nechat stát při pokojové teplotě minimálně 15 minut.
6. 15 – 20 cm dialyzačního střeva jsme namočili do tkáňové  $\text{H}_2\text{O}$  minimálně na 5 minut.



7. Jeden konec střeva jsme poskládali a uzavřeli do 1,5 ml zkumavky, druhý konec jsme prsty rozvolnili a opatrně do střeva vpravili roztok transferinu. Volný konec dialyzačního střeva jsme opět uzavřeli do 1,5 ml zkumavky.
8. Naplněné střevo jsme vložili do velké kádiny s PBS a míchadlem a nechali jej míchat v chladové místnosti (lednici) do druhého dne. Alespoň 1x jsme vyměnili roztok PBS.
9. Vyňali jsme střevo z kádiny, pipetou jsme přenesli obsah do malé (50 ml) kádiny. Střevo jsme 2x propláchli 10 ml R0 a přidali k roztoku.
10. Roztok jsme přefiltrovali do 50 ml centrifugační zkumavky, kádinu vypláchli 10 ml R0 a také přefiltrovali (celkem jsme přidali 30 ml R0).
11. Přidali jsme 729,2 ml R0 a dané stopové prvky a roztoky v osminásobném množství, což odpovídá našemu rozpisu na přípravu 8 ml saturovaného transferinu.

## 4.2. Použité přístroje

Centrifugy: Jouan B4i (Francie), Jouan BR4i (Francie), Minispin plus (Eppendorf), Micro – centrifuge II GMC-260 (LABTECH), Minicentrifuge C-1200 (Labnet)

Cyclery: Thermocycler T-gradient (Biometra), T1 thermocycler (Biometra), UNO thermocycler (Biometra)

Inkubátory: Jouan IGO 150G (Francie), Jouan IGO 150 cell life (Francie)

Laminární boxy: Jouan MSC 12 (Francie), Microbiological safety cabinet Holten Jouan S 2010 (Francie)

pH metr: InoLab pH Level 1, pH-elektroda Hamilton (Německo)

Pipety: Biohit proline PIPETTOR (Finsko), Biohit mLINE PIPETTOR (Finsko), SWIFTPET (High Tech Lab)

Spektrofotometr: GeneQuant pro RNA/DNA Calculator (Biochrom)

System na ELFO: Sigma Aldrich (Německo)

System Real-Time: 7000 SDS ABI Prism (Applied Biosystems)

UV kamera: SynGene (SynGene)

Váhy: analytické váhy KERN 770 ALJ 120-4 (Německo), předvážky EK-1200g

Vodní lázeň: Memmert WB 22 (Německo)

## 4.3. Metody

### 4.3.1. Kultivace buněk

Buňky jsme kultivovali mediu, založeném na RPMI-1640 mediu (základní medium R0) obsahujícím 10 % fetálního bovinního séra [84].

V experimentech jsme používali definovaná media. Medium bez přítomnosti iontů železa (-Fe medium) je definované medium bez přítomnosti séra, založené na RPMI-1640 mediu a obsahující doplněk nahrazující sérum, bez přídavku jakéhokoli zdroje iontů železa. Transferinové medium (Tf medium) obsahuje 5  $\mu\text{g/ml}$  lidského transferinu saturovaného železem jako zdroj iontů železa [85]. Medium obsahující vysokou hladinu iontů železa (FeC medium) zahrnuje v doplňku 500  $\mu\text{M}$  citrát železitý [85].

Buňky jsme kultivovali jednotně v termostatu při 37°C ve vlhčené atmosféře s 5% obsahem CO<sub>2</sub>.

#### 4.3.1.1. Kultivace adherentních buněk

Adherentní buňky rostou na pevném podkladu, na který se přichycují. Podkladem může být sklo nebo umělohmotný materiál. Jakmile buněčná kultura rovnoměrně vyplnila celou kultivační plochu, bylo třeba provést pasážování. Pasážování jsme prováděli ve sterilním prostředí v laminárním boxu tak, že jsme z buněk pomocí pipety odsáli staré kultivační médium, buňky opláchli roztokem PBS a poté k nim přidali roztok trypsinu (asi 150  $\mu\text{l}$  roztoku na zhruba 20 cm<sup>2</sup> plochy). Takto ošetřené buňky jsme uložili přibližně na 5 minut do termostatu. Po této době dojde k uvolnění buněk od podkladu i mezi sebou. K takto

uvolněným buňkám jsme přidali takové množství čerstvého média, jaké měli k dispozici před pasážováním, a řádně je rozsuspendovali. Tuto suspenzi jsme pak podle potřeby naředili a rozdělili do požadovaného množství kultivačních nádob, které jsme uložili do termostatu.

#### 4.3.1.2. Kultivace suspenzních buněk

Buněčné suspenze umožňují růst buněk v prostoru v objemu média. Buňky mohou růst samostatně nebo tvoří menší shluky. Pasážování suspenzních kultur jsme prováděli jejich pravidelným ředěním.

Pasážování pouhým ředěním je však možné i u některých typů buněk rostoucích na substrátu, tzv. adherentní buněčné linie. To je možné v případě, že buňky jsou k substrátu přichyceny jen velmi slabě a i pouhý prudší pohyb média při promíchávání způsobí jejich odpoutání od substrátu aniž by byla nutná jejich trypsinizace.

#### 4.3.1.3. Detekce mykoplazmy

Kontaminace buněčných kultur mykoplazmou je jedním z nejčastějších problémů při jejich kultivaci, proto jsme používané kultury na přítomnost mykoplazmy „otestovali“.

Postup na detekci mykoplazmy v buněčných kulturách sestavila T. Kopská:

Buňky jsme týden před značením kultivovali v médiu bez antibiotik.

Buňky rostoucí v suspenzi: Do media s buňkami jsme přidali formaldehyd o výsledné koncentraci 3,7%. Buňky jsme takto fixovali 3 minuty a poté stočili při 200 g. Supernatant jsme odstranili, buňky poté rozsuspendovali v PBS a stočili při 200 g. Supernatant jsme znovu odstranili a jeho zbytky osušili od hrdla centrifugační zkumavky. Ze sedimentu jsme odsáli 10  $\mu$ l a nanесли na podložní sklo. Na to jsme poté nakapali zalévací roztok s DAPI (4,6-diamidin-2-fenylindol) a přikryli krycím sklem.

Buňky rostoucí na substrátu: Pokud byly buňky v kapkách na krycích sklech, zalili jsme je 3,7% roztokem formaldehydu, pokud byla krycí skla v médiu přidali jsme k nim formaldehyd o výsledné koncentraci 3,7%. Buňky na sklech jsme fixovali 5 minut a poté promyli 3krát 5 minut v PBS. Na podložní skla jsme nanесли 10  $\mu$ l zalévacího media s DAPI, krycí sklo jsme vyňali z PBS a překloupili na kapku.

Detekce mykoplazmy pomocí mikroskopu: Pokud jsme viděli pouze buněčná jádra, byla detekce mykoplazmy negativní. Pokud jsme kromě jader viděli i drobné body v okolí buněk, detekce byla pozitivní.

#### 4.3.2. Experimentální podmínky

Buňky, které jsme používali k experimentům se nacházely v období růstové fáze nebo na jejím vrcholu, přičemž jich bylo již dostatečné množství pro nasazení na daný experiment (viz kap. 4.3.2.2.)

##### 4.3.2.1. Počítání buněk

Buňky K562 jsme řádně rozsuspendovali a asi 50  $\mu$ l jsme odebrali pro zjištění koncentrace buněk v dané suspenzi. Uvedené množství suspenze jsme promíchali se stejným objemem barvicího roztoku trypanové modři (0,4% roztok v PBS) a pomocí Bürkerovy komůrky jsme buňky spočítali. Buněčná linie Caco-2 je adherentní a buňky jsme proto musely nejdříve převést do suspenze pomocí trypsinu. Dále jsme s nimi pracovali jako s K562.

##### 4.3.2.2. Vysetí buněk

Při každém experimentu jsme na jednu Petriho misku o průměru 5 cm vyseli takové množství buněk, aby výsledná koncentrace v celkovém množství 5 ml suspenze byla 400 tisíc buněk/ml.

Spočítané buňky jsme několikrát promyli roztokem PBS a centrifugovali (200 g/10 minut). Promývací roztok jsme odsáli a buňky rozsuspendovali v základním mediu (R0) o stejném objemu z jakého byly buňky odebrány k počítání. Objem suspenze obsahující 2 miliony buněk jsme doplnili do 2,5 ml rovněž základním médiem (R0). Zbývající objem 2,5 ml jsme doplnili příslušným médiem vzhledem k experimentu (viz kap 4.3.1.). Koncentráty přidávající se k základnímu médiu (viz kap. 4.1.1.3.) jsme přidali dvojnásobně koncentrované, neboť po smíchání média s buněčnou suspenzí došlo k jejich naředění na poloviční koncentraci. Po řádném promíchání jsme tedy získali suspenzi 5 ml o koncentraci 400 tis. buněk/ml.

Každý experiment se sestával vždy z kontrolních, tedy z našeho pohledu neovlivněných, a experimentálních podmínek, přičemž jedna experimentální dvojice obsahovala buňky pocházející z téže Petriho misky.

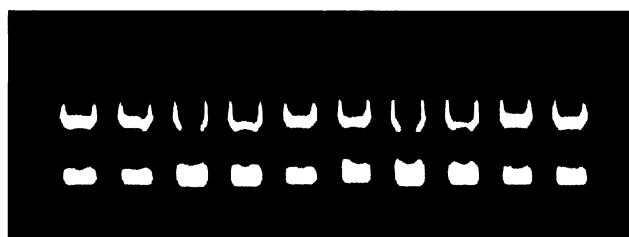
#### 4.3.3. Izolace RNA

Po uplynutí inkubační doby jsme buňky sklídili, promyli omývacím roztokem (PBS) a centrifugovali (200 g/10 minut). Po odsátí supernatantu jsme buněčný sediment lyzovali a izolovali celkovou RNA dle standardního návodu pomocí RNeasy mini kitu (QIAGEN RNeasy mini kit) s úpravami na naše podmínky:

1. K buněčnému lyzátu jsme přidali 350  $\mu$ l RLT pufru (do 1 ml RLT pufru jsme přidali 100  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoethanolu) a rozmíchali pipetou do rozpuštění.
2. Suspenzi jsme přepipetovali do 1,5 ml zkumavky a promíchali nasátím a vystříknutím injekční stříkačkou s jehlou ( $\varnothing$  0,8 mm) minimálně 5x.
3. Přidali jsme 350  $\mu$ l 70% ledového ethanolu a dobře rozmíchali pipetou.
4. Suspenzi jsme přenesli do kolonky a centrifugovali 15 s při 8 000 g.
5. Přidali jsme 350  $\mu$ l RW1 pufru a centrifugovali 15 s při 8 000 g.
6. Do 100 ml zkumavky jsme napipetovali 70  $\mu$ l RDD pufru, přidali 10  $\mu$ l DNasy I a opatrně promíchali.
7. Tento mix jsme napipetovali do kolonky a inkubovali 15 minut při laboratorní teplotě (20 – 30°C).
8. Do kolonky jsme přidali 350  $\mu$ l RW1 pufru a centrifugovali 15 s při 8 000 g.
9. Vyměnili jsme sběrnou zkumavku, napipetovali 500  $\mu$ l RPE pufru na kolonku a centrifugovali 15 s při 8 000 g.
10. Přidali jsme dalších 500  $\mu$ l RPE pufru a centrifugovali 2 min. při 8 000 g.
11. Pro rozpuštění RNA jsme kolonku přendali do 1,5 ml zkumavky, přidali 15  $\mu$ l H<sub>2</sub>O („RNase free“ kvality) a centrifugovali 1 min při 10 000 g.
12. Znovu jsme přidali 15  $\mu$ l H<sub>2</sub>O („RNase free“ kvality) a centrifugovali 1 min. při 10 000 g.

Kvalitu RNA jsme ověřili pomocí gelové elektroforézy (ELFO) na 2% agaróze s vizualizací ethidiumbromidem. Gely jsme vyhodnocovali pomocí UV kamery.

Koncentrace RNA jsme změřili na spektrofotometru.



Obr. 1. Celková RNA v 2 % agarózovém gelu. Jednotlivé proužky odpovídají ribozomální RNA náležící velké a malé podjednotce, smír („šmouhy“) jsou fragmenty mRNA.

#### 4.3.4. Reverzní transkripce (RT)

Izolovanou RNA (100 $\mu$ g/ml) jsme převedli na cDNA reverzní transkripcí (TaqMan – Reverse Transcription Reagents, Applied Biosystems). Reakční podmínky: 10 min při 25°C, 30 min při 48°C, 5 min při 95°C.

Složení reakční směsi na jednu reakci:

10x RT pufr	1,0 $\mu$ l
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,2 $\mu$ l
dNTP mix	2,0 $\mu$ l
Hexamery	0,25 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O (PCR kvality)	3,1 $\mu$ l
RNase inhibitor	0,2 $\mu$ l
Reverzní transkriptáza	0,25 $\mu$ l
RNA (100 $\mu$ g/ml)	1,0 $\mu$ l
Celkový objem	10,0 $\mu$ l

#### 4.3.5. „Real-Time“ PCR (PCR – polymerázová řetězová reakce)

Získanou cDNA jsme použili pro „Real-Time“ PCR (ABI Prism – 7000 Sequence Detection System).

#### 4.3.5.1. PCR

Hlavním přínosem metody PCR (polymerázová řetězová reakce) je rychlé „namnožení“ (amplifikace) zvoleného fragmentu nukleové kyseliny.

Pomocí PCR lze však namnožit jen takové fragmenty, které jsou ohraničeny úseky o známé sekvenci, pokud není jejich sekvence známa celá. Podle těchto sekvencí jsou poté navrhovány tzv. primery, tj. jednořetězcové molekuly DNA komplementární vždy k jednomu z řetězců cílové DNA určené k amplifikaci. Tyto oligonukleotidy jsou syntetizovány uměle a jsou nutnou součástí reakční směsi, která dále obsahuje deoxynukleotidtrifosfáty (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), reakční pufr a termostabilní enzym (Taq polymeráza).

V prvním reakčním kroku, kdy dochází při teplotě nad 92°C k denuraci templátové DNA, je molekula DNA rozbalena, takže je přítomna jako jednořetězcová molekula. Díky tomu je molekula DNA přístupná reakcím probíhajícím v dalších krocích.

Ve druhém kroku je teplota snížena a primery mohou nasednout na komplementární úseky cílové DNA. Tato část bývá označována jako „annealing“ nebo hybridizace primerů. Teoreticky je teplotu možné vypočítat na základě znalosti sekvence primerů, nicméně optimální teplotu je nutné stanovit experimentálně. Předpokladem pro činnost enzymu je přítomnost krátkých dvouřetězcových úseků s volným 5' koncem. Enzym nasedne na volný konec primerů a začne dosyntetizovávat komplementární vlákno dvoušroubovice. To se děje ve třetím kroku reakce při teplotě 72°C, který je označován jako extenze.

Podle typu přístroje a délky amplifikovaných fragmentů trvají jednotlivé kroky desítky sekund až minuty. Reakční kroky jsou automaticky opakovány 20 – 40x. Během této doby dojde k exponenciálnímu „namnožení“ daného fragmentu DNA.

Výhoda reakce spočívá v potřebě minimálního množství výchozí DNA, rychlosti a vysoké specifitě. Nevýhodou je především náchylnost ke kontaminaci cizorodou DNA.

#### 4.3.5.2. „Real-Time“ PCR

Rozdíl této metody od „klasické“ PCR je v tom, že kromě základní cyklické fáze je součástí reakčních podmínek další, tzv. preinkubační fáze. Další rozdíl a zároveň velká výhoda tohoto typu PCR reakce je možnost sledovat průběh reakce. Známe tedy výsledné hodnoty v každém dílčím cyklu reakce a ne pouze konečný, celkový výsledek. Proto se tato metoda také někdy označuje jako kvantitativní PCR, neboť na rozdíl od „klasické“, tedy

kvalitativní PCR, kde zjišťujeme pouze přítomnost produktu, Real-Time PCR nám umožňuje zjistit i jeho relativní množství [86], [87], [88].

Expresi můžeme pomocí „Real-Time“ PCR měřit buď absolutně, kdy jednotlivé hodnoty exprese vztahujeme ke kalibrační křivce, nebo jako v našem případě relativně, kdy sledujeme pouze relativní změnu exprese vzorku vůči kontrole.

Ke zviditelnění získané DNA se používá buď fluorescenčně značená sonda (obr.2, str. 40) nebo fluorescentní barva nespecificky se vážící na dsDNA (obr.3, str. 40).

