

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra Buněčné biologie

Proteinové komplexy metabolismu železa


Irena Ďuríková

Praha 2008

DP 3102 / 3359

Vedoucí práce: MUDr. Daniel Vyoral, CSc.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením vedoucího diplomové práce.


Irena Ďuríková

Děkuji především MUDr. Danielu Vyoralovi, CSc. za to, že mne přijal do své laboratoře, za trpělivost, shovívavost a veškerou pomoc. Dále děkuji Mgr. Jiřímu Petrákovi, Ph.D. za cenné rady a děkuji Mgr. Gabriele Pešlové a Mgr. Denise Myslivcové a všem dalším lidem z laboratoře a z fakulty, kteří mi během studia pomáhali. V neposlední řadě platí mé poděkování také manželovi, který mi byl velkou oporou.

Diplomová práce vznikla v letech 2005 až 2008 a byla vypracována za podpory GA ČR v rámci projektu GA303/04/0003 a GA204/07/0830 a MZCR/UHKT No. 023736.

ABSTRAKT

Železo je nepostradatelným prvkem lidského těla. Jeho hladiny jsou přísně kontrolovány. Při narušení mechanismů, které se na homeostáze železa podílejí, dochází k různým dysfunkcím.

V organismu se železo vyskytuje jako součást proteinů resp. proteinových komplexů. Dosud není plně objasněno, kolik proteinů a jakým způsobem se na procesech zpracování železa v buňkách podílí.

Cílem mojí práce bylo popsat mitochondriální proteinové komplexy, které obsahují železo. V pokusech jsem pro metabolické značení jaterních buněk využívala radioaktivně značené železo (^{59}Fe).

Práce s komplexy bílkovin, které železo vážou nekovalentně, vyžaduje velmi šetrné zacházení. Proto jsem zvolila takové metody separace bílkovin, které by nenarušily nekovalentní vazby mezi proteiny a iontem kovu a zachovaly tím integritu proteinového komplexu s navázaným železem, kterým byly buňky značeny. Pokusy jsem prováděla na modelových buňkách jaterní tkáně. V práci popisuji možný vztah mezi jednotlivými identifikovanými proteiny a železem. Protože se železo podílí na vzniku volných radikálů, sleduji také možný vztah mezi identifikovanými proteiny a volnými radikály.

Klíčová slova: železo, přetížení železem, mitochondrie, volné radikály, proteinové komplexy, proteomika, hmotnostní spektrometrie

Protein complexes of iron metabolism

ABSTRACT

Iron is an essential element in the human body where its metabolism is strictly controlled. When mechanisms participating in the homeostasis are disturbed several dysfunctions occur.

In the organism iron can be found as a component of many proteins or protein complexes. It is still not completely clear how many proteins participate in iron processing in the cells.

The aim of my work was to identify mitochondrial iron containing protein complexes. In my experiments the transport of iron in the cells was monitored by radioactive iron (^{59}Fe). The work with complex proteins which bind iron by non-covalent bonds requires a very sensitive handling and mild separation techniques. I used such protein separation methods which do not break the non-covalent couplings of iron and protein. That way the integrity of the protein complex with bound and radioactively marked iron was not affected. These experiments were performed on model liver cells in tissue culture. In my thesis I described the protein composition of iron-labeled protein complexes and possible relationships between the identified proteins and iron. Since iron participates in the formation of free radicals the roles of free radical-protecting enzymes identified in protein complexes are also discussed.

Keywords: iron, iron overload, mitochondria, reactive oxygen species, protein complexes, proteomics, mass spectrometry

OBSAH

1. ÚVOD.....	8
2. PŘEHLED O BIOLOGICKÉM VÝZNAMU ŽELEZA ZE SOUČASNÝCH PUBLIKACÍ.....	9
2.1 Fyzikálně chemické vlastnosti železa.....	9
2.2 Železo v lidském těle.....	9
2.3 Příjem železa v potravě.....	17
2.4 Vstřebávání železa a vstup železa do buněk.....	18
2.5 Vstup železa do mitochondrií.....	21
2.6 Skladování železa.....	23
2.7 Regulace obratu železa v těle.....	24
2.8 Regulace množství železa v buňce.....	26
2.9 Onemocnění způsobená nedostatkem či nadbytkem železa.....	29
2.10 Nadbytek železa a volné kyslíkové radikály.....	30
3. MATERIÁL A METODY.....	33
3.1 Buněčná linie.....	33
3.2 Kultivace buněk HepG2.....	34
3.3 Metabolické značení buněk HepG2 pomocí ⁵⁹ Fe.....	34
3.4 Lýza buněk a izolace mitochondrií diferencíální centrifugací	34
3.5 Analýza proteinových komplexů vázajících železo dvojrozměrnou nativní separací – kombinací kapalinové iontoměničové chromatografie a nativní elektroforézy.....	35
3.6 Barvení proteinů v gelu stříbrem.....	36
3.7 Detekce radioaktivně označených proteinů v gelu pomocí fosfoimageru.....	36
3.8 Analýza proteinů.....	37
3.8.1 Příprava proteinových komplexů pro tandemovou hmotnostní spektrometrii	37

3.8.2 <i>Analýza peptidů z proteinových komplexů tandemovou hmotnostní spektrometrií LC- MS/MS</i>	37
3.9 Koimunoprecipitace bílkovin asociovaných s TfR.....	39
3.10 Koimunoprecipitace bílkovin asociovaných s VDAC2.....	39
3.11 Analýza imunoprecipitovaných proteinů pomocí polyakrylamidové elektroforézy.....	40
3.12 Western blotting koimunoprecipitovaných proteinů za použití protilátky proti TfR.....	40
3.13 Western blotting koimunoprecipitovaných proteinů za použití protilátky proti VDAC2.....	41
3.14 Roztoky a pufrý	41
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	44
4.1. Výsledky.....	44
4.1.1 <i>Identifikované proteiny chromatografické frakce 20, proužku A</i>	47
4.1.2 <i>Identifikované proteiny chromatografické frakce 21, proužku B</i>	56
4.1.3 <i>Identifikované proteiny chromatografické frakce 22, proužku C</i>	66
4.2. Metodické přístupy.....	76
5. SOUHRN.....	79
6. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY.....	81

„Člověk má v sobě železa, že by se z toho ukoval hřeb, na kterém by se mohl člověk oběsit.“ Bohumil Hrabal, v knize *Obsluhoval jsem anglického krále*.

1. ÚVOD

Železo je nezastupitelný biogenní prvek, který však může iniciovat vznik patogenních volných radikálů. Ty jsou spojovány se vznikem mnoha chorob (viz. dále). Studium metabolismu železa v živých systémech je kvůli fyzikálně-chemickým vlastnostem železa (existence železa ve dvou oxidačních stavech, rychlá oxidace železnatých iontů, téměř nulová rozpustnost trojmocného železa za fyziologických podmínek, tvorba koordinačních komplexů) problematické a vyžaduje speciální metody pro analýzu bílkovin obsahujících železo. Železo netvoří v biologických systémech kovalentní sloučeniny a proto i sebemenší změna fyziologických podmínek může vést k uvolnění železa z bílkovinného komplexu, který je zkoumán. Proto je třeba k jeho studiu využívat co nejšetrnější techniky.

2. PŘEHLED O BIOLOGICKÉM VÝZNAMU ŽELEZA ZE SOUČASNÝCH PUBLIKACÍ

2.1 Fyzikálně chemické vlastnosti železa

Železo, chemická značka Fe, je kovový prvek s relativní atomovou hmotností 55,845. Železo má atomové číslo 26 a patří mezi přechodné prvky, které mají valenční elektrony v d-orbitalu. Díky své elektronové konfiguraci ([Ar] 3d⁶4s² - má čtyři nespárované valenční elektrony) je železo velmi reaktivním redoxním činidlem. V mnoha enzymech je železo donorem i akceptorem elektronů. Železo se běžně vyskytuje ve dvou oxidačních stavech: Fe²⁺ a Fe³⁺. Méně často tvoří velmi nestabilní železičitý Fe (IV) iont. Při fyziologickém pH je železnatý iont (Fe²⁺) rychle oxidován na nerozpustný železitý iont (Fe³⁺).

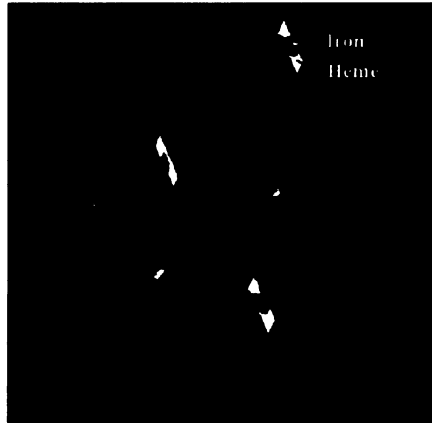
Železo je po kyslíku, křemíku a hliníku čtvrtým nejrozšířenějším prvkem na zeměkouli. Většina anorganicky vázaného železa se vyskytuje v nerozpustné formě oxidů. Pouze malé množství tohoto železa je dostupné pro organizmy, pro které je esenciálním prvkem. Zásadní význam má jako kofaktor mnoha biomolekul podílejících se na transportu elektronů i jako stavební prvek řady proteinů. Jako katalyzátor vzniku volných radikálů má železo význam v patofyziologii mnoha chorob.

2.2 Železo v lidském těle

Lidské tělo obsahuje asi 4-5 gramů železa. Jeho množství záleží na tělesné váze a na pohlaví. Železo se v organismu vyskytuje jako součást biologicky aktivních molekul nebo v zásobní formě. Volná forma železa je pro buňky toxická (CHENG *et al.* 2005). Největší množství biologicky aktivního železa v lidském těle je vázáno v hemoglobinu červených krvinek, kde se účastní na přenosu kyslíku (Obr. 1).

Obrázek 1: Struktura hemoglobinu.

(<http://www.monroecc.edu/depts/pstc/backup/heme.gif>)



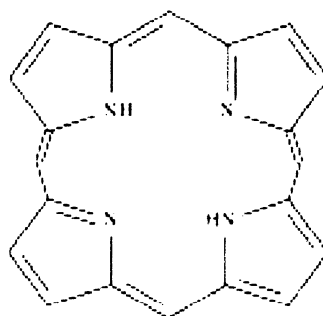
Hemoglobin je bílkovina složená ze čtyř polypeptidových řetězců (podjednotek), z nichž každý váže jednu molekulu hemu.

Hem je pevně vázaná, neproteinová molekula, která slouží jako prostetická skupina mnoha různých hemoproteinů (např. hemoglobinu, myoglobinu, cyklooxygenázy, katalázy, peroxidázy, cytochromů) (LUTTON *et al.* 1991). Hem je složen z protoporfyrinu IX a iontu železa.

Porfyrin je planární struktura čtyř pyrolových kruhů, propojených methinovými můstky v tetrapyrolový kruh, ke kterému jsou připojeny různé postranní řetězce (Obr. 2).

Obrázek 2: Struktura porfyrinu.

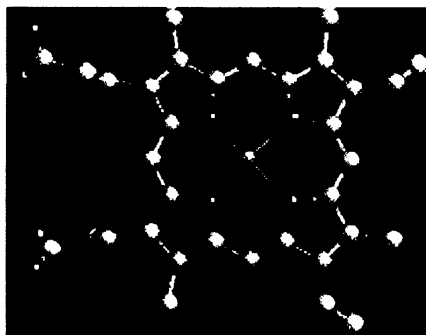
(<http://semicrystalline.wordpress.com/>)



Metaloporfyrin hem vzniká koordinační vazbou Fe^{2+} do centra pyrolového kruhu (Obr. 4). Reakce při níž dochází k inkorporaci železa probíhá v mitochondriích účinkem enzymu ferochelatázy (jinak také nazývaná hemová syntáza). Ke čtyřem dusíkům v centru kruhu je vázán jeden atom železa, pátá a šestá koordinační vazba železa je namířena kolmo k rovině tetrapyrolového kruhu a pomáhá vytvářet společně s postranními řetězci na tetrapyrolovém kruhu komplexy hemu s bílkovinami a vázat molekuly kyslíku. Biosyntéza hemu probíhá zčásti v matrix mitochondrie a zčásti v cytoplazmě buňky.

Obrázek 3: Struktura hemu.

(<http://www.roselab.jhu.edu/~raj/Research/Hemo/images/porph.gif>)



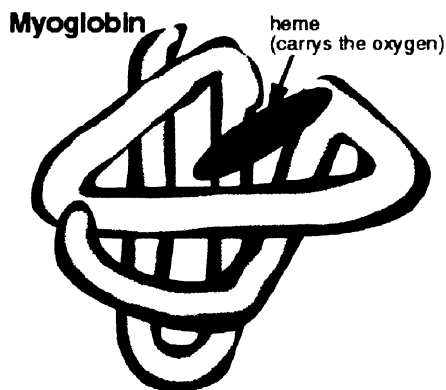
Legenda k obrázku 3:

Uhlíkové atomy jsou zbarveny šedě, kyslíkové atomy červeně, atomy dusíku modře a žlutě je na obrázku znázorněno železo.

Přenosu kyslíku se účastní i transportní bílkovina **myoglobin** (Obr. 4). Myoglobin je globulární hem syntetizovaný v kosterním a srdečním svalu.

Obrázek 4: Struktura myoglobinu.

(<http://www.brooklyn.cuny.edu/bc/ahp/SDPS/graphics/MyoGlobin.GIF>)



Myoglobin je protein složený z jednoho polypeptidového řetězce, který je poskládán okolo hemu.

V krvi je železo navázáno na sérový transportní protein **transferin** (Tf) (Obr. 5). Transferin je glykoprotein o velikosti 80 kDa s N-terminální a C-terminální koncovou doménou vážící trojmocné železo.

Obrázek 5: Transferin s navázanými atomy železa.

(<http://pubpages.unh.edu/~ndc/ltffe2.GIF>)



Legenda k obrázku 5:

Transferinová molekula má dvoudoménové uspořádání. Do každé domény váže jeden ion trojmocného železa (červené kolečko).

Molekula transferinu je stavbou, složením a schopností vazby Fe podobná ovotransferinu u ptáků (WILLIAMS *et al.* 1982), laktoferinu u savců (MAZURIER 1983) a melano-transferinu, který je produkován buňkami nádoru zvaného melanom (BROWN 1982). Transferin udržuje železo v oběhu a přivádí ho ke tkáním. Další význam vazby železa na transferin spočívá v ochraně před toxickým účinkem volných iontů železa. Příjem transferinového železa do buňky je zprostředkován receptory (KAPLAN *et al.* 1991, STURROCK *et al.* 1990, BASSET *et al.* 1986).

Celkový sérový transferin je normálně nasycen železem z jedné třetiny. Při vysycení vazebné kapacity sérového transferinu se v séru zvyšuje zastoupení netransferinového železa.

Železo nenavázané na transferin tvoří v séru nízkomolekulární komplexy s mnoha ligandy, například aminokyselinami, organickými kyselinami a podobně. Soudí se, že významným ligandem pro takové železo je citrát (GROOTVELD *et al.* 1989). Této vlastnosti jsem využila při metabolickém značení buněk linie HepG2 pomocí komplexu ⁵⁹Fe/citrát. Tento komplex je využíván jako nástroj pro studium příjmu železa nenavázaného na transferin (*in vitro* jsou některé typy buněk schopny železo přijmout i v komplexu s askorbátem, kyselinou nitriltriocetovou anebo jako komplex citrát železitoamonný (RICHARDSON a BAKER 1992). Podle kinetiky vstupu netransferinového železa do buněk je pravděpodobné, že se jedná o specifický přenašečový systém (STURROCK *et al.* 1990).

Jaterní buňky obecně přijímají transferinové železo pouze v omezeném množství, proto je účinnější buňky metabolicky značit pomocí citrátového železa. Citrátové – netransferinové železo zaručuje, že železo zůstane během značení buněk v médiu i v buňkách v monoinické podobě.

Transferin s navázaným železem, holotransferin, se váže na transferinový receptor, který je součástí buněčné membrány.

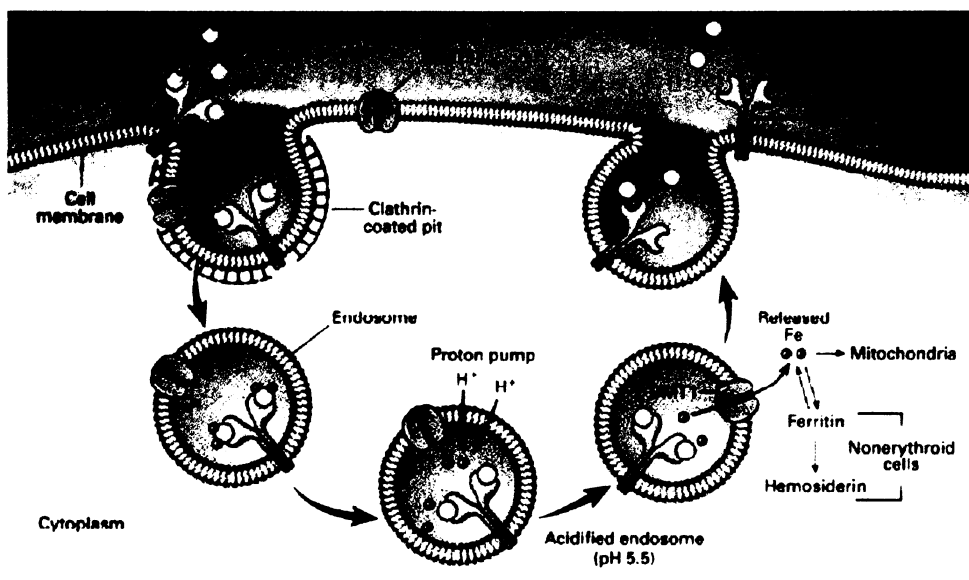
Transferinový receptor (TfR) je membránový protein, který se skládá ze dvou monomerů spojených disulfidovým můstkem. Každý z nich má vazebné místo pro transferin. Nejvyšší afinitu má receptor k transferinu plně saturovanému železem.

Hladina železa v buňkách je regulována mírou exprese membránového transferinového receptoru. Buňka tak reaguje na potřeby příjmu železa, který je ovlivňován rychlostí

dělení buněk a také zvláštními metabolickými potřebami buňky, jako je např. produkce hemoglobinu.

Komplex transferinového receptoru a transferinu s navázaným železem se receptorem zprostředkovanou endocytózou dostává do endozomu, kde se železité ionty uvolňují do kyselého prostředí endozomu (Obr. 6). Kyselé prostředí endozomu vyvolá konformační změnu transferinového receptoru a železité ionty se uvolní z transferinu (BALI *et al.* 1991a, 1991b, BALI a AISEN 1991, 1992, SIPE a MURPHY 1991). Železité ionty se posléze, díky kyselému prostředí endozomu a proteinu Steap3 (KNUTSON 2007), redukuje na železnaté, které váže membránový přenašeč železa (DMT-1 – divalent metal transporter). DMT-1 je dále může transportovat ven z endozomu (do cytoplazmy). Transferin, nyní zvaný apotransferin, však zůstává vázaný na transferinový receptor a společně putují k povrchu buňky, kde dochází k uvolnění apotransferinu celý cyklus se opakuje.

Obrázek 6: Internalizace extracelulárního železa do endozomu přes Tf-TfR komplex.
(http://www.chem.duke.edu/~alc/labgroup/tf_files/image002.jpg)



Železo se z endozomu může dostat i do dalších organel (mitochondrií, endoplazmatického retikula). K přenosu dochází pravděpodobně přímým kontaktem mezi endozomem, organelou nebo (apo)metaloproteinem přes transferinový receptor. Transferinový receptor se však na povrchu endozomu nevyskytuje samostatně, ale

v komplexu s dalšími proteiny. Pravděpodobně se zde vyskytuje kanál, kterým je železo k organelám dopravováno. Jednou z možností je, že by tímto kanálem mohl být protein DMT-1.

Dále se zde mohou vyskytovat další proteiny související s metabolismem železa (Obr. 23).

V okamžiku, kdy se železo uvolní z transferinu, stává se volným železem, které, pokud není náležitě chráněno, může buňku ohrožovat tvorbou hydroxylových radikálů. Je možné, že se zde vyskytuje právě enzym kataláza se svými antioxidačními účinky, aby buňku chránil před poškozením volnými radikály.

Funkce transferinového receptoru je ovlivňována dalšími bílkovinami, např. proteinem HFE (viz. kap. 2.9). HFE je molekula patřící k MHC molekulám I třídy, která interaguje s alfa 2-mikroglobulinem a tvoří komplex s transferinovým receptorem. Když buňky exprimují HFE, afinita transferinového receptoru k transferinu se snižuje (FEDER *et al.* 1998, GROSS *et al.* 1998). Snižená afinita transferinového receptoru k transferinu je způsobena kompeticí mezi HFE a transferinem o překrývající se vazebná místa na transferinovém receptoru (LEBRON *et al.* 1998, LEBRON *et al.* 1999, LEBRON a BJORKMAN 1999). Bylo dokázáno, že HeLa buňky exprimující HFE mají snížené hladiny železa (GROSS *et al.* 1998, CORSI *et al.* 1999, RIEDEL *et al.* 1999, ROY *et al.* 2002). Příčinou sníženého obsahu železa v buňkách je snížený příjem železa do buněk zprostředkovaný transferinem (ROY *et al.* 1999).

Kromě hemoglobinu, myoglobinu a transferinu je železo také obsaženo ve velkém počtu dalších bílkovin. Jednu skupinu tvoří enzymy obsahující Fe ve struktuře hemu. Jsou to především mitochondriální cytochromy, které se účastní procesu oxidativní fosforylace, dále jsou to cytochromy v endoplazmatickém retikulu (cytochrom P450 a cytochrom b5), které se účastní detoxikace léků, kancerogenů a některých xenobiotik (látek tělu cizích).

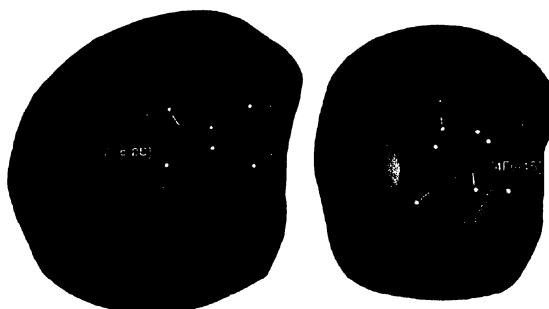
Další skupinu tvoří enzymy v nichž je Fe svázáno s atomy síry, tzv. Fe-S proteiny. Tyto bílkoviny obsahují ve své molekule prostetickou skupinu složenou z železa a síry ([Fe-S] klastr).