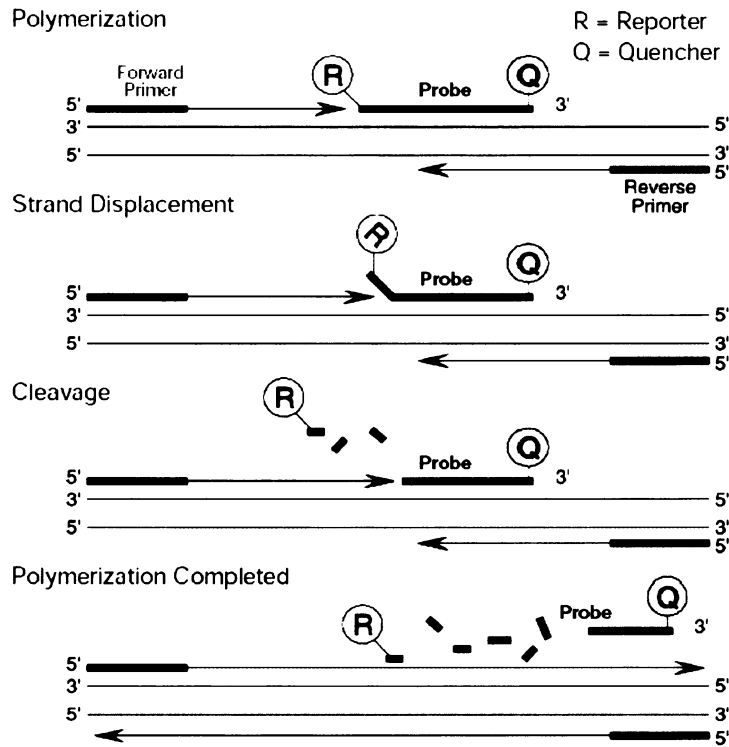
Během PCR je světlo z halogenové lampy průběžně vyzařováno do každé jamky na 96-jamkové optické mikrotitrační destičce. Světlo prochází otvorem do jamky a způsobuje excitaci fluorescenční barvy přítomné ve vzorku. Výsledně emitované fluorescenční záření mezi 500 nm a 660 nm je snímáno v každé jamce během extenční fáze PCR reakce (obr. 4, str.41)

Reakční podmínky: 2 min při 50°C, 10 min při 95°C, cyklická fáze sestávala ze 40 cyklů, při nichž se opakuje 15 s 95°C a 1 min 60°C.

Složení reakční směsi na jednu reakci:

Master Mix (viz kap. 4.1.4.)	12,5 µl
H <sub>2</sub> O (PCR kvality)	7,5 µl
Primer- reverse (400nM)	2,0 µl
Primer – forward (400nM)	2,0 µl
cDNA (viz kap. 4.3.4.)	1,0 µl
Celkový objem	25,0 µl





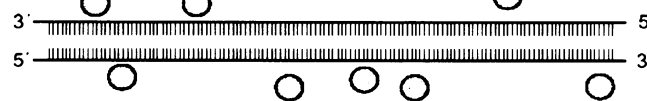
Obr. 2. Princip značení sondou. (převzato z „7000 SDS User Guide“)

### SYBR Green 1 During a Single Cycle of a PCR



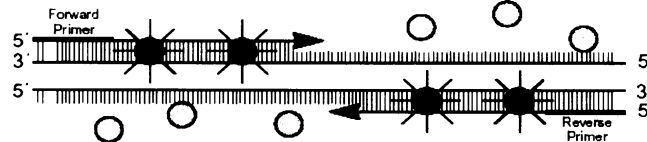
When added to the reaction, the SYBR Green 1 Dye binds non-specifically to the hybridized dsDNA and fluoresces.

### Dissociation



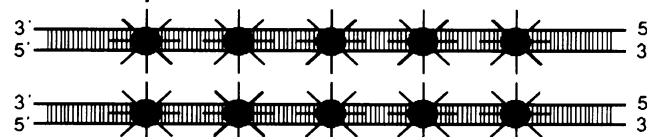
Denaturation complete, the SYBR Green 1 Dye dissociates from the strand, resulting in decreased fluorescence.

### Polymerization



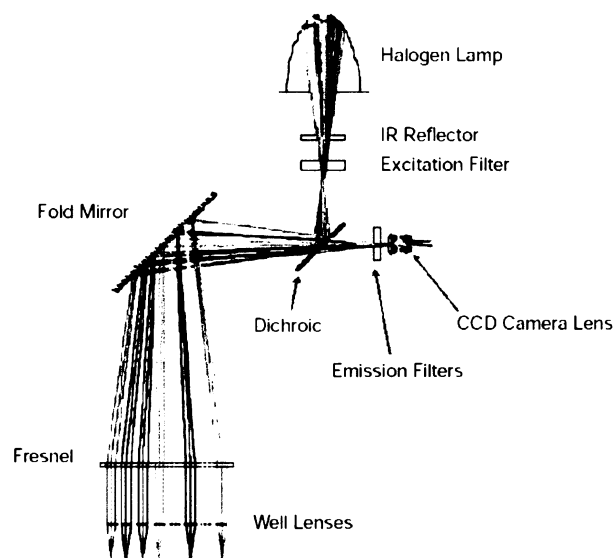
During the extension phase, the SYBR Green 1 Dye begins binding to the PCR product.

### Polymerization Complete



Polymerization is complete and SYBR Green 1 Dye is completely bound, resulting in a net increase in fluorescence.

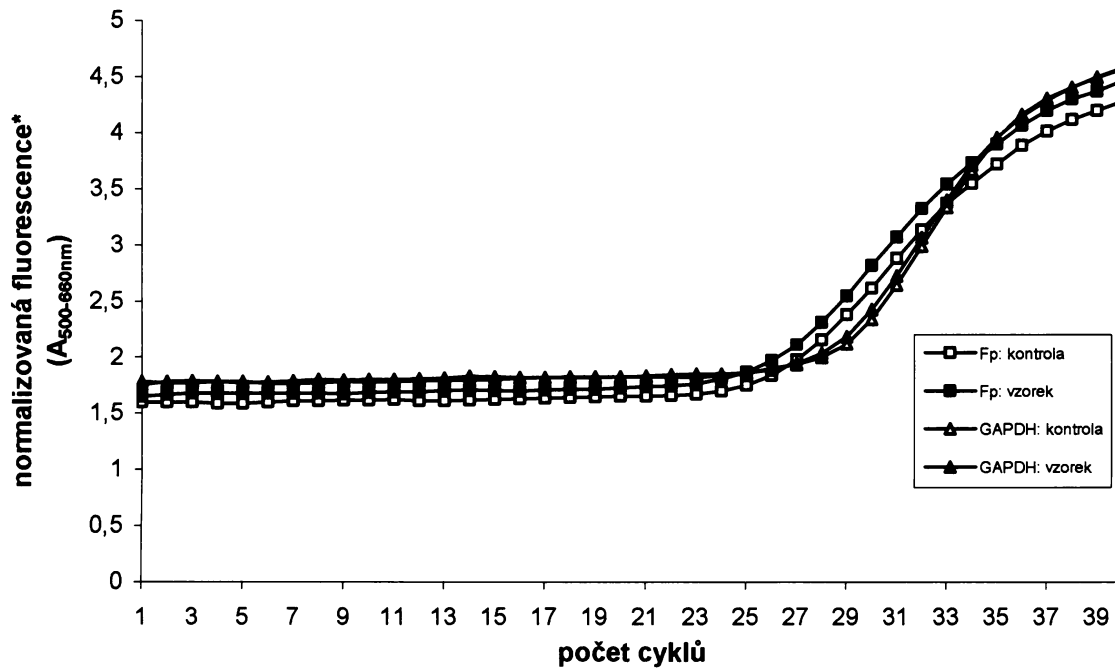
Obr. 3. Princip značení SybrGreenem (převzato z „7000 SDS User Guide“).



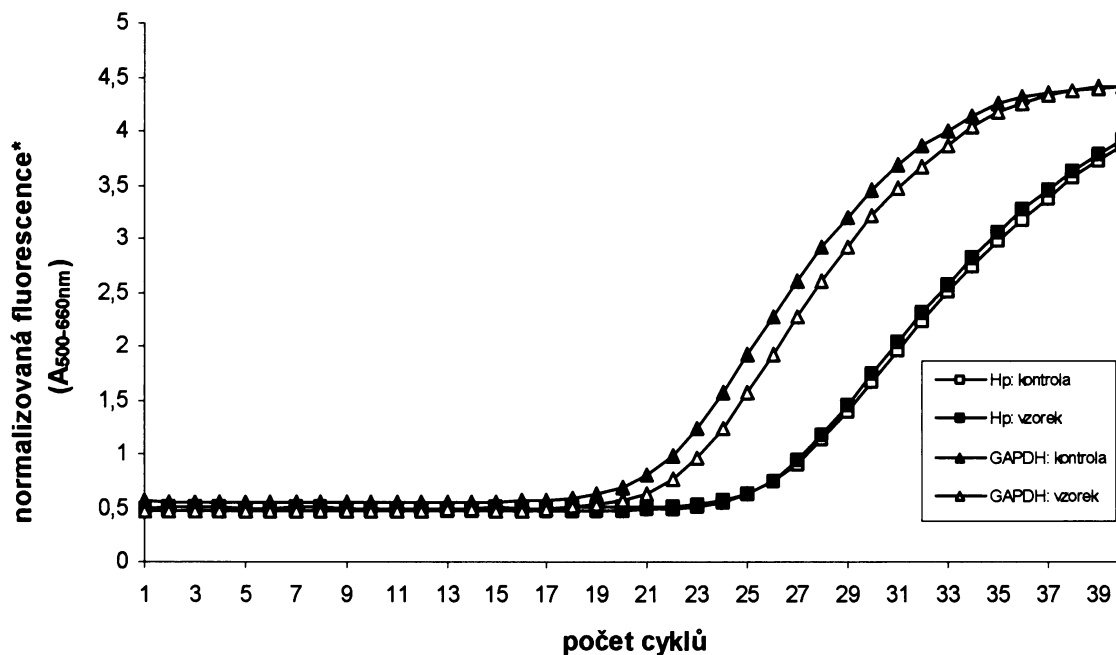
Obr. 4. Princip snímání fluorescence (převzato z „7000 SDS User Guide“)

Z literatury jsme převzali sekvence primerů pro DMT1 a feroportin1 [89]. Primery pro ostatní transportéry, u kterých jsme používali vizualizaci SybrGreenem, navrhovala MUDr. Markéta Čimburová, PhD. Jako kontrolní gen jsme dle literatury použili GAPDH, rovněž vizualizovaný SybrGreenem [89].

Příklad průběhu PCR reakce jednotlivých transportérů (v tomto případě feroportinu 1 a hefestinu) a kontrolního genu (GAPDH) při vizualizaci DNA sondou a SybrGreenem ukazují obr. 5 (str. 42) a 6 (str. 42).



Obr. 5. Fluorescence vzorků sledující expresi ferroportinu 1 (Fp) značených DNA sondou a kontrolního genu (GAPDH) v závislosti na počtu cyklů PCR reakce. \*fluorescence vzorku normalizovaná na pasivní referenci (referenční barva minimalizující fluktuaci signálu způsobenou jinými než PCR faktory).



Obr. 6. Fluorescence vzorků sledující expresi hefestinu (Hp) a kontrolního genu (GAPDH) značených pomocí SybrGreenu v závislosti na počtu cyklů PCR reakce.

\*fluorescence vzorku normalizovaná na pasivní referenci (referenční barva minimalizující fluktuaci signálu způsobenou jinými než PCR faktory).

Pro ověření nulové kontaminace cizorodou DNA jsme po skončení PCR reakce provedli disociaci vzorků. Následné vyhodnocení disociační křivky (teploty tání produktu) ukázalo, zda se během reakce amplifikoval pouze námi požadovaný fragment DNA – disociační křivka má pouze jeden vrchol o odpovídající teplotě tání. Teploty tání produktů PCR reakce: DMT1 – značení sondou neumožňuje vytvořit disociační křivku, Dcytb – 80°C, ferroportin – značení sondou neumožňuje vytvořit disociační křivku, hephaestin – 77°C, ceruloplasmin – 75°C, GAPDH – 79°C.

Vyhodnocení výsledků jsme provedli metodou  $2^{-ddCt}$  [90]. Jednotlivé výsledky jsme poté testovali na odlehlost pomocí Q testu [91] a odlehle hodnoty jsme vyloučili. Konečné statistické zpracování jsme provedli pomocí párového T testu.

## 5. Výsledky

### 5.1. Vliv deprivace iontů železa na expresi molekul zúčastněných v transportu iontů železa

#### 5.1.1. Vliv deprivace iontů železa na expresi molekul zúčastněných v transportu iontů železa u buněk lidské erytroleukemické linie K562

Buňky linie K562 jsme kultivovali po dobu 24 hodin v chemicky definovaném mediu bez přidaného zdroje iontů železa. Jako kontrolu jsme použili buňky kultivované v mediu s lidským transferinem (5 µg/ml) jako zdrojem železa. Kultivace probíhala v inkubátoru při 37°C ve vlhčené atmosféře obsahující 5 % CO<sub>2</sub>. Z buněk jsme následně izolovali RNA a pomocí metody „Real-Time“ PCR jsme zjišťovali vliv deprivace iontů železa na expresi sledovaných molekul transportu iontů železa: DMT1 („divalent metal transporter 1“), Dcytb („duodenal cytochrom b-like“), ferroportin 1, hefestin, ceruloplasmin; na úrovni mRNA. Výsledky byly vyhodnoceny metodou 2<sup>-ddCt</sup>.

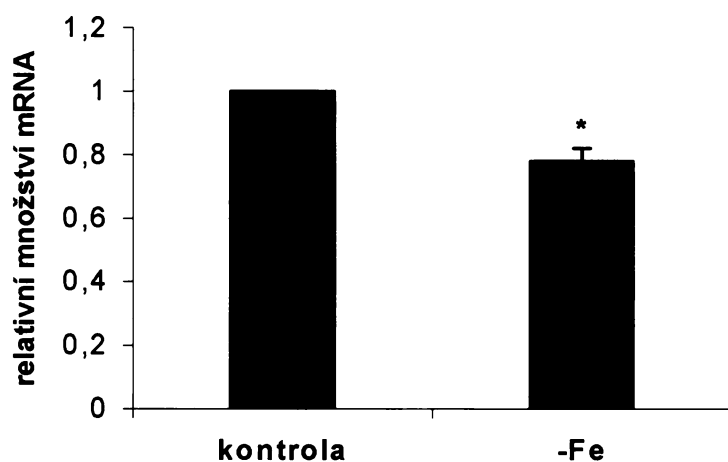
Tab. 1. Vliv deprivace iontů železa na expresi molekul transportu iontů železa na úrovni mRNA u buněk K562 po 24 h kultivace v mediu bez přidaného zdroje iontů železa.

experiment	Relativní množství mRNA*			
	DMT1	Dcytb	Ferroportin	Hefestin
1	0,73	1,18	0,56	1,16
2	0,70	0,72	0,58	0,69
3	0,81	0,76	1,08 <sup>#</sup>	0,98
4	0,88	0,86	0,68	1,18
průměr ± SEM	0,78 ± 0,04	0,88 ± 0,10	0,61 ± 0,04	1,00 ± 0,11

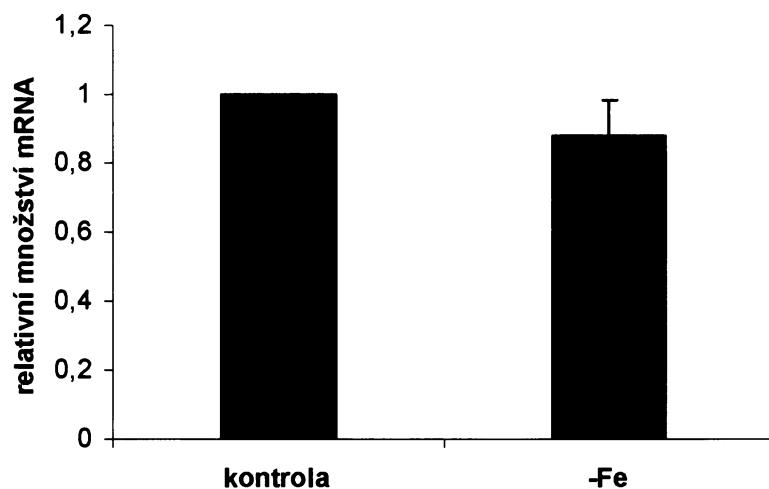
\*Jednotlivé hodnoty jsou vztaženy ke kontrolnímu vzorku (kalibrátoru), který byl nastaven na hodnotu 1,00.

<sup>#</sup>Hodnoty podezřelé jako odlehle a na základě Q testu vyloučené

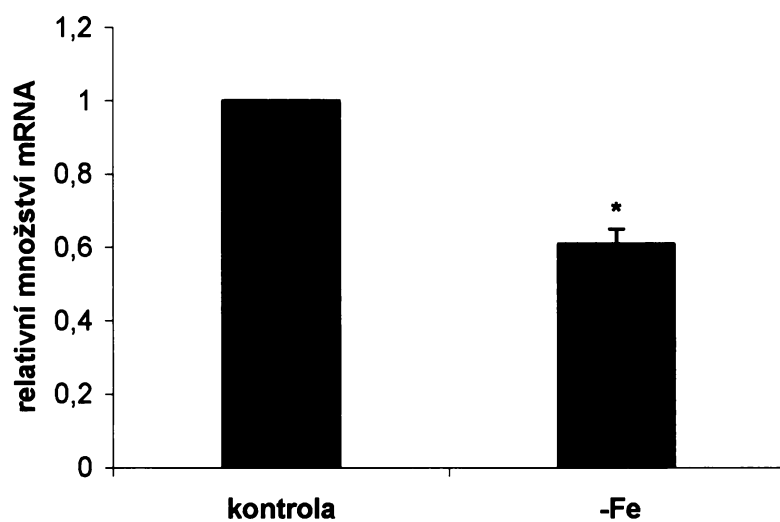
Souhrnné výsledky jsou uvedeny v Tab. 1. V případě transportéru DMT1 byla v důsledku deprivace iontů železa v médiu exprese nižší o 22% (obr. 1). U ferrireduktasy Dcytb došlo ke snížení o 12% (obr. 2, str. 46). Expese ferroportinu se rovněž snížila a to o 39% (obr. 3, str. 46). U ferroxidasy hefestinu ke změně exprese vlivem deprivace iontů železa nedošlo (obr. 4, str. 47). Hladina mRNA pro ceruloplasmin je u buněk K562 tak nízká, že není metodou „Real-Time“ PCR detekovatelná.