[Fe-S] klastr je struktura, která může mít v proteinech odlišnou podobu, nejčastěji se však vyskytuje ve formě 2Fe-2s anebo 4Fe4S (Obr. 7). Proteiny obsahující [Fe-S] klastry se vyskytují již u bakterií. Většinou se jedná o enzymy. Patří sem oxidoreduktázy (bakteriální nitrát reduktáza, formiát dehydrogenáza, fumarát reduktáza, glutamin PRPP amidotransferáza, hydrogenáza, metan monooxygenáza, NADH: ubichinon reduktáza, ftalát dioxygenáza reduktáza, sukcinát dehydrogenáza, sulfid reduktáza a xantin dehydrogenáza, hydrolyázy (akonitáza) a proteiny podílející se na přenosu elektronů (feredoxiny, Rieskeho proteiny, rubredoxiny).

V eukaryotických buňkách probíhá skládání [Fe-S] klastrů v mitochondriích. Tvorba [Fe-S] klastrů je zprostředkována aparátem skládajícím se z komplexu alespoň deseti proteinů. Tento komplex obsahuje enzym cystein desulfarázu, která poskytuje síru jako základní stavební kámen biogeneze klastru, bílkovinu feredoxin, dva chaperony, protein Isu1 a cystein desulfarázu Nfs1. Aparát syntézy mitochondriálních [Fe-S] klastrů nesestavuje pouze mitochondriální [Fe-S] proteiny, ale také se podílí na tvorbě extra-mitochondriálních [Fe-S] proteinů (JOHNSON *et al.* 2005). Proteiny obsahující [Fe-S] klastr hrají důležitou roli v přenosu elektronů, v regulaci genové exprese a v dalších procesech. Mezi mitochondriální enzymy s [Fe-S] klastrem patří některé enzymy dýchacího řetězce (komplex I, II a III), ferochelátáza (syntéza hemu) a enzymy citrátového cyklu (akonitáza, sukcinát dehydrogenáza). Také IRP1 a IRP2, proteiny účastníci se regulace vstupu železa do buněk ovlivňováním transkripce transferinového receptoru (viz. dále), obsahují [Fe-S] klastr.

Obrázek 7: Struktura vybraných Fe-S klastrů v proteinech elektronového transportu.

(<http://www.nature.com/nchembio/journal/v3/n5/images/nchembio0507-243-F1.jpg>)



Legenda k obrázku 7:

2Fe2S (modře) a 4Fe4S klastr (zeleně).

[Fe-S] klastry přijímají a odevzdávají jeden elektron v procesu transportu elektronů.

Výše zmíněné metaloproteiny tvoří pouze malou část bílkovin, na které se železo váže. Železo se může vázat na proteiny i jinými typy vazeb než je vazba přes hem a [Fe-S] klastry. Ty se vyskytují např. u ribonukleotid reduktázy, lysyl a prolyl oxidázy a mnoha dalších enzymů.

2.3 Příjem železa v potravě

Z celkového obsahu železa v potravě vstřebává dospělý člověk asi 1,2 mg železa denně. Železo je přijímáno jako hemové (vázané v molekule hemu) a nehemové (železo nehemově vázané na proteiny anebo železo vázané na nízkomolekulární látky). Schopnost vázat nehemové železo mají i aminokyseliny přítomné v natrávené potravě. Vazba železa na tyto aminokyseliny je závislá na pH (SIMPSON a PETERS 1987). Hemové železo je vysoce biologicky dostupné. Jeho zdrojem je maso, vyskytuje se také ve vnitřnostech (játra, srdce, ledviny). V průmyslově vyspělých zemích tvoří hemové železo až třetinu celkového množství železa získaného z potravy (BEZWODA *et al.* 1983). Hemové železo je pravděpodobně přijímáno slizničními buňkami prostřednictvím

specifického hemového receptoru a jeho následnou endocytózou. Na vstřebání tohoto železa se dále podílí hemová oxygenáza, která vyštěpí železo z komplexu železo-hem.

Nehemové železo se vyskytuje v potravinách jak živočišného původu, tak i v potravinách původu rostlinného (SCZEKAN a JOSHI 1987, THEIL 2004).

V žaludku je většina železa z metaloproteinů uvolněna a rozpouštěna díky kyselině chlorovodíkové, která je součástí žaludečních šťáv. Absorpci také podporuje vitamin C, který napomáhá udržet železo v rozpustném stavu.

Kromě kyseliny askorbové se i další organické kyseliny, jako např. kyselina citronová a mléčná, podílejí na vstřebávání nehemového železa z potravin.

Kromě látek, které podporují vstřebávání nehemového železa, známe i látky, které jeho vstřebávání potlačují. Patří mezi ně fytyáty (nacházejí se např. v rýži, obilných semenech, fazolích, ovesných vločkách), polyfenoly (obsažené v čaji a kávě), soli vápníku, fosforu, oxaláty (např. ve špenátu) a vlákniny.

2.4 Vstřebávání železa a vstup železa do buněk

Železo se vstřebává ve dvanáctníku a horním lačníku, kde přechází ze střeva do enterocytů.

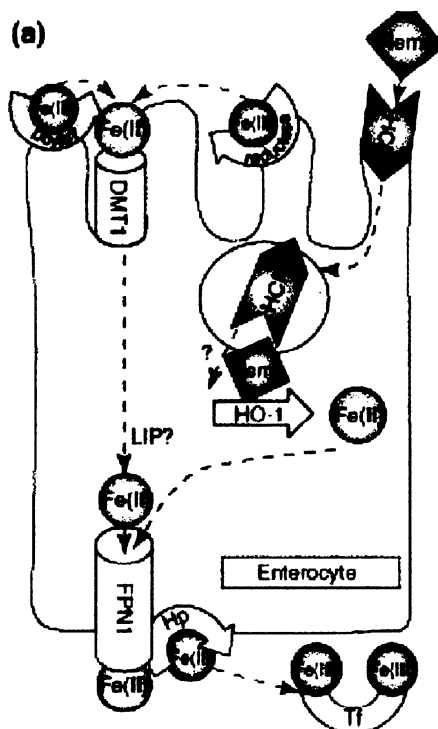
Nehemové železo je přenášeno přes apikální membránu buňky prostřednictvím membránového přenašeče DMT-1 (ANDREWS 1999). Před absorpcí železa musí být železité ionty redukovány na železnaté ionty. Jedním z enzymů zodpovídajících za redukcí iontů železa je duodenální cytochrom-b reduktáza (Dcytb) (GUNSHIN *et al.* 2005).

V enterocyty vytváří železo uvolněné z hemu nebo železo vnesené transporterem DMT-1 intracelulární zásobu železa. Železo se uvnitř buňky váže na nízkomolekulární cheláty nebo se stává součástí chaperonových proteinů, které železo dále transportují.

Přenos přes bazolaterální membránu vyžaduje souhru minimálně dvou proteinů, feroportinu, který slouží jako přenašeč (ABBOUD a HAILE 2000, DONOVAN *et al.* 2000, 2006; HENTZE *et al.* 2004) a hefaistinu, membránového enzymu, který železo oxiduje z jeho Fe^{2+} formy na Fe^{3+} a tím usnadňuje přestup železa z buňky do krve (CHEN *et al.* 2004, VULPE *et al.* 1999). Množství feroportinu na bazolaterální

membráně enterocytu je nepřímě úměrné hladině peptidového hormonu hepcidinu, který snižuje resorpci železa ve střevě (viz. kap. 2.7 a obr. 11). Navázání hepcidinu na ferroportin vede k internalizaci a degradaci ferroportinu (NEMETH *et al.* 2004). Vstřebávání železa enterocytem je přehledně znázorněno na obrázku 8.

Obrázek 8: Vstřebávání železa enterocytem.



Legenda k obrázku 8:

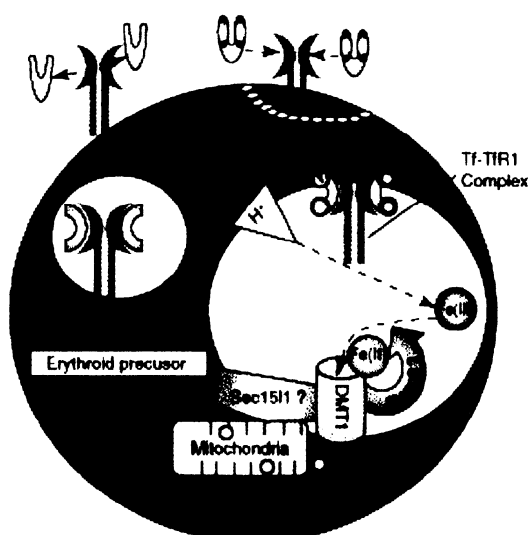
Nehemové železo je po redukci trojmocného železa (Fe^{3+} na dvojmocné Fe^{2+}) enzymem ferireduktázou (*reductase*), vychytáváno enterocytem ve dvanáctníku (McKIE *et al.* 2001). Identita tohoto proteinu není dosud známa. Jedním z kandidátů pro tuto funkci je duodenální protein Dcytb (GUNSHIN *et al.* 2005). Po redukci je Fe^{2+} iont transportován do cytoplazmy transportérem DMT-1. Hemové železo (*Heme*) je vázáno na receptor HCP-1 (*HCP-1*), internalizováno společně s receptorem a uvolněno z hemu enzymem hemovou oxygenázou (*HO-1*). Část železa může část železa vytvářet tzv. labilní fond železa (*LIP*-, „labile iron pool“). Podle některých názorů je LIP směs organických komplexů železa, které difundují v cytozolu (např. citrát-Fe, ATP-Fe, aminokyseliny-Fe

a další) (VYORAL *et al.* 1992). Podle jiných mínění může být železo přenášeno přímým kontaktem mezi jednotlivými proteinovými komplexy (Obr. 10).

Železo je přenášeno přes bazolaterální membránu enterocyty bílkovinou feroportinem (*FPN-1*). Železnaté ionty jsou oxidovány hefaistinem (*Hp*) na Fe^{3+} a poté navázány na transferin (*Tf*) a transportovány do krve (obrázek převzat z publikace DUNN *et al.* 2007).

Železo navázané na transferin vstupuje do buněk přes povrchové receptory pro transferin (Obr. 6). Transferinové receptory se nacházejí na všech buňkách, nejvíce je jich však na prekurzorech červených krvinek. Komplex transferinu s Fe^{3+} je vychytáván na TfR prekurzorů červené krevní řady, ve kterých se železo stává součástí hemu a podílí se na přenosu kyslíku hemoglobinem. Navázaný transferin je společně s receptorem endocytován (HENTZE *et al.* 2004). Z endozomálního váčku je železo exportováno pomocí DMT-1. Protože DMT-1 transportuje Fe^{2+} , musí být uvnitř endozomu železo enzymaticky redukováno. V buňkách červené krevní řady je touto reduktázou protein Steap3 (OHGAMI *et al.* 2005). Schéma vstupu železa do prekurzorů červených krvinek je znázorněno na obrázku 9.

Obrázek 9: Vstup železa do buněk přes transferinový receptor a intracelulární transport železa v prekurzorech červených krvinek (Erythroid precursor).



Legenda k obrázku 9:

Transferin s navázaným železem vytváří komplex s transferinovým receptorem (*Tf-TfR1 Complex*) a jsou společně internalizovány. V endozómu působením sníženého pH (H^+) je železo uvolněno z transferinu a redukováno enzymem Steap3 (*Steap3*) na Fe^{2+} . Endozomální váčky jsou nasměrovány k mitochondriích (*Mitochondria*) působením proteinu Sec15/1 (*Sec15/1*) a exportovány z endozomu transportérem DMT-1 (*DMT-1*). Kontakt endozomu a mitochondrie je znázorněn na obrázku 22. Komplex transferin-transferinový receptor je navrácen na membránu a transferin uvolněn z vazby (obrázek převzat z publikace DUNN *et al.* 2007).

2.5 Vstup železa do mitochondrií

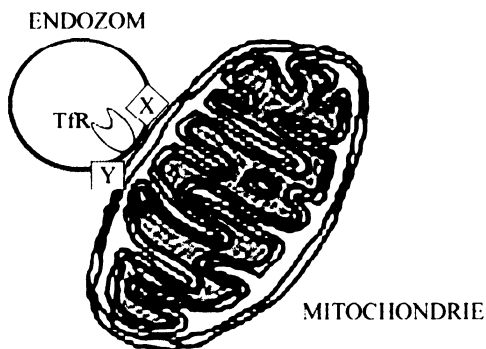
Přesný mechanismus vstupu železa do mitochondrie zatím není znám.

Jednou z možností, jak se železo dopravuje k mitochondrii, je difuze. Taková forma difuzibilního transportu železa se nazývá LIP (viz. legenda k obr. 8). Železo by se mohlo dostávat do mitochondrie volnou difuzí přes mitochondriální membránu.

Další z možností je vstup železa směrováním a těsným kontaktem endozomální membrány s vnější membránou mitochondrie. V tomto případě by se železo k mitochondrii dostávalo díky bílkovinnému komplexu obsahujícímu transferinový receptor s navázaným železem (VYORAL a PETRAK 1998, PONKA 1997). Tato možnost je znázorněna na obrázku 10. Z endozomů se železo dostává do cytozolu, endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu, jádra i mitochondrií. V mitochondriích je železo využito při syntéze hemu a [Fe-S] klastrů (HENTZE *et al.* 2004).

Podle „kiss and run“ teorie, dochází ke kontaktu mitochondrie s endozomem vytvoří přechodný komplex (PONKA 1997). V momentu přiblížení membrán může docházet k přenosu železa díky transferinovému receptoru a dalším, dosud neidentifikovaným, bílkovinám (X, Y) na endozomální membráně (Obr. 22). Mohlo by též docházet ke splynutí obou membrán.

Obrázek 10: Kontakt endozomu a mitochondrie.



Legenda k obrázku 10:

Na obrázku je vyznačen kontakt mitochondrie a endozomu společně s proteinovým komplexem (X, Y, TfR), který by se mohl tvořit mezi oběma membránami. Tento proteinový komplex by mohl obsahovat řadu bílkovin, kterou se nám podařilo koimunoprecipitovat společně s transferinovým receptorem (Obr. 22).

Mezi neznámé proteiny komplexu (X, Y) by mohly patřit např. Steap proteiny. Steap proteiny jsou endozomální reduktázy kovů (železa a mědi) (OHGAMI *et al.* 2006, KNUTSON 2007). Reduktázy kovů redukují železo ze stavu Fe^{3+} na Fe^{2+} , aby mohlo být přenášeno přes membrány. Steap reduktázy tak stimulují příjem železa do buněk (OHGAMI *et al.* 2006). Steap proteiny se vyskytují v plazmatické membráně a v endosomech. Steap2, Steap3 a Steap4 obsahují ve své struktuře N-terminální oxidoreduktázovou doménu s motivem vázjícím NAD(P)H, které slouží jako donor elektronů transmembránového elektronového přenosu. Protein Steap2 se hojně vyskytuje v tkáni produkující mozkomíšni mok (choroid plexus), žaludku a tenkém střevě. Jelikož je železo je v těchto tkáních vstřebáváno, zdá se, že protein Steap2 má vliv na míru jeho dostupnosti pro tyto tkáně a podporuje jeho vstřebávání. Protein Steap3 je důležitý pro udržování homeostázy železa u červených krvinek (OHGAMI *et al.* 2005). Steap4 protein je hojně exprimován v placentě. Steap proteiny jsou také schopny zvýšit příjem netransferinového železa v situacích přebytku železa (opakované transfúze, hemochromatóza). To nasvědčuje tomu, že tyto proteiny mohou hrát důležitou roli i při

onemocněních způsobených přetížením organismu železem. Dalším proteinem patřícím mezi Steap proteiny je protein Steap1, který sice kolokalizuje s transferinem i transferinovým receptorem, ale železo neredukuje a ani se nepodílí na jeho příjmu. Stejně jako proteiny Steap2, Steap3 a Steap4, i tento protein prochází membránou a váže hem. Je také možné, že fungují-li ostatní Steap proteiny jako heteromultimery s proteinem Steap1, pak Steap1 může upravovat jejich aktivitu nebo lokalizaci.

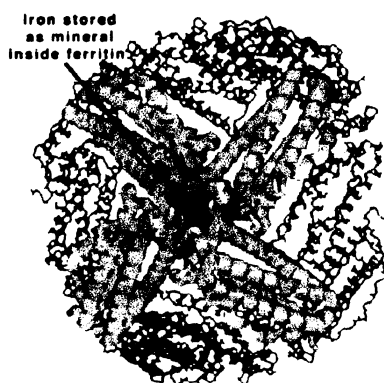
Mezi dalšími proteiny bílkovinného komplexu, podílejícího se na přenosu železa z endozomu do mitochondrie, by mohly být např. proteiny DMT-1 a Sec proteiny (viz. legenda k obrázku 9).

2.6 Skladování železa

Zásobní železo tvoří 15-20% celkového železa v lidském těle. Hlavní zásobárnou železa pro organismus jsou játra. Zásobní železo je rezervou, která může být, v případě potřeby organismu, mobilizována. Železo je v játrech uloženo především ve formě feritinu a hemosiderinu. Feritin je komplexem bílkovinné složky apoferitinu, multimeru složeného z 24 podjednotek, a železitých iontů (Obr. 11) (CRICHTON 1971). Obsah železa uskladněného ve feritinu kolísá podle celkového obsahu železa v organismu. Feritin uvolňuje železo po jeho redukci na dvojmocný iont.

Obrázek 11: Struktura feritinu.

(<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/perinatal/ferritin1.jpg>)



Legenda k obrázku 11:

Uprostřed molekuly feritinu je zobrazeno železo.

Feritin působí na tvorbu volných radikálů, které hrají důležitou roli v degenerativních buněčných procesech a také působí na tvorbu neurotransmiteru glutamátu (DAVALOS *et al.* 2000), který je během nervového přenosu recyklován glutamát dehydrogenázami. Tyto dehydrogenázy patří mezi proteiny, které byly v této práci také identifikovány (viz. kap. 4.1.2).

Nahromaděním feritinových molekul vznikají nerozpustná granula hemosiderinu. Hemosiderin je pravděpodobně degradovanou formou feritinu (bližší znalosti chybí). Železo uložené v hemosiderinu již mobilizovatelné není.

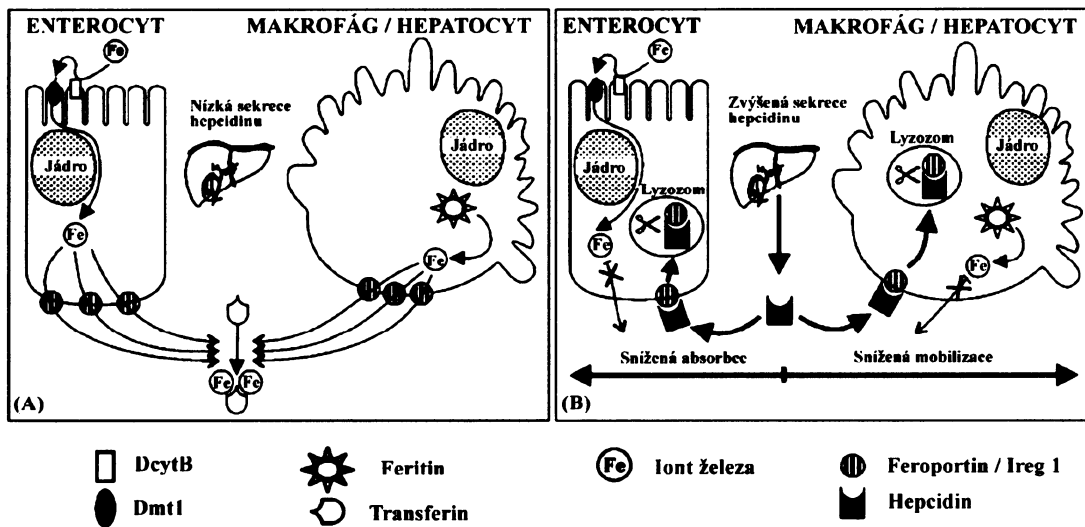
2.7 Regulace obratu železa v těle

Hladina železa v těle je regulována na úrovni absorpce železa v tenkém střevě a recyklování železa z makrofágů (HENTZE *et al.* 2004). Regulaci hladin železa v těle řídí antimikrobiální peptid hepcidin. Hepcidin je produkován téměř výhradně v játrech. Vyskytuje se ve třech formách. Podle délky aminokyselinového řetězce jsou označeny: hepcidin 25, hepcidin 22 a hepcidin 20. Všechny formy hepcidinu vznikají z jednoho společného prekurzoru dlouhého 84 aminokyselin. Po odštěpení signálního peptidu je transportován skrz jaterní bazolaterální membránu do krevního řečiště. Na povrchu buněk

(enterocytů, makrofágů a hepatocytů) interaguje hepcidin s transmembránovým exportním kanálem pro Fe^{2+} feroportinem a způsobuje internalizaci a degradaci feroportinu. Hecpidin zamezuje uvolňování železa z enterocytů, makrofágů a hepatocytů (KNUTSON 2005, NEMETH 2004, KNUTSON 2003). Vliv hepcidinu na tok železa z enterocytů, hepatocytů a makrofágů je zobrazen na obrázku 11. Zvýšená hladina hepcidinu vede k sideropenické anemii. Snížená hladina hepcidinu vede k přetížení organismu železem. Hladina hepcidinu se zvyšuje také při zánětech a infekcích (GANZ 2003) a nádorových onemocněních (WEINSTEIN 2002). V těchto stavech způsobují zvýšené hladiny hepcidinu pokles železa v krvi a snižují tak dostupnost železa pro organismy vyvolávající infekci a pro nádorové buňky. Soudí se, že hladina hepcidinu je alespoň částečně regulována proteiny HFE, hemojuvelinem a Tfr2, tj. proteiny jejichž geny jsou mutovány u vrozených chorob s nadbytkem železa v těle.

Nebyl nalezen žádný významný fyziologický mechanismus řízení exkrece železa. Příjem železa z potravy je kompenzován jeho ztrátou způsobenou odlupováním pokožky a odíráním slizničních povrchů, včetně výstelky gastrointestinálního traktu. Každý den tak tělo přijde asi o 1-2 miligramy železa (CHUNG *et al.* 2003). U menstrujících žen pak dochází ke ztrátě železa ještě během menstruace, kdy denní úbytek vzroste až o další 2 miligramy (BOTHWELL a CHARLTON 1982).

Obrázek 12: Vliv hepcidinu na tok železa z enterocytů, hepatocytů a makrofágů.



Legenda k obrázku 12:

(A) Železo je redukováno DcytB proteinem a transportováno přes membránu kartáčkového lemu enterocytu pomocí DMT-1. Z enterocytu je železo transportováno proteinem ferroportinem/Ireg1 a váže se na cirkulující protein transferin. V makrofázích a hepatocytech je železo uvolňováno z feritinu a transportováno přes buněčnou membránu proteinem ferroportinem/Ireg1 a také se váže na cirkulující protein transferin.

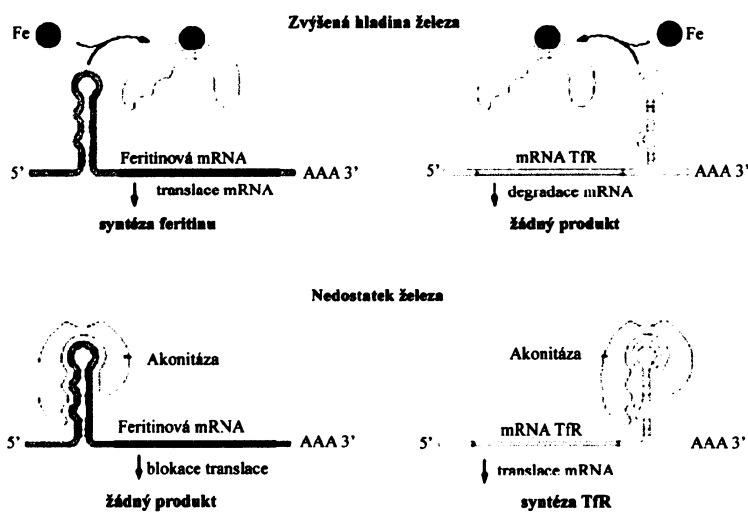
(B) Na povrchu buňky se hepcidin váže na protein ferroportin/Ireg1, což způsobí internalizaci komplexu hepcidin/feroportin. V lyzozomech poté dojde k degradaci tohoto komplexu. Tok železa z enterocytů, hepatocytů a makrofágů do krve je blokován a způsobuje snížení koncentrace železa v séru (VYORAL a PETRAK 2005).

2.8 Regulace množství železa v buňce

Buňky jsou ohroženy nedostatkem železa ale i jeho nadbytkem, který podporuje vznik kyslíkových radikálů a oxidativní poškození. Buňky tedy regulují vstup železa a ukládání železa v buňkách několika mechanismy. Buňky monitorují intracelulární hladinu železa a ovlivňují množství transferinových receptorů na povrchu buněk a hladinu intracelulárního feritinu. Exprese obou proteinů je regulována posttranskripčně

(CRICHTON 1998, PONKA *et al.* 1998, THEIL 1998). Je-li v buňce dostatečné množství železa, vytváří se [Fe-S] klastry cytoplazmatické akonitázy a enzym vykazuje akonitázovou aktivitu (kovertuje citrát na izocitrát). Při nedostatku se železo uvolňuje z [Fe-S] klastrů cytoplazmatické akonitázy slouží jako cytoplazmatický regulační protein 1 (IRP-1 - iron regulatory protein) se schopností vázat se na RNA. IRPs reagují se specifickou vlásenkovou oblastí, označovanou jako IRE (iron responsive element), v 5' nepřekládané oblasti mRNA pro feritin a v 3' nepřekládané oblasti mRNA pro transferinový receptor. Účinek navázání na mRNA se liší podle toho na jakou část mRNA se IRP-1 váže. Při vazbě IRP-1 na 5' nepřekládanou oblast dochází k supresi translace blokováním vazby ribozomálních podjednotek na mRNA pro feritin a při vazbě IRP-1 na 3' nepřekládanou oblast dochází k zesílení translace prodloužením životnosti mRNA pro transferinový receptor (HAILE *et al.* 1989). Kromě IRP-1 je znám ještě IRP-2, který má stejnou funkci, zvýšit hladinu železa v buňce, ale není ovlivňován tvorbou [Fe-S] klastrů. Při nadbytku železa v buňce je IRP-2 proteolyticky rozštěpen. V regulaci příjmu nehemového železa slizničními buňkami se uplatňuje nepřímo sérový transferin a transferinový receptor na bazolaterální membráně enterocytů. Informace o hladině železa v těle se promítá do množství aktivních enzymů na apikální membráně enterocytu, čímž je regulováno množství absorbovaného železa (LOMBARD *et al.* 1997).

Obrázek 13: Posttranslační kontrolní mechanizmy hladiny železa v buňce.



Jako odpověď na vyšší hladinu železa zvyšuje buňka syntézu feritinu, aby mohla vyvázat přebytečné železo a současně inhibuje syntézu transferinových receptorů, aby méně železa vstupovalo do buňky přes plazmatickou membránu.

Oba mechanismy jsou regulovány akonitázou, která rozpoznává vlásenkovité struktury v sekvenci mRNA pro feritin a pro transferinový receptor.

Návázání železa na akonitázu uvolňuje protein z vazby na mRNA. Protože transferinový receptor a feritin mají opačný vliv na intracelulární hladinu železa, má i navázání akonitázy na mRNA různý efekt.

Při nedostatku železa navázání akonitázy na 5'-UTR oblast mRNA pro feritin blokuje iniciaci translace. Navázání akonitázy na 3'-UTR mRNA pro transferinový receptor prodlužuje životnost mRNA blokováním endogenního štepného místa pro endonukleázy (endonukleázy nejsou do obrázku zakresleny).

2.9 Onemocnění způsobená nedostatkem či nadbytkem železa

Při narušení mechanismů, které se na homeostáze železa podílejí, dochází k různým onemocněním vlivem nadbytku nebo nedostatku železa v těle. Přetížení organismu železem může být podmíněno genetickým defektem (dědičná hemochromatóza) nebo zvýšeným příjmem železa (např. u pacientů závislých na transfúzích).

Dědičná hemochromatóza je onemocnění, které vzniká nadměrným vstřebáváním železa ve dvanáctníku a v tenkém střevě, jeho nahromaděním v různých tkáních a orgánech (játra, žlázy s vnitřní sekrecí, srdce) a jejich následným poškozením. Lidé s vrozenou hemochromatózou mají několikanásobně vyšší hladinu železa v organismu, protože potravou přijímají několikrát více železa než zdraví lidé. Železo se ukládá do tkání a způsobuje orgánové poškození.

Souhrnně lze dědičné hemochromatózy rozdělit na tzv. HFE hemochromatózy a non-HFE hemochromatózy podle genů ve kterých se nachází defekt (HENTZE *et al.* 2004). U HFE hemochromatózy se objevuje mutace v genu pro HFE protein (PIETRANGELO 2004). Mezi non-HFE hemochromatózy patří onemocnění s genovým defektem v genu pro hepcidin, hemojuvelin, transferinový receptor 2 a feroportin.

Zvýšenou absorpci železa mají také pacienti s narušenou erythropoézou, kteří dostávají opakované krevní transfúze. Jedná se o choroby jako například talasémie, kongenitální dyserythropoietické anémie a sideroblastické anémie. U těchto chorob dochází k zvýšení obratu červených krvinek a sekundárně k zvýšení vstřebávání železa. Železo uvolněné z erytrocytů se pak ukládá v játrech. U pacientů s játry přetíženými železem se často vyvíjí jaterní cirhóza, která může vést až k tvorbě jaterních nádorů. Dále nadměrné množství železa působí negativně na myokard a žlázy s vnitřní sekrecí (např. poškození endokrinní funkce slinivky). Zvýšený objem železa ve tkáních může vést ke kardiomyopatii, diabetu, artritidě, hypogonádizmu, impotenci, hyperpigmentaci a dalším nespecifickým symptomům, jakými jsou například únava a celková tělesná slabost.

Vývoj nádorů v játrech je spojen s přímým toxickým efektem volných iontů železa, které nejsou navázány na ochranné molekuly jako je transferin nebo feritin. Volné ionty železa způsobují produkci kyslíkových radikálů, které způsobují peroxidaci lipidů a tím poškození buněčných membrán a DNA. Poškození buněčných membrán je pokládáno za jednu z hlavních příčin poškození organismu při přetížení železem (BRITTON *et al.* 1994).

Příčiny nedostatečného zásobení tkání železem mohou být různé. Může se jednat o chronické nedostatečné vstřebávání železa z potravy, nedostatek železa v potravě (nedostatečný obsah železa v potravě je běžný u nevyvážené vegetariánské diety, kdy nehemové železo z rostlin zůstává jako jediný zdroj železa), poruchu transportu železa, chybné vychytávání a využití železa v tkáních, zvýšenou ztrátu železa při chronickém krvácení (např. krvácení z gastrointestinálního traktu), defekty syntézy hemoglobinu nebo vrozené genetické defekty transferinu a transferinového receptoru, akutní a chronické infekce (poškození epitelu střeva způsobující poruchy vstřebávání železa). K poruchám absorpce železa ve střevě může také dojít po chirurgickém odstranění části střeva. Nejcitlivější na nedostatek železa je krvetvorná tkáň. Deficit železa je nejběžnější příčinou mikrocytární hypochromní anemie, při které dochází k narušení zásobování tkání kyslíkem. Při deficitu železa se zvyšuje únava a dochází ke snížení fyzické výkonnosti.

2.10 Nadbytek železa a volné kyslíkové radikály

Volné radikály jsou sloučeniny charakterizované nepárovými elektrony. V přítomnosti kyslíku se na místo nepárového elektronu okamžitě naváže elektron z molekuly kyslíku a vzniká radikál, který se snaží získat z jiné sloučeniny chybějící elektron, čímž vytváří jiný volný radikál. Tato řetězová reakce je přerušena buď vazbou dvou radikálů na sebe nebo reakcí s antioxidanty. Hlavním zdrojem volných radikálů v buňkách je proces aerobní respirace, kde oxidací substrátů vzdušným kyslíkem vzniká energie a jako vedlejší produkty volné radikály superoxid (O_2^-) a volný hydroxylový radikál (OH^*). V tomto procesu vznikají volné radikály v katalytických centrech proteinů obsahujících Fe. Vznikají v okamžiku, kdy jsou tyto proteiny s katalytickým centrem s Fe poškozeny. Na vzniku volných radikálů se dále podílí mnoho reakcí a mechanismů (např. stimulace fagocytózy patogeny nebo lipopolysacharidy, metabolismus argininu a specifické tkáňové enzymy) (FIERS *et al.* 1999, NICHOLLS a BUDD 2000).

Metabolické produkty volných radikálů bývají označovány jako ROS (reactive oxygen species). ROS jsou sloučeniny kyslíku (např. peroxid vodíku, hydroxylové radikály, superoxidy, hydrogen peroxidy, peroxyinitridy, singletový kyslík, kyselina chlorná a další).

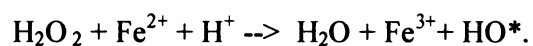
Volné radikály mohou být pro buňky jak prospěšné, tak i škodlivé.

Krvinky bílé řady obsahují volné radikály, jimiž zabíjí mikroorganismy, kvasinky a parazity. T-buňky jimi ničí nádorové buňky, osteoklasty jimi remodelují kost. Volnými radikály uvolňovaná kyselina arachidonová, např. z buněčných membrán, je zpracovávána volnými radikály na regulační molekuly jako jsou prostaglandiny, prostacykliny, tromboxany.

Volné radikály mají schopnost poškodit prakticky všechny buněčné struktury. Nenasycené mastné kyseliny jsou působením volných radikálů lipoperoxidovány, při čemž vnikají mj. kancerogenní aldehydy (např. malondialdehyd, 4-hydroxynonenal aj.), hydroperoxydy, lipofusciny aj. Lipoperoxidaci podléhají i **bílkoviny**, dochází k poškození dusíkatých bazí **DNA** s možností **mutací** a **kancerogeneze**. Glykooxidace (současná glykace a působení volných radikálů vede k tvorbě vysoce reaktivních AGE látek (advanced glycosylation end-products), vytváří se křížové vazby s bílkoviny, které těžce poškozují jejich funkci. Lipoperoxidace nastává např. uvolněním Fe^{2+} z jeho sloučenin působením superoxidu a dochází pak k iniciaci, dále propagaci a nakonec terminaci lipoperoxidace. Volné radikály hrají klíčovou úlohu při vzniku a rozvoji celé řady onemocnění (CRICHTON *et al.* 2002). Významně přispívají ke vzniku a průběhu **diabetu**, jak již bylo výše zmíněno, podporují **stárnutí**, vznik očních chorob např. šedého zákalu, vznik **zánětů**, řady plicních chorob, kožních chorob, neurodegenerativních chorob (např. **Parkinsonova choroba** a **Alzheimerova choroba**), různých **poruch imunity**, podporují virové infekce, mají význam u některých intoxikací, podílí se např. na vzniku revmatického zánětu kloubů, působí mužskou neplodnost, vznikají v reperfuční fázi po ischemii, což má význam např. u **transplantací** nebo **infarktu myokardu**. Při **ateroskleróze** volné radikály oxidují LDL-cholesterol. Oxidovaná forma cholesterolu se stává volným radikálem a šíří poškození biomolekul dále. Aterosklerotické změny zvyšují riziko tvorby krevních sraženin a urychlují proces stárnutí tělních tkání, které jsou kumulací volných radikálů soustavně poškozovány. Neméně významný je jejich podíl na nádorových změnách buněk, kdy se z normálně fungující buňky stává buňka preneoplastická a posléze buňka neoplastická až nakonec, nekontrolovaným dělením buněk, vznikne **nádor**.

Látky neutralizující účinek volných radikálů se nazývají antioxidanty. Antioxidanty působí buď v extracelulární tekutině (hydrofilní antioxidanty) nebo pronikají buněčnou membránou a účinkují intracelulárně (antioxidanty lipofilní). Antioxidanty jsou buď enzymové (superoxid dizmutáza, kataláza, glutathion peroxidáza) nebo neenzymové

povahy (kyselina močová, vitaminy A, C, E, b-karoten, bílkoviny, flavonoidy, selen a zinek). Superoxid je účinkem superoxidodismutázy (SOD) zpracován na peroxid vodíku, který není volným radikálem, ale je neméně škodlivý. Proniká přes buněčné membrány a je v organismu inaktivován glutathionperoxidázou (GSHPx) a katalázou (CAT). Při nedostatku těchto enzymů a v přítomnosti iontů železa vznikají z peroxidu vodíku volné hydroxylové radikály, tzv. **Fentonova reakce**:



3. MATERIÁL A METODY

3.1 Buněčná linie

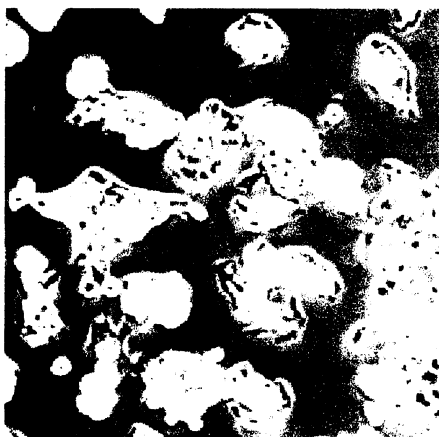
Pro studium metabolismu železa v játrech byla jako modelový systém použita linie buněk HepG2 (HB-8065). HepG2 jsou buňky odvozené z jaterní tkáně, které mají zachovanou většinu z metabolických vlastností standardních hepatocytů jako např. syntézu albuminu, alfa-2 makroglobulinu, alfa-1 antitrypsinu, transferinu a dalších bílkovin (KNOWLESS *et al.* 1980).

Růst buněk v kultivačních lahvích lze rozčlenit do čtyř růstových fází:

- 1) lag fáze, kdy se buňky přichytávají ke stěně kultivační nádoby a téměř se nedělí
- 2) log fáze, kdy počet buněk exponenciálně roste
- 3) zpomalení růstu buněk
- 4) stacionární fáze, kdy se buňky nedělí, vzájemně se v růstu inhibují a postupně hynou

Pro experimenty s metabolickým značením buněk ^{59}Fe z media byly použity buňky v exponenciální fázi růstu (Obr. 14). Porostlá kultivační láhev o ploše 150 cm^2 obsahovala přibližně 20 miliónů buněk HepG2.

Obrázek 14: Buňky HepG2.



HepG2 buňky v log fázi (objektiv 10 x 10, mikroskop Nikon TMS).

3.2 Kultivace buněk HepG2

Buňky HepG2 byly pěstovány v mediu IMDM s přidavkem 10% fetálního telecího séra ve inkubátoru v atmosféře s řízeným obsahem CO₂ (6,5%), při 37°C.

Buňky HepG2 rostou přisedlé k podkladu, mají polygonální tvar a v kultivační lahvi pokrývají dostupnou plochu a navzájem se překrývají.

S buňkami se pracovalo za sterilních podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu (Heraeus). Buňky byly pasážovány v plastových kultivačních lahvích Costar (Coming, USA) s povrchem 150 cm².

Médium pro buňky HepG2 bylo připraveno z koncentráту 10 x IMDM (Sigma Aldrich): sterilní deinoizovaná voda, IMDM (Sigma Aldrich), 10% fetální telecí sérum (Cambrex), 0,75% NaHCO₃ (Sevapharma), 100 mM roztok neesenciálních aminokyselin (Sevapharma), 1 M roztok pyruvátu sodného (Cambrex).

3.3 Metabolické značení buněk HepG2 pomocí ⁵⁹Fe

Buňky HepG2 na šesti čerstvě porostlých kultivačních lahvích s povrchem 150 cm² (Costar, USA) třikrát omyty 20 ml PBS (viz. kap. Roztoky a pufrů). K buňkám byl přidán nízkomolekulární komplex radioaktivně značeného železa navázaného na citrátové ionty (citrát sodný, Sigma Aldrich, komplex citrát - ⁵⁹Fe v poměru 1000:1 s ⁵⁹FeCl₃ (PerkinElmer, izotop ⁵⁹Fe) rozpuštěné ve 2 ml média IMDM bez přidaného fetálního telecího séra. Za těchto podmínek je komplex železa s citrátem monoionický a netvoří polynkleární komplexy. Železo je v komplexu s citrátem v rozpustné formě a pro buňku je metabolicky dostupné. Do buňky se dostává netransferinovou cestou.

Buňky byly inkubovány v mediu (IMDM, bez séra) se značkou ⁵⁹Fe 30 min při 37°C.

3.4 Lýza buněk a izolace mitochondrií diferenciální centrifugací

Buňky metabolicky naznačené ⁵⁹Fe byly v každé kultivační láhvi schlazeny na teplotu 0 °C a 3 x opláchnuty 10 ml PBS. Poté k nim byly přidány 2 ml hypotonického lyzačního pufru (0,01 M HEPES s přidavkem inhibitorů proteáz Complete mini, Roche). Buňky

byly 5 min lyzovány hypotonickou lýzou při teplotě 0°C. Poté byly buňky seškrábány stěrkou (rubber policeman) ze stěn kultivační lahve a dále byly homogenizovány ve skleněném Downsově homogenizátoru.

Buněčná jádra a nerozbité buňky byly odstraněny centrifugací při 1000 x g, po dobu 10 min, při 4°C v centrifuze Hettich Universal 320R (rotor 1689-L). Postnukleární supernatant byl dále centrifugován při 15 000 x g po dobu 25 min. Výsledná peleta obohacených mitochondrií byla resuspendována ve 1 ml lyzačního pufru (0,14 M NaCl, 0,01 M HEPES, pH 7,4) a opět stočena při 15 000 x g po dobu 25 min. Supernatant byl odebrán a mitochondriální frakce byla uchovávána do dalšího použití při – 80°C.

3.5 Analýza proteinových komplexů vázajících železo dvojrozměrnou nativní separací – kombinací kapalinové iontoměničové chromatografie a nativní elektroforézy

Chromatografie na měničích iontů je vratnou výměnou iontů mezi mobilní a stacionární fází. Ionty, které jsou elektrostaticky vázané ke stacionární fázi se reverzibilně vyměňují s ionty v roztoku. Dělení látek je způsobeno rozdílem ve velikosti náboje. Ionty se stejným nábojem se hromadí na stejném místě a jsou eluovány současně.

Chromatografie byla provedena na pracovišti katedry Parazitologie Přírodovědecké fakulty UK Mgr. Róbertem Šuťákem.

Vzorek obsahující mitochondrie byl resuspendován v 5 ml lyzačního roztoku (0.1% Triton-X 100, 0,02 M HEPES, pH 7,4). Lyzát byl nanesen na kolonu Mono Q HR 5/5 (Pharmacia Biotech) ekvilibrovanou lyzačním pufrem a zapojenou do chromatografického systému BioLogic HR (Bio-Rad). Proteinové komplexy zachycené na koloně byly vymývány z kolony lineárním gradientem chloridu sodného (0 až 1 M NaCl, rychlost toku 1ml/min). Frakce vytékající z kolony byly sbírány do 1,5 ml polypropylenových zkumavek (Sigma Aldrich). Pomocí detektoru gama záření Gabi Star (Raytest) byla sledována přítomnost radioaktivního železa.

Před elektroforézou byly frakce obsahující radioaktivní železo zahuštěny na centrifugačních ultrafiltrech (Millipore, ultrafree, NMWL 5 000) a poté rozděleny na nativním polyakrylamidovém gelu s přidavkem neionického detergentu Triton X-100.

Elektroforéza byla uskutečněna v přístroji Hoefer SE 600. Gradientové gely (3-20% polyakrylamidu) byly připraveny pomocí gradientového mixéru Hoefer SG gradient mixer. Složení obou komponent pro vytvoření gradientu je uveden v oddíle Roztoky a pufrů. Separace proteinů na gelu probíhala 4 hodiny při konstantních 55 mA na 1 gel, při nastavení vnějšího chlazení na 15°C. Separace probíhala paralelně na dvou identických gelech. Po elektroforéze byl analyzován radioaktivní signál pomocí fosfoimageru a také přítomnost proteinů stříbřením.

3.6 Barvení proteinů v gelu stříbrem

Tato metoda je založena na principu vazby stříbrných iontů na –SH a –COOH skupiny aminokyselin. Schopnost vázat na sebe stříbrné ionty je tedy u každého proteinu jiná v závislosti na jeho aminokyselinovém složení.