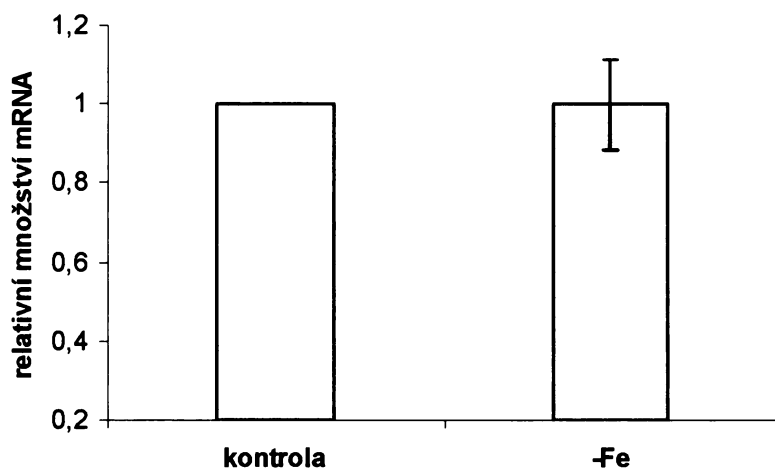
Obr. 1. Vliv deprivace iontů železa na expresi DMT1 u buněk K562. Buňky byly kultivovány 24 h v médiu bez dodaného zdroje iontů železa (-Fe) a buňky kontroly v médiu s transferinem (5  $\mu\text{g/ml}$ ) jako zdrojem iontů železa. \* statisticky signifikantní snížení exprese,  $P < 0,05$ .



Obr. 2. Vliv deprivace iontů železa na expresi Dcytb u buněk K562. Buňky byly kultivovány 24 h v mediu bez dodaného zdroje iontů železa (-Fe) a buňky kontroly v mediu s transferinem (5  $\mu\text{g/ml}$ ) jako zdrojem iontů železa.



Obr. 3. Vliv deprivace iontů železa na expresi ferroportinu u buněk K562. Buňky byly kultivovány 24 h v mediu bez dodaného zdroje iontů železa (-Fe) a buňky kontroly v mediu s transferinem (5  $\mu\text{g/ml}$ ) jako zdrojem iontů železa. \* statisticky signifikantní snížení exprese,  $P < 0,05$ .



Obr. 4. Vliv deprivace iontů železa na expresi hefestinu u buněk K562. Buňky byly kultivovány 24 h v mediu bez dodaného zdroje iontů železa (-Fe) a buňky kontroly v mediu s transferinem (5  $\mu\text{g/ml}$ ) jako zdrojem iontů železa.

#### 5.1.2. Vliv deprivace iontů železa na expresi molekul zúčastněných v transportu iontů železa u buněk lidské linie kolorektálního karcinomu Caco-2

Buňky linie Caco-2 jsme kultivovali po dobu 24 hodin v definovaném mediu bez přidaného zdroje iontů železa. Jako kontrolu jsme použili buňky kultivované v mediu obsahující transferin z FBS jako zdroj iontů železa. Kultivace probíhala v inkubátoru při 37°C a vlhčené atmosféře obsahující 5 % CO<sub>2</sub>. Z buněk jsme následně izolovali mRNA a pomocí metody „Real-Time“ PCR jsme zjišťovali vliv deprivace iontů železa na expresi molekul transportu iontů železa: DMT1 („divalent metal transporter 1“), Dcytb („duodenal cytochrom b-like“), ferroportin 1, hefestin, ceruloplasmin; na úrovni mRNA. Výsledky byly vyhodnoceny metodou  $2^{-\text{ddCt}}$ .

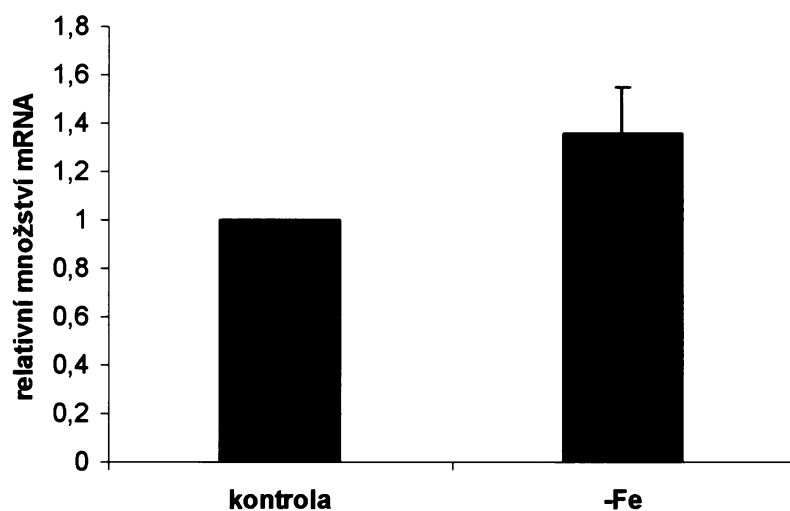


Tab. 2. Vliv deprivace iontů železa na expresi molekul transportu iontů železa na úrovni mRNA u buněk CaCo2 po 24 h kultivace v mediu bez přidaného zdroje iontů železa.

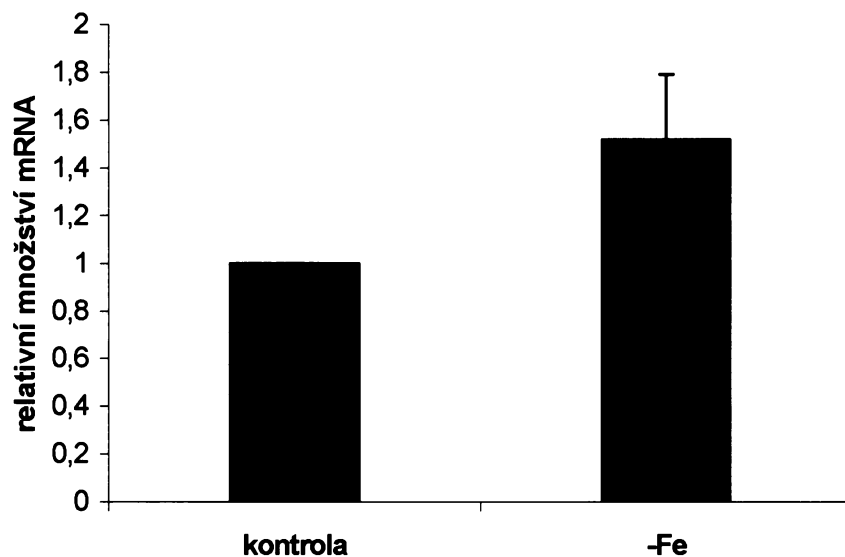
experiment	Relativní množství mRNA*				
	DMT1	Dcytb	Ferroportin	Hefestin	Ceruloplasmin
1	1,26	1,58	1,69	1,44	0,82
2	1,66	1,64	1,41	1,57	0,74
3	1,66	0,77	1,15	1,44	1,33
4	0,85	2,07	1,19	1,23	1,32
průměr ± SEM	1,36 ± 0,19	1,52 ± 0,27	1,36 ± 0,12	1,42 ± 0,07	1,05 ± 0,16

\*Jednotlivé hodnoty jsou vztaženy ke kontrolnímu vzorku (kalibrátoru), který byl nastaven na hodnotu 1,00.

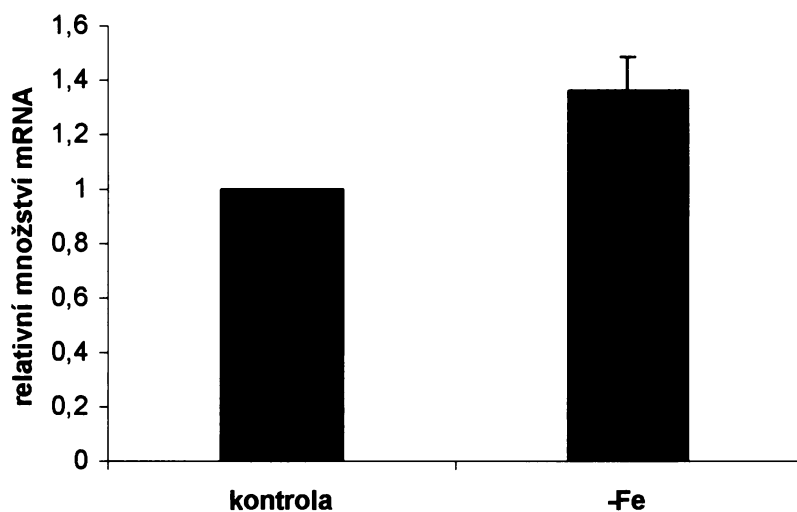
Souhrnné výsledky jsou uvedeny v Tab. 2. V případě buněk Caco-2 se u molekuly DMT1 po 24 hodinách bez iontů železa exprese zvýšila o 36% (obr. 5, str. 49). Ke zvýšení došlo i u Dcytb. Exprese byla zvýšená o 52% (obr. 6, str. 49). Exprese ferroportinu byla rovněž zvýšená. Zvýšení bylo 36% (obr. 7, str. 50). U hefestinu jsme zaznamenali zvýšení exprese, které činí 42% (obr. 8, str. 50). Co se týče ceruloplasminu se exprese zvýšila pouze o 5% (obr. 9, str. 51).



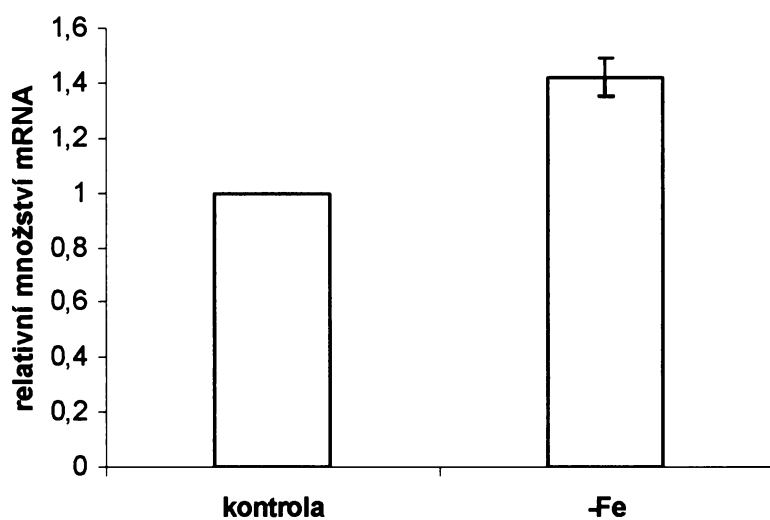
Obr. 5. Vliv deprivace iontů železa na expresi DMT1 u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 24 h v mediu bez dodaného zdroje iontů železa (-Fe) a buňky kontroly v mediu s transferinem obsaženým ve FBS jako zdrojem iontů železa.



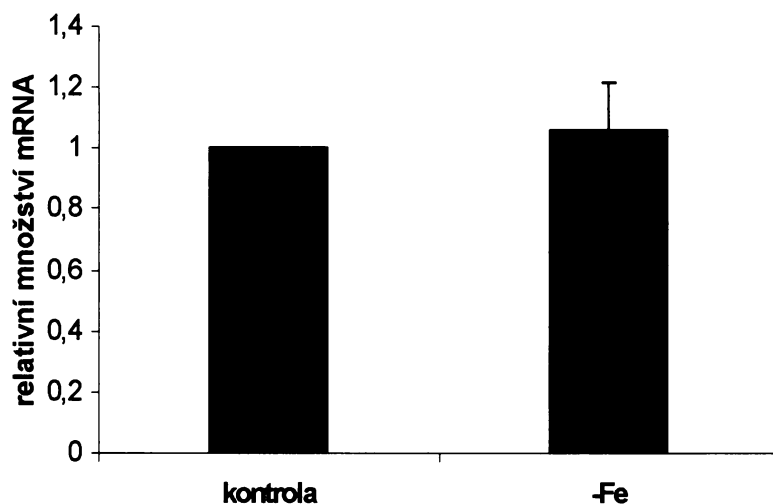
Obr. 6. Vliv deprivace iontů železa na expresi Dcytb u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 24 h v mediu bez dodaného zdroje iontů železa (-Fe) a buňky kontroly v mediu s transferinem obsaženým ve FBS jako zdrojem iontů železa.



Obr. 7. Vliv deprivace iontů železa na expresi ferroportinu u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 24 h v mediu bez dodaného zdroje iontů železa (-Fe) a buňky kontroly v mediu s transferinem obsaženým ve FBS jako zdrojem iontů železa.



Obr. 8. Vliv deprivace iontů železa na expresi hephaestinu u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 24 h v mediu bez dodaného zdroje iontů železa (-Fe) a buňky kontroly v mediu s transferinem obsaženým ve FBS jako zdrojem iontů železa.



Obr. 9. Vliv deprivace iontů železa na expresi ceruloplasminu u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 24 h v mediu bez dodaného zdroje iontů železa (-Fe) a buňky kontroly v mediu s transferinem obsaženým ve FBS jako zdrojem iontů železa.

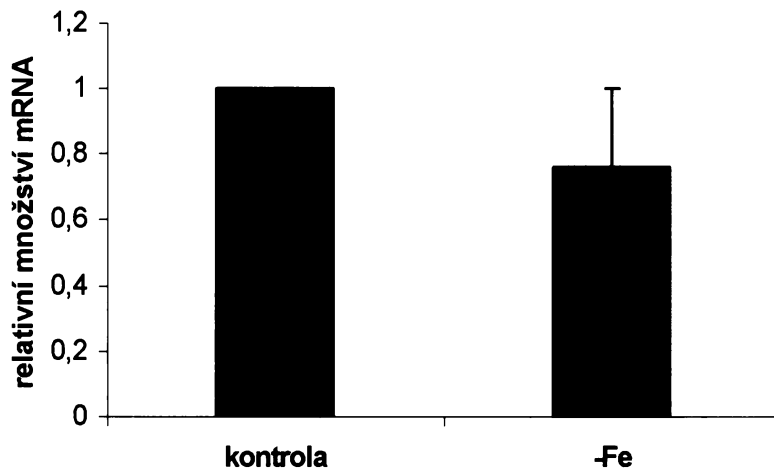
Podobně jsme stanovili expresi sledovaných molekul u buněk Caco-2 i po 72 hodinách kultivace v definovaném mediu bez přidaného zdroje iontů železa. Jako kontrolu jsme použili buňky kultivované v mediu obsahující transferin z FBS jako zdroj iontů železa. Kultivace probíhala v inkubátoru při 37°C a vlhčené atmosféře obsahující 5% CO<sub>2</sub>. Z buněk jsme následně izolovali mRNA a pomocí metody „Real-Time“ PCR jsme zjišťovali vliv deprivace iontů železa na expresi molekul transportu iontů železa: DMT1 („divalent metal transporter 1“), Dcytb („duodenal cytochrome b-like“), ferroportin 1, hefeštin, ceruloplasmin; na úrovni mRNA. Výsledky byly vyhodnoceny metodou 2<sup>-ddCt</sup>.

Tab. 3. Vliv deprivace iontů železa na expresi molekul transportu iontů železa na úrovni mRNA u buněk CaCo2 po 72 h kultivace v mediu bez přidaného zdroje iontů železa.

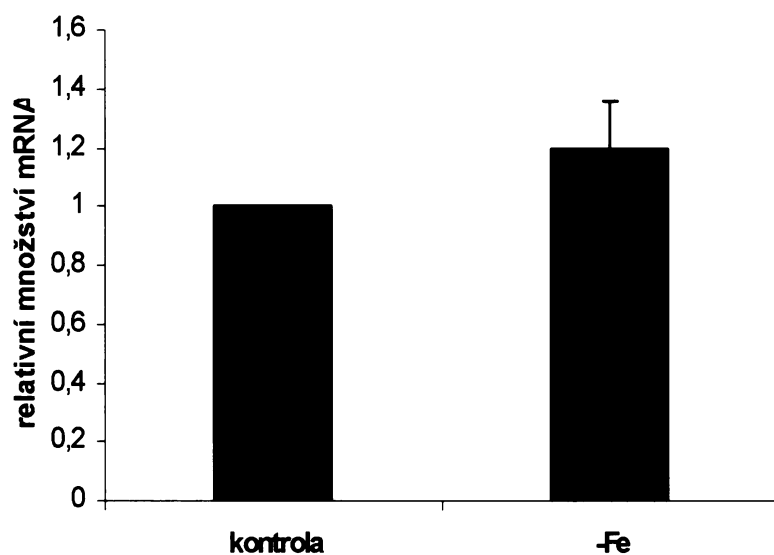
experiment	Relativní množství mRNA*				
	DMT1	Dcytb	Ferroportin	Hefestin	Ceruloplasmin
1	0,20	0,85	0,38	1,61	1,58
2	0,61	1,04	1,52	1,59	0,98
3	0,87	1,38	1,74	1,61	0,71
4	1,36	1,52	1,89	1,68	1,32
průměr ± SEM	0,76 ± ,24	1,20 ± 0,15	1,38 ± 0,34	1,62 ± 0,02	1,15 ± 0,19

\*Jednotlivé hodnoty jsou vztaženy ke kontrolnímu vzorku (kalibrátoru), který byl nastaven na hodnotu 1,00.

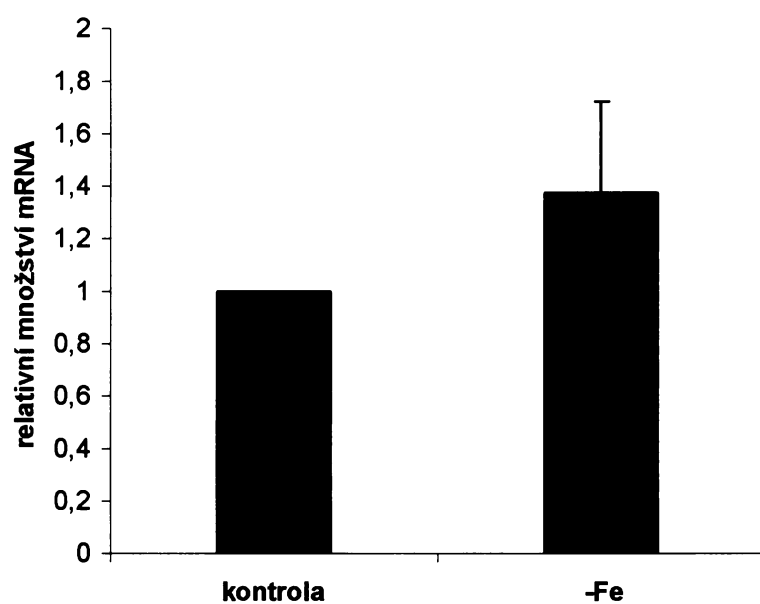
Souhrnné výsledky jsou uvedeny v Tab. 3. Po kultivaci 72 hodin v mediu bez přidaného zdroje iontů železa se u buněk Caco-2 snížila exprese DMT1 o 24% (obr. 10, str. 53). Ke zvýšení exprese došlo u molekuly Dcytb o 20% (obr. 11, str.53) a u ferroportinu 1 o 38% (obr. 11, str.54). U hefestinu jsme rovněž zaznamenali zvýšení, které činí 62% (obr. 13, str. 54). Stejně tak u ceruloplasminu se exprese o 15% zvýšila (obr.14, str. 55).



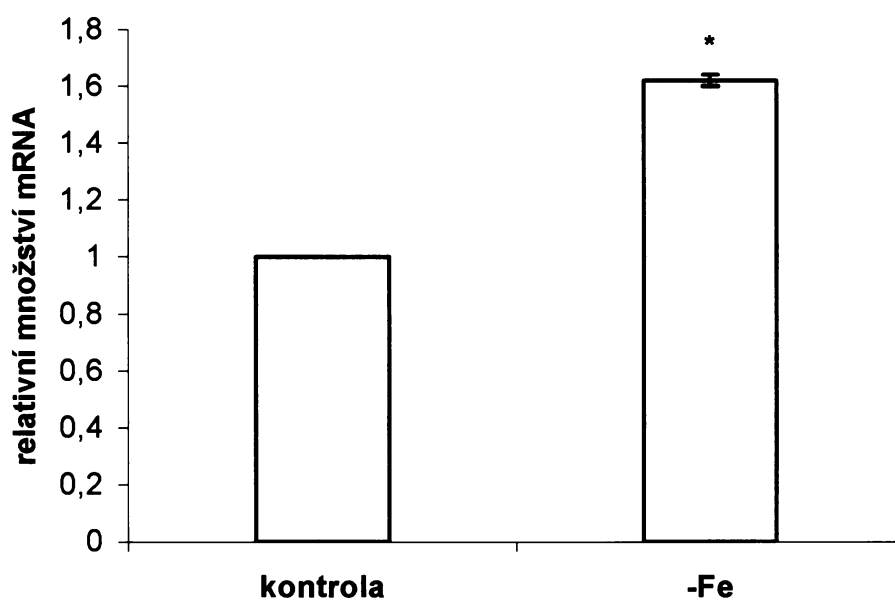
Obr. 10. Vliv deprivace iontů železa na expresi DMT1 u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 72 h v mediu bez dodaného zdroje iontů železa (-Fe) a buňky kontroly v mediu s transferinem obsaženým ve FBS jako zdrojem iontů železa.



Obr. 11. Vliv deprivace iontů železa na expresi Dcytb u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 72 h v mediu bez dodaného zdroje iontů železa (-Fe) a buňky kontroly v mediu s transferinem obsaženým ve FBS jako zdrojem iontů železa.

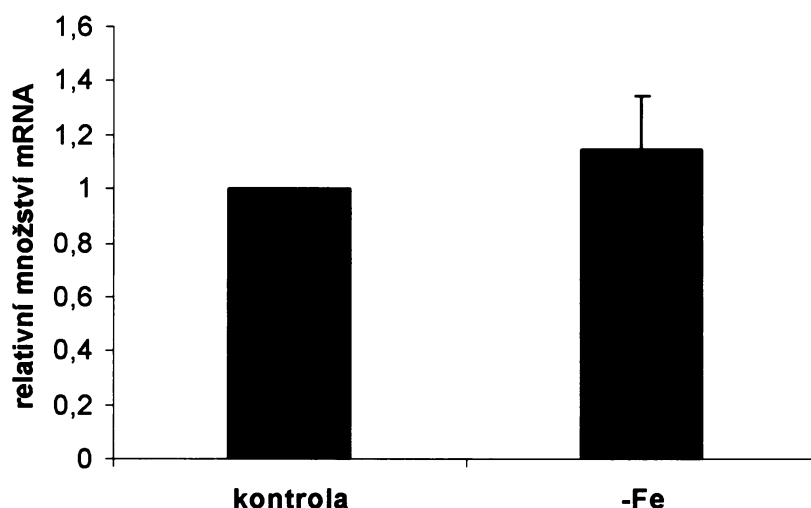


Obr. 12. Vliv deprivace iontů železa na expresi ferroportinu u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 72 h v mediu bez dodaného zdroje iontů železa (-Fe) a buňky kontroly v mediu s transferinem obsaženým ve FBS jako zdrojem iontů železa.



Obr. 13. Vliv deprivace iontů železa na expresi hephaestinu u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 72 h v mediu bez dodaného zdroje iontů železa (-Fe) a buňky kontroly

mediu s transferinem obsaženým ve FBS jako zdrojem iontů železa. \* statisticky signifikantní zvýšení exprese,  $P < 0,05$ .



Obr. 14. Vliv deprivace iontů železa na expresi ceruloplasminu u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 72 h v mediu bez dodaného zdroje iontů železa (-Fe) a buňky kontroly v mediu s transferinem obsaženým ve FBS jako zdrojem iontů železa.

## 5.2. Vliv vysokých hladin netransferinových iontů železa na expresi molekul zúčastněných v transportu iontů železa

### 5.2.1. Vliv vysokých hladin netransferinových iontů železa na expresi molekul zúčastněných v transportu iontů železa u buněk lidské erytroleukemické linie K562

Buňky linie K562 jsme kultivovali po dobu 24 hodin v chemicky definovaném médiu s citrátem železitým (500  $\mu\text{M}$ ) jako zdrojem iontů železa. Jako kontrolu jsme opět použili buňky kultivované v médiu s lidským transferinem (5  $\mu\text{g/ml}$ ) jako zdrojem iontů železa. Kultivace probíhala v inkubátoru při 37°C a vlhčené atmosféře obsahující 5 %  $\text{CO}_2$ . Z buněk jsme izolovali RNA a pomocí metody „Real-Time“ PCR jsme zjišťovali vliv na expresi



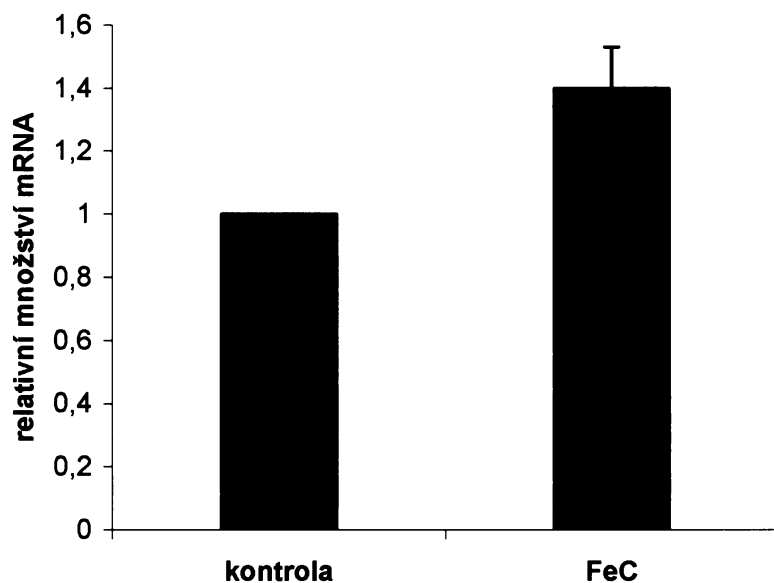
sledovaných molekul transportu iontů železa: DMT1 („divalent metal transporter1“), Dcytb („duodenal cytochrome b-like“), ferroportin, hefestin, ceruloplasmin; na úrovni mRNA. Výsledky byly vyhodnoceny metodou  $2^{-ddCt}$ .

Tab. 4. Vliv vysoké hladiny iontů železa na expresi molekul transportu iontů železa na úrovni mRNA u buněk K562 po 24 h kultivace v mediu s přidáním zdrojem iontů železa (citrát železitý 500  $\mu$ M).

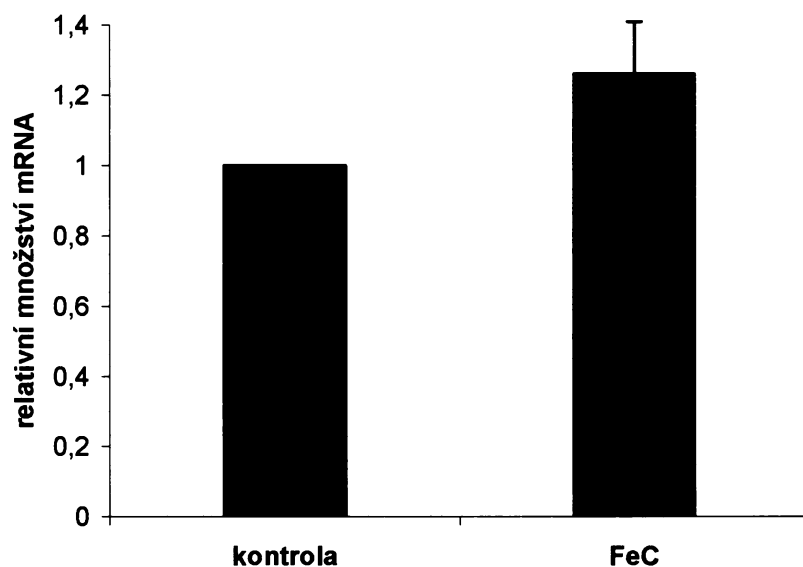
experiment	Relativní množství mRNA *			
	DMT1	Dcytb	Ferroportin	Hefestin
1	1,04	1,04	1,33	1,04
2	1,65	1,43	2,06	1,01
3	1,51	1,59	1,73	1,26
4	1,41	0,97	1,68	1,03
průměr $\pm$ SEM	1,40 $\pm$ 0,13	1,26 $\pm$ 0,15	1,70 $\pm$ 0,15	1,09 $\pm$ 0,06

\*Jednotlivé hodnoty jsou vztaženy ke kontrolnímu vzorku (kalibrátoru), který byl nastaven na hodnotu 1,00.

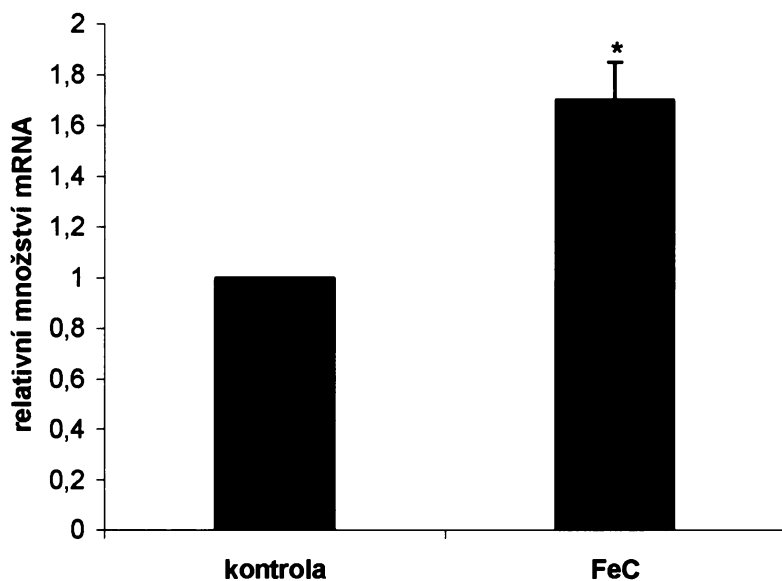
Souhrnné výsledky jsou uvedeny v Tab. 4. Hladina mRNA pro ceruloplasmin byla opět tak nízká, že nebyla u buněk K562 metodou Real-Time PCR detekovatelná. U transportéru DMT1 se exprese po vlivu zvýšené hladiny iontů železa zvýšila o 40% (obr. 15, str. 57). Stejně tak došlo ke zvýšení exprese u molekuly Dcytb a to o 26% (obr. 16, str. 57). Exprese ferroportinu se rovněž výrazněji zvýšila, byla vyšší o 70% (obr. 17, str. 58). U hefestinu ke změně exprese vlivem zvýšené hladiny iontů železa téměř nedošlo (obr. 18, str. 58).



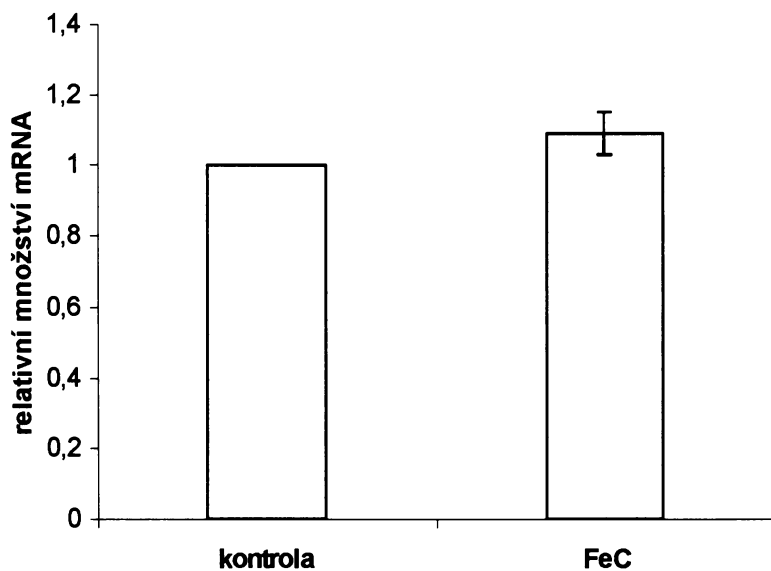
Obr. 15. Vliv zvýšené hladiny iontů železa na expresi DMT1 u buněk K562. Buňky byly kultivovány 24 h v mediu s citrátem železitým (FeC) jako zdrojem zvýšené hladiny iontů železa (500  $\mu$ M) a buňky kontroly v mediu s transferinem (5  $\mu$ g/ml) jako zdrojem iontů železa.



Obr. 16. Vliv zvýšené hladiny iontů železa na expresi Dcytb u buněk K562. Buňky byly kultivovány 24 h v mediu s citrátem železitým (FeC) jako zdrojem zvýšené hladiny iontů železa (500  $\mu$ M) a buňky kontroly v mediu s transferinem (5  $\mu$ g/ml) jako zdrojem iontů železa.



Obr. 17. Vliv zvýšené hladiny iontů železa na expresi ferroportinu 1 u buněk K562. Buňky byly kultivovány 24 h v médiu s citrátem železitým (FeC) jako zdrojem zvýšené hladiny iontů železa ( $500 \mu\text{M}$ ) a buňky kontroly v médiu s transferinem ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) jako zdrojem iontů železa. \* statisticky signifikantní zvýšení exprese,  $P < 0,05$ .



Obr. 18. Vliv zvýšené hladiny iontů železa na expresi hefestinu u buněk K562. Buňky byly kultivovány 24 hod. v médiu s citrátem železitým (FeC) jako zdrojem zvýšené hladiny iontů železa ( $500 \mu\text{M}$ ) a buňky kontroly v médiu s transferinem ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) jako zdrojem iontů železa.

### 5.2.2. Vliv vysokých hladin netransferinových iontů železa na expresi molekul zúčastněných v transportu iontů železa u buněk lidské linie kolorektálního karcinomu Caco-2

Buňky linie Caco-2 jsme kultivovali po dobu 24 hodin v chemicky definovaném mediu s citrátem železitým (500  $\mu\text{M}$ ) jako zdrojem iontů železa. Jako kontrolu jsme použili buňky kultivované v mediu obsahující transferin z FBS jako zdroj iontů železa. Kultivace probíhala v inkubátoru při 37°C a vlhčené atmosféře obsahující 5 %  $\text{CO}_2$ . Z buněk jsme izolovali RNA a pomocí metody „Real-Time“ PCR jsme zjišťovali vliv na expresi sledovaných molekul transportu iontů železa: DMT1 („divalent metal transporter 1“), Dcytb („duodenal cytochrome b-like“), ferroportin, hefestin, ceruloplasmin; na úrovni mRNA. Výsledky byly vyhodnoceny metodou  $2^{-\text{ddCt}}$ .