Po proběhnutí nativní elektroforézy v polyakrylamidovém gelu s Tritonem X-100 byly proteiny v gelu fixovány roztokem obsahujícím metanol (50% metanol (Merck), 12% kyselina octová (Fluka), 0,05 % formaldehyd (Riedel – de Haen). Gel byl po fixaci třikrát promyt vodným roztokem 35% etanolu (Merck) po dobu 20 min a přenesen na 2 min do ethanolového roztoku s thiosulfátem sodným (35% ethanol, 0,02% natrium thiosulfat (Sigma Aldrich) v dH₂O). Poté byl třikrát promyt v destilované vodě (5 min). Dále byl gel ponechán na 20 min v roztoku dusičnanu stříbrného s formaldehydem (0,2% dusičnan stříbrný, 0,076% formaldehyd v dH₂O a dvakrát promyt v dH₂O (1 min). Zviditelnění gelu bylo provedeno v roztoku uhličitanu sodného s formaldehydem a thiosulfátem sodným (6% Na₂CO₃, 0,05% formaldehyd, 0,0004% thiosulfát sodný v dH₂O). Redukce stříbrných iontů se projevila zčernáním míst na gelu, kde bylo stříbro na proteiny navázáno. Redukční reakce byla zastavena roztokem metanolu a kyseliny octové (50% metanol, 12% kyselina octová v dH₂O).

3.7 Detekce radioaktivně označených proteinů v gelu pomocí fosfoimageru

Po proběhnutí nativní elektroforézy v polyakrylamidovém gelu s Tritonem X-100 byl gel omyt v destilované vodě, vložen mezi dvě celofánová folie a sušen ve vakuu při 40°C

po dobu 3 hodin (BioRad gel dreyer). Teplota 40°C byla zvolena, aby se minimalizovalo tepelné poškození proteinů, které by mohlo komplikovat následnou analýzu hmotnostním spektrometrem. Vysušený gel byl 24 hodin exponován na Fuji phosphorimaging plate BAS-IP-MS 2025 a záznam na exponované desce byl vizualizován pomocí fosfoimageru FLA 2000 (Fuji, Cypress, CA, USA). Výsledný digitální radiogram byl analyzován pomocí softwaru Aida (Raytest).

3.8 Analýza proteinů

Práce byla provedena na pracovišti MBÚ AV ČR Ing. Petrem Haladou, PhD.

3.8.1 Příprava proteinových komplexů pro tandemovou hmotnostní spektrometrii

Proteinové komplexy byly vyříznuty z gelu (pomocí masky zhotovené podle xerokopie obrázku z phosphoimageru (1:1) vystřížením okének), nakrájeny na malé kousky a inkubovány 5 min v 100 mM roztoku 4-ethylmorpholin acetátu (pH 8,1) v 50% acetonitrilu (MeCN). Proteiny byly poté 30 min redukovány 30 mM tris-(2-carboxyethyl)-fosfinem při 65°C a následně za tmy alkylovány 30 mM roztokem iodacetamidu po dobu 60 min. Dále byl gel dvakrát střídavě promyt vodou a MeCN. Po odstranění supernatantu byl gel částečně vysušen ve vakuové odparce (SpeedVac). Poté bylo ke gelovým kouskům přidáno 50 µl štěpícího pufru o následujícím složení: 50 mM 4-ethylmorpholin acetát, 1 mM CaCl₂, 10% MeCN a trypsin (50 ng, Promega, Madison, WI). Vzorky byly inkubovány přes noc při teplotě 37°C a vzniklé peptidy byly extrahovány 30% MeCN v 0,5% octové kyselině (HAc) a poté částečně vysušeny.

3.8.2 Analýza peptidů z proteinových komplexů tandemovou hmotnostní spektrometrií LC-MS/MS

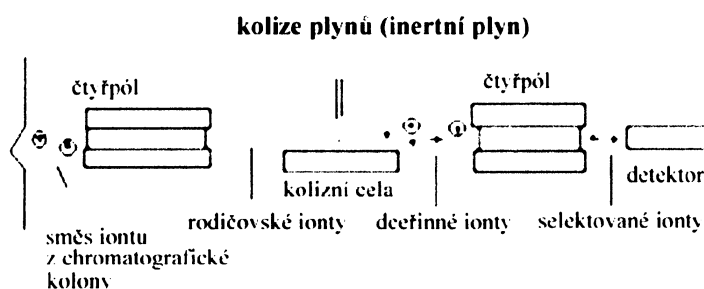
Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda určování hmotnosti iontů. Podstatou MS je separace iontů a fragmentů analyzované látky, které vznikly ionizací atomů, popřípadě molekul. Nabité částice se dělí podle své hybnosti a energie. MS

vypovídá o primární struktuře analyzované látky. Tato metoda umožňuje identifikaci proteinů. Je to velice citlivá a rychlá metoda.

Hmotnostní spektrometr je přístroj, který se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru, detektoru a řídicího počítače (Obr. 15).

Obrázek 15: Tandemová hmotnostní spektrometrie.

(http://upload.wikimedia.org/wikibooks/en/2/26/Tandem_mass.JPG)



U tandemové hmotnostní spektrometrie jsou vedle sebe v činnosti dva spektrometry a mezi nimi v kolizní cele dochází k rozbití molekuly na fragmenty, které lze identifikovat podle specifických spekter.

Peptidy, získané trypsinovým štěpením elektroforézou rozdělených proteinových komplexů, byly nastříknuty na kolonu (0,180 x 120 mm) naplněnou nosičem MAGIC C18 (5 μm, 200 Å; Michrom BioResources, Auburn, WA) a separovány gradientem od 5% MeCN/0,5% HAc do 45% MeCN/0,5% HAc po dobu 90 min. Kolona byla připojena přímo k nanoelektrosprejovému iontovému zdroji hmotnostního spektrometru LCQ^{DECA} (Thermo, San Jose, CA). Hmotnostní spektra byla snímána v rozsahu 350-1800 Da následovaná kolizními MS/MS spektry tří nejintenzivnějších píků v předchozím běžném skenu. Interpretace získaných kolizních spekter a identifikace proteinů byla provedena pomocí programu SEQUESTTM (příklady reprezentativních spekter jsou uvedeny na stránkách 37 a 45).

3.9 Koimunoprecipitace bílkovin asociovaných s TfR

Do tří 1,5 ml polypropylenových zkumavek (Sigma Aldrich) bylo rozděleno po 50 μ l suspenze magnetických kuliček (Protein G MicroBeads, MACS molecular, Miltenyi Biotec). K suspenzi kuliček první zkumavky bylo přidáno 400 μ l mitochondriálního lyzátu (jako kontrola nespecifické sorpce proteinů v lyzátu na povrch kuliček), do druhé zkumavky bylo přidáno 400 μ l mitochondriálního lyzátu a 1 μ l protilátky proti transferinovému receptoru (mouse monoclonal CD71, clone MEM-189, EXBIO, product no. 11-353-M001) a do třetí zkumavky bylo přidáno 400 μ l lyzačního pufru a 1 μ l protilátky (mouse monoclonal CD71, clone MEM-189, EXBIO, product no. 11-353-M001; jako kontrola míry sorpce protilátek na povrch kuliček). Objem suspenzí byl doplněn na 1 ml lyzačním pufrem (0,14 M NaCl, 0,05 M HEPES, 1% Triton, pH 7,4).

Vše bylo inkubováno při pokojové teplotě na orbitální míchačce po dobu 1 hodiny.

Po inkubaci byly suspenze aplikovány na kolony v magnetickém stojanu a 3 x promyty 400 μ l lyzačního pufru.

Následně byly kuličky stáhnuty magnetem a ke kuličkám s navázanými proteiny bylo přidáno 100 μ l Tris-Glycine SDS Sample Buffer (Invitrogen) s redukujícím činidlem (beta-merkapt ethanol) a vzorky byly inkubovány 5 min při 95°C.

3.10 Koimunoprecipitace bílkovin asociovaných s VDAC2

Do tří 1,5 ml zkumavek bylo přidáno po 100 μ l suspenze magnetických kuliček Dynabeads (Dyna), pokrytých proteinem G, v zásobním roztoku. Kuličky byly promyty lyzačním pufrem (0,14 M NaCl, 0,01 M HEPES, 1,5% Triton, inhibitory proteáz).

K suspenzi kuliček první zkumavky bylo přidáno 200 μ l mitochondriálního lyzátu (jako kontrola nespecifické sorpce proteinů v lyzátu na povrch kuliček). K pročištěným kuličkám druhé zkumavky bylo přidáno 200 μ l protilátky proti VDAC2 (VDAC2, Goat polyclonal IgG, Santa Cruz, sc8830 nebo VDAC2, Goat polyclonal IgG, Imgenex, IMG-3297) v lyzačním pufrem (20 μ l protilátky (1mg/ml) a 180 μ l lyzačního pufru); jako kontrola míry sorpce protilátek na povrch kuliček. Do třetí zkumavky byla přidán lyzační pufr s protilátkou proti VDAC2 (VDAC2, Goat polyclonal IgG, Santa Cruz, sc8830 nebo VDAC2, Goat polyclonal IgG, Imgenex, IMG-3297).

Kuličky s protilátkou byly inkubovány po dobu 40 min při laboratorní teplotě. Kuličky s navázanou protilátkou byly promyty lyzačním pufrům.

Ke kuličkám třetí zkumavky s navázanou protilátkou bylo přidáno 150 μ l mitochondriálního lyzátu. Inkubace probíhala 1 hodinu při laboratorní teplotě. Kuličky ze všech zkumavek byly promyty lyzačním pufrům.

3.11 Analýza imunoprecipitovaných proteinů pomocí polyakrylamidové elektroforézy

Elektroforéza probíhala na 7,5% polyakrylamidovém gelu v zařízení X-Cell (Invitrogen) v pufru (viz. Pufr pro SDS elektroforézu v oddílu Roztoky a pufrы). Separace proteinů na gelu probíhala 4 hodiny při konstantních 30 mA. Separace probíhala paralelně na dvou identických gelech. Jeden gel byl po elektroforéze obarven Simply Blue Safe Stain (Invitrogen) podle instrukcí výrobce a druhý byl použit na Western blot.

3.12 Western blotting koimunoprecipitovaných proteinů za použití protilátky proti TfR

Pro potvrzení identity proužku 90 kDa, korespondujícího s TfR, byl po elektroforéze v polyakrylamidovém gelu z filtračních papírů a PVDF membrány Hybond-P (GE-Amersham) vytvořen sendvič pro přenos proteinů v elektrickém poli. Pro elektroforetický přenos proteinů byl použit pufr (Glycin, Tris-base, MeOH, H₂O). Elektroforetický přenos probíhal po dobu 1 hodiny při proudu 350 mA. Po transferu bílkovin byla membrána přes noc inkubována s blokovacím pufrům (5% sušené mléko, 0,1% Tween-20 v PBS). Po zablokování byla membrána 1 hodinu promývána PBS a poté 2 hodiny inkubována s primární protilátkou (mouse monoclonal CD71, clone MEM-189, EXBIO a.s. Praha, product no. 11-353-M001) 5000 x ředěnou v blokovacím pufrům. Nenavázaná protilátka byla odmyta v 0,1% Tween v PBS. Poté byla membrána inkubována 1 hodinu se sekundární protilátkou (Biosource, Goat F(ab)₂ anti mouse Ig, HRP conjugated katalog.č. AMI4404) 50 000 x ředěnou v blokovacím roztoku. Nenavázaná protilátka byla 3 x odmyta v roztoku 0,1% Tween v PBS. Membrána byla vyvolána pomocí TMB

(3,3',5,5'-tetramethylbenzidin, Sigma Aldrich, product no. T0565). Inkubace membrány s TMB probíhala 20 min. Poté byla membrána promyta v destilované vodě a usušena na vzduchu.

3.13 Western bloting koimunoprecipitovaných proteinů za použití protilátky proti VDAC2

Po elektroforéze v polyakrylamidovém gelu byly z filtračních papírů a PVDF membrány Hybond-P (GE-Amersham) vytvořeny podmínky pro přenos proteinů v elektrickém poli. Polosuchý přenos byl proveden na přístroji Semiphor (Hoeffer), po dobu 1 hodiny při proudové hustotě 0,8 mA na 1 cm² membrány. Po transferu byla membrána přes noc inkubována s blokovacím pufrem (5% sušené mléko, 0,1% Tween-20 v PBS). Po zablokování byla membrána 1,5 hodiny inkubována s primární protilátkou (VDAC2, Goat polyclonal IgG, Santa Cruz, sc8830 nebo VDAC2, Goat polyclonal IgG, Imgenex, IMG-3297) 1000 x ředěná v blokovacím roztoku. Nenavázaná protilátka byla odmyta v 0,1% Tween v PBS. Poté byla membrána inkubována 1 hodinu se sekundární protilátkou (Rabbit anti goat IgG, Santa Cruz, sc2768, HRP conjugated) 5000 x ředěnou v blokovacím roztoku. Nenavázaná sekundární protilátka byla odmyta v 0,1% Tween v PBS a v PBS. Membrána byla inkubována s roztokem chromogenního substrátu ECL+ (Amersham) podle instrukcí výrobce a chemilumiscenční signál byl zachycen na speciální fotografický papír pro detekci chemiluminiscence (Kodak).

3.14 Roztoky a pufry

Lyzační pufry

0,14 M NaCl

0,01 M / 0,05 M / 0,02 M HEPES

1,5% / 1% / 0.1% Triton X-100

1 tableta EDTA-free Complete mini protease inhibitor cocktail (Roche) na 10 ml roztoku

PBS (phosphate buffered saline)

1x PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4

Pufr pro SDS elektroforézu:

10 x pufr, pH 8,3:

0,25 M TRIS

1,92 M GLYCIN

1% SDS

Destilovaná voda

Komponenty pro polyakrylamidový nativní gradientový gel 3-20%:

Složka roztoku	3 % Akrylamid	20 % Akrylamid	Ostřicí gel:
30% akrylamid	3,2 ml	21,4 ml	2 ml
1,5M Tris-Cl, pH 8,8	8 ml	8 ml	-
10M Tris-Cl, pH 6,8	-	-	5 ml
Triton X-100, 20 %	2,4 ml	2,4 ml	1,5 ml
Destilovaná voda	18,20 ml	0,14 ml	11,38 ml
Peroxodvojsíran amonný	86 µl	86 µl	107 µl
TEMED	26 µl	13 µl	32 µl

Komponenty pro polyakrylamidový gel 7,5%:

Složka roztoku	Dělicí gel	Ostřicí gel:
40% akrylamid +bis (29:1)	1,1 ml	0,3 ml
3M Tris pH 8,5	2 ml (+SDS)	0,75 ml
Glycerol 60%	1,7 ml	-
Destilovaná voda	1,8 ml	2 ml
Peroxodvojsíran amonný	75 μ l	30 μ l
TEMED	7,5 μ l	3 μ l

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

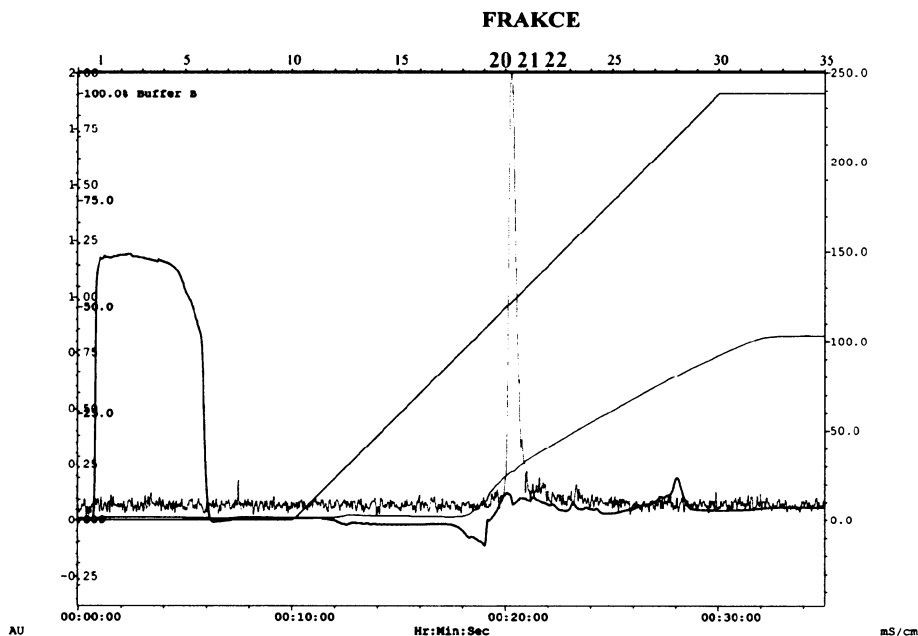
4.1 Výsledky

Pokusy byly prováděny na HepG2 buňkách značených ^{59}Fe (podrobný popis značení je uveden v kapitole Materiál a metody).

Z těchto buněk byly diferenciální centrifugací vyizolovány mitochondrie (viz. Materiál a metody). Mitochondrie byly lyzovány neionickým detergentem, při jehož použití dochází k minimální dezintegraci proteinových komplexů, a lyzát obsahující proteinové komplexy byl nanesen na kolonu MONO Q HR 5/5 (Pharmacia Biotech) zapojenou do chromatografického systému BioLogic HR (Bio-Rad). Proteinové komplexy zachycené na koloně byly eluovány z kolony gradientem chloridu sodného.

Z kolony byly jímány frakce. Přítomnost radioaktivního železa byla sledována pomocí detektoru gama záření Gabi Star (Raytest).

Obrázek 16: Chromatogram mitochondriálního lyzátu buněk značených ^{59}Fe .



Legenda k obrázku 16:

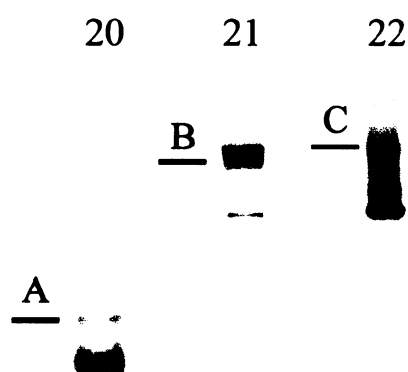
Fialová křivka znázorňuje radioaktivitu lyzátu. Modrá křivka znázorňuje UV absorbanci

(koncentraci proteinů). Černá křivka znázorňuje solný gradient, který je měřítkem obsahu iontů v elučním pufru. Červená křivka znázorňuje vodivost elučního pufru.

Jak je vidět ze záznamu, chromatografie odstranila většinu proteinů z celkového spektra lyzátu (modrá křivka, frakce 1-5). Redukce množství proteinů byla nezbytná pro další analýzu, neboť bílkovinné komplexy obsahující ^{59}Fe , které jsme dále analyzovali, tvoří pouze několik procent celkového vstupního množství proteinů (fialová křivka, frakce 20, 21 a 22). Z jímaných frakcí byly pro další postupy vybrány frakce 20, 21 a 22.

Obrázek 17: Nativní elektroforetická separace radioaktivních frakcí 20, 21 a 22.

CHROMATOGRAFICKÉ FRAKCE



Proteinové komplexy obsažené v těchto radioaktivních frakcích byly dále děleny pomocí nativní elektroforézy (Obr. 17). Centrifugační ultrafiltrací koncentrované

chromatografické frakce obsahující radioaktivitu byly separovány nativní elektroforézou na polyakrylamidovém gelu (3-20% polyakrylamid) s přidavkem neionického detergentu Triton X-100. Gel byl vysušen a poté byl exponován na Fuji phosphorimaging plate BAS-IP-MS 2025. Záznam na exponované desce byl vizualizován pomocí Fuji fosfoimageru FLA 2000. Výsledný digitální radiogram byl analyzován pomocí softwaru Aida.

Nativní elektroforetická separace probíhala se stejnými vzorky souběžně na dvou gelech, z nichž byl jeden nastříbřen a druhý vysušen. Z vysušeného gelu s radioaktivně označenými proteiny byly pomocí masky vyřezány vybrané oblasti gelu korespondující s nejlépe rozdělenými proteinovými komplexy naznačenými železem (na obrázku označené A, B, C). Masky byla vytvořena podle radioaktivního gelu (Obr. 17). Barvení proteinů stříbrem prokázalo, že se v blízkosti vybraných proužků (A, B, C) nevyskytují žádné další proteinové komplexy, které by kontaminovaly vzorky během další hmotnostní analýzy.

Vyřezané kousky gelu, obsahující proteinové komplexy A, B, C, byly rehydratovány a proteolyticky štěpeny trypsinem. Připravené peptidy byly zpracovány hmotnostní tandemovou spektrometrií LC-MS/MS.

Interpretace získaných kolizních spekter a identifikace proteinů byla provedena pomocí programu SEQUESTTM (viz. ukázková spektra a tabulka 1, 2 a 3).

Z identifikovaných proteinů proužků A, B, C chromatografických frakcí 20, 21 a 22 jsem se zabývala proteiny, které byly určeny na základě 4 a více peptidových fragmentů (počet peptidových fragmentů je uveden v tabulkách 1, 2 a 3). Za anglickým názvem proteinu je vždy uveden jeho kód v databázi Swiss prot a v závorce počet peptidových fragmentů, na jejichž základě byla identita proteinu určena.