Tab. 5. Vliv zvýšené hladiny iontů železa na expresi molekul transportu iontů železa na úrovni mRNA u buněk Caco-2 po 24 h kultivace v mediu s přidaným zdrojem iontů železa (citrát železitý 500  $\mu\text{M}$ ).

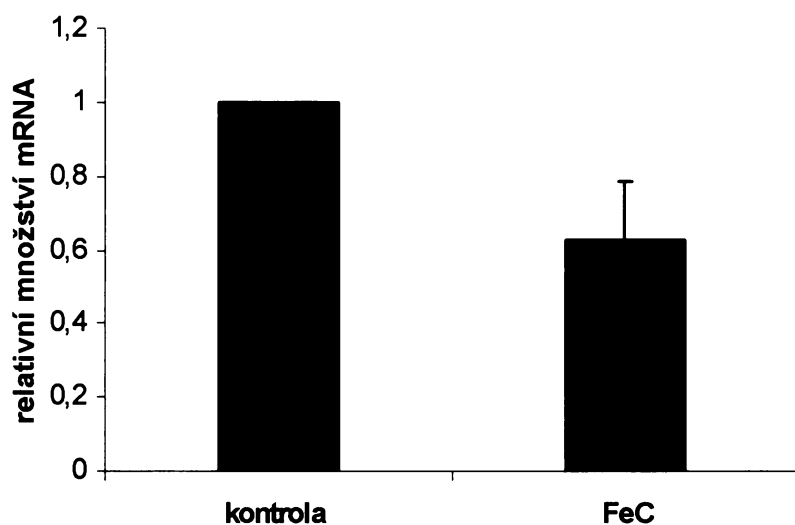
experiment	Relativní množství mRNA*				
	DMT1	Dcytb	Ferroportin	Hefestin	Ceruloplasmin
1	0,97	1,67	1,44	1,45	1,17
2	0,30	1,63	0,70 <sup>#</sup>	1,35	1,07
3	0,43	1,74	1,46	1,39	1,23
4	0,81	1,35	1,37	1,49	1,79 <sup>#</sup>
průměr $\pm$ SEM	0,63 $\pm$ 0,16	1,60 $\pm$ 0,09	1,42 $\pm$ 0,03	1,42 $\pm$ 0,03	1,16 $\pm$ 0,07

\*Jednotlivé hodnoty jsou vztaženy ke kontrolnímu vzorku, který byl nastaven na hodnotu 1,00.

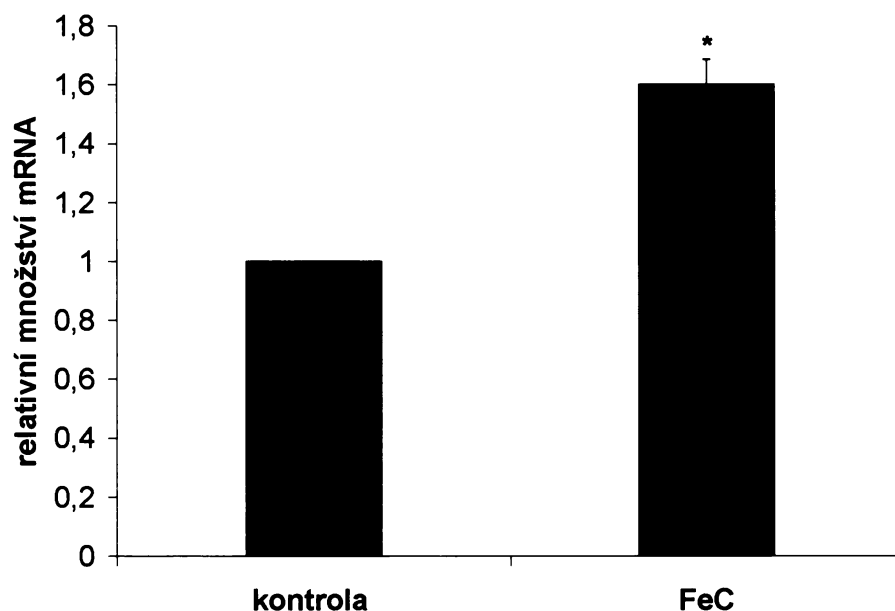
<sup>#</sup>Hodnoty podezřelé jako odlehlé a na základě Q testu vyloučené.

Souhrnné výsledky jsou uvedeny v Tab. 5. U molekuly DMT1 jsme jako u jediné ze sledovaných molekul transportu iontů železa zjistili snížení exprese o 37% (obr. 19, str. 60). Ke zvýšení exprese došlo u Dcytb a to více jak o polovinu, o 60% (obr. 20, str. 60). Exprese ferroportinu se rovněž zvýšila, a to o 42% (obr. 21, str. 61). Ke stejnému zvýšení exprese

došlo u hefestinu (obr. 22, str. 61). U ceruloplasminu se ukázalo pouze mírné zvýšení exprese a to o 16% (obr. 23, str. 62).

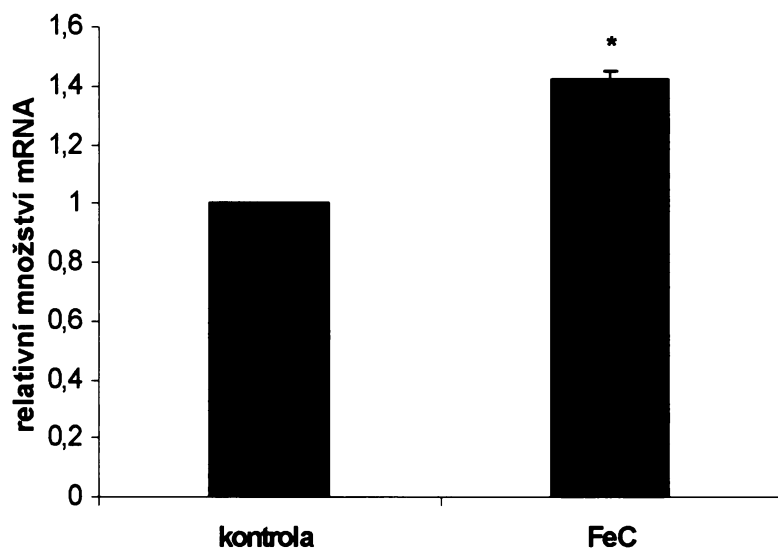


Obr. 19. Vliv zvýšené hladiny iontů železa na expresi DMT1 u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 24 h v mediu s citrátem železitým (FeC) jako zdrojem zvýšené hladiny iontů železa (500  $\mu$ M) a buňky kontroly v mediu s transferinem (5  $\mu$ g/ml) jako zdrojem iontů železa.

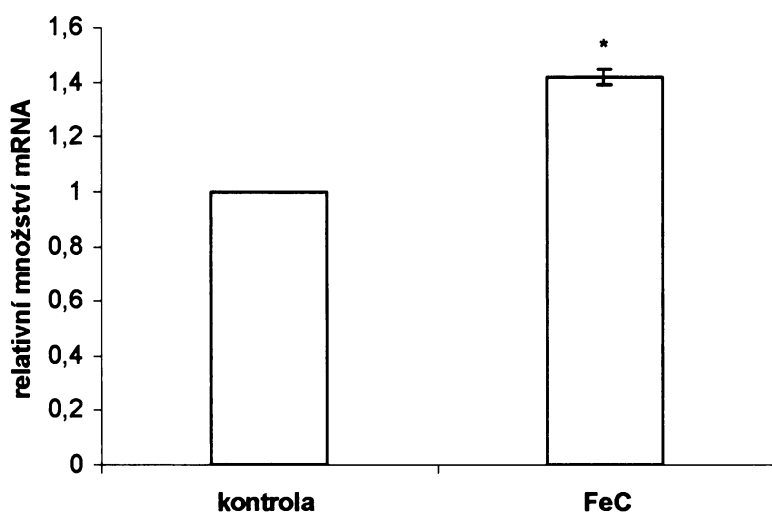


Obr. 20. Vliv zvýšené hladiny iontů železa na expresi Dcytb u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 24 hod. v mediu s citrátem železitým (FeC) jako zdrojem zvýšené

hladiny iontů železa (500  $\mu\text{M}$ ) a buňky kontroly v médiu s transferinem (5  $\mu\text{g/ml}$ ) jako zdrojem iontů železa. \* statisticky signifikantní zvýšení exprese,  $P < 0,05$ .

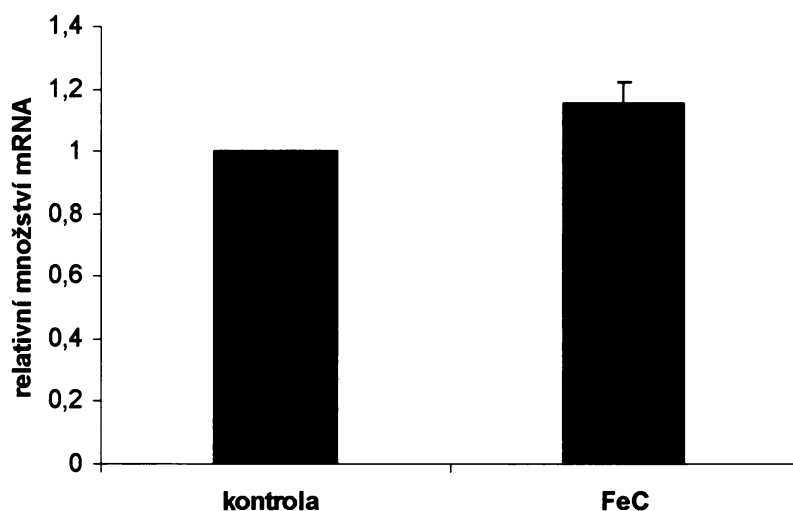


Obr. 21. Vliv zvýšené hladiny iontů železa na expresi ferroportinu u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 24 h v médiu s citrátom železitým (FeC) jako zdrojem zvýšené hladiny iontů železa (500  $\mu\text{M}$ ) a buňky kontroly v médiu s transferinem (5  $\mu\text{g/ml}$ ) jako zdrojem iontů železa. \* statisticky signifikantní zvýšení exprese,  $P < 0,05$ .



Obr. 22. Vliv zvýšené hladiny iontů železa na expresi hephaestinu u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 24 h v médiu s citrátom železitým (FeC) jako zdrojem zvýšené

hladiny iontů železa (500  $\mu\text{M}$ ) a buňky kontroly v mediu s transferinem (5  $\mu\text{g/ml}$ ) jako zdrojem iontů železa. \* signifikantní zvýšení exprese,  $P < 0,05$ .



Obr. 23. Vliv zvýšené hladiny iontů železa na expresi ceruloplasminu u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 24 hod. v mediu s citrátem železitým (FeC) jako zdrojem zvýšené hladiny iontů železa (500  $\mu\text{M}$ ) a buňky kontroly v mediu s transferinem (5  $\mu\text{g/ml}$ ) jako zdrojem iontů železa.

Buňky linie Caco-2 jsme kultivovali v chemicky definovaném mediu s citrátem železitým (500  $\mu\text{M}$ ) jako zdrojem iontů železa i po dobu 72 hodin. Jako kontrolu jsme použili buňky kultivované v mediu obsahující transferin z FBS jako zdroj iontů železa. Kultivace probíhala v inkubátoru při 37°C a vlhčené atmosféře obsahující 5 %  $\text{CO}_2$ . Z buněk jsme izolovali RNA a pomocí metody „Real-Time“ PCR jsme zjišťovali vliv exprese na úrovni mRNA u námi sledovaných molekul transportu iontů železa. Výsledky byly vyhodnoceny metodou  $2^{-\text{ddCt}}$ .

Tab. 6. Vliv zvýšené hladiny iontů železa na expresi molekul transportu iontů železa na úrovni mRNA u buněk Caco-2 po 72 h kultivace v mediu s přidáním zdrojem iontů železa (citrát železitý 500  $\mu$ M).

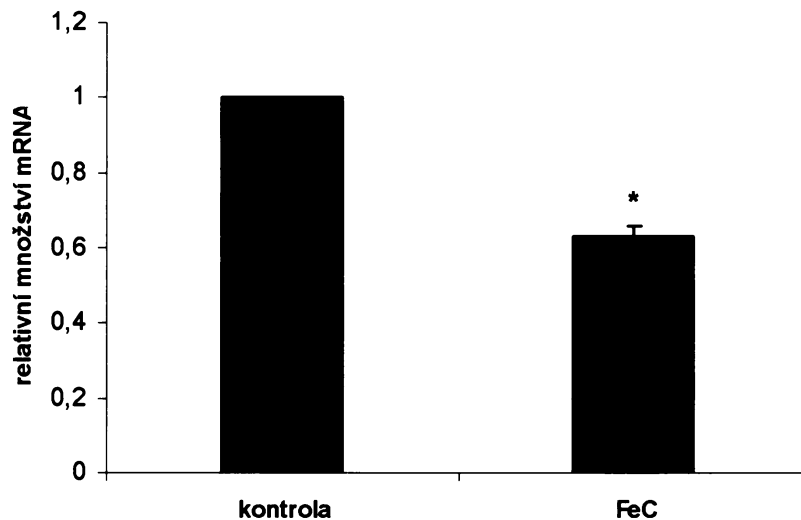
experiment	Relativní množství RNA*				
	DMT1	Dcytb	Ferroportin	Hefestin	Ceruloplasmin
1	0,59	1,89	1,69 <sup>#</sup>	2,00	0,85
2	0,60	1,57	1,14	1,57	1,12
3	0,63	2,19	1,03	2,06	1,34
4	0,71	1,83	1,03	1,91	0,73
průměr $\pm$ SEM	0,63 $\pm$ 0,03	1,87 $\pm$ 0,13	1,07 $\pm$ 0,04	1,89 $\pm$ 0,11	1,01 $\pm$ 0,14

\*Jednotlivé hodnoty jsou vztaženy ke kontrolnímu vzorku (kalibrátoru), který byl nastaven na hodnotu 1,00

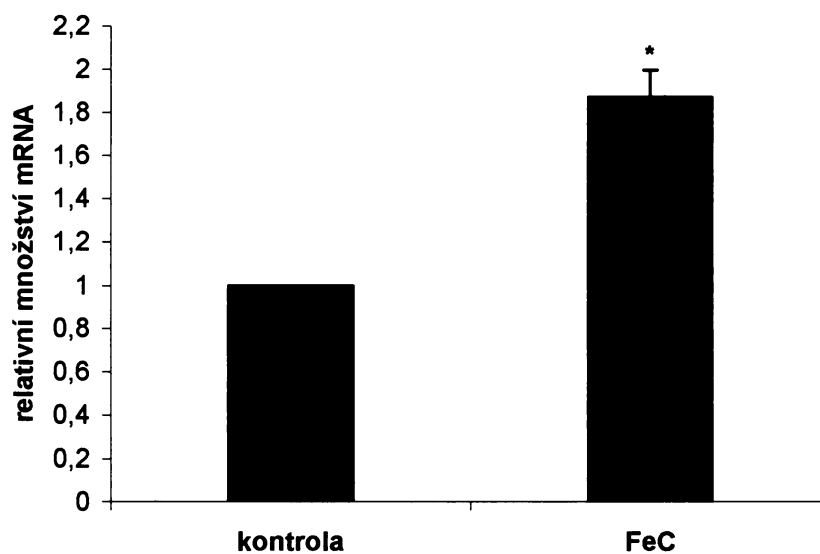
<sup>#</sup>Hodnoty podezřelé jako odlehlé a na základě Q testu vyloučené

Souhrnné výsledky jsou uvedeny v Tab. 6. Expres mRNA kódující DMT1 se snížila o 27% (obr. 24, str. 64) Expres ferrireduktázy Dcytb se poměrně značně zvýšila, navýšení bylo o 87% (obr. 25, str. 64). Expres mRNA kódující ferroportin se téměř nezměnila, o pouhých 7% se zvýšila (obr. 26, str. 65). U hephaestinu, stejně jako u Dcytb, došlo k navýšení o 87% (obr. 27, str. 66). Expres ceruloplasminu se prakticky nezměnila (obr. 28, str. 67).

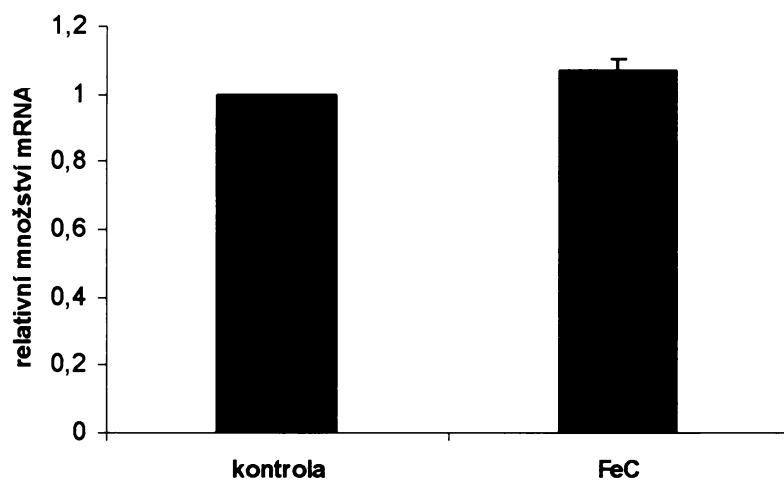




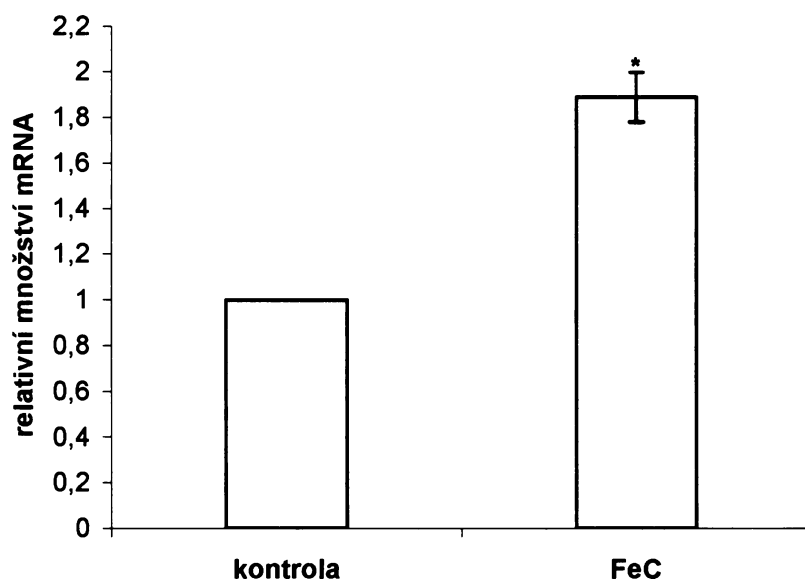
Obr. 24. Vliv zvýšené hladiny iontů železa na expresi DMT1 u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 72 h v mediu s citrátem železitým (FeC) jako zdrojem zvýšené hladiny iontů železa (500  $\mu$ M) a buňky kontroly v mediu s transferinem (5  $\mu$ g/ml) jako zdrojem iontů železa. \*statisticky signifikantní snížení exprese,  $P < 0,05$ .