4.1.1 Identifikované proteiny chromatografické frakce 20, proužku A.

Tabulka 1:

Protein name	SwissProt No.	No. peptides
Catalase	P04040	18
Liver carboxylesterase 1	P23141	14
Lanosterol synthase	P48449	13
Acyl-coenzyme A oxidase 1	Q15067	9
Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase	Q13011	8
Fructose-bisphosphate aldolase A	P04075	7
GDH/6PGL endoplasmic bifunctional protein	O95479	5
Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	P11279	5
Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	P13473	4
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	P13688	3
Prenylcysteine oxidase	Q9UHG	3
Fascin	Q16658	3
Cathepsin D	P07339	3
Nicastrin	Q92542	3
Serotransferrin	P02787	3
Gamma-glutamyltranspeptidase 1	P19440	3
Aminopeptidase N	P15144	3
KDEL motif-containing protein 2	Q7Z4H8	2
Basigin	P35613	2
Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	P42785	2
Hemoglobin subunit beta	P68871	1
Dehydrogenase/reductase SDR family member 4	Q9BTZ2	1
Ras-related protein Rab-11B	Q15907	1
Aldehyde dehydrogenase X	P30837	1
Epoxide hydrolase 1	P07099	1
Gamma-glutamyltransferase-like protein 4	Q14390	1
Tumor-associated calcium signal transducer 1	P16422	1
Rab GDP dissociation inhibitor alpha	P31150	1
Glypican-3	P51654	1
HLA class I histocompatibility antigen, B-52 alpha chain	P30490	1
Proactivator polypeptide	P07602	1
Keratin, type II cytoskeletal 1	P04264	1
Transferrin receptor protein 1	P02786	1
Cytochrome P450 24A1	Q07973	1
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	O00469	1

Chromatografická frakce 20, proužek A

Mezi identifikovanými proteiny této frakce jsou především proteiny s enzymatickou funkcí (oxidoreduktázy, izomerázy, hydroláza a lyáza). Dále jsou zde proteiny, které se účastní ochrany buňky před oxidativním stresem a toxickým působením volných radikálů, proteiny β -oxidace mastných kyselin a proteiny podílející se na glykolýze. Značka ^{59}Fe se dále vyskytuje u těch bílkovin, které využívají jako kofaktor hem (kataláza). Kataláza je klíčovým enzymem chránícím buňku před oxidativním stresem. Spojitost se železem lze vysledovat u dalších proteinů identifikovaných v těchto komplexech, např. u oxidoreduktáz, které mohou jako vedlejší produkt tvořit toxický peroxid vodíku rozkládaný výše zmíněnou katalázou. Jedná se o proteiny zapojené do metabolických redoxních reakcí a transportu elektronů (acetyl koenzym A oxidáza 1, delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA izomeráza). U některých z identifikovaných proteinů byla zjištěna souvislost s anémiemi (fruktóza-bisfosfát, aldoláza A). Dalšími proteiny této frakce jsou glykoproteiny LAMP1 a LAMP2, u kterých byly nalezeny spojitosti s proteiny, které se uplatňují při transportu železa např. s bílkovinou HFE (viz. kap. 2.2; GROSS *et al.* 1998, ROY *et al.* 1999, DAVIES *et al.* 2003). LAMP proteiny se nacházejí v peroxizomech a zároveň i v lyzozomech, které vznikají z tzv. pozdních endozomů. Endozomy jsou orgány, které hrají významnou roli v nitrobuněčném vezikulárním transportu železa.

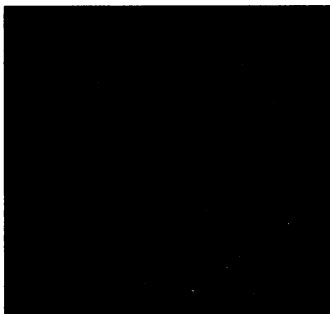
U dalších proteinů, identifikovaných v tomto komplexu, není patrna žádná souvislost se železem. Je však možné, že tyto proteiny interagují a kolokalizují s proteiny a proteinovými komplexy, které byly označeny železem. Také mohou představovat kontaminace proteinových komplexů označených ^{59}Fe jinými, s biochemií železa nesouvisejícími, proteiny.

Catalase, P04040 (18)

Kataláza je homotetramerní protein. Je složena ze čtyř identických podjednotek, které obsahují jako prostetickou skupinu hem.

Obrázek 18: Kataláza.

(<http://www.steve.gb.com/images/molecules/proteins/catalase.jpg>)

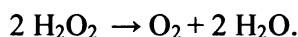


Legenda k obrázku 18:

Tetrapyrolová struktura hemu je na obrázku znázorněna fialovou barvou.

Kataláza se vyskytuje v peroxizomech, cytozolu i v mitochondriích (del RÍO *et al.* 1992).

Hlavní funkcí této oxidoreduktázy je předcházet akumulaci peroxidu vodíku, který je tvořen jako vedlejší produkt různých metabolických drah (je rozvedeno v odstavci o volných radikálech). Katalyzuje rozklad peroxidu vodíku na vodu a molekulární kyslík v reakci:



Volné ionty železa v buňce mění peroxid vodíku na hydroxylové radikály. Tyto radikály atakují DNA a způsobují její mutace, napadají proteiny, sacharidy a lipidy. Buňka se brání nebezpečnému působení kyslíku pomocí enzymů s antioxidačními účinky. Mezi tyto enzymy patří kataláza, superoxid dismutáza a další (více je uvedeno v odstavci o volných radikálech). Každá molekula katalázy dokáže během vteřiny rozložit miliony molekul hydrogen peroxidu. Kataláza, nalezená v této frakci bílkovinných komplexů, pravděpodobně představuje právě takový ochranný mechanismus. Bylo již popsáno, že se kataláza může objevovat mezi proteiny, které se nacházejí v komplexu s transferinovým receptorem na povrchu endozomu (VYORAL a PETRÁK 1998). Více je zmíněno v odstavci o transferinovém receptoru.

Liver carboxylesterase, P23141 (14)

Tento enzym hydrolyzuje aromatické a alifatické estery. Také se podílí se na metabolismu cholesterolu a je zapojena do procesu detoxifikace xenobiotik. Pravděpodobně chrání cholesterol před působením volných radikálů, jejichž vznik může být katalyzován železem. Volné radikály totiž mohou cholesterol oxidovat. Poškozený, oxidovaný, cholesterol se pak stává šířitelem oxidativního poškození, které může vést až k destrukci vlastních tkání. Ve struktuře karboxylesterázy se železo nevyskytuje.

Lanosterol synthase, P48449 (13)

Lanosterol syntáza je enzym - izomeráza. Účastní se biosyntézy steroidů a lipidů, katalyzuje cyklizaci (S)-2,3 oxidoskvalenu na lanosterol. Lanosterol je prvkem biosyntézy cholesterolu. Biosyntéza cholesterolu probíhá ve třech krocích. V prvním kroku dochází ke kondenzaci acetyl-CoA a vytváří se z něj mevalonát, ten v druhém kroku biosyntézy cholesterolu polymerizuje na squalén a z něj pak ve třetím kroku oxygenací, hydrogenací části dvojných vazeb a cyklizací vzniká lanosterol. Lanosterol je poté modifikován na cholesterol.

Cholesterol je součástí buněčných membrán. Jeho hladina v buňce je přísně regulována. Zatím nebylo prokázáno, že by molekula lanosterol syntázy obsahovala železo. Přímá souvislost s metabolismem železa není u tohoto proteinu prokázána. Mohl by se však uplatňovat při biogenezi endozomální membrány nebo by se mohl vyskytovat v komplexu společně s bílkoviny obsahujícími ve své struktuře železo, např. s katalázou.

Acyl-coenzyme A oxidase 1, Q15067 (9)

Acetyl koenzym A oxidáza 1 je enzym - oxidoreduktáza. Je prvním proteinem procesu β -oxidace mastných kyselin. Katalyzuje desaturaci dlouhých řetězců acyl-CoA na 2-trans-enoyl-CoA. Účastní se metabolismu lipidů prostaglandinů, které vznikají biosyntézou z nenasycených mastných kyselin. Oxidativní stres vyvolaný tímto enzymem

může způsobovat peroxidaci lipidů, oxidativní poškození DNA a aktivaci transkripčních faktorů. Tyto změny mohou vést až k vzniku nádorů jater. Kromě těchto poškození působí i inhibičně na ochranný antioxidační systém (O'BRIEN *et al.* 2005).

Acetyl koenzym A oxidáza 1 odebírá elektrony molekulárnímu kyslíku a tím dochází k produkci peroxidu vodíku (H_2O_2), který je rozkládán za přítomnosti enzymu katalázy. V našem komplexu A frakce 20, může tato asociace znamenat, že by se zde acetyl koenzym A oxidáza 1 mohla objevovat ve spojení s katalázou. Může se jednat buď o náhodnou asociaci obou proteinů anebo o existenci velkého komplexu proteinů, ve kterém by mohly acetyl koenzym A oxidáza 1 a kataláza spolupracovat. Acetyl koenzym A oxidáza 1 ve spolupráci s katalázou mohou sloužit jako ochrana před železem katalyzovaným vznikem volných radikálů. Společný výskyt těchto dvou proteinů již byl popsán u myších hepatocytů, kde tyto proteiny spolu působí jako proliferátory peroxizomů. V lidských HepG2 buňkách ale v této souvislosti nebyly nalezeny (AMMERSCHLAEGER *et al.* 2004).

Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase (enoyl-coenzyme A hydratase), Q13011 (8)

Enoyl-CoA hydratáza je homoexamerní protein. Patří do enoyl-Coa hydratázové/izomerázové rodiny. Nachází se v mitochondriích a v peroxizomech. Uplatňuje se v cyklu β -oxidace mastných kyselin, v metabolismu lipidů. Stejně jako ostatní identifikované proteiny participující na metabolismu lipidů, může být tento protein součástí bílkovinného komplexu, který obsahuje metaloproteiny a enzymy chránící buněčné struktury před působením volných radikálů.

Fructose-bisphosphate aldolase A, P04075 (7)

Fruktóza-bisfosfát aldoláza A je homotetramerní protein. Patří do I fruktóza-bisfosfátové aldolázové rodiny. Je to glykolytický enzym (lyáza), který katalyzuje reverzibilní konverzi fruktózy 1,6 bisfosfátu na glyceraldehyd-3-fosfát a dihydroxyaceton fosfát.

Defektní aldolázy způsobují hemolytickou anémii. Tento typ anémií je způsoben defektem anaerobní glykolýzy a tvorby ATP. Deficit ATP vede k dysfunkci iontových pump a následně k hemolýze (YAO *et al.* 2004). Výskyt tohoto enzymu v komplexu metaloproteinů obsahujících Fe v mitochondriích jaterních buněk může znamenat regulační úlohu tohoto enzymu v metabolismu Fe-metaloproteinů, nebo souviset s energetickými nároky a produkcí ATP v tomto procesu. ATP/Fe komplex by mohl náležet k souboru LIP, který by se mohl podílet na transportu železa (viz. legenda k obr. 8).

Endoplasmic bifunctional protein (glukóza-6-fosfátdehydrogenáza, G6PDH), O95479 (5)

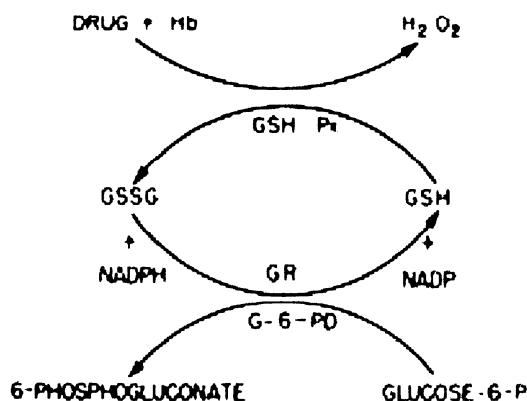
Tento protein je složen z identických podjednotek, které existují jako monomery, dimery a tetramery (COHEN a ROSEMEYER 1969). Asociace těchto podjednotek je závislá na vazbě NADP (KIRKMAN a HENDRICKSON 1962, CHUNG a LANGDON 1963).

G6PDH se vyskytuje ve dvou formách, H a G. G forma se vyskytuje v červených krvinkách (TAN a ASHTON 1976). Obě izoformy se účastní metabolismu sacharidů (pentózového cyklu). H forma vykazuje aktivitu s hexóza-6-fosfáty, především s galaktózou-6-fosfátem, kdežto G forma je specifická pro glukózu-6-fosfát. Při přeměně glukóza-6-fosfátu na 6-fosfoglukonát se vytváří NADPH z NAD(P)^+ , který je hlavním zdrojem NADPH v buňce. NADPH je kofaktorem enzymů účastnících se metabolismu železa (např. NADH differic reductase). Dále se NADH uplatňuje také v dýchacím řetězci v mitochondrii, jehož komponenty jsou mnohé metaloproteiny obsahující železo.

Deficience G6PD vede k hemolytické anémii. G6PD deficientní červené krvinky nejsou schopny chránit své sulfhydrylové skupiny proti oxidativnímu poškození (BEUTLER 2008).

Obrázek 19: Tato série reakcí by mohla vysvětlovat uplatnění defektního enzymu G6PD při poškození membrán červených krvinek oxidativním stresem.

(Obrázek převzat z publikace BEUTLER 2008)



Interakce léků (xenobiotik) s červenými krvinkami vede k produkci hydrogen peroxidu (přímo nebo prostřednictvím ROS). Další reakce, vyžadující neustálou redukci NADP na NADPH, je závislá na aktivitě G6PD reakci a selhává u G6PD deficientních červených krvinek.

Podobnou úlohu by mohl tento enzym hrát v likvidaci peroxidu vznikajícího během přenosu železa z endozomů do mitochondrií jaterních buněk, což by mohlo vysvětlit jeho přítomnost ve zkoumaném proteinovém komplexu proužku A.

Lysosomal-associated membrane protein 1, P11279 (5)

LAMP1 je lyzozomální membránový glykoprotein. Jeho cytoplazmatická doména obsahuje lyzozomální cílovou sekvenci YQTI, která LAMP1 proteinu umožňuje dopravit se z buněčného povrchu k lyzozomům, organelám, které mají vztah k endozomům. V endozomech LAMP1 interaguje s HFE proteinem (DAVIES *et al.* 2003), který během endocytózy interaguje s transferinovým receptorem (TfR) na endozomální membráně (GROSS *et al.* 1998, FEDER *et al.* 1998, ROY *et al.* 1999, DAVIES *et al.* 2003). HFE-LAMP dále interaguje s TfR a tvoří komplex, který posléze putuje k lyzozomům. Oba

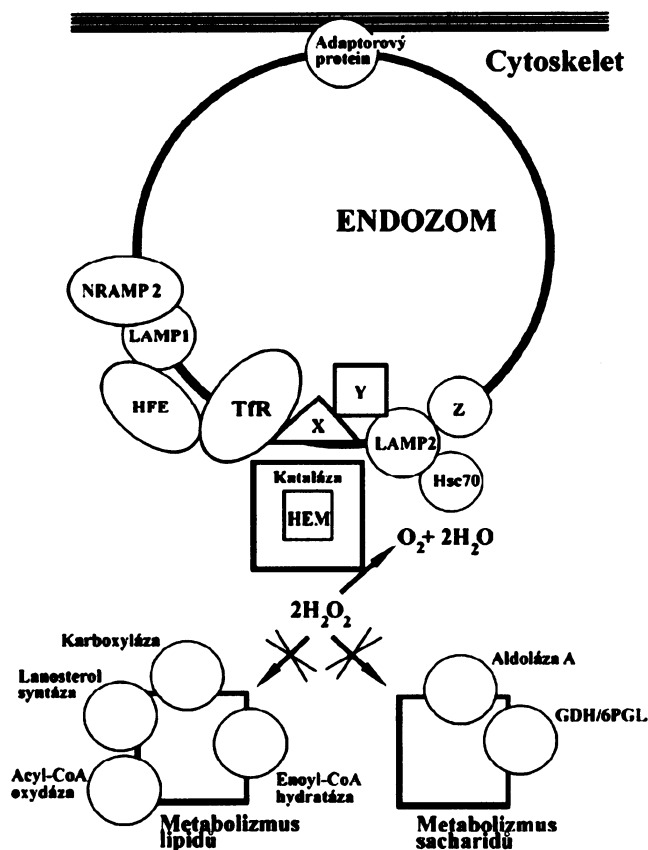
proteiny, LAMP1 i TfR, vstupují do buněk stejnou cestou endocytózy. Může tak docházet ke kompetici obou proteinů o vstup do buňky (WARREN *et al.* 1998). LAMP1 je cílen do lyzozomů, kdežto TfR je recyklován zpět k plazmatické membráně.

Isoform LAMP-2A of Lysosome-associated membrane glycoprotein 2, P13473 (4)

LAMP2 je lyzozomální membránový glykoprotein. Patří do LAMP rodiny. LAMP2 tvoří komplexy s hsc70. Hsc70 je cytoplazmatický chaperonový protein, který se účastní skládání a transportu proteinů do různých částí buňky. Asociace LAMP s proteiny tepelného šoku může napomáhat opravám proteinů poškozených volnými radikály iniciovanými železem.

LAMP proteiny se vyskytují v organelách s velice nízkým pH (pozdních endozomech a v pozdních fagozomech při pH 5,5-6,0 a v lyzozomech a ve fagolyzozomech při pH 4,5-5,5). Oba tyto proteiny jsou zodpovědné za fúzi lyzozomů s fagozomy (HUYNH *et al.* 2007), což může hrát úlohu při regulaci vezikulárního transportu Fe. Nízké pH je nutné pro uvolnění železa z transferinu.

Obrázek 20: Názorné zobrazení analyzovaných proteinů chromatografické frakce 20, proužku A.



Legenda k obrázku 20:

Na obrázku jsou znázorněny proteiny tak, jak by mohly fungovat v komplexech. Je zde vyobrazena souvislost mezi proteiny chránícími biomolekuly před působením volných radikálů, jejichž vznik může být katalyzován železem. NRAMP2 (DMT-1) je přenašečem železa, který se pravděpodobně vyskytuje v proteinových komplexech společně s TfR (Obr. 23, VYORAL a PETRAK 2000, PRIWITZEROVA 2005). Bílkoviny koprecipitované s TfR a označené X, Y a Z jsou dalšími, dosud neidentifikovanými, bílkovinami, které by se mohly podílet na distribuci železa a které by mohly kooperovat s uvedenými proteiny. Mohlo by se jednat o bílkoviny označené X, Y na obrázku 23 a případně další bílkoviny jako jsou proteiny Sec a Steap3 (Obr. 10) a další dosud neznámé bílkoviny.

4.1.2 Identifikované proteiny chromatografické frakce 21, proužku B.

Tabulka 2:

Protein name	SwissProt No.	No. peptides
Transferrin receptor protein 1	P02786	24
Serotransferrin	P02787	13
Integrin alpha-2	P17301	13
Complement C4-A	P0C0L4	13
Glutamate dehydrogenase 2	P49448	12
4F2 cell-surface antigen heavy chain	P08195	10
ATP synthase subunit alpha	P25705	9
Glutamate dehydrogenase 1	P00367	8
60 kDa heat shock protein	P10809	7
Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA	P33908	7
Keratin, type II cytoskeletal 1	P04264	7
Adipocyte plasma membrane-associated protein	Q9HDC9	6
Liver carboxylesterase 1	P23141	6
ATP synthase subunit beta	P06576	5
Keratin, type I cytoskeletal 10	P13645	5
Intercellular adhesion molecule 1	P05362	5
Integrin alpha-1	P56199	5
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1	P13073	4
Vesicular integral-membrane protein VIP36	Q12907	4
ERGIC-53	P49257	4
Serine hydroxymethyltransferase	P34897	4
Basigin	P35613	4
Trifunctional enzyme subunit alpha	P40939	4
Integrin beta-1	P05556	4
Alpha-2-macroglobulin	P01023	4
N-acetyllactosaminide beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase	O43505	3
Neutral amino acid transporter B(0) (ATB(0))	Q15758	3
Translocon-associated protein subunit delta	P51571	2
Cytochrome c oxidase subunit 2	P00403	2
Transmembrane emp24 domain	P49755	2
B-cell receptor-associated protein 31	P51572	2
Minor histocompatibility antigen H13	Q8TCT9	2
Lysosome membrane protein 2	Q14108	2
Large neutral amino acids transporter small subunit 1	Q01650	2
Keratin, type II cytoskeletal 6D	P48667	2
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	P11166	2

Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 1	P22413	2
Transmembrane emp24 domain-containing protein 9	Q9BVK6	1
Actin, alpha skeletal muscle	P68133	1
Secretory carrier-associated membrane protein 2	O15127	1
Actin, cytoplasmic 1	P60709	1
Trifunctional enzyme subunit beta	P55084	1
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2	P50993	1

Chromatografická frakce 21, proužek B

Majoritním proteinem frakce B je transferinový receptor, klíčový protein, který hraje roli ve vstupu železa do buňky. Dalším důležitým metaloproteinem z této frakce je cytochrom c oxidáza, která je součástí dýchacího řetězce v mitochondriích. Je možné, že transport železa z endozomů do mitochondrií je spřažen s komplexy dýchacího řetězce (SHEFTEL *et al.* 2007).

Další souvislost se železem lze vysledovat u integrinu alfa-2, který interaguje s hsp5 (více o proteinech tepelného šoku a jejich souvislosti s volnými radikály je uvedeno u chromatografické frakce 20, proužku C). Dále se v této frakci nacházejí proteiny imunitního systému, které se zároveň vyskytují při buněčném stresu (zánětech) a zprostředkovávají kontakt mezi buňkami (komplementový protein C4-A, intracelulární adhezivní molekula 1, integrin beta, alfa-2-makroglobulin). Alfa-2-makroglobulin může sloužit jako přenašeč hormonu hepcidinu, který ovlivňuje resorpci železa ve střevě. Kromě výše zmiňovaných proteinů se zde vyskytují proteiny, u kterých souvislost s metabolismem železa zatím není zřejmá.

V proužku B bylo nalezeno několik proteinů shodujících se s proteiny v proužcích A a C. Budou uváděny u proužků A a C. Jsou to následující proteiny:

Liver carboxylesterase 1, P23141 (pep.6) (viz. proteiny proužku A)

ATP synthase subunit alpha, P25705 (pep.9) (viz. proteiny proužku C)

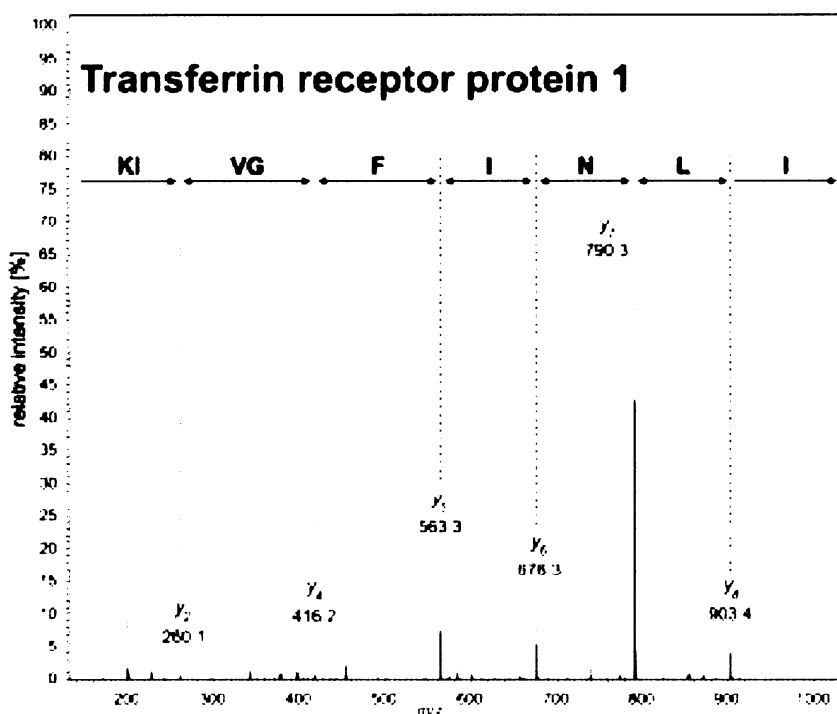
ATP synthase subunit beta, P06576 (pep.5) (viz. proteiny proužku C)

4F2 cell-surface antigen heavy chain, P08195 (pep.10) (viz. proteiny proužku C)

60 kDa heat shock protein, heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin), P10809 (pep.7)
(viz. proteiny proužku C)

Transferrin receptor (TfR), P02786 (24)

Obrázek 21: Ukázkové spektrum identifikovaného proteinu pomocí LC-MS/MS.



Legenda k obrázku 21:

MS-MS spektrum dvakrát nabitého iontu $[M+2H]^{2+} = 508.8$ Da tryptického peptidu $^{386}\text{ILNIFGVIK}^{394}$ z transferinového receptoru. Sekvenci peptidu odpovídá téměř kompletní série C-koncových iontů typu y přítomných ve spektru.

Transferinový receptor a jeho buněčná funkce jsou podrobně popsány v kapitole 2.

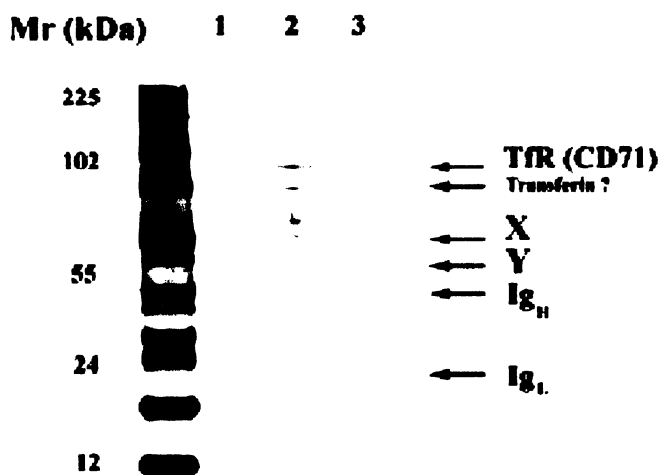
Podle dosavadních názorů mitochondrie neobsahují transferin ani transferinový receptor.

Přesto byl v této práci transferinový receptor při analýze mitochondriálních proteinových komplexů identifikován (Tab. 2). Pro tuto skutečnost jsou další doklady, např. se transferinový receptor objevuje u vysoce purifikovaných mitochondriálních frakcí, dělených na gradientech Percollu a identifikovaných značkami subcelulárních organel, (Babusiak, osobní sdělení, dosud nepublikováno).

Skutečnost, že se transferinový receptor objevil v komplexu proteinů proužku B chromatografické frakce 21, by mohla vysvětlovat hypotéza o kontaktu mitochondrie s endozomem, který obsahuje transferinový receptor ve své membráně (VYORAL a PETRAK 1998, SHEFTEL *et al.* 2007). Tímto kontaktem by se ke vnější mitochondriální membráně mohlo dostávat železo navázané na transferinový receptor. Kontakt endozomu s mitochondrií by pak mohl hrát roli v transportu železa do mitochondrie (Obr. 10). Je možné, že přenos železa z transferinového receptoru na endozomální membráně do mitochondrie je zprostředkován komplexem bílkovin (Obr. 23).

Tato hypotéza nás vedla k experimentu imunoprecipitovat TfR z mitochondriálního lyzátu společně s komplexem proteinů, který by mohl s TfR asociovat (Obr. 23). Přítomnost transferinového receptoru v imunoprecipitátu byla detekována separací na elektroforetickém gelu (Obr. 22) a potvrzena Western blotem. Na elektroforetickém gelu, kde byl imunoprecipitát rozdělen, se objevil proužek, který svou velikostí vypovídá o přítomnosti transferinového receptoru, dále se zde objevil proužek velikostně odpovídající transferinu a nakonec proužky obsahující proteiny, objevené imunoprecipitací společně s transferinovým receptorem (Obr. 22). Může se jednat o proteiny Sec a Steap3 nebo zcela nové, dosud nepopsané bílkoviny, nutné pro přenos železa do mitochondrií. Další analýza těchto proteinů, které mohou reprezentovat nové bílkoviny v transportu železa, bude úkolem naší laboratoře v budoucnu.

Obrázek 22: Elektroforetická analýza imunoprecipitovaných proteinů na polyakrylamidovém gelu.



Legenda k obrázku 22:

1. Kontrola: mitochondriální lyzát inkubovaný s magnetickými kuličkami Dynabeads.

V kontrole není patrna žádná kontaminace ani nespecifická vazba proteinů mitochondriálního lyzátu na magnetické kuličky.

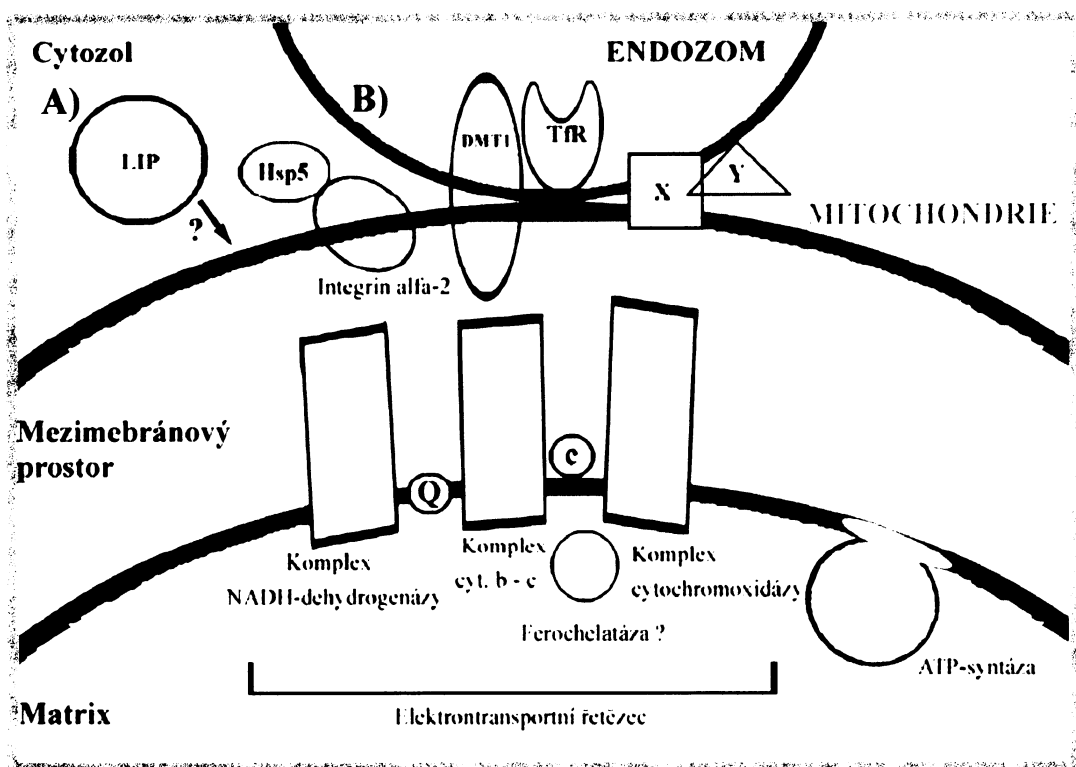
2. Mitochondriální lyzát inkubovaný s magnetickými kuličkami Dynabeads s protilátkou proti TfR

V 2. vzorku můžeme vidět proužek náležící transferinovému receptoru. Pod ním se objevuje proužek, který by mohl být transferinem uvolněným z transferinového receptoru. V dalších proužkách by se mohly objevovat další proteiny související se železem (HFE, reduktázy železa, proteiny tvořící kanály pro železo, proteiny tvořící komplexy s metaloproteiny a hemoproteiny apod.). Tyto zatím neidentifikované proteiny (X, Y) mohou představovat další zajímavé proteiny spojené s transportem železa. Jejich studiem se bude naše laboratoř zabývat v budoucnu.

3. Protilátka proti TfR inkubovaná s magnetickými kuličkami Dynabeads.

V 3. vzorku jsou vidět lehké a těžké řetězce protilátky.

Obrázek 23: Kontakt endozomu a mitochondrie.



Legenda k obrázku 23:

Na obrázku jsou zobrazeny proteiny, které by se mohly účastnit transportu železa do mitochondrie (DMT-1 – viz. kap. 2.4, obrázky 6, 8, 9 a legendy k obrázkům 12 a 20) a další proteiny související se železem (např. enzym ferochelatáza, který je pravděpodobně

spojen s komplexem I dýchacího řetězce a který vestavuje Fe do protoporfyrinu IX. Vestavování Fe do protoporfyrinu IX by mohl ovlivňovat i enzym cytochrom c oxidáza). Dále jsou zde označeny neznámé proteiny X, Y (Obr. 22), mezi které by mohly patřit např. bílkoviny Sec a Steap (viz. legenda k obrázku 9 a 10).

Jsou zde znázorněny dvě cesty vstupu železa do mitochondrie. A) je spoluúčastí LIP (vysvětleno u obrázku 8) a B) by mohl být vstup železa s účastí transferinového receptoru.

Dále je zde zobrazen dýchací řetězec, ve kterém jsou bílkoviny obsahující železo ve své struktuře.

Integrin alpha-2, P17301 (13)

Tento protein se řadí do integrinové alfa řetězcové rodiny. Integriny jsou heterodimerické membránové glykoproteiny složené z alfa a beta řetězce. Nacházejí se v různých buňkách včetně T-buněk, fibroblastů a krevních destiček. Integriny se účastní buněčné adheze a participují také na signálech zprostředkovaných buněčným povrchem. Integrin alfa-2/beta-1 je receptorem pro laminin, kolagen, fibronectin a e-kadherin. Interaguje s proteinem tepelného šoku 5 (souvislost mezi proteiny tepelného šoku a volnými radikály je podrobněji uvedena v odstavci 60 kDa heat shock protein, chromatografické frakce 22, proužku C).

Trifunctional enzyme subunit alpha, P40939 (4)

Tento protein, složený ze čtyř alfa a čtyř beta podjednotek, se nachází v mitochondriích. Tento heterokomplex katalyzuje druhý a třetí krok v mitochondriální β -oxidaci mastných kyselin. Souvislost se železem není dosud známa. Tento enzym by se mohl podílet na opravách mastných kyselin poškozených působením volných radikálů.

Cytochrome c oxidase, P13073 (4)

Cytochrom c oxidáza je mnohopodjednotkový enzymový komplex obsahující železo (Obr. 24).

Umožňuje přenos elektronů z cytochromu c na molekulární kyslík a přispívá k protonovému elektrochemickému potenciálu přes vnitřní mitochondriální membránu. Cytochrom c oxidáza je enzymem mitochondriálního elektrontransportního dýchacího řetězce, komplexu IV (Obr. 23). Obsahuje prostetickou skupinu hemu a, a₃ a dva atomy mědi.

Mezi další proteiny dýchacího řetězce obsahující skupinu hemu patří cytochrom c, který obsahuje prostetickou skupinu hemu c a QH-cytochrom c (oxido)reduktáza obsahující skupinu hemu b₅₆₆, b₅₆₂, c₁ a [FeS] klastr.

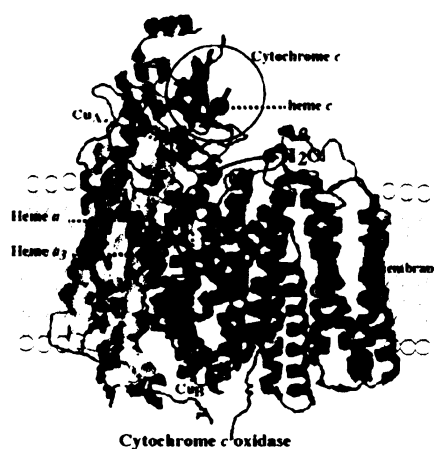
Dýchací řetězec se skládá ze tří enzymových komplexů (Obr. 23). NADH-dehydrogenázový komplex, kterým řetězec začíná, oxiduje NADH a přenáší dva elektrony prostřednictvím nehemového železa se sírou na QH₂-cytochrom c oxidoreduktázu a 2 protony na vnější stranu mitochondriální membrány. Dalším komplexem je komplex cytochromů b – c₁. Cytochrom c₁, bílkovina lokalizovaná na vnější straně vnitřní membrány, přenáší elektrony z QH₂ poslednímu členu enzymového komplexu cytochrom c oxidáze. Akceptorem elektronů odebraných cytochromu c₁ je cytochrom a; odtud jsou přenášeny na cytochrom a₃. Cytochrom a₃ je oxidován molekulovým kyslíkem O₂ tak, že mu předá dva elektrony. Vzniklý O²⁻ vstupuje do interakce s protony přítomnými v matrix mitochondrie za vzniku molekuly H₂O.

Protony nahromaděné na vnější straně vnitřní mitochondriální membrány jsou přenášeny prostřednictvím F₀F₁-ATPázy zpět do mitochondriální matrix. Tohoto transportu se využívá k syntéze ATP, které by mohlo patřit mezi složky LIP (obrázek 8).

Respirační komplexy jsou v mitochondriální membráně vzájemně propojeny. Podle některých představ (TAKETANI *et al.* 1986) je s komplexem I dýchacího řetězce spojen enzym ferochelatáza, který vestavuje Fe do protoporphyrinu IX. Enzym cytochrom c oxidáza by se mohl podílet na přenosu železa přímým kontaktem komplexu I s ferochelatázou a mohl by ovlivňovat vestavování Fe do protoporphyrinu IX.

Obrázek 24: Struktura cytochrom c oxidázy.

(<http://www.bch.msu.edu/faculty/fergusonmiller/joan.jpg>)



Alfa-2-macroglobulin, P01023 (4)

Alfa-2-makroglobulin je homotetramerní protein patřící do rodiny proteázových inhibitorů. Je to sekreční protein syntetizovaný v játrech. Inhibuje mnoho proteáz včetně trypsinu, trombinu a kolagenázy. Podílí se na přenosu mnoha druhů proteinů v plazmě a uvnitř buněk. Váže množství cytokinů a také pravděpodobně hlavní regulátor obratu železa v těle - peptidový hormon hepcidin (PEŠLOVÁ *et al.* 2007).

Serine hydroxymethyltransferase, P34897 (4)

Tento homotetramerní protein se vyskytuje se v mitochondriích. Má transferázovou aktivitu, účastní se metabolismu glycinu a L-serinu. Má katalytickou aktivitu: 5,10-metylenetetrahydrofolát + glycin + H₂O = tetrahydrofolát + l-serin. U tohoto proteinu byla popsána souvislost mezi železem a deregulací buněčných metylací v jaterních buňkách (PETRAK *et al.* 2007).

Glutamate dehydrogenase 1, P00367 (8) a Glutamate dehydrogenase 2, P49448 (12)

Glutamát dehydrogenázy se nacházejí v mitochondriích. Jsou důležité pro recyklaci hlavního excitačního neurotransmiteru, glutamátu, během nervového přenosu. Také se podílí na metabolismu aminokyselin. Souvislost tohoto proteinu se železem není zřejmá.

Complement C4-A, P0C0L4 (13)

Tento protein je součástí aktivační cesty komplementu. Komplement je soubor sérových a membránových proteinů a je humorální složkou nespecifické imunity. Protein je exprimován jako jednoduchý řetězec, který je následně štěpen na trimer alfa, beta a gama podjednotky. Alfa řetězec může být štěpen na C4 anafylatoxin, který je mediátorem místního zánětu, který také může souviset s volnými radikály. Složky komplementu jsou syntetizovány jaterními buňkami a tento protein se pravděpodobně v komplexu proteinů proužku B vyskytl jako kontaminace.

Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA, P33908 (7)

Tento transmembránový protein katalyzuje odstranění manózy z oligosacharidů vázaných na určité druhy glykoproteinů. Souvislost se železem u tohoto proteinu dosud není známa.

Adipocyte plasma membrane-associated protein, Q9HDC9 (6)

Tento membránový protein se vyskytuje v membránách adipocytů, tukových buněk. Adipocyty slouží jako energetická zásobárna, vytvářejí velké vnitřní vakuoly obsahující triacylglyceroly. Ani u tohoto proteinu není dosud známa souvislost se železem. Tento protein by se však mohl podílet na energetické dotaci reakcím spojeným se železem a mohl by mít na ně regulační vliv.

Intercellular adhesion molecule 1, P05362 (5)

ICAM1 (CD54) je membránová molekula patřící do imunoglobulinové superrodiny, do ICAM rodiny. Je exprimována na endoteliálních buňkách a na buňkách imunitního systému. Váže integriny typu CD11a / CD18 nebo CD11b / CD18. ICAM proteiny jsou ligandy pro integrin alpha-l/beta-2. Zprostředkovává kontakt mezi buňkami. Její souvislost se železem nebo volnými radikály dosud není popsána.

Vesicular integral-membrane protein VIP36, Q12907 (4)

Tento protein se nachází v membránách endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu. Hraje roli jako intracelulární lektin v časně sekreční dráze. Interaguje s n-acetyl-d-galactosaminem a vysokomanóзовými typy glykanů. Je zapojený do transportu a třídění glykoproteinů nesoucích vysokomanóзовé typy glykanů. Jako kofaktor váže dva vápenaté ionty na jednu podjednotku. Ani u tohoto proteinu není zřejmá souvislost se železem. Mohl by však hrát roli ve vezikulárním transportu endozomů s TfR.

ERGIC-53, P49257 (4)

Tento protein je lektin (protein, který rozpoznává cukerné části glykoproteinů, glykolipidů a glykosylfosfatidil inositolových kotev). Pravděpodobně se podílí na třídění a recyklování proteinů a lipidů, což může souviset s funkcí endozomů obsahujícími TfR.

Isoform 1 of Basigin, P35613 (4)

Tento protein se nachází v buněčných membránách. Je přítomen ve vaskulárním endoteliu v neneoplastických oblastech mozku a hojně se vyskytuje i na membránách nádorových buněk. Hraje rozhodující roli ve spermatogenezi, implantaci embryí, při formování neurální sítě a v růstu nádorů. Stimuluje fibroblasty ke tvorbě matrixových metaloproteináz a váže cukry. Matrixové metaloproteinázy degradují kolagen, bílkovinu, pro jejíž syntézu je nutné železo. Přímé doklady o souvislosti basiginu se železem nejsou dosud známy.

Isoform Beta-1C of Integrin beta-1, P05556 (4)

Integriny jsou membránové receptory účastníci se adheze a rozpoznávání buněk, embryogeneze, hemostázy, opravy tkání, imunitní odpovědi a metastáze nádorových buněk. Souvislost se železem není známa.

4.1.3 Identifikované proteiny chromatografické frakce 22, proužku C.

Tabulka 3:

Název proteinu	SwissProt No.	Počet peptidů
60 kDa heat shock protein	P10809	20
ATP synthase subunit alpha	P25705	18
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein	P04843	13

glycosyltransferase 67 kDa subunit		
Keratin, type II cytoskeletal 1	P04264	9
NADH-cytochrome b5 reductase 3	P00387	8
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 63 kDa subunit	P04844	6
Protein transport protein Sec23A	Q15436	6
Actin, cytoplasmic 1	P60709	5
Actin, alpha skeletal muscle	P68133	5
4F2 cell-surface antigen heavy chain	P08195	5
Keratin, type I cytoskeletal 9	P35527	5
Liver carboxylesterase 1	P23141	5
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	P11166	5
Hypoxia up-regulated protein 1	Q9Y4L1	5
ATP synthase subunit beta	P06576	4
Keratin, type I cytoskeletal 10	P13645	4
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	P05023	4
Complement C3	P01024	4
Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	P11717	3
Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase	P45954	2
Trifunctional enzyme subunit beta	P55084	2
Trifunctional enzyme subunit alpha	P40939	2
Keratin, type II cytoskeletal 6D	P48667	2
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	P35908	2
Immediate early response 3-interacting protein	Q9Y5U9	1
Hemoglobin subunit beta	P68871	1
ATP synthase B chain	P24539	1
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	P39656	1
Microsomal glutathione S-transferase 2	Q99735	1
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6	P56556	1
Ras-related protein Rab-1A	P62820	1
Ras-related protein Rab-1B	Q9H0U4	1
Vesicle-trafficking protein SEC22b	O75396	1
Ras-related protein Rap-1A	P62834	1
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	P45880	1
Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	P49755	1
Elongation factor 1-alpha 1	P68104	1
Ras-related protein Rab-3B	P20337	1
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	P05026	1
Scavenger receptor class B member 1	Q8WTV0	1
Neutral amino acid transporter B(0) (ATB(0))	Q15758	1
Monocarboxylate transporter 4	O15427	1

Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2	P50993	1
Protein transport protein Sec23B	Q15437	1
Delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase	P54886	1
Protein deltex 3-like protein	Q8TDB6	1
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	P11169	1

Chromatografická frakce 22, proužek C

Ve frakci C bylo identifikováno 15 proteinů se zastoupením vyšším než 3 peptidové fragmenty. Mezi těmito proteiny se objevuje protein patřící do skupiny proteinů tepelného šoku, které se mohou účastnit oprav biomolekul poškozených následkem působení volných radikálů. Dále se zde nachází podjednotky ATP-syntázy, která je přímo spjata s dýchacím řetězcem v mitochondriální membráně. Dalším důležitým identifikovaným proteinem ve spojitosti s železem je NADH-cytochrom b5 reduktáza, která je součástí dýchacího řetězce v mitochondrii. Dále jsou zde identifikovány proteiny buněčného cytoskeletu a proteiny podílející se na vezikulárním transportu (aktin, Sec23A), membránové transportéry (Na/K-ATPáza, GLUT1, 4F2), jaterní karboxyláza nezbytná pro esterifikaci cholesterolu, HUP-1 protein, který by mohl mít vztah k regulaci syntézy hemoglobinu a další proteiny, u kterých není souvislost se železem zřejmá.