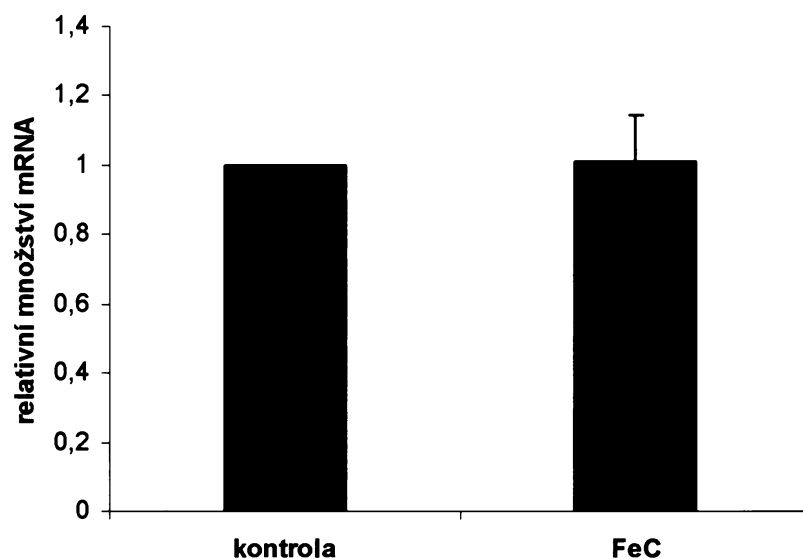
Obr. 25. Vliv zvýšené hladiny iontů železa na expresi Dcytb u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 72 h v mediu s citrátem železitým (FeC) jako zdrojem zvýšené hladiny iontů železa (500  $\mu$ M) a buňky kontroly v mediu s transferinem (5  $\mu$ g/ml) jako zdrojem iontů železa. \* statisticky signifikantní zvýšení exprese,  $P < 0,05$ .



Obr. 26. Vliv zvýšené hladiny iontů železa na expresi ferroportinu u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 72 h v mediu s citrátem železitým (FeC) jako zdrojem zvýšené hladiny iontů železa (500  $\mu$ M) a buňky kontroly v mediu s transferinem (5  $\mu$ g/ml) jako zdrojem iontů železa.



Obr. 27. Vliv zvýšené hladiny iontů železa na expresi hepcidinu u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 72 h v mediu s citrátem železitým (FeC) jako zdrojem zvýšené hladiny iontů železa (500  $\mu$ M) a buňky kontroly v mediu s transferinem (5  $\mu$ g/ml) jako zdrojem iontů železa. \* statisticky signifikantní zvýšení exprese,  $P < 0,05$ .



Obr. 28. Vliv zvýšené hladiny iontů železa na expresi ceruloplasminu u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 72 h v mediu s citrátem železitým (FeC) jako zdrojem zvýšené hladiny iontů železa (500  $\mu$ M) a buňky kontroly v mediu s transferinem (5  $\mu$ g/ml) jako zdrojem iontů železa.

### 5.3. Vliv ethanolu na expresi molekul zúčastněných v transportu netransferinových iontů železa

#### 5.3.1. Vliv ethanolu na expresi molekul zúčastněných v transportu netransferinových iontů železa u buněk lidské linie kolorektálního karcinomu Caco-2

Na základě klinických zjištění, kdy byl prokázán vztah ethanolu a poruch metabolismu iontů železa se může předpokládat, že ethanol ovlivňuje transport iontů železa. Expresi transportních molekul jsme se snažili ovlivnit přítomností ethanolu v kultivačním mediu. V tomto experimentu byly v mediu s alkoholem kultivovány buňky, které nikdy dříve s alkoholem do styku nepřišly. Pozorovali jsme, jaká bude odpověď po prvních 48 hodinách kultivace. Cílem bylo zjistit zda nedochází k ovlivnění exprese molekul transportu: DMT1 („divalent metal transporter 1“), Dcytb („duodenal cytochrom b-like“), ferroportin 1, hefeštin, ceruoplasmin; na úrovni mRNA působením ethanolu.

Buňky linie Caco-2 jsme kultivovali po dobu 48 hodin v mediu obsahující 2 % ethanolu. Jako kontrolu jsme použili buňky kultivované v mediu bez ethanolu. Kultivace probíhala v

inkubátoru při 37°C a vlhčené atmosféře obsahující 5 % CO<sub>2</sub>. Z buněk jsme izolovali RNA a pomocí metody „Real-Time“ PCR jsme zjišťovali vliv exprese na úrovni mRNA u námi sledovaných molekul transportu iontů železa. Výsledky byly vyhodnoceny metodou 2<sup>-ddCt</sup>.

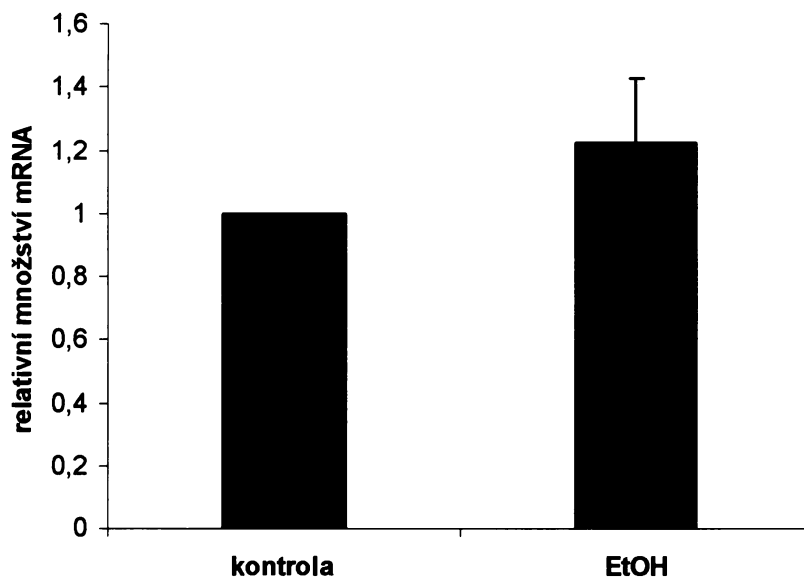
Tab. 7. Vliv ethanolu na expresi molekul transportu iontů železa na úrovni mRNA u buněk Caco-2 po 48 hod kultivace v mediu obsahujícím 2 % ethanolu.

experiment	Relativní množství mRNA*				
	DMT1	Dcytb	Ferroportin	Hefestin	Ceruloplasmin
1	1,16	1,13	1,51	1,05	1,06
2	0,64	1,06	0,70 <sup>#</sup>	1,06	0,49 <sup>#</sup>
3	1,50	1,20	1,40	1,24	1,03
4	1,58	1,21	1,35	1,00	1,02
průměr ± SEM	1,22 ± 0,21	1,15 ± 0,04	1,42 ± 0,05	1,09 ± 0,05	1,04 ± 0,01

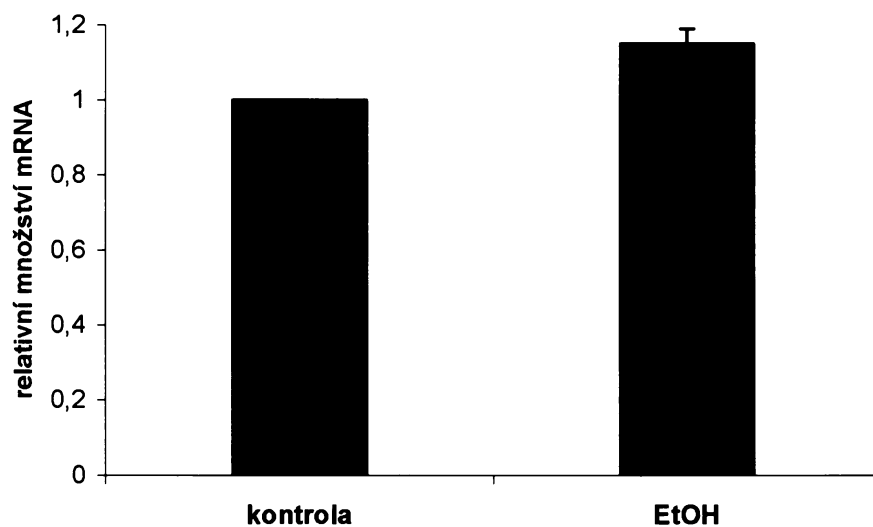
\*Jednotlivé hodnoty jsou vztaheny ke kontrolnímu vzorku (kalibrátoru), který byl nastaven na hodnotu 1,00

<sup>#</sup>Hodnoty podezřelé jako odlehlé a na základě Q testu vyloučené

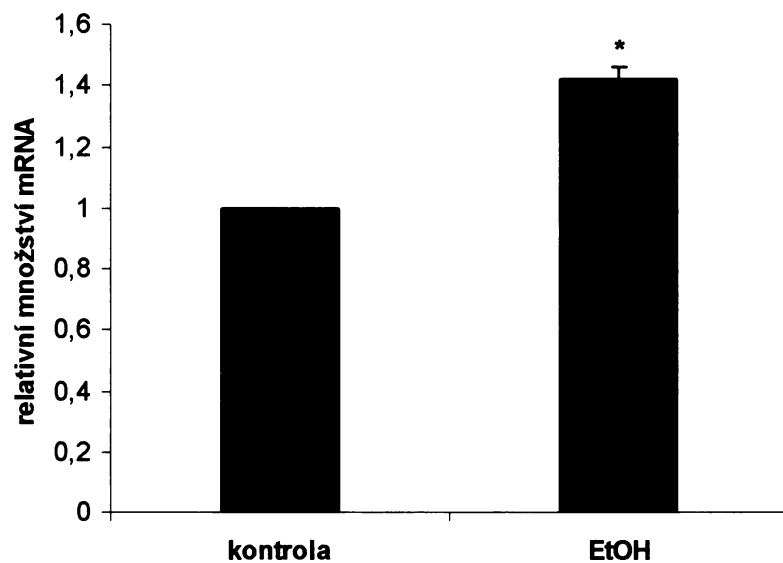
Souhrnné výsledky jsou uvedeny v Tab.7. Výsledky ovlivnění buněk Caco-2 ethanolem, jsou u molekul transportu iontů železa na úrovni mRNA následující. Exprese DMT1 se zvýšila o 22% (obr. 29, str. 68). U Dcytb byla exprese vyšší o 15% (obr. 30, str. 68). Jediné významnější ovlivnění jsme zaznamenali u ferroportinu. Exprese ferroportinu se o 42% zvýšila (obr. 31, str. 69). Exprese hefestinu a ceruloplasminu nedoznala téměř žádných změn. U hefestinu byla exprese zvýšena o 9% (obr. 32, str. 69) a u ceruloplasminu o pouhé 4% (obr. 33, str. 70).



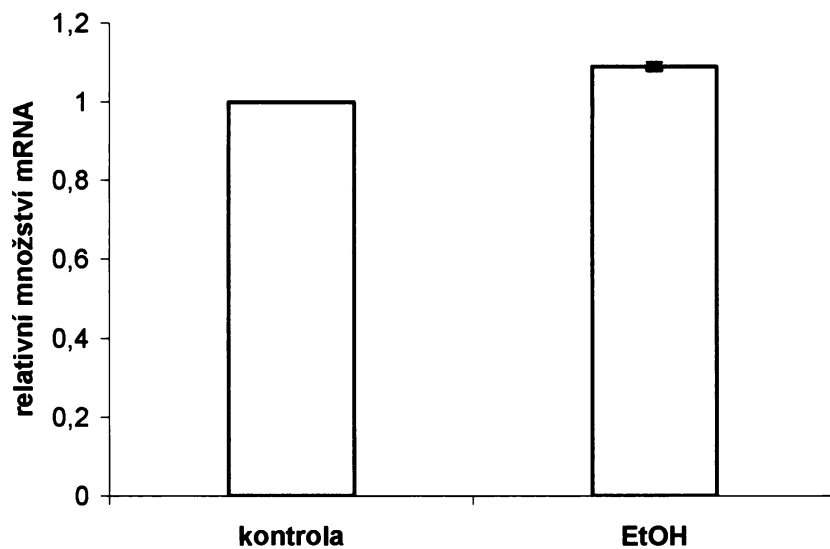
Obr. 29. Vliv ethanolu na expresi DMT1 u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 48 h v mediu s 2 % ethanolu (EtOH) a buňky kontroly v mediu bez ethanolu.



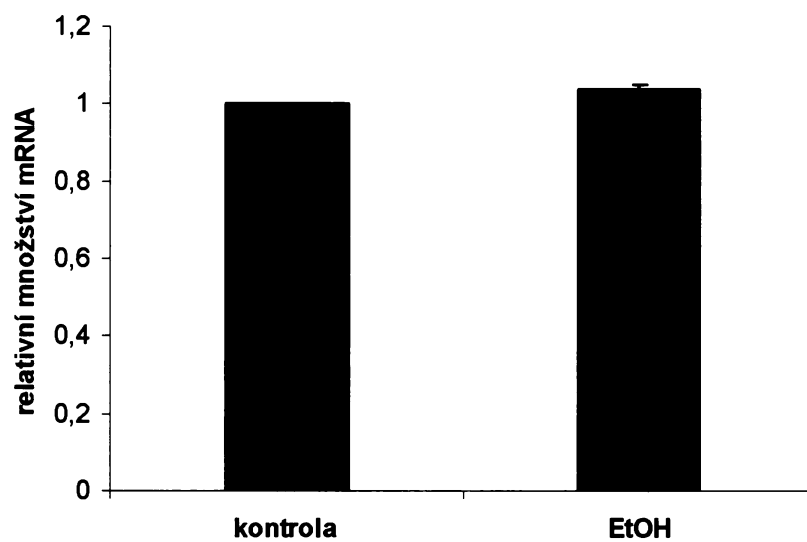
Obr. 30. Vliv ethanolu na expresi Dcytb u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 48 h v mediu s 2 % ethanolu (EtOH) a buňky kontroly v mediu bez ethanolu.



Obr. 31. Vliv ethanolu na expresi ferroportinu 1 u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 48 h v mediu s 2 % ethanolu (EtOH) a buňky kontroly v mediu bez ethanolu. \* statisticky signifikantní zvýšení exprese,  $P < 0,05$ .



Obr. 32. Vliv ethanolu na expresi hepcidinu u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 48 h v mediu s 2 % ethanolu (EtOH) a buňky kontroly v mediu bez ethanolu.



Obr. 33. Vliv ethanolu na expresi ceruloplasminu u buněk Caco-2. Buňky byly kultivovány 48 h v mediu s 2 % ethanolu (EtOH) a buňky kontroly v mediu bez ethanolu.

## 6. Diskuse

Díky velkému zájmu o problematiku metabolismu a transportu iontů železa došlo v posledních letech ke značnému pokroku v poznání některých mechanismů transportu iontů železa přes plazmatickou membránu.

Zásadní roli při absorpci a transportu netransferinových iontů železa přes apikální a bazální membránu enterocytů hrají membránové transportéry DMT1 („divalent metal transporter 1“) a ferroportin 1. Tyto transportéry byly detekovány i u neenterocytárních buněk. Vzhledem k tomu, že oba uvedené transportéry jsou schopny přenášet pouze dvojmocné ionty železa, mají svou nezastupitelnou roli v transportu iontů železa také membránová ferrireduktasa Dcytb („duodenal cytochrom b-like“) přítomná na apikální straně enterocytů, která redukuje ionty železité na železnaté, a membránová ferroxidasa hefestin případně cytoplazmatický ceruloplasmin, které na bazální straně enterocytů zajišťují zpětnou oxidaci iontů železnatých na železité. Další důležitou funkcí DMT1 v transportu iontů železa je jejich přenos z endosomů do cytoplazmy. Železnaté ionty, transportované přes cytoplazmatickou membránu, jsou po oxidaci na ionty železité přenášeny v organismu pomocí molekuly transferinu.