60 kDa heat shock protein, (chaperonin), P10809 (20)

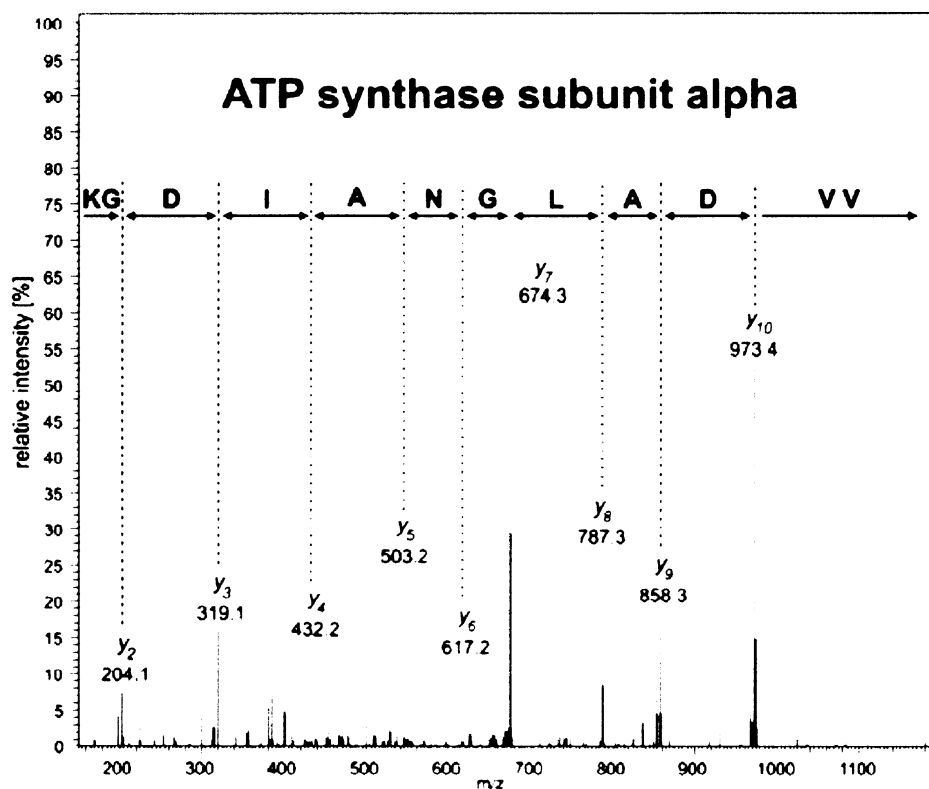
Chaperonin patří mezi proteiny tepelného šoku. Patří do rodiny HSP60. Proteiny tepelného šoku jsou pojmenovány podle jejich molekulární hmotnosti – proto hsp60. Vyskytuje se v mitochondriální matrix, kde se účastní importu proteinů do mitochondrie a podílí se na jejich správném skládání. Proteiny tepelného šoku (HSP) jsou skupinou proteinů, jejichž exprese se zvyšuje pokud jsou buňky vystaveny zvyšujícím se teplotám nebo jinému stresu (infekce, záněty, hladovění, nedostatek vody, hypoxie, působení toxinů – etanol, UV záření apod.). Kontrolují buněčné proteiny, zda jsou správně složeny, pomáhají nově syntetizovaným proteinům k zaujetí správné konformace (slouží jako molekulární chaperony) a podílejí se na odbourávání starých a nefunkčních proteinů.

Pomáhají stabilizovat částečně sbalené proteiny a podílejí se na jejich transportu přes buněčnou membránu (SCHLESINGER 1990).

Proteiny tepelného šoku jsou aktivovány při zvýšeném výskytu poškozených proteinů (tzn. i proteinů poškozených působením volných radikálů, jejichž vznik může být katalyzován železem). Mohly by se vyskytovat v komplexech bílkovin souvisejících se železem.

ATP synthase subunit alpha, P25705 (18); ATP synthase subunit beta, P06576 (4)

Obrázek 25: Ukázkové spektrum proteinu identifikovaného pomocí LC-MS/MS.



Legenda k obrázku 25:

MS-MS spektrum dvakrát nabitého iontu $[M+2H]^{2+} = 586.4$ Da tryptického peptidu $^{150}\text{VVDALGNAIDGK}^{161}$ z proteinu ATP syntáza alfa podjednotka. Téměř kompletní série C-koncových iontů typu y jednoznačně potvrzuje sekvenci peptidu.

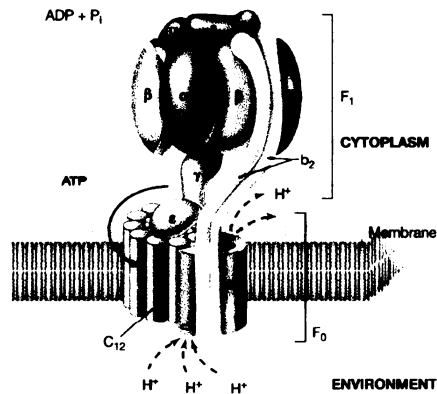
ATP syntáza je multimerický komplex skládající se z 16ti různých polypeptidů. ATP syntáza se řadí do rodiny ATPázových alfa/beta řetězců. ATP syntáza se skládá ze dvou oligomerních komplexů. Komplex F_0 tvoří protonový kanál. Komplex F_1 je periferní a má čtyři podjednotky. Jedna z nich katalyzuje přeměnu $\text{ADP} + \text{P}_i$ na ATP. Využívá při tom, v procesu oxidativní fosforylace, elektrochemického gradientu protonů procházejících přes membrány mitochondrie.

Téměř všechny organické molekuly jsou schopny vázat železo, ale právě ATP by mohl být hlavním z ligandů pro Fe tvořících LIP. V literatuře se objevují diskuze o vztahu mezi ATP a železem (VYORAL a PETRAK 1998).

V jedné z předchozích studií se ukázalo, že by se ATP syntáza vyskytuje také v proteinových komplexech společně s proteiny tepelného šoku, feritinem, peroxiredoxiny a proteiny obsahujícími ve své struktuře hem (BABUSIAK *et al.* 2005). Takové komplexy by teoreticky mohly inaktivovat volné radikály nebo inaktivovat jejich tvorbu.

Obrázek 26: ATP syntáza.

(<http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/images/10atpasa.JPG>)



Na obrázku je znázorněna ATP syntáza tvořící ATP. Ve žlutých čtvercích jsou zobrazeny vodíkové protony procházející přes membránu.

Isoform Long of Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 (Na,K-ATPase (Na⁺),K⁺)-activated ATP phosphohydrolase), P05023 (4)

Tento protein patří do rodiny ATPáz typu P, které transportují kationty. Sodno-draselná ATPáza je membránový protein zodpovědný za ustanovení a udržení elektrochemického gradientu sodných a draselných iontů přes plazmatickou membránu. Jeho katalytická aktivita je: $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} + \text{Na}^+(\text{dovnitř}) + \text{K}^+(\text{ven}) = \text{ADP} + \text{fosfát} + \text{Na}^+(\text{ven}) + \text{K}^+(\text{ven})$.

Tento enzym hraje důležitou roli ve fyziologii buňky, neboť elektrochemický gradient sodných a draselných iontů je nezbytný pro osmoregulaci, spřažený transport sodných iontů s řadou organických a anorganických molekul a také pro elektrickou excitabilitu nervů a svalů.

Byl prokázán vztah mezi NaK ATPázou a transferinově vázaným železem. Je možné, že dochází ke vzájemné regulaci transportu železa, volných radikálů a NaK ATPázy (YIN *et al.* 2003).

Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase 67 kDa subunit (Riboforin I), P04843 (13)

Riboforin I je protein, který se podílí se na vazbě ribozomů. Jeho vztah k železu není dosud jasný. Mohl by se např. podílet na regulaci syntézy globinových řetězců hemoglobinu.

Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase 63 kDa subunit, P04844 (6)

RPN2 je enzym náležící do riboforinové rodiny. Tato transferáza katalyzuje přenos manózových oligosacharidů a lipid-vázaných oligosacharidů na asparaginové zbytky. Vztah tohoto proteinu k železu nebyl dosud popsán.

NADH-cytochrome b5 reductase 3, P00387 (8)

NADH-cytochrom b5 reduktáza se vyskytuje se ve dvou formách: izoforma 1 je membránově vázaná v somatických buňkách (na cytosolické straně membrány endoplazmatického retikula a vnější mitochondriální membráně) a izoforma 2 se ve volné formě nachází v červených krvinkách. Forma vázaná na cytoplazmatické straně endoplazmatického retikula se podílí na desaturaci a prodlužování mastných kyselin a biosyntéze cholesterolu. NADH-cytochrom b5 reduktáza by se také mohla podílet na redoxních reakcích, ke kterým dochází během transportu iontů železa přes membránu.

Protein transport protein Sec23A, Q15436 (6)

SEC23A protein je součástí COPII obalu, který pokrývá váčky derivované z hladkého endoplazmatického retikula. Podílí se na transportu vezikulů z endoplazmatického retikula

do Golgiho aparátu. COPII váčky také napomáhají transportu sekrečních a vakuolárních proteinů a také proteinů plazmatické membrány z endoplazmatického retikula do Golgiho aparátu. Tento protein by mohl být ve vztahu k proteinovému aparátu na endozomu, který by přenášel železo (pomocí transferinového receptoru) k mitochondriální membráně (viz. obr. 10, 20, 23).

Actin (Alpha-actin-1), P68133 (5); Actin (Beta-actin), P60709 (5)

Aktiny tvoří od 10ti do 20ti procent buněčných proteinů. Aktiny se podílí na buněčném transportu. Alfa aktiny jsou hlavními stavebními kameny kontraktálního aparátu. Beta aktin je strukturálním proteinem cytoskeletu, má aktivitu proteinového motoru a váže další proteiny.

Po aktinovém cytoskeletu se také mohou pohybovat endozomy obsahující, mimo jiné, i transferinový receptor (Obr. 20).

4F2 cell-surface antigen heavy chain, P08195 (5)

4F2 antigen je membránový protein, který se podílí na na sodíku nezávislém, vysoce afinitním transportu velkých neutrálních aminokyselin. Je nezbytný pro normální a neoplastický buněčný růst. Má vápníkovo-sodnou antiporterovou aktivitu, podílí se na transportu vápenatých iontů, aminokyselin a také se účastní metabolismu sacharidů. U tohoto proteinu není souvislost se železem zřejmá.

Liver carboxylesterase 1, P23141 (5)

Karboxylesteráza 1 je enzym zodpovědný za hydrolýzu esterů a drog obsahujících amidy (kokain, heroin). Zároveň participuje na hydrolýze dlouhých řetězců mastných kyselin a thioesterů. Tento enzym je také znám tím, že hydrolyzuje aromatické a alifatické estery a je nezbytný pro esterifikaci buněčného cholesterolu.

Cholesterol chrání membrány před poškozením volnými radikály, jejichž vznik může být katalyzován železem. Tato karboxyláza by mohla opravovat poškozený cholesterol (působením volných radikálů), který šíří oxidativní poškození na další molekuly. Patřila by mezi proteiny, které se podílejí na ochraně a opravě proteinů, které byly poškozeny produkty Fentonovy reakce.

Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1 (Glucose transporter type 1, erythrocyte/brain) (GLUT-1) (HepG2 glucose transporter), P11166 (5)

Přenašeče glukózy jsou glykoproteiny integrované v membráně, které přenášejí glukózu do většiny buněk. Glukózový transportér přenáší glukózu pomocí usnadněné difuze i do erytrocytů. Defekty v transportu glukózy vedou ke zkrácení životaschopnosti erytrocytu a rozpad červených krvinek vede k uvolňování hemoglobinu, který obsahuje železo. Při odbourávání hemoglobinu se železo váže na ferritin. Byla nalezena souvislost mezi množstvím železa v těle a metabolismem glukózy. Chelátory železa regulují expresi GLUT-1 a transport glukózy (POTASHNIK *et al.* 1995). Také bylo prokázáno, že transferin a železo způsobují inzulinovou rezistenci transportu glukózy (GREE *et al.* 2006). Jakou souvislost se železem má tento protein není dosud objasněno.

Hypoxia up-regulated protein 1 (HUP-1), Q9Y4L1 (5)

Tento protein patří do rodiny proteinů tepelného šoku 70. Je proteinem, který se objevuje v tkáních jako odpověď na stresové podmínky, pomáhá sbalování proteinů, váže ATP a nesbalené proteiny. Je regulován hypoxií. Hypoxie vzniká při nedostatečném zásobení tkání kyslíkem. Nedostatek kyslíku může být způsoben nedostatkem červených krvinek (anémie), zpomalením cirkulace krve při srdeční nedostatečnosti nebo také vysokým množstvím karboxyhemoglobinu v krvi. Karboxyhemoglobin je forma hemoglobinu, kdy je vazebné místo pro kyslík (tj. dvojmocné železo) obsazeno oxidem uhelnatým. Hemoglobin má 200 až 240x větší afinitu pro oxid uhelnatý než pro kyslík, proto se stoupajícím podílem karboxyhemoglobinu v krvi klesá schopnost hemoglobinu vázat

kyslík. Přítomnost HUP-1 v komplexu C je velmi zajímavý nález. Jeho možná souvislost s regulací syntézy hemu v mitochondriích a transportem železa vyžaduje další studie.

Complement C3, P01024 (4)

Tento protein je součástí komplementu (viz. protein proužku B - Complement C4-A). C3 část komplementu se vyskytuje extracelulárně (v séru) a je syntetizován jaterními buňkami. Aktivace C3 součástí komplementu vede k aktivaci komplementového systému. A to jak cestou klasické aktivace komplementu, tak i cestou alternativní. Souvislost tohoto proteinu se železem nebyla dosud popsána. Je možné, že se tento protein v komplexu proteinů proužku C vyskytl jako kontaminace.

Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 (VDAC2), P45880 (1)

Analýzou proteinových komplexů jsme identifikovali pouze 1 peptid, který přísluší bílkovině VDAC2. Identifikace jednoho peptidu se nepovažuje za dostatečně průkaznou. Proteiny označované jako VDAC nebyly dosud dávány do souvislostí s distribucí železa. Náš zájem o tento protein pramenil z osobního sdělení prof. Dese Richardsona (University of Sydney), který popisuje u bílkoviny VDAC2 reduktázovou aktivitu specifickou pro železo. Další z našich úvah bylo, že VDAC2, protein, který tvoří pór v membráně, by mohl transportovat ionty železa a metabolity spojené s činností volných radikálů, které VDAC2 také transportuje přes mitochondriální membránu.

VDAC protein existuje ve dvou izofórmách: VDAC1 a VDAC2. VDAC se vyskytuje v různých funkčních stavech, které se liší jejich schopností propouštět neelektrolyty a ionty (HODGE a COLOMBINI 1997). Různí se také v selektivě mezi kationty a anionty (COLOMBINI 1989). Jedním z kationtů by mohl být např. Fe^{2+} . Ve stavu, kdy je kanál otevřený, nejvíce propustný, preferuje anionty, především anionty metabolické. VDAC má na stěně kanálu mobilní doménu, která slouží jako napěťový senzor. Tím se řadí mezi napěťově ovládané kanály.

Uvažuje se o existenci supramolekulárního komplexu (póru), který by dosahoval vnitřní i vnější membrány mitochondrie. Předpokládá se, že hlavními složkami tohoto póru by

mohly být VDAC protein ve vnější membráně a transportér adeninových nukleotidů ve vnitřní membráně (VYSSOKIKH a BRDICZKA 2003).

Vědecký zájem o tento protein vzrostl s prokázáním jeho významu při buněčné smrti – apoptóze a jeho důležité roli v regulaci toku metabolitů přes vnější mitochondriální membránu. Do procesu buněčné smrti jsou zapojeny i ROS, jejichž vznik může být katalyzován železem.

Podobně jako u transferinového receptoru, jsme se pokusili imunoprecipitovat VDAC2 společně s komplexem proteinů, který by mohl s VDAC2 asociovat.

Přestože jsme vyzkoušeli dvě komerčně dostupné protilátky, ani u jedné se nám nepodařilo prokázat, že váže protein VDAC2 s dostatečnou afinitou. I přes to, že se imunoprecipitace nezdařila, by bylo zajímavé se o imunoprecipitaci znovu pokusit s jinou protilátkou, případně modifikovat pracovní postup tak, aby vedl k izolaci VDAC2 spolu s dalšími proteiny, se kterými by mohl být v těsné blízkosti a se kterými by mohl kooperovat.

4.2 Metodické přístupy

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na bílkoviny související se železem v těle. Studium železa v živých systémech je kvůli povaze tohoto iontu značně problematické. Jeho fyzikálně-chemické vlastnosti: existence železa ve dvou oxidačních stavech, rychlá oxidace železnatých iontů, téměř nulová rozpustnost trojmocného železa za fyziologických podmínek, tvorba koordinačních komplexů, to vše vyžaduje speciální metody pro analýzu železo vázících molekul. Železo netvoří v biologických systémech kovalentní sloučeniny a proto i sebemenší změna fyziologických podmínek (změna pH, změna redukčního potenciálu) může vést k uvolnění železa z bílkovinného komplexu, který je zkoumán.

Vycházela jsem z biochemických a proteomických metod studia bílkovin. Proteom je soubor všech buněčných i tkáňových bílkovin. Proteomika sleduje strukturu a funkce proteinů, změny proteinů v závislosti na funkčním stavu buňky či tkáně, vnitrobuněčnou lokalizaci proteinů i regulaci jejich funkcí. Studium interakcí proteinů a proteinových komplexů se zabývá podobor proteomiky – komplexomika.

Bílkoviny v buňkách nepůsobí samostatně, ale organizovaně. Téměř všechny bílkoviny fungují v bílkovinných komplexech. Práce s bílkovinnými komplexy vyžaduje podmínky, při kterých nedochází k narušení vazeb mezi jednotlivými proteiny komplexu.

Technologie studia proteinů se neustále vyvíjejí a stávají se více účinnými.

Separace intaktních proteinových komplexů bývají často zahájeny technikami frakcionace buněk, což umožňuje redukovat vstupní komplexitu bílkovin. Ve své práci jsem využívala diferenciální centrifugaci k získání mitochondrií z lyzátu buněk. Úskalím této metody je, že se spolu s mitochondriemi mohou vyizolovat i další buněčné organely, např. endozomy, které jsou v okamžiku centrifugace k mitochondriím přilnuty.

Pro separaci proteinových komplexů z mitochondrií byla využita iontoměničová kapalinová chromatografie pro svou schopnost separace s vysokým rozlišením. Nevýhodou tohoto typu chromatografie je, že v gradientu soli, kde dochází ke zvyšování iontové síly, se mohou části proteinových komplexů rozpadat.

Pro další separaci metaloproteinových komplexů za nedenaturujících podmínek jsem využívala nativní gradientovou elektroforézu na akrylamidovém gelu v přítomnosti detergentu Triton X-100. Výhodou takové modifikace elektroforézy je, že zamezuje agregaci bílkovin, napomáhá stabilizovat jejich nativní strukturu a umožňuje separovat membránové bílkoviny a jejich komplexy.

Gradient polyakrylamidu napomáhá ostrému rozdělení proteinů a proteinových komplexů. Proteiny mají v přítomnosti Tritonu X-100 mnohem menší náboj než při SDS elektroforéze. Tento problém se řeší použitím větších elektrických proudů než při běžné SDS elektroforéze. To ale vede k velkému vývoji tepla a proto je nutné při takovéto elektroforéze gel v průběhu celé separace chladit. Svými schopnostmi však tritonová elektroforéza umožňuje vysoce citlivou separaci bílkovin obsahujících železo, které jsou středem zájmu mé práce.

Alternativní technikou, kterou bylo možno použít k separaci nativních proteinových komplexů, byla modrá nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza (BN-PAGE). Poprvé byla popsána roku 1991 při separaci proteinových komplexů dýchacího řetězce na membránách mitochondrií (SCHAGGER a von JAGOW 1991). Modrá nativní elektroforéza na polyakrylamidovém gelu je zvláštním případem nativní elektroforézy. BN-PAGE je elektroforézou s vysokým rozlišením pro proteinové komplexy izolované

z tkání a z buněčných frakcí (CLAEYS *et al.* 2005). Pomocí tohoto typu elektroforézy lze separovat proteinové komplexy o velikosti v rozmezí od 10 do 10 000 kDa. BN-PAGE umožňuje proteinovým komplexům, aby si zachovaly své enzymatické funkce a nerozpadaly se, jak je tomu v případě denaturujících elektroforéz (JUNG *et al.* 2000). Díky BN-PAGE je možné studovat i interakce mezi proteiny (EUBEL *et al.* 2005). Tato nativní elektroforéza je vhodná i pro proteinové komplexy mitochondriálních membrán (WITTIG *et al.* 2006). Pomocí této metody byly analyzovány komplexy membránových přenašečových proteinů (CARROZZO *et al.* 2006). BN-PAGE využívá navázání Coomassie blue G250 na povrch proteinů, tím proteinům dává negativní náboj a umožňuje jejich migraci. Separace takto „obarvených“ proteinových komplexů odpovídá jejich velikosti a tvaru.

Pro naše studie jsme však tuto techniku nezvolili, neboť, jak víme z předchozích pokusů, modrá nativní elektroforéza je nevhodná pro studium proteinů, které ve své struktuře obsahují hem, protože Coomassie blue G250 je schopná jej z hemoproteinu vytěsnit.

5. SOUHRN

V diplomové práci jsem se soustředila na mitochondriální proteiny, proteinové komplexy a proteinové přenašeče související se železem.

Železo je schopno katalyzovat vznik volných radikálů, které hrají klíčovou roli v patogenezi mnoha chorob. Choroby spojené se vznikem volných radikálů a nedostatkem nebo nadbytkem železa v organismu jsou velmi časté (jednou z nejčastějších autozomálně recesivních nemocí v evropské populaci je dědičná hemochromatóza, dále jsou časté anémie způsobené nedostatkem železa v organismu a přetížení železem následkem mnohočetných transfúzí). Mechanizmy vzniku těchto chorob, vstřebávání železa a role proteinových komplexů v těchto procesech nejsou na molekulární úrovni dosud plně objasněny. Porozumění komplexům metaloproteinů a roli železa v buněčném transportu má didaktický i praktický význam. Identifikace nových bílkovin souvisejících se železem přinese praktické přínosy pro diagnostiku či terapii řady chorob. Na základě nových poznatků o přesném molekulárním mechanismu buněčného transportu železa mohou být proti chorobám způsobeným nerovnováhou železa v organismu nebo poškozením proteinů obsahujících železo v budoucnu vyvinuta nová, účinnější léčiva.

K pokusům jsem si vybrala model jaterních buněk - buněčnou linii HepG2. Hepatocyty skladují velké množství železa ve feritinu a syntetizují důležité proteiny, které mají schopnost vázat železo a ovlivňovat jeho distribuci v organismu. Játra, podobně jako erytroblasty, také syntetizují velké množství hemu v mitochondriích (např. pro cytochrom P450). Mechanismus transportu železa do mitochondrií erytroidních a jaterních buněk by tedy mohl být podobný. Dalším z důvodů, proč jsem si vybrala jaterní linii buněk je skutečnost, že játra jsou často postižena přetížením železem, které hraje roli v patogenezi téměř všech jaterních chorob (pravděpodobně katalýzou vzniku volných radikálů) včetně rakoviny.

Jelikož se játra pokládají za orgán detoxifikující netransferinově vázané železo, byly HepG2 buňky značeny nízkomolekulárním komplexem radioaktivně značeného železa navázaného na citrátové ionty.

K identifikaci proteinů a jejich komplexů jsem v této práci zvolila především nedenedaturující techniky, protože umožňují separaci intaktních proteinových komplexů

a metaloproteinů, aniž by se rozpadaly a vyvázaly by se z nich ionty kovu. Pro separaci metaloproteinů jsem využívala iontoměničové chromatografie, pro její vysoké rozlišení a nativní gradientové elektroforézy na akrylamidovém gelu v přítomnosti detergentu Triton X-100, který napomáhá stabilizovat nativní strukturu bílkovin a umožňuje jejich vysoce účinnou separaci. Použitá technika nedenanaturující dvojrozměrné separace je vhodná i k výzkumu jiných metaloproteinů (obsahujících např. zinek a měď) jejichž porušený metabolismus vede ke vzniku řady chorob.

Proteiny byly určeny na základě peptidových fragmentů hmotnostní analýzou. Mezi identifikovanými proteiny byly proteiny, které mají železo zabudované ve své struktuře, bílkoviny podílející se na zpracování železa v těle (proteiny dýchacího řetězce, přenašeče železa), proteiny vyskytující se při oxidativním stresu buňky (proteiny podílející se na ochraně buňky před toxickým působením volných radikálů; proteiny interagující s proteiny tepelného šoku, které se mohou účastnit oprav bílkovin poškozených volnými radikály) a proteiny vyskytující se u nemocí způsobených nadbytkem či nedostatkem železa v organismu (bílkoviny související s hereditární hemochromatózou a anémiemi). Dále byly identifikovány proteiny, které se vyskytují v komplexech společně s výše jmenovanými typy bílkovin a proteiny interagující s dalšími proteiny, které souvisejí se železem.

Další zkoumání vzájemné asociace proteinů v komplexech označených ^{59}Fe identifikovaných hmotnostní spektrometrií probíhalo pomocí imunoprecipitace, zejména s protilátkami proti transferinovému receptoru a bílkovině VDAC2.

V této diplomové práci byla pomocí proteomické techniky nativní 2D separace a hmotnostní spektrometrie identifikována řada zajímavých bílkovin souvisejících se železem. Ověřování úlohy identifikovaných proteinů souvisejících se železem a podílejících se na ochraně buňky před volnými radikály a identifikace a charakterizace dalších komponent proteinových komplexů souvisejících se železem, jejichž prvotní analýza byla náplní této diplomové práce, bude v naší laboratoři dále pokračovat.

6. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

Abboud, S, Haile, D.J. (2000): A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem.* 275, pp. 19906–12.

Ammerschlaeger, M., Beigel J., Klein, K.-U., and Mueller, S.O. (2004): Characterization of the Species-Specificity of Peroxisome Proliferators in Rat and Human Hepatocytes. *Toxicological Sciences* 78, pp. 229-240.

Andrews, N.C. (1999): The iron transporter dmt1, *Int J Biochem Cell Biol* 31, pp. 991-994.

Babusiak, M., Man, P., Sutak, R., Petrak, J., and Vyoral, D. (2005): Identification of heme binding protein complexes in murine erythroleukemic cells: study by a novel two-dimensional native separation -- liquid chromatography and electrophoresis. *Proteomics*, pp.340-350.

Bali, P.K. and Aisen, P. (1991b): Receptor-modulated iron release from transferrin: Differential effects on N- and C- terminal sites. *Biochemistry*, pp. 9947-9952.

Bali, P.K. and Aisen, P. (1992): Receptor-induced switch in site-site cooperativity during iron release by transferrin., *Biochemistry*, pp. 3963-3967.

Bali, P.K., Zak, O. and Aisen, P. (1991a): A new role for the transferrin receptor in the release of iron from transferrin. *Biochemistry* 30, pp. 324-328.

Basset, P., Quesneau, Y., Zwiller, J. (1986): Iron-induced L1210 cell growth: evidence of a transferrin-independent iron transport. *Cancer Res.* 46, pp 1644–1647.

Beutler, E. (2008): Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective., *Blood*, Vol. 111, pp. 16-24.

Bezwodna, W.R., Bothwell, T.H., Charlton, R.W., Torrance, J.D., MacPhail, A.P., Derman, D.P., and Mayet, F. (1983): The relative dietary importance of haem and non-haem iron. *S Afr Med J* 64, pp. 552-556.

Bothwell, T.H., and Charlton, R.W. (1982): A general approach of the problems of iron deficiency and iron overload in the population at large. *Seminars in Hematology* 19, 54.

Bridle, K.R., Crawford, D.H.G., and Ramm, G.A. (2003): Identification and Characterization of the Hepatic Stellate Cell Transferrin Receptor, *American Journal of Pathology*, Volume 162, Number 5, pp. 1661-1667.

Britton, R.S., Bacon, B.R., Tavill, A.S., Brock, J.H., Halliday, J.W., Pippard, M.J., Powell, L.W. (1994): *Iron Metabolism in Health and Disease*. W.B. Saunders, London, pp. 311 – 351.

Brown, J.P., Hewick, R.M., Hellström, I., Hellström, K.E., Doolittle, R.F., and Dreyer, W.J. (1982): Human melanoma-associated antigen p97 is structurally and functionally related to transferrin. *Nature*. 296, pp. 171–173.

Carrozzo, R., Wittig, I., Santorelli, F.M., Bertini, E., Hofmann, S., Brandt, U., Schägger, H. (2006): Subcomplexes of human ATP synthase mark mitochondrial biosynthesis disorders. *Ann. Neurol.* 59, pp. 265–275.

Chen, H., Attieh, Z.K., Su, T., Syed, B.A., Gao, H., Alaeddine, R.M., Fox, T.C., Usta, J., Naylor, C.E., Evans, R.W., McKie, A.T., Anderson, G.J., and Vulpe C.D. (2004): Hephaestin is a ferroxidase that maintains partial activity in sex-linked anemia mice. *Blood*, Vol. 103, No. 10, pp. 3933-3939.

Cheng, Y., Zak O., Aisen, P., Harrison, S.C., Walz, T. (2005): Single particle reconstruction of the human apo-transferrin-transferrin receptor complex. *J Struct Biol.* 152, pp. 204-210.

Chung, A.E., Langdon, R.G. (1963): Human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase, I: isolation and properties of the enzyme. *J Biol Chem.* 238, pp. 2309-2316.

Claeys, D., Geering, K., Meyer, B.J. (2005): Two-dimensional Blue Native/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis for analysis of multimeric proteins in platelets. *Electrophoresis* 26, pp. 1189-1199.

Cohen P., Rosemeyer, M.A. (1969): Subunit interactions of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Eur J Biochem.* 8, pp. 8-15.

Colombini, M. (1989): Voltage gating in the mitochondrial channel, VDAC. *J. Membr. Biol.* 111, pp. 103–111.

Corsi, B., Levi, S., Cozzi, A., Corti, A., Altimare, D., Albertini, A. and Arosio, P. (1999): Overexpression of the hereditary hemochromatosis protein, HFE, in HeLa cells induces an iron-deficient phenotype. *FEBS Lett.* 460, pp. 149-52.

Crichton, R.R. (1971): Ferritin: structure, synthesis and function. *N Engl J Med.* 284, pp. 1413-22.

Crichton, R.R. (1998): Iron Homeostasis. *Metal Ions in Biological Systems.* Vol. 35, pp. 633-665.

Crichton, R.R., Wilmet, S., Legssyer R., Ward, R.J. (2002): Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, Volume 91, Number 1, pp. 9-18.

Davalos, A., Castillo, J., Marrugat, J., Fernandez-Real, J.M., Armengou, A., Cacabelos, P., and Rama, R. (2000): Body iron stores and early neurologic deterioration in acute cerebral infarction. *Neurology* 54, pp. 1568-1574.

Davies, P.S., Zhang, A-S., Anderson, E.L., Roy, C.N., Lampson, M.A., McGraw, T.E., and Enns, C.A. (2003): Evidence for the interaction of the hereditary haemochromatosis

protein, HFE, with the transferrin receptor in endocytic compartments. *Biochem J.* 373, pp. 145–153.

Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, S., 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. and Zon, L.I. (2000): Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature.* 403, pp. 776-781.

Donovan, A., Roy, C.N., and Andrews, N.C. (2006): The Ins and Outs of Iron Homeostasis. *Physiology*, Vol. 21, No. 2, pp. 115-123.

Dunn, L., Rahmanto, Y., Richardson, D. (2007): Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol.*, pp. 93-100.

Eubel, H., Braun, H.P. and Millar, A.H. (2005): Blue-Native PAGE in Plants: a Tool in Analysis of Protein-Protein Interactions. *BMC Plant Methods*, doi: 10.1186/1746-4811-1-11.

Feder, J.N., Penny, D.M., Irrinki, A., Lee, V. K., Lebron, J.A., Watson, N., Tsuchihashi, Z., Sigal, E., Bjorkman, P.J. and Schatzman, R.C. (1998): The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, pp. 1472-1477.

Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W., Vandenabeele, P. (1999): More than one way to die: apoptosis and necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 18, pp. 7719–30.

Ganz, T. (2003): Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*, Vol. 102, No. 3, pp. 783-788.

Gree A., Basile R., Rumberger J.M. (2006): Transferrin and iron induce insulin resistance of glucose transport in adipocytes. *Metabolism* 55, pp. 1042-1045.

Grootveld, M., Bell, J.D., Halliwell, B., Aruoma, O.I., Bomford, A., Sadler, P.J. (1989): Non-transferrin-bound iron in plasma or serum from patients with idiopathic hemochromatosis. Characterization by high performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem.* 264, pp. 4417–4422.

Gross, C.N., Irrinki, A., Feder, J.N. and Enns, C.A. (1998): Co-trafficking of HFE, a nonclassical major histocompatibility complex class I protein, with the transferrin receptor implies a role in intracellular iron regulation. *J. Biol. Chem.* 273, pp. 22068-22074.

Gunshin H., Starr C.N., DiRenzo C., Fleming M.D., Jin J., Greer E.L., Sellers V.M., Galica S.M., and Andrews N.C. (2005): Cybrd1 (duodenal cytochrome b) is not necessary for dietary iron absorption in mice. *Blood*, Vol. 106, No. 8, pp. 2879-2883.

Haile, D.J., Hentze, M.W., Rouault, T.A., Harford, J.B. and Klausner, R.D. (1989): Regulation of interaction of the iron-responsive element binding protein with iron-responsive RNA elements. *Mol Cell Biol.* 9, pp. 5055-5061.

Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., Andrews, N.C. (2004): Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell.* 117, pp. 285–297.

Hodge, T., and Colombini, M. (1997): Regulation of metabolite flux through voltage-gating of VDAC channels. *J. Membr. Biol.* 157, pp. 271–279.

Huynh, K.K., Eskelinen, E-L., Scot C.C., Malevanets, A., Saftig, P., and Grinstein, S. (2007): LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *The EMBO Journal* 26, pp. 313–324.

Johnson, D.C., Dean, D.R., Smith, A.D., and Johnson, M.K. (2005): Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 74, pp. 247-281.

Jung, C., Higgins, C.M.J., Xu, Z. (2000): Measuring the quantity and activity of mitochondrial electron transport chain complexes in tissues of central nervous system using blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 286, pp. 214–223.

Kaplan, J., Jordan, I., and Sturrock, A. (1991): Regulation of the transferrin-independent iron transport system in cultured cells. *J Biol Chem.* 266, pp. 2997–3004.

Kirkman, H.N., Hendrickson, E.M. (1962): Glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes, II: subactive states of the enzyme from normal persons. *J Biol Chem.* 237, pp. 2371-2376.

Knowles, B.B., Howe, C.C., and Aden, D.P. (1980): Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209, pp. 497-499.

Knutson, M.D. (2007): Steap Proteins: Implications for Iron and Copper Metabolism, *Nutrition Reviews* Volume 65, Number 7, pp. 335-340.

Knutson, M. D., Oukka, M., Koss, L. M., Aydemir, F., and Wessling-Resnick, M. (2005): Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 over-expression and down-regulated by hepcidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, pp. 1324-1328.

Knutson, M.D., Vafa M.R., Haile D. J., Wessling-Resnick M. (2003): Iron loading and erythrophagocytosis increase ferroportin 1 (FPN1) expression in J774 macrophages. *Blood*, Vol. 102, pp. 4191-4197.

Lebron, J.A., Bennett, M.J., Vaughn, D.E., Chirino, A.J., Snow, P.M., Mintier, G.A., Feder, J.N. and Bjorkman, P.J. (1998): Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell* 93, pp. 111-123.

Lebron, J.A., and Bjorkman, P.J. (1999): The transferrin receptor binding site on HFE, the class I MHC-related protein mutated in hereditary hemochromatosis. *J. Mol. Biol.* 289, pp. 1109-1118.

Lebron, J.A., West, A.P., and Bjorkman, P.J. (1999): The hemochromatosis protein HFE competes with transferrin for binding to the transferrin receptor. *J. Mol. Biol.* 294, pp. 239-245.

Lombard, M., Chua, E., and O'Toole, P. (1997): Regulation of intestinal non-haem iron absorption. *Gut.* 40, pp. 435–439.

Lutton, J.D., Levere, R.D., and Abraham, N.G. (1991): Physiologic role of heme and cytochrome P-450 in hematopoietic cells. *Proc Soc Exp Biol Med.* 196, pp. 260–269.

Mazurier, J., Montreuil, J., and Spik, G. (1985): Visualization of lactotransferrin brush-border receptors by ligand-blotting. *Biochim Biophys Acta* 821, pp. 453-460.

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. (2001): An Iron-Regulated Ferric Reductase Associated with the Absorption of Dietary Iron. *Science* 291, pp. 1755-1759.

Nemeth, E., Tuttle, M.S., Powelson, J., Vaughn M. B., Donovan A., McVey Ward D., Ganz T., and Kaplan J. (2004): Hepcidin Regulates Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. *Science*, 306, pp. 2051-2053.

Nicholls, D.G., and Budd, S.L. (2000): Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* 80, pp. 315-360.

O'Brien M.L., Spear, B.T., Glauert, H.P. (2005): Role of oxidative stress in peroxisome proliferator-mediated carcinogenesis. *Crit Rev Toxicol.* 35, pp. 61-88.

Ohgami, R.S., Campagna, D.R., Antiochos, B., Wood, E.B., Sharp, J.J., Barker, J. E., Fleming, M.D. (2005): *nm1054*: a spontaneous, recessive, hypochromic, microcytic anemia mutation in the mouse., *Blood*, Vol. 106, No. 10, pp. 3625-3631.

Ohgami, R.S., Campagna, D.R., McDonald, A., Fleming, M.D. (2006): The Steap proteins

are metalloreductases, *Blood*, Vol. 108, No. 4, pp. 1388-1394.

Peslova, G., Petrak, J., Hrdy I., Sutak, R., Halada, P., Richardson, D., Vyoral, D. (2007): Heparin is bound to alpha-2 macroglobulin in blood plasma. European Iron Club, King's College London.

Petrak, J., Myslivcova, D., Man, P., Cmejla, R., Cmejlova, J., Vyoral, D., Elleder, M., and Vulpe, C.D. (2007): Proteomic analysis of hepatic iron overload in mice suggests dysregulation of urea cycle, impairment of fatty acid oxidation, and changes in the methylation cycle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G1490-G1498.

Pietrangelo, A. (2004): Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease. *N Engl J Med*. 350, pp. 2383-97.

Ponka, P. (1997): Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood*, Vol. 89 No. 1, pp. 1-25.

Ponka, P., Beaumont, and C., Richardson, D.R. (1998): Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol*. 35, pp. 35-54.

Ponka, P., Sheftel, A.D. and Zhang A.-S. (2002): Iron targeting to mitochondria in erythroid cells. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 735-738.

Potashnik, R., Kozlovsky N., Ben-Ezra, S., Rudich, A., Bashan, N. (1995): Regulation of glucose transport and GLUT-1 expression by iron chelators in muscle cells in culture. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 269, E1052-E1058.

Priwitzerova, M., Nie, G., Sheftel, A.D., Pospisilova, D., Divoky, V., Ponka, P. (2005): Functional consequences of the human DMT1 (*SLC11A2*) mutation on protein expression and iron uptake. *Blood*, Vol. 106, No. 12, pp. 3985-3987.

Richardson, D., Professor of Cancer Cell Biology, Pathology, School of Medical Sciences, Bosch Institute, The University of Sydney, Australia.

Richardson, D., and Baker, E. (1992): Two mechanisms of iron uptake from transferrin by melanoma cells. The effect of desferrioxamine and ferric ammonium citrate. *J Biol Chem* 267, pp. 13972–13979.

del Río, L. A., Sandalio, L. M., Palma, J. M., Bueno, P., and Corpas, F. J. (1992): Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications., *Free Radic. Biol. Med.* 13, pp. 557–580.

Riedel, H.D., Muckenthaler, M.U., Gehrke, S.G., Mohr, I., Brennan, K., Herrmann, T., Fitscher, B.A., Hentze, M.W. and Stremmel, W. (1999): HFE downregulates iron uptake from transferrin and induces iron- regulatory protein activity in stably transfected cells. *Blood*, Vol. 94, pp. 3915-3921.

Roy, C.N., Blemmings, K.P., Deck, K.M., Davies, P.S., Anderson, E.L., Eisenstein, R.S. and Enns, C.A. (2002): Increased IRP1 and IRP2 RNA Binding Activity Accompanies a Reduction of the Labile Iron Pool in HFE-Expressing Cells. *J. Cell. Phys.* 190, pp. 208-226.

Roy, C.N., Penny, D.M., Feder, J.N., and Enns, C.A. (1999): The hereditary hemochromatosis protein, HFE, specifically regulates transferrin-mediated iron uptake in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 274, pp. 9022-9028.

Schägger, H., von Jagow, G. (1991): Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199, pp. 223-231.

Sczekan, S.R., and Joshi, J.G. (1987): Isolation and characterization of ferritin from soybeans. *J. Biol. Chem.*, Vol. 262, Issue 28, pp. 13780-13788.

Schlesinger, M.J. (1990): Heat shock proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 265. pp. 12111-12114.

Sheftel, A. D., Zhang, A.-S., Brown, C., Shirihai, O.S., and Ponka, P. (2007): Direct interorganellar transfer of iron from endosome to mitochondrion. *Blood*, Vol. 110, No. 1, pp. 125-132.

Simpson, R.J., Peters, T.J. (1987): Iron-binding lipids of rabbit duodenal brush-border membrane. *Biochim Biophys Acta* 898, pp. 181-186.

Sipe, D.M., and Murphy, R.F. (1991): Binding to cellular receptor results in increased iron release from transferrin at mildly acidic pH. *J. Biol. Chem.* 266, pp. 8002-8007.

Sturrock, A., Alexander, J., Lamb, J., Craven, C.M., and Kaplan, J. (1990): Characterization of a transferrin-independent uptake system for iron in HeLa cells. *J Biol Chem.*, 265, pp. 3139–3145.

Taketani, S., Tanaka-Yoshioka, A., Masaki, R., Tashiro, Y. and Tokunaga, R. (1986): Association of ferroxidase with Complex I in bovine heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 883, pp. 277-283.

Tan, S. G., and Ashton, G. C. (1976): An autosomal glucose-6-phosphate dehydrogenase (hexose-6-phosphate dehydrogenase) polymorphism in human saliva. *Hum. Hered.* 26, pp. 113-123.

Theil, E.C. (1998): The iron responsive element (IRE) family of mRNA regulators. Regulation of iron transport and uptake compared in animals, plants, and microorganisms. *Met Ions Biol Syst.* 35, pp. 403-434.

Theil, E.C. (2004): Iron, ferritin, and nutrition. *Annu Rev Nutr.* 24, pp. 327-343.

Vulpe, C.D., Kuo, Y.M., Murphy, T.L., Cowley L., Askwith C., Libina N., Gitschier, J., and Anderson G.J. (1999): Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nature Genet.* 21, pp. 195–199.

Vyoral, D., Hradilek, A., and Neuwirt, J. (1992): Transferrin and iron distribution in subcellular fractions of K562 cells in the early stages of transferrin endocytosis. *Biochim Biophys Acta.* 1137, pp. 148-154.

Vyoral, D. and Petrak, J. (1998): Iron transport in K562 cells: a kinetic study using native gel electrophoresis and ⁵⁹Fe autoradiography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Molecular Cell Research* Volume 1403, Number 2, pp. 179-188.

Vyoral, D. and Petrak, J. (2000): Transferrin receptor and NRAMP2 protein are present in metalosome multiprotein complex. In XIV. olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí. Univerzita Palackého, Olomouc, 79.

Vyoral, D. and Petrak, J. (2005): Heparin - a direct link between iron metabolism and immunity. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 37, pp.1768-1773.

Vysokikh, M. and Brdiczka, D. (2003): The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. *Acta Biochim Polon*, 50, pp. 389-404.

Warren, R.A., Green, F.A., Stenberg, P.E. and Enns, C.A. (1998): Distinct Saturable Pathways for the Endocytosis of Different Tyrosine Motifs., *J. Biol. Chem.* 273, pp. 17056-17063.

Weinstein, D.A., Roy C.N., Fleming, M.D., Loda, M.F., Wolfsdorf, J.I., and Andrews, N.C. (2002): Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood*, Vol. 100, No. 10, pp. 3776-3781.

Williams, J., Elleman, T.C., Kingston, I.B., Wilkins, A.G., and Kuhn, K.A. (1982): The primary structure of hen ovotransferrin. *Eur J Biochem* 122, pp. 297-303.

Wittig, I., Braun, H.P., and Schägger, H. (2006): Blue-native PAGE. *NATURE Protocols* 1, pp. 418-428.

Yao, D.C., Tolan, D.R., Murray, M.F., Harris, D.J., Darras, B.T., Geva, A., and Neufeld, E. J. (2004): Hemolytic anemia and severe rhabdomyolysis caused by compound

heterozygous mutations of the gene for erythrocyte/muscle isozyme of aldolase, ALDOA (Arg303X/Cys338Tyr), *Blood*, Vol. 103, No. 6, pp. 2401-2403.

Yin, W., Jiang, G., Takeyasu, K., and Zhou, X. (2003): Stimulation of Na,K-ATPase by Low Potassium Is Dependent on Transferrin. *J. Membr Biol.* 193, pp. 177-84.