Studovali jsme vliv deprivace netransferinových iontů železa, vliv vysokých hladin netransferinových iontů železa a vliv ethanolu na expresi molekul transportu netransferinového železa přes plazmatickou membránu *in vitro*. Jedná se o molekuly DMT1, Dcytb, ferroportin 1, hefestin a ceruloplasmin. Vliv na jejich expresi jsme zjišťovali na úrovni mRNA pomocí metody „Real-Time“ PCR. Dvě základní nastavení experimentů měla simulovat jednak nedostatek iontů železa v organismu – buňky byly kultivovány v mediu bez přídavku iontů železa, jednak přesycení organismu ionty železa – buňky byly kultivovány v mediu s vysokou hladinou volných iontů železa v podobě citrátu železitého.

### 6.1. Experimentální model

Jako model střevních enterocytů, s odlišnou apikální a bazální membránou, jsme použili buněčnou linii Caco-2 (lidský kolorektální karcinom), jež reprezentuje buňky zajišťující absorpci iontů železa do organismu. Jako model neenterocytárních buněk jsme



použili linii K562 (lidská erytroleukemie), která reprezentuje buňky významným způsobem využívající ionty železa. Vzhledem k pomalejšímu růstu buněk Caco-2, a tomu, že k ovlivnění exprese transportních proteinů u nich může docházet v delším časovém horizontu, jsme sledovali vliv na expresi transportních molekul jak po 24 hodinách tak i po 72 hodinách.

V naší laboratoři jsme pro studium použili vlastní chemicky definovaná kultivační media. Kultivační medium pro buňky K562 bylo chemicky definované medium obsahující lidský transferin (5  $\mu\text{g/ml}$ ) jako zdroj iontů železa. Medium pro buňky Caco-2 obsahuje jako zdroj iontů železa transferin z fetálního bovinního séra (FBS). Medium navozující stav deprivace iontů železa bylo chemicky definované medium bez jakýchkoli přísad iontů železa. Pro navození vysokých hladin iontů železa jsme buňky inkubovali v chemicky definovaném mediu obsahující citrát železitý o výsledné koncentraci 500  $\mu\text{M}$ , jako zdroj netransferinových iontů železa. Použitím tohoto modelu můžeme zajistit, že případné změny exprese sledovaných molekul jsou skutečně důsledkem různé koncentrace iontů železa v mediu.

## **6.2. Vliv deprivace iontů železa na expresi molekul účastnicích se transportu iontů železa**

### **6.2.1. Vliv deprivace iontů železa na expresi molekul účastnicích se transportu iontů železa u buněk linie K562**

Při sledování vlivu nedostatku netransferinových iontů železa na molekuly transportu těchto iontů u buněčné linie K562 jsme zjistili, že tyto buňky neexprimují detekovatelnou hladinu mRNA pro ceruloplasmin.

Attieh a kol. [92] však pomocí radioaktivního železa stanovili, že ferroxidasová aktivita ceruloplasminu stimuluje absorpci iontů železa. Ceruloplasminem stimulovaná absorpce byla 2-3krát vyšší u buněk s nedostatečným přísunem iontů železa. V případě nadbytku iontů železa nebyla žádná změna zjištěna.

U feroxidasy hefestinu jsme žádný vliv na expresi nezaznamenali. Nesignifikantní snížení jsme zjistili u ferrireduktasy Dcytb (12%). Exprese mRNA se také snížila u molekuly DMT1 (přibližně o 20%) a molekuly ferroportinu (přibližně o 40%).

Z těchto výsledků vyplývá, že exprese molekul účastnících se transportu iontů netransferinového železa přes plazmatickou membránu u K562 buněk se výrazněji nemění, a nebo se snižuje (ferroportin1 a DMT1) při deprivaci iontů železa.

### **6.2.2. Vliv deprivace iontů železa na expresi molekul účastnících se transportu iontů železa u buněk linie Caco-2**

V současnosti je známo několik studií zabývajících se sledováním vlivů iontů železa na expresi transportéru DMT1 a ferroportinu u Caco-2 buněčné linie [10], [93]. V těchto studiích bylo prokázáno, že se exprese mRNA obou proteinů s nedostatkem iontů železa zvyšuje. Vzhledem k tomu, že nastavení jednotlivých experimentů bylo odlišné, je srovnání výsledků velice obtížné. Ukázali jsme, že po 24 hodinách inkubace v médiu bez přítomnosti iontů železa došlo rovněž ke zvýšení exprese DMT1 a ferroportinu 1 a to shodně o necelých 40%. Po 72 hodinách se exprese ferroportinu 1, ve srovnání s expresí naměřenou po 24 hodinách, nezměnila. Exprese DMT1 byla po 72 hodinách ve srovnání s expresí ovlivněnou inkubací bez přítomnosti iontů železa po 24 hodin nižší, a to dokonce o 60%. Došlo tedy ke 25% snížení exprese molekuly DMT1 po 72 hodinách inkubace bez iontů železa.

Studie prováděné na vzorcích lidské duodenální sliznice potvrzují uvedené skutečnosti. Nedostatek iontů železa, v těchto pracech sledovaný u anemických pacientů, měl za následek vzrůst exprese DMT1 a ferroportinu 1 [94], [89], [95], [96], [97]. U molekuly Dcytb a hefestinu nezjistili Gleeson a kol. [96] signifikantní změnu. Oproti tomu Zoller a kol. [95] ve své práci ukazuje u deficientních pacientů zvýšení exprese mRNA kódující Dcytb i hefestin. Ferrooxidaseou ceruloplasminem se žádná z těchto prací nezabývala. Naše výsledky ukazují jak v případě Dcytb, tak hefestinu zvýšení exprese přibližně o polovinu po 24 i 72 hodinách inkubace buněk bez železa. V obou případech byla změna exprese u hefestinu zvýšená statisticky signifikantně.

### **6.3. Vliv vysokých hladin netransferinových iontů železa na expresi molekul transportu iontů železa**

#### **6.3.1. Vliv vysokých hladin netransferinových iontů železa na expresi molekul transportu iontů železa u buněk K562**

Oproti deprivaci iontů železa jsme v tomto případě zjistili zvýšení exprese u všech sledovaných molekul kromě ceruloplasminu (viz kap. 6.2.1.). K nevýznamnému zvýšení exprese došlo u hephaestinu a poměrně malé zvýšení se ukázalo i u molekuly Dcytb (26%). V případě molekuly DMT1 jsme zaznamenali 40% a u ferroportinu dokonce 70% zvýšení exprese.

Tyto výsledky tedy nasvědčují tomu, že snad s výjimkou hefestinu, u něž nebyla exprese téměř ovlivněna, je v případě buněčné linie K562 pozorovatelná korelace mezi množstvím iontů železa v médiu a expresí molekul účastnících se jeho transportu na úrovni mRNA. Vliv na expresi je však výraznější v případě nadbytku iontů železa než při jejich absenci v mediu.

#### **6.3.2. Vliv vysokých hladin netransferinových iontů železa na expresi molekul transportu iontů železa u buněk Caco-2**

Analogicky s výsledky deprivace ionty železa ukazují některé práce [98], [99], [93], [100] na snížení exprese mRNA kódující DMT1 a ferroportin 1. V našem experimentu se toto potvrdilo pouze u molekuly DMT1. V obou časových horizontech inkubace buněk s nadbytkem iontů železa došlo shodně ke snížení přibližně o 40%. Vzhledem k velkému rozptylu hodnot však tato změna není po 24 hodinách signifikantní. Exprese ferroportinu 1 se však v našem případě na rozdíl od předchozích studií nezměnila.

Ve studiích na duodenálních biopsiích, bylo přetížení organismu ionty železa sledováno u hemochromatických pacientů [94], [89], [95], [96], [101] a u pacientů se sekundárním přetížením organismu ionty železa. V Zollerově studii [89], [95] se exprese DMT1 a ferroportinu na úrovni mRNA nezměnila. Rolfs a kol. [94] ukazují zvýšení a to v případě ferroportinu 1 signifikantní. Stuart a kol. [101] poukazují na podobné hladiny

exprese mRNA v případě hemochromatiků i kontrolní skupiny. U Dcytb a hefestinu v této studii nebyla prokázána změna. Nesignifikantní zvýšení Dcytb zaznamenali i Zoller a kol. [95]. Co se týče hefestinu nezaznamenal změny žádné. Stejně tak žádné změny v případě exprese mRNA u těchto dvou molekul nezjistili ani Gleeson a kol. [96]. Vzhledem k těmto zjištěním je velice zajímavé, že v našich experimentech došlo ke zvýšení exprese oproti kontrole u Dcytb i hefestinu. Po 72 hodinách bylo toto zvýšení dokonce téměř 90%. U molekuly ceruloplasmin nedošlo k žádné významné změně, stejně tak jako v experimentu bez přítomnosti iontů železa v mediu.

## **6.4. Vliv ethanolu na expresi molekul účastnících se transportu iontů železa**

### **6.4.1. Vliv ethanolu na expresi molekul účastnících se transportu iontů železa u buněk Caco-2**

Zde jsme sledovali vliv ethanolu na expresi molekul transportu iontů železa. Na základě klinických zjištění, kdy byl prokázán vztah mezi poruchami metabolismu iontů železa a ethanolu, můžeme předpokládat, že ethanol ovlivňuje transport iontů železa. Zajímalo nás, zda kultivace buněk v mediu s ethanolem může ovlivnit expresi molekul zúčastněných v transportu iontů netransferinového železa (DMT1, Dcytb, ferroportin 1, hefestin, ceruloplasmin) na úrovni mRNA. Vycházeli jsme z dřívějších studií, jež poukazují na případy zvýšené absorpce iontů železa u pacientů trpící jaterní cirrhózou [102], [103]. Dále, kromě cirrhosy, může být přetížení organismu ionty železa spojeno i s dalšími jaterními chorobami [103]. To znamená, že by mohla existovat pozitivní korelace mezi intestinální absorpcí iontů železa a vznikem jaterní hemosiderózy [102]. V dané studii, sledující změnu exprese molekuly DMT1 a ferroportinu u pacientů trpících alkoholickou cirrhózou metodou „Ribonuclease Protection Assay“, byla stanovena u DMT1 třikrát a u ferroportinu 1,8krát zvýšená exprese na úrovni RNA v duodenální biopsii oproti kontrole [102]. Zoller a kol. [89] sledoval v rámci jedné ze studií pacienty s chronickým jaterním onemocněním s neprokázaným přetížením organismu ionty železa (nealkoholická a alkoholická jaterní steatosa). Sledovali změnu exprese molekuly DMT1 a ferroportinu na úrovni mRNA pomocí „Real-Time“ PCR v duodenální biopsii. U molekuly

DMT1 k žádné změně nedošlo, v případě ferroportinu výsledky naznačovaly zvýšení, nicméně vzhledem k velké standardní odchylce nedosahoval tento rozdíl statistické signifikance. Podobně také Rolfs a kol. [94] neprokázali zvýšení regulace exprese DMT1, ferroportinu 1 či hefestinu u malé skupiny pacientů s alkoholickou jaterní cirrhózou, nesouvisející s hereditární hemochromatózou.

V našem *in vitro* experimentu jsme buňky Caco-2 kultivovali v médiu obsahujícím ethanol po dobu 48 hodin. Množství ethanolu v médiu jsme stanovili na 2%. Simulovali jsme tak stav, kdy jsou buňky organismu ovlivňovány ethanolem. Zajímalo nás zjištění, zda ke zvýšení hladiny iontů železa v organismu s alkoholickým jaterním onemocněním, může vést změna exprese molekul účastnících se absorpce iontů železa enterocyty po ovlivnění ethanolem. Ani u jedné ze sledovaných molekul transportu však nedošlo k významnému ovlivnění exprese. Nejnápadnější změna nastala u ferroportinu, kde se exprese o 42% zvýšila. Z tohoto můžeme usuzovat, že působení ethanolu na enterocytární buňky nemá na transport iontů železa přes plazmatickou membránu těchto buněk výrazný vliv.

## 6.5. Plánované experimenty

Následující plány zahrnují sledování exprese molekul transportu iontů železa u buněk Caco-2 adaptovaných na přítomnost alkoholu v médiu. Buňky se nám již na tyto podmínky podařilo adaptovat. Po dobu šesti měsíců jsme do kultivačního media přidávali 2% ethanolu. To při každém pasážování, či výměně media, tedy minimálně 2x týdně. Pokusili jsme se tak navodit stav chronického alkoholizmu.

Dále bychom se chtěli zaměřit na sledování exprese molekul zúčastněných v transportu iontů železa i u jaterních buněčných linií. A to jak při ovlivnění ethanolem, tak stejně jako v předchozí studii po inkubaci v médiu s nedostatkem, respektive se zvýšeným množstvím těchto iontů.

V neposlední řadě je naším dalším cílem zjistit ovlivnění exprese molekul transportu iontů železa dostupností těchto iontů i na proteinové úrovni a tyto údaje porovnat s údaji v předkládané práci. Expresi molekul transportu na úrovni proteinů budeme sledovat pomocí metody „Western blot“.

## 7. Závěr

Cílem této práce bylo objasnění vlivu dostupnosti netransferinových iontů železa na expresi molekul zúčastněných v transportu těchto iontů přes plazmatickou membránu. Pro *in vitro* model jsme použili buněčnou linii Caco-2 jako zástupce enterocytárních buněk s odlišnou apikální a bazolaterální membránou a buněčnou linii K 562 jako model neenterocytárních buněk využívajících ionty železa.

Po 24 hodinách kultivace buněk v mediu bez iontů železa se v případě buněčné linie K562 nezměnila pouze exprese hefestinu. Exprese DMT1 se o 22% snížila, stejně tak i exprese Dcytb, která se snížila o 12%. U ferroportinu 1 došlo ke snížení exprese téměř o 40 %. U DMT1 a ferroportinu 1 se jednalo o změnu statisticky signifikantní. Exprese ceruloplasminu byla velice nízká a metodou „Real-Time“ PCR nedetekovatelná. Z výsledků je patrné, že v případě buněk K562 dochází v případě nedostatku iontů železa v mediu ke snížení exprese proteinů zúčastněných v transportu iontů železa (kromě hefestinu) a tedy i ke sníženému příjmu iontů železa.

U buněčné linie Caco-2 se po 24 hodinách kultivace v mediu bez přítomnosti iontů železa exprese DMT1 i ferroportinu 1 o 36% zvýšila. Exprese Dcytb se zvýšila o 52%, hefestinu o 42 %. Exprese ceruloplasminu nebyla téměř ovlivněna. O signifikantní zvýšení se jednalo pouze u molekuly hefestin. Inkubace 72 hodin v mediu bez přídavku iontů železa měla největší vliv na expresi hefestinu. Exprese se zde o 62% zvýšila. Jde o zvýšení statisticky signifikantní. Ke zvýšení exprese došlo rovněž u Dcytb o 20%, u ferroportinu 1 o 38% a u ceruloplasminu o 15%. Exprese DMT1 se o 24 % snížila. V tomto případě je zřejmé, že nedostatek iontů železa v mediu u enterocytárních buněk, vede ke zvýšení exprese transportních molekul, přičemž doba inkubace nemá na tuto expresi výrazný vliv. Pouze v případě molekuly DMT1 má dlouhodobější nedostatek iontů železa v mediu za následek, že po prvotním vzrůstu exprese DMT1 klesla.

Kultivace buněk 24 hodin v mediu se zvýšenou hladinou netransferinových iontů železa měla za následek zvýšení exprese u všech sledovaných molekul zúčastněných v transportu netransferinových iontů železa. Exprese DMT1 se zvýšila o 40%, Dcytb o 26%. U ferroportinu 1 došlo k největšímu zvýšení, o 70%. Exprese hephaestinu se zvýšila o necelých 10 %. Je evidentní, že zvýšená hladina netransferinových iontů železa v mediu u buněk K562 způsobuje zvýšení exprese všech sledovaných molekul transportu.

Hladina mRNA u buněčné linie Caco-2 po 24 hodinách inkubace se zvýšenou hladinou netransferinových iontů železa v mediu byla ovlivněna následovně. Expres DMT1 se o 37 % snížila. Expres Dcytb se o 60% zvýšila. Toto zvýšení je statisticky signifikantní. U molekul ferroportinu 1 a hefestinu došlo shodně ke 42% statisticky signifikantnímu nárůstu exprese. V případě ceruloplasminu došlo k nárůstu exprese o 16%. Inkubace po 72 hodin znamenala pro expresi DMT1 snížení o 37%. K minimálnímu zvýšení došlo u ferroportinu 1 a u ceruloplasminu. K signifikantnímu zvýšení exprese téměř o 90% došlo v případě Dcytb a hefestinu. Zde je patrné, že zvýšená hladina netransferinových iontů železa v mediu vede u buněk Caco-2 u většiny transportních molekul ke zvýšení jejich exprese. Ke snížení exprese dochází pouze u molekuly DMT1, a tudíž pravděpodobně dochází i ke sníženému příjmu iontů železa z media.

K výraznějšímu ovlivnění exprese molekul transportu iontů železa po 48 hodinách přítomnosti ethanolu v kultivačním mediu, kdy byla do media přidána 2 % ethanolu, došlo pouze u ferroportinu 1, jehož exprese se o 42% statisticky signifikantně zvýšila. Expres DMT1 se zvýšila o 22%. U Dcytb bylo zvýšení pouze 15% a u hefestinu nedosáhlo ani 10%. Z těchto výsledků lze usuzovat, že ethanol nemá na expresi molekul zúčastněných v transportu iontů železa výrazný vliv, případně může indukovat mírné zvýšení exprese.

Můžeme shrnout, že v případě buněk K562, jako modelu buněk využívajících ionty železa, dostupnost těchto iontů v mediu pozitivně asociuje se změnou exprese transportních molekul. U buněk Caco-2, jako modelu enterocytárních buněk, naopak pozorujeme nepřímou úměru mezi dostupností netransferinových iontů železa v mediu a změnou exprese většiny transportních molekul.

## 8. Seznam použité literatury

- [1] Andrews, N. C.: *Annu. Rev. Genomic Hum. Genet.* **1**, 75-98 (2000)
- [2] Andrews, N. C.: *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* **18**, 159-169 (2005)
- [3] Siah, Ch. W., Trinder, D., Olynyk, J. K.: *Clin. Chim. Acta* **358**, 24-36 (2005)
- [4] Aisen, P.: *Ciba Found. Symp.* **51**, 1-17 (1976)
- [5] Conrad, M. E., Umbreit, S. N.: *Am. J. Hematol.* **42**, 67-73 (1993)
- [6] Britton, R. S., Ramm, G. A., Olynyk, J., Singh R., O'Neill, R., Bacon, B. R.: *Adv. Exp. Med. Biol.* **356**, 239-253 (1994)
- [7] Petrák, J.: *Metabolismus železa v savčích buňkách: Disertační práce PřF UK Praha, Ústav hematologie a krevní transfúze, 2000*
- [8] McKie, A. T., Barrow, D., Latunde-Dada, G. O., Rolfs, A., Sager, G., Mudaly, E., Mudaly, M., Richardson, C., Barlow, D., Bomford, A., Peters, T. J., Raja, K. B., Shirali, S., Hediger, M. A., Farzaneh, F., Simpson, R. J.: *Science* **291**, 1755-1759 (2001)
- [9] Fleming, M. D., Trenor, C. C., Su, M. A., Foerzler, D., Beier, D. R., Dietrich, W. F., Andrews, N. C.: *Nat. Genet.* **16**, 383-386 (1997)
- [10] Gunshin, H., Allerson, Ch. R., Polycarpou-Schwarz, M., Rofts, A., Rogers, J. T., Kishi, F., Hentze, M. W., Rouault, T. A., Andrews, N. C., Hediger, M. A.: *FEBS Letters* **509**, 309-316 (2001)
- [11] Hallberg, L., Rossander, L.: *Am. J. Clin. Nutr.* **35**, 502-509 (1982)
- [12] Lee, G. R., Herbert, V.: *Nutritional factors in the production and function of erythrocytes, v knize Wintrobe's Clinical Hepatology, 10th edition, Williams and Wilkins, str. 228-266 (1999)*
- [13] Uc, A., Stokes, J. B., Britigan, B. E.: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **287**, 1150-1157 (2004)
- [14] Shayeghi, M., Latunde-Dada, G. O., Oakhill, J. S., Laftah, A. H., Takeuchi, K., Halliday, N., Khan, Y., Warley, A., McCann, F. E., Hider, R. C., Frazer, D. M., Anderson, G. J., Vulpe, C. D., Simpson, R. J., McKie, A. T.: *Cell* **122**, 789-801 (2005)
- [15] Quigley, J. G., Yang, Z., Worthington, M. T., Phillips, J. D., Sabo, K. M., Sabath, D. E., Berg, C. L., Sassa, S., Wood, B. L., Abkowitz, J. L.: *Cell* **118**, 757-766



(2004)

- [16] Watts, R. N., Ponka, P., Richardson, D. R.: *Biochem. J.* 369, 429-440 (2003)
- [17] Jacobs, A.: *Blood* 50, 433-439 (1997)
- [18] Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S. J., Moynihan, J., Paw, B. H., Drejer, A., Barut, B., Zapata, A., Law, T. C., Brugnara, C., Lux, S. E., Pinkus, G. S., Pinkus, J. L., Kingsley, P. D., Palis, J., Fleming, M. D., Andrews, N. C., Zon, L. I.: *Nature* 403, 776-781 (2000)
- [19] Vulpe, C. D., Kuo, Y. M., Murphy, T. L., Cowley, L., Askwith, C., Libina, N., Gitschier, J., Anderson, G. J.: *Nat. Genet.* 21, 195-199 (1999)
- [20] Andrews, N. C.: *New Eng. J. Med.* 341, 1986-1995 (1999)
- [21] Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, I., Beaumont, C., Grandchamp, B., Kahn, A., Vaulont, S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 8780-8785 (2001)
- [22] Papanikolaou, G., Samuels, M. E., Ludwig, E. H., MacDonald, M. L., Franchini, P. L., Dube, M. P., Andres, L., MacFarlane, J., Sakellaropoulos, N., Politou, M., Nemeth, E., Thompson, J., Risler, J. K., Zaborowska, C., Babakaiff, R., Radomski, C. C., Pape, T. D., Davidas, O., Christakis, J., Brissot, P., Lockitch, G., Ganz, T., Hayden, M. R., Goldberg, Y. P.: *Nat. Genet.* 36, 77-82 (2004)
- [23] Feder, J. N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D. A., Basava, A., Dormishian, F., Domingo, R. Jr., Ellis, M. C., Fullan, A., Hinton, L. M., Jones, N. L., Kimmel, B. E., Kronmal, G. S., Lauer, P., Lee, V. K., Loeb, D. B., Mapa, F. A., McClelland, E., Meyer, N. C., Mintier, G. A., Moeller, N., Moore, T., Morikang, E., Wolf, R. K., et al.: *Nat. Genet.* 13, 399-408 (1996)
- [24] Hentze, M. W., Kühn, L. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8175-8182 (1997)
- [25] Ganz, T.: *Blood* 102, 783-788 (2003)
- [26] Laurel, C. B.: *Pharm. Rev.* 4, 371-395 (1952)
- [27] Kovář, J.: *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 25, 395-396 (1989)
- [28] Sturrock, A., Alexander, J., Lamb, J., Craven, C. M., Kaplan, J.: *J. Biol. Chem.* 265, 3139-3145 (1990)
- [29] Richardson, D. R., Baker, E.: *Biochim. Biophys. Acta* 1091, 294-302 (1991)
- [30] Parkes, J. C., Templeton D. M.: *Ann. Clin. Lab. Science* 24, 509-520 (1994)
- [31] Kennard, M. L., Richardson, D. R., Gabathuler, R., Ponka, P., Jefferies, W. A.: *EMBO J.* 14, 4178-4186 (1995)
- [32] Kühn, L. C., Schulman, H. M., Ponka, P.: *CRC Press Inc.* 1, 149-191 (1990)

- [33] Nunez, M. T., Gaete, V., Watkins, J. A., Glass, J.: *J. Biol. Chem* 265, 6688-6692 (1990)
- [34] Gonzales-Sepulveda, M., Nunez, M. T.: *J. Membr. Biol.* 141, 225-230, 1994
- [35] Richardson, D. R., Baker, E.: *Biochim. Biophys. Acta* 1053, 1-12 (1990)
- [36] Ponka, P., Beaumont, C., Richardson, D. R.: *Semin. Hematol* 35, 35-54 (1998)
- [37] Bates, G. W., Schlabach, M. R.: *J. Biol. Chem.* 248, 3228 -3232(1973)
- [38] Kawabata, H., Yang, R., Hirama, T., Vuong, P. T., Kawano, S., Gombart, A. F., Koeffler, H. P.: *J. Biol. Chem.* 274, 20826-20832 (1999)
- [39] Kawabata, H., Germain, R. S., Vuong, P. T., Nakamaki, T., Said, J. W., Koeffler, H. P.: *J. Biol. Chem.* 275, 16618-16625 (2000)
- [40] Devireddy, L. G., Gazin, C., Zhu, X., Green, M. R.: *Cell* 123, 1293-1305 (2005)
- [41] Kaplan, J.: *Cell* 111, 603-606 (2002)
- [42] Sekyere, E., Richardson, D. R.: *FEBS Letters* 483, 11-16 (2000)
- [43] Kriegerbecková, K., Kovář, J.: *Folia Biol.* 46, 77-81 (2000)
- [44] Richardson, D. R.: *Eur. J. Biochem.* 267, 1290-1298 (2000)
- [45] Ward, P. P., Conneely, O. M.: *Biometals* 17, 203-208 (2004)
- [46] Conrad, M. E., Umbreit, J. N., Moore, E. G., Hainswoth, L. N., Porubcin, M., Simovich, M. J., Nakata, M. T., Dolan, K., Garrick, M. D.: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, 767-774 (2000)
- [47] Conrad, M. E., Umbreit, J. N.: *Blood Cells Mol. Dis.* 29, 336-355 (2002)
- [48] Simovich, M. J., Conrad, M. E., Umbreit, J. N., Moore, E. G., Hainswoth, L. N., Smith, H. K.: *Am. J. Hematol.* 69, 164-170 (2002)
- [49] Yang, J., Goetz, D., Li, J.-Y., Wang, W., Mori, K., Setlik, D., Du, T., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Strong, R., Barasch, J.: *Mol. Cel.* 10, 1045-1056 (2002)
- [50] Gunshin, H., MacKenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J. L., Hediger, M. A.: *Nature* 388, 482 (1997)
- [51] Eisenstein, R. S.: *Annu. Rev. Nutr.* 20, 627-662 (2000)
- [52] Munro, H. N., Linder, M. C.: *Physiol. Rev.* 58, 317-396 (1978)
- [53] Harrison, P. M., Arosio, P.: *Biochim. Biophys. Acta* 1275, 161-203 (1996)
- [54] Theil, E. C.: *J. Nutr.* 133, 1549-1553 (2003)
- [55] Lipschitz, D. A., Cook, J. D., Finch, C. A.: *New Engl. J. Med.* 290, 1213-1216 (1974)

- [56] Richardson, D. R.: *Curr. Med. Chem.* **12**, 2711-2729 (2005)
- [57] Roy, C. N., Enns, C. A.: *Blood* **96**, 4020-4027 (2000)
- [58] Goswami, T., Rolfs, A., Hedinger, M.A.: *Biochem. Cell Biol.* **80**, 679-689 (2002)
- [59] Muckenthaler, M., Roy, C. N., Custodio, A. O., Minana, B., deGraaf, J., Montross, L. K., Andrews, N. C., Hentze, M. W.: *Nat. Genet.* **34**, 102-107 (2003)
- [60] Abboud, S., Haile, D. J.: *J. Biol. Chem.* **275**, 19906-19912 (2000)
- [60] De Gobbi, M., Roetto, A., Piperno, A., Mariani, R., Alberti, F., Papanikolaou, G., Politou, M., Lockitch, G., Girelli, D., Fargion, S., Cox, T. M., Gasparini, P., Cazzola, M., Camaschella, C.: *Br. J. Haematol.* **117**, 973-979 (2002)
- [61] Camakaris, J., Voskoboinik, I., Mercer, J. F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**, 225-232 (1999)
- [62] Musci, G., Polticelli, F., Calabrese, L.: *Adv. Exp. Med. Biol.* **448**, 175-182 (1999)
- [63] Hirling, H., Heuduson, B. R., Kühn, L. C.: *EMBO J.* **13**, 453-461 (1994)
- [64] Zheng, Y., Connor, J. R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264**, 709-713 (1999)
- [65] Zheng, Y., Connor, J. R.: *Nucleic Acids Res.* **28**, 1802-1807 (2000)
- [66] Novotný, J.: *Metabolismus železa u dárců krve: Disertační práce Transfúzní oddělení a krevní banka, FN Brno, Oddělení klinické hematologie, str. 7-20 (2005)*
- [67] Hoffbrand, V. A.: *Essential Haematology*, 3-rd edition, Blackwell Science, Oxford, str. 18 (1998)
- [68] Harris, Z. L., Klomp, L. W., Gitlin, J. D.: *Am. J. Clin. Nutr.* **67**, 972-977 (1998)
- [69] Hamill, R. L., Woods, J. C., Cook, B. A.: *Amer. J. Clin. Pathol.* **96**, 215-218 (1991)
- [70] Beutler, E., Gelbart, T., Lee, P., Trevino, R., Fernandez, M. A., Fairbanks, V. F.: *Blood* **96**, 4071-4074 (2000)
- [71] Andrews, N. C.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 181-186 (2002)
- [72] Hanson, E. H., Imperatore, G., Burke, W.: *Am. J. Epidemiol.* **154**, 193-206 (2001)
- [72] Jouanolle, A. M., Gandon, G., Jezequel, P., Blayau, M., Campion, M. L., Yaouanq, J., Mosser, J., Fergelot, P., Chauvel, B., Bouric, P., Carn, G., Andrieux, N., Gicquel, I., Le Gall, J. Y., David, V.: *Nat. Genet.* **14**, 251-252 (1996)
- [73] Jazwinska, E. C., Cullen, L. M., Busfield, F., Pyper, W. R., Webb, S. I., Powell, L. W., Morris, C. P., Walsh, T. P.: *Nat. Genet.* **14**, 249-251 (1996)
- [74] Cord, J. M.: *Semin. Hematol.* **35**, 5-12 (1998)
- [75] Hentze, M. W., Muckenthaler, U., Andrews, N.: *Cell* **117**, 285-297 (2004)

- [76] Camaschella, C., Roetto, A., Cali, A., De Gobbi, M., Garozzo, G., Carella, M., Majorano, N., Totaro, A., Gasparini, P.: *Nat. Genet.* 25, 14-15 (2000)
- [77] Pietrangelo, A., Casalgrandi, G., Quaglino, D., Gualdi, R., Conte, D., Milani, S., Montosi, G., Cesarini, L., Ventura, E., Cairo, G.: *Gastroent.* 108, 208-217 (1995)
- [78] Montosi, G., Donovan, A. Totaro, A., Garuti, C., Pignatti, E., Cassanelli, S., Trenor, C. C., Gasparini, P., Andrews, N. C., Pietrangelo, A.: *J. Clin. Invest.* 108, 619-623 (2001)
- [79] Njajou, O. T., Vaessen, N., Joesse, M., et al.: *Nat. Genet.* 28, 213-214 (2001)
- [80] Kato, J., Fujikawa, K., Kanda, M., Fukuda, N., Sasaki, K., Takayama, T., Kobune, M., Takada, K., Takimoto, R., Hamada, H., Ikeda, T., Niitsu, Y.: *Am. J. Hum. Genet.* 69, 191-197 (2001)
- [81] Patel, B. N., Dunn, R. J., David, S.: *J. Biol. Chem.* 275, 4305-4310 (2000)
- [82] Ludwig, J., Hashimoto, E., Porayko, M. K., Moyer, T. P., Baldus, W. P.: *Gastroent.* 112, 882-888 (1997)
- [83] Napier, I., Ponka, P., Richardson, D. R.: *Blood* 105, 1867-1874 (2005)
- [84] Musílková, J., Kovář, J.: *Biochim. Biophys. Acta* 1514, 117-126 (2001)
- [85] Musílková, J., Kriegerbecková, K., Krušek, J., Kovář, J.: *Biochim. Biophys. Acta* 1369, 103-108 (1998)
- [86] Editorial: *Methods* 26, 383-385 (2001)
- [87] Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, Ch.: *Methods* 25, 386-401 (2001)
- [88] Ginzinger, D. G.: *Exp. Hematol.* 30, 503-512 (2002)
- [89] Zoller, H., Koch, R. O., Theurl, I., Obrist, P., Pietrangelo, A., Montosi, G., Haile, D. J., Vogel, W., Weiss, G.: *Gastroent.* 120, 1412-1419 (2001)
- [90] Livak, K. J., Schmittgen, T. D.: *Methods* 25, 42-48 (2001)
- [91] Eysseltová, J., Mička, Z., Lukeš, I.: *Základy laboratorní techniky, skriptum PŘF UK Praha*, str. 35-36 (2000)
- [92] Attieh, Z. K., Mukhopadhyay, Ch. K., Seshadri, V., Tripoulas, N. A., Fox, P. L.: *J. Biol. Chem.* 274, 1116-1123 (1999)
- [93] Zoller, H., Theurl, I., Koch, R., Kaser, A., Weiss, G.: *Blood Cells Mol. Dis.* 29, 488-497 (2002)
- [94] Rolfs, A., Bonkovsky, H. L., Kohloser, J. G., McNeal, K., Sharma, A., Berger, U.

- V., Hediger, M. A.: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 282, 598-607 (2002)
- [95] Zoller, H., Theurl, I., Koch, R. O., McKie, A. T., Vogel, W., Weiss, G.: *Gastroent.* 125, 746-754 (2003)
- [96] Gleeson, F., Ryan, E., Barrett, S., Russell, J., Kelleher, B., Crowe, J.: *Blood Cells Mol. Dis.* 35, 303-308 (2005)
- [97] Stuart, K. A., Anderson, G. J., Frazer, D. M., Murphy, T. L., Powel, L. W., Fletcher, L. M., Crawford
- [98] Martini, L. A., Tchack, L., Wood, R. J.: *J. Nutr.* 132, 693-696 (2002)
- [99] Sharp, P., Tandy, S., Yamaji, S., Tennant, J., Williams, M., Srail, S. K. S.: *FEBS Letters* 510, 71-76 (2002)
- [100] Johnson, D. M., Yamaji, S., Tennant, J., Srail, S. K., Sharp, P. A.: *FEBS Letters* 579, 1923-1929 (2005)
- [101] Stuart, K. A., Anderson, G. J., Frazer, D. M., Powel, L. W., McCullen, M., Fletcher, L. M., Crawford, D. H. G.: *Gut* 52, 953-959 (2003)
- [102] Stuart, K. A., Anderson, G. J., Frazer, D. M., Murphy, T. L., Powel, L. W., Fletcher, L. M., Crawford, D. H.: *Hepatology* 39, 492-499 (2004)
- [103] Stuart, K. A., Fletcher, L. M., Clouston, A. D., Lynch, S. V., Purdie, D. M., Kerlin, P., Crawford, D. H.: *Hepatology* 32, 1200-1207 (2000)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka