

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



**Bc. Matěj Běhounek**

**Diplomová práce**

**Buněčná smrt jako důsledek železem indukovaného buněčného poškození**

Cell death as a result of iron-induced cell damage

Školitel: RNDr. Kamila Balušíková, Ph.D

3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze,  
Oddělení buněčné a molekulární biologie

Praha, 2016

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

Podpis

**Poděkování:**

Tímto bych rád poděkoval přátelům a rodině za podporu a velikou trpělivost, zaměstnancům Oddělení buněčné a molekulární biologie 3. LF UK za vytvoření velmi přátelského pracovního prostředí, zejména Simoně Kvisové, Janě Bečvarovské, MUDr. Markétě Dostálíkové, Ph.D., RNDr. Vlastě Němcové, Ph.D. a školitelce RNDr. Kamile Balušíkové, Ph.D. za rady a přátelský přístup. Také děkuji prof. RNDr. Janu Kovářovi, DrSc. za možnost získání odborné praxe. Děkuji.

Práce byla podpořena projekty UNCE 204015 a PRVOUK P31.

## Abstrakt

Železo je esenciální stopový prvek pro většinu známých organismů. Nadbytek železa v buňkách a tkáních však vede k jejich poškození. Nejčastěji dochází k poškození parenchymatických orgánů, jako jsou játra, pankreas či srdce.

Náplní této diplomové práce bylo vytvořit buněčné *in vitro* modely pro zkoumání vlivu nadbytku železa u hepatocytů a pankreatických beta buněk a na těchto modelech zkoumat děje, které při nadbytku železa vedou k buněčnému poškození. Zaměřili jsme se na zkoumání přítomnosti oxidativního stresu a stresu endoplasmatického retikula a aktivaci apoptotické buněčné smrti. K experimentům jsme používali buňky buněčné linie HEP-G2 zastupující lidské hepatocyty a linie NES2Y zastupující lidské pankreatické beta buňky.

Pro studium mechanismů buněčného poškození v důsledku nadbytku železa jsme použili dva přístupy, pomocí nichž jsme sledovali jak akutní, tak dlouhodobý vliv vysokých hladin železa na poškození vybraných buněčných linií. Při studiu akutního vlivu nadbytku železa jsme na buňky aplikovali vysoké dávky železa (za použití 15 mM citrátu železitého v médiu), které vedly k aktivaci buněčné smrti během kultivace buněk v řádu hodin. Dlouhodobý vliv nadbytku železa jsme sledovali u buněk pravidelně kultivovaných v přítomnosti 50  $\mu$ M a 100  $\mu$ M citrátu železitého po dobu několika měsíců. Koncentrace železa v podobě citrátu železitého použité při dlouhodobé kultivaci buněk odpovídaly běžně dosažitelným hodnotám koncentrace železa v plasmě při nadbytku železa u člověka.

Během kultivace buněk při akutních vysokých dávkách železa jsme u obou sledovaných buněčných linií pozorovali aktivaci iniciačních i exekučních kaspáz, doprovázenou signifikantním snížením množství buněk oproti kontrole. Poprvé jsme přitom poukázali na možnou roli kaspázy-2 při reakci buněk na nadbytek železa. Jako možnou příčinu aktivace kaspáz jsme v buňkách detekovali známky probíhajícího oxidativního stresu a stresu endoplasmatického retikula. U dlouhodobě kultivovaných buněk v přítomnosti nadbytku železa jsme již po jednom měsíci kultivace zaznamenali pomalejší růst buněk oproti kontrolním buňkám obou testovaných linií. U těchto buněk jsme pozorovali zvýšenou aktivaci exekučních kaspáz a kaspázy-2 bez výraznějších známek přítomnosti oxidativního stresu a stresu endoplasmatického retikula.

Naše výsledky tak přispívají k poznání molekulárních mechanismů působení nadbytku železa na vybrané buněčné linie. Během kultivace buněk při nadbytku železa jsme pozorovali vyšší hladinu oxidativního stresu, stresu endoplasmatického retikula

a aktivaci apoptotické signalizace. Navíc jsme během krátkodobé i dlouhodobé kultivace při nadbytku železa zaznamenali aktivaci kaspázy-2, jejíž role bude předmětem dalšího zkoumání.

**Klíčová slova:** Nadbytek železa, NES2Y, HEP-G2, apoptóza, oxidativní stres, stres endoplasmatického retikula, kaspáza-2

## Abstract

Iron is an essential trace element for almost all living organisms. Iron overload in cells and tissues, however, leads to their disruption. Most oftenly damaged are parenchymatic organs such as the liver, pancreas and heart.

The aim of this thesis was to create cellular *in vitro* models for the investigation of effects of excess iron on hepatocytes and pancreatic beta cells and on these models to investigate cellular processes which lead to cellular damage during iron overload. We focused on examining the presence of oxidative and endoplasmic reticulum stress and the activation of apoptotic cell death. For our experiments, we used HEP-G2 cell line which represents human hepatocytes and NES2Y cell line which represents human pancreatic beta cells.

To study the mechanisms of cellular damage during iron overload, we used two approaches by which we observed both acute and long-term effects of high levels of iron on damage of the tested cell lines. When studying the acute effect of excess iron on the cells, we applied high doses of iron (using 15 mM ferric citrate in medium) that led to the activation of cell death in hours. Long-term effects of iron overload were tested on cells regularly cultivated in the presence of 50  $\mu$ M and 100  $\mu$ M ferric citrate over a period of several months. Iron concentrations in the form of ferric citrate used during prolonged cultivation of the cells corresponded with normally attainable values of plasma iron concentration during iron overload in humans.

During the cultivation of the cells at high acute doses of iron, we observed activation of initiation and execution caspases in both cell lines, which was accompanied by a significant decrease in the amount of cells relative to controls. Moreover, we have first identified the possible role of caspase-2 in the cell's response to excess iron. As a possible cause of caspase activation, we detected signs of ongoing oxidative and endoplasmic reticulum stress. During long-term cultivation of cells in the presence of excess iron, we have seen slower growth of the cells of both tested lines compared to control cells already after one month of cultivation. In these cells we observed increased activation of execution caspases and caspase-2, with no significant signs of oxidative and endoplasmic reticulum stress.

Our results have contributed to our understanding of the molecular mechanism of effect of iron overload on specific cell lines. During the cultivation of cells in iron

overload, we observed higher levels of oxidative and endoplasmic reticulum stress and the activation of apoptotic signaling. Moreover, we observed the activation of caspase-2 during the short as well as long-term cultivation in iron overload. Its role will be the subject of further investigation.

**Key words:** Iron overload, apoptosis, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, cellular models, caspase-2

## OBSAH

Seznam použitých zkratek.....	11
1 Úvod.....	14
2 Literární přehled.....	16
2.1 Metabolismus železa.....	16
2.1.1 Absorpce organismem.....	16
2.1.1.1 Absorpce hemového železa.....	17
2.1.1.2 Absorpce ne-hemového železa.....	17
2.1.1.3 Skladování železa v buňce.....	18
2.1.1.4 Uvolnění železa do organismu.....	20
2.1.2 Transport železa do buněk v rámci organismu.....	20
2.1.2.1 Transferrinový cyklus.....	20
2.1.2.2 Transport ne-transferrinového železa.....	21
2.2 Regulace homeostáze železa.....	22
2.2.1 Regulace homeostáze železa na úrovni buňky.....	22
2.2.2 Regulace homeostáze železa na úrovni systému.....	24
2.3 Poruchy homeostáze železa.....	25
2.3.1 Poruchy spojené s nedostatkem železa.....	25
2.3.2 Poruchy spojené s nadbytkem železa.....	27
2.4 Nadbytek železa a mechanismus buněčného poškození.....	29
2.4.1 Oxidativní stres.....	29
2.4.2 Stres endoplasmatického retikula.....	31
2.4.2.1 Endoplasmatické retikulum.....	31
2.4.2.2 Stres endoplasmatického retikula.....	32
2.4.2.3 Signální dráhy „Unfolded Protein Response“.....	33
2.5 Buněčná smrt.....	34
2.5.1 Apoptóza.....	35
2.5.1.1 Kaspázy.....	35
2.5.1.2 Vnější dráha indukce apoptózy.....	36
2.5.1.3 Vnitřní dráha indukce apoptózy.....	38
2.5.2 Nekróza.....	39
2.5.3 Autofagie.....	40
2.6 Nadbytek železa, buněčné poškození a buněčná smrt.....	41
3 Materiál a metody.....	45
3.1 Chemikálie.....	45
3.2 Materiál.....	46



3.3	Přístrojové vybavení.....	47
3.4	Komerční sady .....	47
3.5	Software .....	48
3.6	Roztoky a média.....	48
3.7	Buněčné linie.....	51
3.8	Rozmrazování a kultivace buněčných linií .....	52
3.8.1	Rozmrazování buněčných linií.....	52
3.8.2	Kultivace buněčných linií.....	52
3.9	Příprava buněk pro experimenty .....	53
3.9.1	Počítání buněk pomocí Bürkerovy komůrky.....	53
3.9.2	Vysetí buněk pro experimenty .....	54
3.10	Experimenty odpovědi buněk na dávku – „dose response“ .....	54
3.11	Kultivace buněk s nadbytkem železa .....	55
3.11.1	Krátkodobá kultivace buněk s nadbytkem železa .....	55
3.11.2	Dlouhodobá kultivace buněk s nadbytkem železa.....	55
3.11.3	Růstová křivka dlouhodobě kultivovaných buněk s nadbytkem železa .....	55
3.12	Příprava buněčných lyzátů a vzorků pro SDS-PAGE .....	55
3.12.1	Sklízení buněk a tvorba proteinových lyzátů .....	55
3.12.2	Měření koncentrace proteinů metodou BCA.....	56
3.13	SDS-PAGE (SDS-Polyakrylamidová gelová elektroforéza).....	57
3.13.1	Příprava vzorků a provedení SDS-PAGE .....	57
3.14	Western blot .....	58
3.14.1	Provedení western blotu .....	58
3.14.2	Imunodetekce proteinů .....	59
3.15	Průtoková cytometrie .....	59
4	Výsledky .....	62
4.1	Krátkodobá kultivace buněk s vysokými koncentracemi citrátu železitého .....	62
4.1.1	Vliv krátkodobého nadbytku železa na růst a přežívání buněk .....	62
4.1.2	Vliv krátkodobého nadbytku železa na hladiny vybraných proteinů homeostáze železa .....	65
4.1.3	Vliv krátkodobého nadbytku železa na hladiny vybraných proteinů účastnící se odpovědi na oxidativní stres.....	65
4.1.4	Vliv krátkodobého nadbytku železa na hladiny vybraných proteinů účastnících se stresu endoplasmatického retikula.....	65
4.1.5	Vliv krátkodobého nadbytku železa na přítomnost autofagie .....	68
4.1.6	Vliv krátkodobého nadbytku železa na aktivaci apoptózy .....	72

4.1.6.1	Vliv krátkodobého nadbytku železa na aktivaci iniciačních kaspáz .....	72
4.1.6.2	Vliv krátkodobého nadbytku železa na aktivaci exekučních kaspáz.....	72
4.2	Dlouhodobá kultivace buněk s nadbytkem citrátu železitého .....	76
4.2.1	Vliv dlouhodobého nadbytku železa na růst a přežívání buněk .....	76
4.2.2	Vliv dlouhodobého nadbytku železa na hladinu vybraných proteinů homeostáze železa .....	77
4.2.3	Vliv dlouhodobého nadbytku železa na hladiny vybraných proteinů účastnících se odpovědi na oxidativní stres.....	79
4.2.4	Vliv dlouhodobého nadbytku železa na hladiny proteinů účastnících se stresu endoplasmatického retikula.....	82
4.2.5	Vliv dlouhodobého nadbytku železa na aktivitu iniciačních a exekučních kaspáz..	82
5	Diskuze.....	88
5.1	Vytvoření buněčných modelů .....	89
5.1.1	Buněčný model akutního vlivu nadbytku železa.....	89
5.1.2	Buněčný model chronického vlivu nadbytku železa .....	90
5.2	Homeostáze železa při nadbytku citrátu železitého .....	91
5.2.1	Vliv akutních vysokých dávek železa na vybrané proteiny homeostáze železa.....	92
5.2.2	Vliv dlouhodobě zvýšených dávek železa na vybrané proteiny homeostáze železa	93
5.3	Vliv vysokých dávek železa na oxidativní stres, stres endoplasmatického retikula a autofagii.....	94
5.3.1	Vliv akutních vysokých dávek železa na vybrané proteiny reagující na oxidativní stres, stres endoplasmatického retikula a účastnících se autofagie .....	94
5.3.2	Vliv dlouhodobě zvýšených dávek železa na vybrané proteiny reagující na oxidativní stres, stres endoplasmatického retikula a účastnících se autofagie .....	97
5.4	Aktivace kaspáz .....	98
5.4.1	Vliv akutních vysokých dávek železa na aktivaci kaspáz .....	98
5.4.1.1	Aktivace kaspázy-2 během akutního nadbytku železa .....	99
5.4.2	Vliv dlouhodobě zvýšených dávek železa na aktivaci kaspáz .....	100
5.4.2.1	Aktivace kaspázy-2 během dlouhodobého nadbytku železa .....	100
6	Závěr .....	101
7	Literatura .....	103
5.5	Ostatní zdroje: .....	122
5.6	Seznam obrázků, tabulek a grafů: .....	122

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3' UTR	3' untranslated region
5' UTR	5' untranslated region
8-exodG	7,8-dihydro-8-oxo-2' deoxyguanosine
ACD	Anemia of chronic disease
ACO1	Aconitase 1
ADP	Adenosine diphosphate
AIF	Apoptosis inducing factor
ALD	Alcoholic liver disease
APAF-1	Apoptotic protease activating factor 1
ATF4	Activating transcription factor 4
ATF6	Activating transcription factor 6
Atg	Autophagy related
Atg1/ULK	Unc 51 like kinase
ATP	Adenosine triphosphate
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-XL	B-cell lymphoma extra large
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BiP/GRP78	Immunoglobulin binding protein; glucose regulated protein 78
bZIP	Basic leucine zipper domain
CARD	Caspase recruitment domain
c-FLIP	Cellular FLICE inhibitory protein
CHK1	Checkpoint kinase 1
cIAP1	Cellular inhibitor of apoptosis protein 1
cIAP2	Cellular inhibitor of apoptosis protein 2
CREBH	Cyclic AMP response element-binding protein H
DcytB	Duodenal cytochrome B
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DISC komplex	Death inducing signaling complex
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DMT1	Divalent metal transporter 1
DNA	Deoxyribonucleic acid
DR5	Death receptor 5
eALAS	Erythroid aminolevulinate synthase;

EDEM1	ER degradation-enhancing $\alpha$ -mannosidase-like protein 1
eIF2 $\alpha$	Eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$
ER	Endoplasmic reticulum
ERAD	ER associated protein degradation
ERO1-L $\alpha$	ER oxidoreductase 1 L $\alpha$
FADD	Fas-associated protein with death domain
FBS	Fetal bovine serum
FLVCR1	Feline leukemia virus group C receptor
GII	Glucosidase II
GLUD1	Glutamate dehydrogenase 1
GRP94	Glucose regulated protein 94
HCP1	Heme carrier protein 1
HH	Hereditary haemochromatosis
HNE	4-hydroxy-2-nonenal
HO	Heme oxygenase
HO1	Heme oxygenase 1
HO2	Heme oxygenase 2
HSP70	Heat shock protein 70
HSP90	Heat shock protein 90
CHOP	CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein
iCAD	Inhibitor of caspase activated deoxyribonuclease
IDA	Iron deficiency anemia
IL-6	Interleukin 6
IRE	Iron-responsive element
IREB	Iron responsive element binding protein
IRIDA	Iron refractory iron deficiency anemia
IRP	Iron regulatory protein
IRP1	Iron regulatory protein 1
IRP2	Iron regulatory protein 2
JNK	Jun N-termined kinase
LC3B	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 B
LIP	Labile iron pool
MDA	Malondialdehyde
MPT	Mitochondrial permeability transition pore
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mRNA	Messenger ribonucleid acid

NADH	Nicotinamide adenine dinucleotid
NF-κB	Nuclear factor κB
NTBI	Non-transferrin bound iron
Omi/HrtA2	Omi/high temperature requirement protein A2
PDI	Protein disulfid isomerase
PE	Phosphatidylethanolamine
PERK	RNA dependent protein kinase (PKR) like ER kinase
PI3K	Phosphatidylinositol 3 kinase
RIP1	Receptor associated protein kinase 1
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Revolutions per minute
S.E.M.	Standard error of the mean
Smac/DIABLO	Second mitochondria-derived activator of caspases/ direct IAP binding protein with low pI
SOD	Superoxide dismutase
STEAP2	Six transmembrane epithelial antigen of the prostate 2
STEAP3	Six transmembrane epithelial antigen of the prostate 3
tBid	Truncated BID
TfR	Transferrin receptor
TfR1	Transferrin receptor 1
TfR2	Transferrin receptor 1
TGF-β1	Transforming growth factor beta 1
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1
TNF-α	Tumor necrosis factor α
TRADD	TNFR associated death domain
TRAF2	TNF receptor associated protein 2
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand
TRAILR1	TNF related apoptosis inducing ligand receptor 1
UPR	Unfolded protein response
UTR	Untranslated region
Vps34	Vesicular protein sorting 34
WHO	World Health Organization
XBP1	X-box binding protein 1

# 1 ÚVOD

Železo patří mezi nejčastěji se vyskytující prvky zemské kůry. Hraje nezastupitelnou roli během biologických procesů většiny známých organismů. V biologických systémech se železo nejčastěji vyskytuje jako důležitá součást železo-sírných klastrů účastnících se oxidativně redukčních dějů, hemu (cytochromy, hemoglobin, myoglobin) či je vázané ve formě ferritinu, transferrinu, železitých solí organických kyselin aj. Přes svou nenahraditelnost je však zvýšená přítomnost kationtů železa v buňce pro buňky toxická (Andrews, 1999; Gómez *et al.*, 2005).

Dodnes není znám žádný mechanismus, kterým by se lidský organismus aktivně zbavoval nadbytečného železa, proto jsou poruchy příjmu železa spojené s jeho hromaděním v organismu závažným problémem. K hromaděni železa v buňkách a tkáních dochází v důsledku různých patologických stavů, přičemž asi nejznámějším příkladem je akumulace železa u pacientů s hereditární hemochromatózou (Swinkels *et al.*, 2006). Zvyšující se hladina intracelulárního železa vede k tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů, které následně poškozují struktury buňky a tkání (Burkitt and Mason, 1991; Kadiiska *et al.*, 1995). Pokud není nadbytečné ukládání železa včas diagnostikováno, mohou být tyto patologické stavy nevratné. Poškození nadbytkem železa jsou poté asociována s řadou onemocnění, mezi něž patří například diabetes mellitus, fibróza nebo cirhóza jater, kardiomyopatie a selhání srdce, artritida nebo poškození varlat. U pacientů s nadbytkem železa jsou také častěji diagnostikovány různé typy nádorových onemocnění, mezi nimiž převládá hepatocelulární karcinom (Fujita *et al.*, 2009).

S ohlédnutím na fakt, že téměř 10% populace západní civilizace nese mutovanou formu genu *HFE*, která je spojena s možným rozvojem hereditární hemochromatózy (Feder *et al.*, 1996), a rizikový životní styl (vysoký příjem železa v potravě, obezita aj.), je vliv nadbytku železa na buněčné procesy důležitým předmětem výzkumu. Přesto, že ještě není znám přesný mechanismus, kterým nadbytek železa v buňkách a tkáních způsobuje jejich poškození, byla jasně prokázána role železa při tvorbě velmi reaktivních kyslíkových radikálů a následném oxidativním poškození struktur buňky, jako jsou DNA, proteiny či lipidy biomembrán, s následným vlivem na přestavbu tkání *in vivo* (Bartsch and Nair, 2004). Během posledních let byly provedeny experimenty, které poukazují na vliv nadbytku železa na vznik stresu endoplasmatického retikula (Lou *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2014) a které popisují vliv nadbytku železa na aktivaci apoptózy (Miwa *et al.*, 2011; Taoka

*et al.*, 2012; *Li et al.*, 2015). Pro potvrzení úlohy stresu endoplasmatického retikula, apoptózy a případně dalších buněčných procesů se však musí ve výzkumu pokračovat.

V naší laboratoři již dlouhodobě probíhá výzkum metabolismu železa člověka a vlivu nadbytku železa na jeho zdraví (Balušíková *et al.*, 2009; Dostalíková-Čimburová *et al.*, 2012a; Dostalíková-Čimburová *et al.*, 2012b; Dostalíková-Čimburová *et al.*, 2014). Cílem této diplomové práce bylo přispět k poznání molekulárních mechanismů buněčného poškození a následné buněčné smrti v důsledku akumulace železa u *in vivo* modelů lidských hepatocytů (buněčná linie HEP-G2) a pankreatických beta buněk (buněčná linie NES2Y) a přispět tak k vysvětlení dosud nejasné problematiky poškození příslušných orgánů.

Cílem práce bylo:

- [1] Vytvořit buněčné modely pro studium akutního i dlouhodobého působení nadbytku železa u vybraných buněčných linií
- [2] Stanovit vliv krátkodobého a dlouhodobého působení nadbytku železa na expresi vybraných proteinů homeostáze železa u vytvořených buněčných modelů
- [3] Stanovit vliv krátkodobého a dlouhodobého působení nadbytku železa na expresi markerů oxidativního stresu, stresu endoplasmatického retikula a autofagie u vytvořených buněčných modelů
- [4] Stanovit vliv krátkodobého a dlouhodobého působení nadbytku železa na aktivaci iniciačních a exekučních kaspáz u vytvořených buněčných modelů

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Metabolismus železa

Obsah železa se u zdravého dospělého muže obvykle pohybuje v rozmezí mezi 35 až 50 mg iontů železa na kilogram tělesné váhy. U žen je tato hladina nižší v důsledku periodické ztráty krve (Andrews, 1999; Gómez *et al.*, 2005). Ve zdravém těle dospělého člověka je tedy přítomno zhruba 3 – 5 mg železa, přičemž největší část (1800 – 2300 mg) je součástí hemoglobinu červených krvinek. Zbylé železo se nachází v myoglobinu svalů, je součástí enzymů a cytochromů (250 – 350 mg), uloženo v játrech (200 – 1000 mg), makrofázích retikuloendoteliálního systému (500 – 600 mg) či v kostní dřeni (150 – 300 mg). Zhruba 3 mg železa jsou vázané na transferrin (Andrews, 1999; Gómez *et al.*, 2005; Swinkels *et al.*, 2006).

#### 2.1.1 Absorpce organismem

Typická západní strava obsahuje 15 – 20 mg železa (Andrews, 1999, Gómez *et al.*, 2005), které se nachází ve formě organické (hemové železo) především ze živočišných zdrojů (hemoglobin a myoglobin, případně cytochromy) a ve formě anorganické (ne-hemové železo), přijímané především z rostlinné, ale i živočišné stravy (Hallberg, 1981; Andrews *et al.*, 1999). Poměr hemového a ne-hemového železa ve stravě závisí na stravovacích návycích. Obvyklá západní strava obsahuje 10 – 15 % hemového železa a 85 – 90 % železa ne-hemového (Hallberg, 1981). Ze stravou přijatých 15 – 20 mg železa je do organismu absorbováno cca 1 – 2 mg. Tedy množství, které kompenzuje přirozené denní ztráty (Andrews *et al.*, 1999; Gómez *et al.*, 2005).

Ke vstřebávání hemového i ne-hemového železa dochází v duodenu a v proximální části jejunu apikální membránou zralých enterocytů (Muir and Hopfer, 1985; Chowrimootoo *et al.*, 1992). Zatímco střebávání hemového železa je méně závislé na složení potravy, absorpce ne-hemového železa je pozitivně ovlivněna kyselým prostředím žaludku, přítomností vitamínu C, citrátu, přítomností masa a ryb ve stravě. Naopak negativní dopad na vstřebávání železa mají některé rostlinné složky (např. fytáty, oxaláty, proteiny sóji, či taniny obsažené v kávě a čaji) nebo živočišné produkty (vaječný žloutek a bílek, mléko). Kromě toho je vstřebávání sníženo přítomností vápníku a dvojmocných kationtů manganu a zinku (Rhodes *et al.*, 1968; Hallberg, 1981; Rossander-Hultén *et al.*, 1991; Salovaara *et al.*, 2002; Hurrell and Egli, 2010).



### 2.1.1.1 Absorpce hemového železa

Hemové železo je absorbováno snadněji než ne-hemové. Prostřednictvím enterocytů je absorbováno 15 – 35 % hemu přijatého potravou, přičemž hemové železo může tvořit až dvě třetiny celkově přijatého železa (Monsen, 1988; Anderson *et al.*, 2005). K trávení proteinů obsahujících hem dochází pomocí duodenálních enzymů, především trypsinu v přítomnosti kyselého obsahu žaludku. Po štěpení se uvolňuje globin a intaktní molekula hemu (Conrad *et al.*, 1966).

Molekula hemu je do enterocytu přenesena pomocí transportéru HCP1 (heme carrier protein 1) nacházejícím se na apikální membráně enterocytu (obr. 2.1). Kromě hemu však HCP1 transportuje také folát, ke kterému navíc vykazuje vyšší afinitu (Le Blanc *et al.*, 2012). Po přenesení hemu do cytosolu enterocytu je hem oxidován a degradován hem oxygenázou (HO) za uvolnění železnatého kationtu, oxidu uhelnatého a vody (Kikuchi *et al.*, 2005). Proteiny s hem oxygenázovou aktivitou jsou známy dva – hem oxygenáza 1 (HO1) a hem oxygenáza 2 (HO2) (Rotenber and Maines, 1990; Bianchetti *et al.*, 2007). Exprese HO1 je podmíněna přítomností hemu a buněčnými stresy, jako je hypoxie, zánět či oxidativní stres (Ryter *et al.*, 2006). Oproti tomu, HO2 je exprimována konstitutivně (Fraser *et al.*, 2011).

V buňkách nedochází po absorpci hemu pouze k jeho katabolismu, ale také se může intaktní dostávat do plasmy pomocí transportéru FLVCR1 (feline leukemia virus group C receptor) (Quigley *et al.*, 2004; Khan and Quigley, 2013). Po přenesení do plasmy je hem vázán na přenašečové proteiny albumin nebo hemopexin (Seery and Muller-Eberhard, 1973).

### 2.1.1.2 Absorpce ne-hemového železa

Biologická dostupnost ne-hemového železa je nízká, pouze 2 – 20 % (Monsen, 1988), přičemž se v potravě vyskytuje především ve své velmi málo rozpustné, trojmocné podobě (Carpenter and Mahoney, 1992). Trojmocné železo uvolněné z potravy je třeba převést na železo dvojmocné, které je lépe rozpustné. K redukci  $Fe^{3+}$  na  $Fe^{2+}$  dochází v kyselém prostředí žaludku (např. působením vitamínu C) či je zajištěna ferrireduktázami v tenkém střevu (Bergeim and Kirch, 1949; Raja *et al.* 1992; Han *et al.*, 1995).

Příkladem známé ferrireduktázy je protein DcytB (duodenální cytochrom B), jež je součástí bazolaterální membrány enterocytů (obr. 2.1) a ke své funkci vyžaduje kofaktor vitamín C (McKie *et al.*, 2001; Wyman *et al.*, 2008). Je však pravděpodobné, že DcytB

není jedinou ferrireduktázou, která zajišťuje redukci železitého kationtu v duodenu (Gunshin *et al.*, 2005). Potenciální ferrireduktázou fungující při vstřebávání železa je například protein STEAP2 (six transmembrane epithelial antigen of the prostate 2), jehož exprese byla nalezena mimo jiné právě v žaludku a duodenu (Ohgami *et al.*, 2006). Redukce železitého kationtu na železnatý je předpokladem pro transport železa prostřednictvím transportéru dvojmocných iontů DMT1 (divalent metal transporter 1), který má vysokou aktivitu v přítomnosti  $\text{Fe}^{2+}$ , avšak nevykazuje žádnou aktivitu za přítomnosti  $\text{Fe}^{3+}$  (Zhang *et al.*, 2000; Illing *et al.*, 2012). Kromě železnatých iontů přenáší také  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  (Gunshin *et al.*, 1997; Garrick *et al.*, 2006). Transport těchto iontů je zajištěn energií z elektrochemického gradientu protonů (Gunshin *et al.*, 1997; Mackenzie *et al.*, 2006). Dalším potenciálním importérem železa do enterocyty je protein ZIP14 (Liuzzi *et al.*, 2006), který je prozatím znám jako transportér ne-transferrinově vázaného železa (NTBI, non-transferrin bound iron) z plasmy do hepatocytů (kapitola 2.1.2.2)

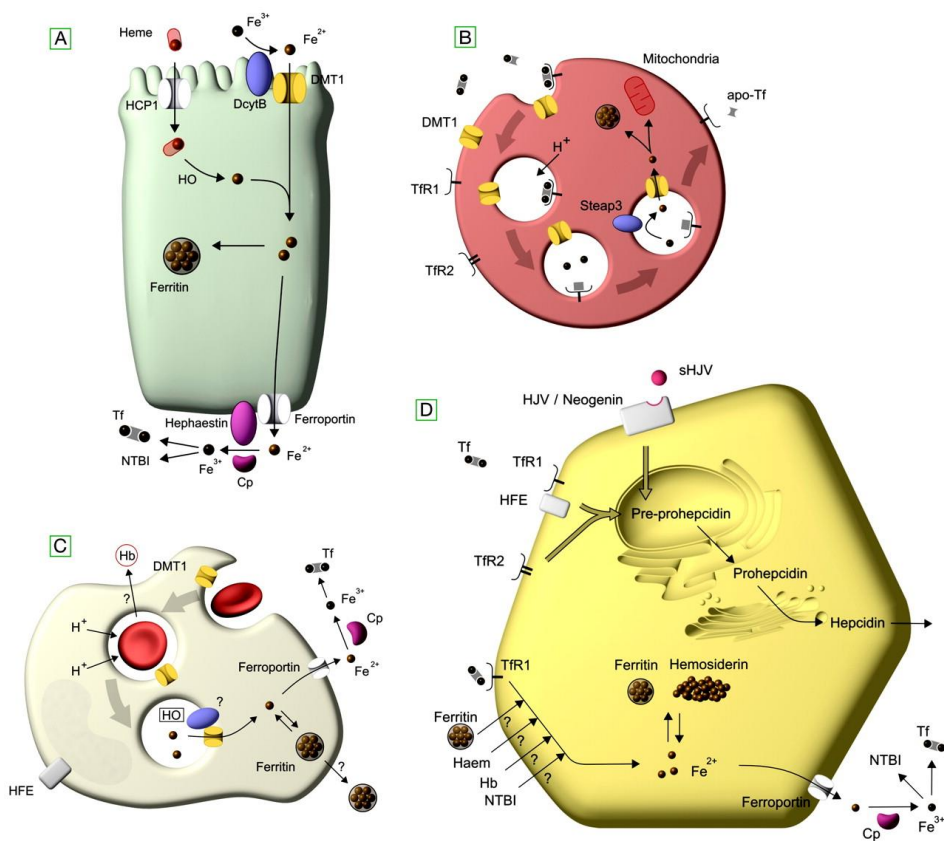
### 2.1.1.3 Skladování železa v buňce

Železnatý kationt se po transportu do cytoplasmy či po uvolnění z hemu stává součástí tzv. LIP (labile iron pool). Takové železo je s malou afinitou vázáno pomocí nízko molekulárních ligandů a je dobře přístupné chelaci. Dle některých autorů se jedná o jeden z mechanismů, který umožňuje pohyb železa v buňce. Zároveň LIP reprezentuje zásobu železa pro jeho další zpracování (uložení do ferritinu, export z buňky, použití na syntézu proteinů obsahujících železo) a to z důvodu, že železo ve formě LIP je snadno přístupné. Jiní autoři naznačují, že LIP je právě ta složka, která je pro buňky toxická a v buňce se objevuje po překročení vazebné kapacity ferritinu (viz níže). Zatím nebyla zcela pochopena chemická podstata ligandů vázajících železo v LIP, ale pravděpodobně se jedná o železo vázané na ADP/ATP, citrát, fosfáty, karboxyláty, polypeptidy nebo povrchy membrán (Weaver and Pollack, 1989; Vyoral *et al.*, 1998; Kakhlon and Cabantchik, 2002; Korantzopoulos *et al.*, 2012; Cabantchik, 2014).

V případě dostatku či nadbytku železa v organismu dochází k jeho skladování pomocí proteinu ferritinu (obr. 2.1). Uskladněním se buňka brání proti toxickému působení volného železa (Bonkovsky, 1991). Ferritin je protein skládající se z 24 podjednotek L (light chain, lehký řetězec) a H (heavy chain, těžký řetězec), jejichž poměr závisí na typu tkáně. Podjednotky L a H společně tvoří strukturu, kde se ukládá až 4500 iontů železa ve

trojmocné podobě ferrihydritových krystalů (Harrison, 1986; Chasteen and Harrison, 1999). Těžký řetězec má ferrioxidázovou aktivitu, lehký řetězec strukturu stabilizuje a pomáhá vyvazovat ionty železa (Bakker and Boyer, 1986; Chasteen and Harrison, 1999). Při vysokém nadbytku železa může docházet k tvorbě obdobné, avšak nerozpustné struktury – hemosiderinu (Ringeling *et al.*, 1989; Saito, 2012).

Ferritin se nevyskytuje pouze uvnitř buněk, ale jisté množství je obsaženo i v plasmě, avšak bez navázaného železa. Přesto hladiny ferritinu v plasmě reflektují množství železa uvnitř organismu (Walters *et al.*, 1973; Lipschitz *et al.*, 1974), ale také přítomnost zánětu či buněčného poškození (Kell and Pretorius, 2014). Pokud není třeba zvýšit příjem železa do organismu, je železo uložené ve ferritinu či hemosiderinu po 2 – 3 dnech vyloučeno z těla jako součást starého enterocyty.



**Obrázek 2.1: Schéma transportu železa u čtyř buněčných typů – enterocyty (A), erytroidní prekursorů (B), makrofágy (C) a hepatocyty (D), (převzato z Swinkels *et al.*, 2006). HCP1 = heme carrier protein 1; apo-Tf = apotransferrin; Cp = ceruloplasmin; DcytB = duodenal cytochrome B; DMT1 = divalent metal transporter 1; Hb = hemoglobin; HJV = hemojuvelin; HO = heme oxygenase; NTBI = non-transferrin bind iron; sHJV = soluble HJV; Steap3 = six transmembrane epithelial antigen of the prostate 3; Tf = transferrin; TfR1 = transferrin receptor 1; TfR2 = transferrin receptor 2**

V případě nedostatku železa v systému či v případě zvýšené potřeby železa v tkáních (regenerace tkání po zranění, zvýšená erythropoéza po krvácení či menstruaci, růst plodu v těhotenství aj.) je volné železo (ve formě LIP) a železo vázané na ferritinu uvolňováno do plasmy, kde je dále distribuováno k místům potřeby. Proces, kterým dochází k uvolnění železa z ferritinové klece zatím nebyl zcela objasněn. Pravděpodobný mechanismus, kterým dochází k uvolnění železa z ferritinu, je rozklad ferritinu v lysozomu za doprovodu makroautofagie (Kidane *et al.*, 2006; Asano *et al.*, 2011).

#### **2.1.1.4 Uvolnění železa do organismu**

Export železnatých kationtů z enterocyty do plasmy je zajištěn pomocí transportéru ferroportinu 1 (obr. 2.1), který je lokalizován na bazolaterální membráně enterocyty. Ferroportin je dosud jediný známý exportér iontů železa a kromě enterocytů je také hojně exprimován v hepatocytech, makrofázích sleziny a jater (Kupfferovi buňky), monocytech, ledvinách, plicích, vyvíjejícím se nervovém systému a srdci (Abboud and Haile, 2000; Donovan *et al.*, 2000; McKie *et al.*, 2000; Lakhal-Littleton *et al.*, 2015). Stejně jako v enterocytech, i v ostatních buněčných typech slouží k exportu železa z buněk do krevního řečiště a to při zvýšené potřebě železa v organismu (např. z jaterních buněk) (Abboud and Haile, 2000), při recyklaci železa po rozkladu erytrocytů (v makrofázích a Kupfferových buňkách) (Knutson and Wessling-Resnick, 2003b) a v případě homeostáze železa a ochraně před toxickými vlivy železa u ostatních typů buněk, jako jsou buňky ledvin, mozku a srdce (Lakhal-Littleton *et al.*, 2015). Transport železa prostřednictvím ferroportinu probíhá u enterocytů za přítomnosti ferrioxidázy hefestin, se kterou je kolokalizován na bazolaterální membráně (Han and Kim, 2007). Hefestin přispívá k usnadnění transportu železa ferroportinem pravděpodobně udržováním gradientu  $\text{Fe}^{2+}$  jeho oxidací na  $\text{Fe}^{3+}$  (Kuo *et al.*, 2004).

### **2.1.2 Transport železa do buněk v rámci organismu**

#### **2.1.2.1 Transferrinový cyklus**

Po transportu železnatého kationtu z enterocyty a jeho oxidaci může být trojmocné železo vázáno na sérový transferrin. Transferrin je transportní protein obsahující dvě vysoko-afinní vazebná místa pro železo (při pH 7,4). Může přitom vázat dva atomy  $\text{Fe}^{3+}$  (diferric, holotransferrin), jeden atom  $\text{Fe}^{3+}$  (monoferric) nebo být bez vazby  $\text{Fe}^{3+}$  (apotransferrin) (Williams and Moreton, 1980). Transferrin v plasmě je u zdravého jedince

saturován cca ze 35 %. Za podmínek nadbytku železa však dochází i ke 100% saturaci (Cazzola *et al.*, 1985). Míra saturace transferrinu, společně s hladinou sérového ferritinu, se používá jako diagnostický marker nedostatku či nadbytku železa v organismu. Vazebné místo blíže N-konci molekuly transferrinu má nižší afinitu k železitému iontu a je přístupné k vazbě i jiných iontů kovů (Vincent and Love, 2012; Senthilnathan *et al.*, 2014).

Transferrin s navázaným železem je rozpoznán transferrinovým receptorem (TfR) na povrchu buněk (obr. 2.1). Vazba transferrinu a vznik komplexu TfR-transferrin vyvolává internalizaci komplexu pomocí receptorem zprostředkované endocytózy (Harding *et al.*, 1983). Ve vzniklém endozomu dochází ke snižování pH a při hodnotě pH 5 – 5,5 dochází ke značnému snížení afinity vazebných míst transferrinu k železitému kationtu, který je poté uvolněn do lumen endozomu (Dautry-Varsat *et al.*, 1983). Volné železo je redukováno ferrireduktázou STEAP3 (six transmembrane epithelial antigen of the prostate 3) (Ohgami *et al.*, 2005) a exportováno do cytoplasmy pomocí transportéru DMT1 (Gunshin *et al.*, 1997; Fleming *et al.*, 1998). Transferrinový receptor s apotransferrinem se vrací na povrch cytoplasmatické membrány, kde se komplex TfR-transferrin opět ocitá v prostředí s pH 7,4 a dochází k disociaci apotransferrinu (Dautry-Varsat *et al.*, 1983; Harding *et al.*, 1983).

Transferrinové receptory jsou známy dva – transferrinový receptor 1 (TfR1) a transferrinový receptor 2 (TfR2). Ačkoli jsou TfR1 a TfR2 vysoce homologní (Kawabata *et al.*, 1999), jejich primární funkce a vlastnosti se liší. Transportu železa se primárně účastní TfR1, přičemž jeho afinita k transferrinu je až 30 krát vyšší než u TfR2 (Kawabata *et al.*, 2000). Na rozdíl od TfR1, který je exprimován téměř ve všech buněčných typech, je TfR2 exprimován výhradně v jaterních buňkách a erytroidních prekurzorech (Gatter *et al.*, 1983; Calzolari *et al.*, 2004) a účastní se především regulace homeostáze železa (Deaglio *et al.*, 2002; Calzolari *et al.*, 2004).

### **2.1.2.2 Transport ne-transferrinového železa**

Železo v plasmě se může vyskytovat i v podobě tzv. ne-transferrinově vázaného železa (NTBI, non transferrin bound iron). U zdravého jedince se ne-transferrinově vázané železo vyskytuje pouze minoritně, ovšem u jedinců s nadbytkem železa se takto vázané železo stává podstatnou součástí plasmy se značně toxickými účinky. NTBI se v plasmě objevuje především poté, co saturace transferrinu v krvi dosáhne hodnoty 100 % (Breuer *et al.*, 2000). Z chemického hlediska se pravděpodobně jedná o molekuly acetátu, citrátu,

případně albuminu, které vážou železitý kationt (Breuer *et al.*, 2000), přičemž přesná chemická podstata NTBI zatím nebyla stanovena (Brissot *et al.*, 2012). NTBI vstupuje především do buněk jater, mozku, pankreatu a srdce, které jsou při nadbytku železa nejvíce postiženy. Ke vstupu NTBI do buněk dochází nejčastěji prostřednictvím transportérů DMT1 a ZIP14 (Liuzzi *et al.*, 2006; Nam *et al.*, 2013). V případě srdečních buněk dochází k importu NTBI s velkou pravděpodobností i za pomoci vápenatých kanálů typu L a T (Oudit *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2014). Nicméně je pravděpodobné, že kromě zmíněných importérů se transportu NTBI do buněk účastní i další dosud nepopsané transportní mechanismy (Wang and Knutson, 2013).

Nadbytečné NTBI je uloženo v makrofázích retikuloendoteliálního systému (recyklace erytrocytů) a především v játrech (hlavní zásobní orgán železa) (Andrews, 1999). Železo je zde uchováno stejně jako v případě enterocytů ve ferritinové kleci. Stejně jako u enterocytů dochází k exportu železa z ne-enterocytárních buněk prostřednictvím ferroportinu, ovšem v tomto případě je s ferroportinem asociována ferrioxidáza ceruloplasmin (Attieh *et al.*, 1999).

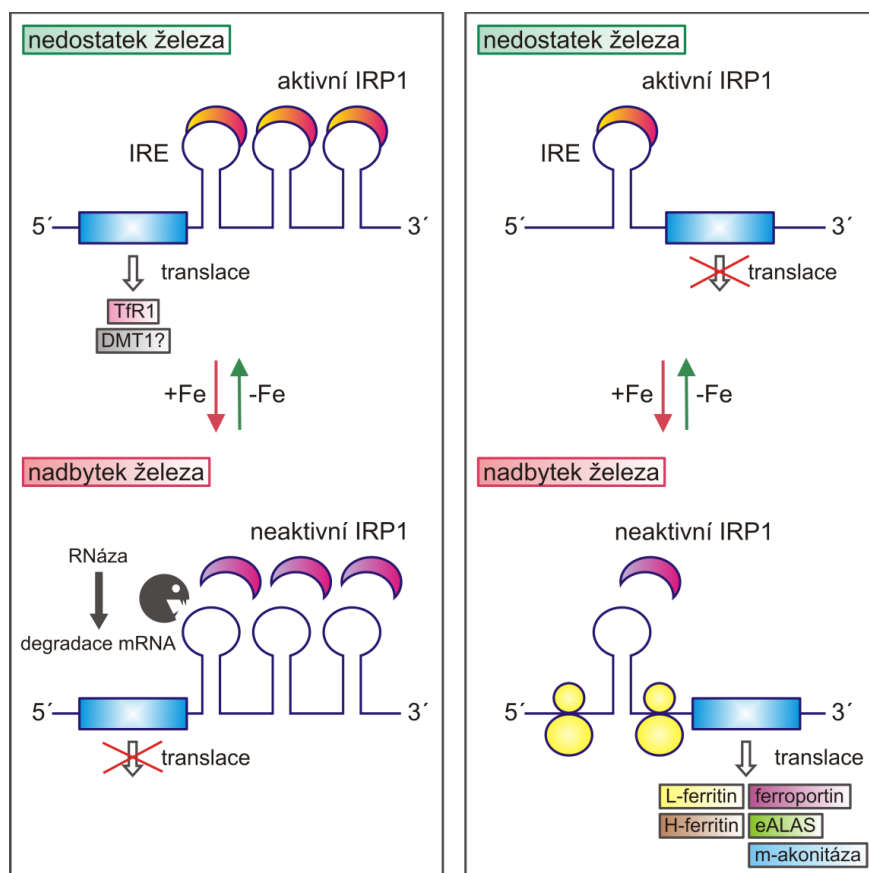
## **2.2 Regulace homeostáze železa**

Doposud není znám žádný způsob, jakým by organismus aktivně vylučoval železo. Z toho důvodu je velmi přísně regulována absorpce železa do organismu tak, aby v organismu nedocházelo k nedostatku či toxickému nadbytku železa. Regulace příjmu železa do organismu a regulace hladin železa v tkáních je zajišťována na dvou úrovních – na úrovni vnitrobuněčné a na úrovni systémové. Obě úrovně regulace se vzájemně doplňují a ovlivňují.

### **2.2.1 Regulace homeostáze železa na úrovni buňky**

Uvnitř buněk se vyvinul mechanismus reagující na intracelulární hladinu železa, tzv. IRP (iron regulatory protein) / IRE (iron responsive element) regulační systém. Pomocí tohoto mechanismu dochází ke zvýšení exprese proteinů pro import železa při nízkých intracelulárních hladinách železa a naopak ke snížení hladiny proteinů zodpovědných za export a ukládání železa (Rouault, 2006). IRP/IRE systém nalezneme ve všech tkáních, ovšem díky unikátní funkci enterocytů má v tomto buněčném typu IRP/IRE systém dopad nejen na hladinu železa uvnitř buněk, ale i na celkový příjem železa ze

stravy do organismu (Casey *et al.*, 1988). Základním principem tohoto systému je interakce mezi IRP proteiny a IRE sekvencemi na mRNA (obr. 2.2).



**Obrázek 2.2: Schéma regulace homeostáze železa pomocí IRP/IRE regulačního systému** (převzato z Horák *et al.*, 2010). *DMT1* = divalent metal transporter 1; *eALAS* = erythroid aminolevulinat synthase; *IRE* = iron responsive element; *IRP1* = iron regulatory protein 1; *TfR1* = transferrin receptor 1

IRE sekvence jsou vysoce konzervované vlásenkové struktury nacházející se na nepřekládaných oblastech mRNA (UTR, untranslated region) některých proteinů. IRE se mohou vyskytovat jak ve 3' UTR, tak ve 5' UTR (Horák *et al.*, 2010). IRP proteiny jsou schopny rozpoznávat tyto struktury a na základě vazby na 3' UTR pak molekulu mRNA stabilizovat, bránit před působením RNáz a podporovat tak syntézu příslušného proteinu. Naopak, pomocí vazby na 5' UTR mohou IRP regulační molekuly syntézu proteinu inhibovat (Casey *et al.*, 1988; Piccinelli and Samuelsson, 2007). Při nedostatku železa tak dochází k podpoření translace proteinů, které zajišťují import železa (*DMT1*, *TfR1*) a naopak se snižuje translace železo vázajících a železo exportujících proteinů (*eALAS*, *L* i *H* ferritin, *ferroportin*, mitochondriální *akonitáza*) (Rouault, 2006). Byla ovšem nalezena

i forma molekuly DMT1 bez IRE sekvence a existují i jiné transportéry železa, které sekvence IRE nemají (Liuzzi *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2014) a tak tento systém není při ochraně buňky před nadbytkem železa zcela efektivní.

IRP proteiny jsou známy dva – IRP1 (ACO1, aconitase 1) a IRP2 (IREB, iron responsive element binding protein). IRP1 má při dostatku železa akonitázovou aktivitu a nedochází k jeho vazbě na IRE. Při nedostatku železa je akonitázová aktivita potlačena z důvodu nedostatku železa pro formaci 4Fe-4S klastru v IRP1 proteinu. IRP1 bez akonitázové aktivity vykazuje vysokou afinitu k IRE sekvencím. IRP2 je naproti tomu při normálních hladinách železa v buňce oxidován, ubiquitinilován a následně degradován (Hentze and Kühn, 1996; Rouault, 2006).

### **2.2.2 Regulace homeostáze železa na úrovni systému**

Před objevem hlavního regulátoru hladiny železa v těle byl navrhnout regulační mechanismus založený na programování enterocytů během jejich zrání hladinou sérového železa. Teorie programování enterocytů během vývoje předpokládá, že enterocyty během zrání čerpají železo z plasmu pomocí TfR a na základě přijatého množství železa exprimují importéry iontů železa na apikální membráně. Je-li v plasmě železa dostatek, zralé enterocyty poté téměř neabsorbují železo z lumen tenkého střeva a naopak (Conrad *et al.*, 1964). Ovšem pokud by tato teorie byla jediná správná, změna absorpce železa by nastala až za 2 – 3 dny po stimulu. Po objevení regulačního hormonu hepcidinu se objasnilo, jak je možné, že ke změně absorpce dochází v řádu hodin a ne dnů (Frazer *et al.*, 2004). Hepcidin je tedy klíčovou molekulou v regulaci homeostáze železa v biologickém systému (Nemeth *et al.*, 2004).

Maturovaný hepcidin je peptidický hormon tvořený 25 aminokyselinami, méně často 20 či 22 aminokyselinami (Park *et al.*, 2001), ovšem tyto kratší formy mají jen velmi omezenou schopnost regulace (Nemeth *et al.*, 2006). Původně byl hepcidin objeven v moči a plasmě jako peptid s antimikrobiálními a fungicidními účinky, exprimovaný především v jaterní tkáni (Krause *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001). Jeho vyšší exprese byla zároveň zaznamenána u myši vykazujících známky přetížení železem (Pigeon *et al.*, 2001). Následně byla ukázána spojitost mezi hepcidinem a regulací homeostáze železa (Nicolas *et al.*, 2002a).

Hepcidin působí jako negativní regulátor transportu železa přes plasmatickou membránu. V krvi se váže na jediný známý exportér železa ferroportin 1 (Nemeth *et al.*,



2004; Ramey *et al.*, 2010). Tato vazba vede k fosforylaci ferroportinu, internalizaci komplexu ferroportin-hepcidin a následné degradaci ferroportinu uvnitř buňky (Ross *et al.*, 2012). Ze všech buněčných typů je ferroportin nejvíce exprimován především v enterocytech, hepatocytech a makrofázích. Vlivem hepcidinu tedy dochází především ke snížení recyklace železa makrofágy, uvolňování zásob železa z hepatocytů a vypouštění železa přes bazolaterální membránu enterocytů do organismu.

Hepcidin produkovaný mimo játra má pravděpodobně pouze autokrinní/parakrinní efekt. Role lokální exprese hepcidinu zůstává zatím nepochopena a je pravděpodobné, že má cytoprotektivní funkci před toxickými účinky intracelulárního železa (Collins *et al.*, 2008). Kromě exprese v jaterní tkáni byla nízká míra exprese hepcidinu zjištěna také v srdci a míše (Krause *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001), monocytech a makrofázích (Theurl *et al.*, 2008), ledvinách, (Kulaksiz *et al.*, 2005), adipocytech (Bekri *et al.*, 2006), pankreatických beta buňkách (Kulaksiz *et al.*, 2008) a mozkové tkáni (Raha-Chowdhury *et al.*, 2015). Exprese hepcidinu je pozitivně i negativně regulována různými podněty. Mezi pozitivní stimuly patří například vysoká hladina železa v séru (Pigeon *et al.*, 2001), působící pravděpodobně přes TfR2 (Rishi *et al.*, 2015). Negativními regulátory jsou například anemie, hypoxie, zánět nebo erytropoéza (Nicolas *et al.* 2002b; Pak *et al.*, 2006).

## **2.3 Poruchy homeostáze železa**

Poruchy homeostáze železa vedou k patologickým stavům, při kterých na jedné straně dochází k nedostatku železa a na straně druhé k jeho nadbytku. Deficit železa je například příčinou sideropenické anemie nebo hraje roli u selhání srdce (Silverberg *et al.*, 2004). Naproti tomu nadbytek železa v organismu je spjat s nadměrným ukládáním železa v buňkách a tkáních, které jsou nadbytkem železa následně poškozeny (kapitola 2.4), jako je tomu například u onemocnění hereditární hemochromatózou (Swinkels *et al.*, 2006).

### **2.3.1 Poruchy spojené s nedostatkem železa**

K nedostatku železa v těle dochází ve chvíli, kdy hladina metabolicky dostupného železa klesne na úroveň, při které není schopné pokrýt fyziologické nároky organismu.

Dle WHO (World Health Organization) je deficit železa nejběžnější a nejrozšířenější nutriční poruchou na světě. Hlavními příčinami nedostatku železa jsou především nedostatečný příjem potravinou (malnutrice, nevyvážená rostlinná dieta) a nadměrné ztráty (především ztráta krve), ve vzácnějších případech mutace genů účastnících se homeostáze

železa (Zimmermann and Hurrell, 2007; Bermejo and García-López, 2009). Mezi nejčastější projevy deficitu železa patří únava, snížená produktivita, snížená odolnost vůči zátěži, snížené mentální a motorické funkce, zhoršená imunita, bolesti hlavy, sucho v ústech, tachykardie, a to i za normálních hodnot hemoglobinu.

Deficit železa je hlavní příčina vzniku anemie, tzv. anemie z nedostatku železa (též sideropenická anémie, IDA – „iron deficiency anemia“). Anemií trpí až třetina světové populace<sup>1</sup>. Často se vyvíjí v důsledku snížené syntézy hemoglobinu a erythropoézy (Zimmermann and Hurrell, 2007; Bermejo and García-López, 2009). Dochází k ní ve stavu, kdy koncentrace krevního hemoglobinu klesne u mužů pod 130 g/l a u netěhotných žen pod 120 g/l.<sup>2</sup> Rozvoji sideropenické anemie předchází mobilizace uloženého železa a pokles hladin ferritinu. Když jsou buněčné zásoby železa vyčerpány, dochází ke klesání sérové hladiny železa se snížením hladiny sérového ferritinu a saturace transferrinu (Siimes *et al.*, 1980; Lokeshwar and Shah, 2010).

Dalším příkladem anemií způsobených nedostatkem železa jsou anemie z chronických onemocnění (ACD, anemia of chronic disease) a IRIDA (iron refractory iron deficiency anemia). Obě tyto formy anemie jsou způsobeny aktivitou hormonu hepcidin. ACD vzniká poté, kdy je v těle přítomen dlouhou dobu zánět. Zánět vede T-lymfocyty k produkci cytokinu IL-6 (interleukin 6), který mimo jiné vede k zvýšené expresi hepcidinu. Hepcidin poté uzavírá železo v buňkách. Tím se stává nedostupné nejen pro patogeny, pro něž je železo esenciální složkou, ale také pro účely erythropoézy (Weiss *et al.*, 2005).

Extrémně vzácně se vyskytujícími typy anemií z nedostatku železa jsou geneticky podmíněná onemocnění aceruloplasminémie (Harris *et al.*, 1995) a atranferrinémie (hypotransferrinémie) (Beutler *et al.*, 2000; Beaumont-Epinette *et al.*, 2015). Obě nemoci jsou spojeny s rozvinutou anemií v důsledku zadržování železa v buňkách tkání. Aceruloplasminémie je způsobena defektním genem pro ceruloplasmin, který tak není přítomen v cytoplasmě, v důsledku čehož nedochází k exportu železa z hepatocytů a makrofágů. Organismus tak nemá dostatek železa pro erythropoézu a přitom v jaterních buňkách a makrofázích se železo hromadí a tyto buňky poškozují (Harris *et al.*, 1995). Stejně následky má atranferrinémie, při které dochází k mutaci transportního proteinu transferrinu. Následkem mutace je přítomnost transferrinu značně snížena, nebo není

---

<sup>1</sup> – <http://www.who.int/nutrition/topics/ida/en/>

<sup>2</sup> – <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf>

dostatečně schopný vázat železo, které tak nemůže být transportováno k dalšímu užití (Beutler *et al.*, 2000; Beaumont-Epinette *et al.*, 2015). V případě obou těchto onemocnění tak bez léčby dochází jak k rozvoji anemie, z důvodu nedostatku železa pro syntézu hemoglobinu, tak i k těžkému poškození nadbytkem železa v buňkách a tkáních, které železo ukládají.

### 2.3.2 Poruchy spojené s nadbytkem železa

K nadbytku železa v organismu dochází primárně, kvůli genetickým poruchám (Swinkels *et al.*, 2006), nebo sekundárně, například při léčbě anemií (časté krevní transfuze) (Cheng *et al.*, 2015) nebo při zvýšeném příjmu železa v potravě. Příznaky nadbytku železa jsou velmi nespecifické, často dochází k únavě a chronickému vyčerpání, hyperpigmentaci kůže, bolestem kloubů nebo erektilním dysfunkcím a hypogonadismu (Andrews, 1999; Mattman *et al.*, 2002). Nejvíce jsou toxickým působením železa postižena játra (fibróza, cirhóza, hepatocelulární karcinom) (Batts, 2007), srdce (arytmie, fibróza, kardiomyopatie) (Oudit *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2015), mozek (neurodegenerativní choroby, např. Alzheimerova a Parkinsonova choroba) (Hadzhieva *et al.*, 2014), klouby (bolest, artritida) a endokrinní orgány jako například pankreas (diabetes mellitus) či varlata (hypogonadismus) (Feder *et al.*, 1996; Swinkels *et al.*, 2006). Zvláště u pacientů se sekundárním nadbytkem železa je nejčastější příčinou úmrtí selhání srdce (Gao *et al.*, 2009a).

Nejčastějším onemocněním spojeným s nadbytkem železa je primární (hereditární) hemochromatóza (HH), která je zapříčiněna mutacemi v genech, které ovlivňují hladiny hepcidinu a tím regulaci homeostáze železa (Swinkels *et al.*, 2006). HH typu 1 je nejběžnější genetické onemocnění evropské populace (Feder *et al.*, 1996; Datz *et al.*, 1998; Allen *et al.*, 2008). Jedná se o autozomálně recesivní onemocnění způsobené bodovou mutací genu *HFE*. Nejčastěji se jedná o mutace C282Y a H63D. V důsledku mutace nedochází k vazbě molekuly HFE na  $\beta$ 2-mikroglobulin. Protein HFE tak není transportován na povrch buňky, nemůže fungovat jako senzor nadbytku železa v plasmě a ovlivňovat tak expresi hepcidinu (Feder *et al.*, 1996). K nástupům symptomů obvykle dochází po 40. věku života, přičemž více je nemoc rozvinuta u mužské populace. U žen je nástup pozdější z důvodu pravidelných ztrát krve. I přes značně vysoký výskyt mutací *HFE* genu v populaci, jen u 1 % populace se onemocnění rozvine (Allen *et al.*, 2008). Během života mohou lidé s HH v těle nastřádat až 40 g železa (Gurzau *et al.*, 2003).

Druhou nejčastější formou hemochromatózy je juvenilní hemochromatóza (HH typu 2A a 2B). Příčinou je mutace genu pro *HFE2* (typ 2A), kódující hemojuvelin (Papanikolaou *et al.*, 2004), a genu *HAMP* (typ 2B), kódující hepcidin (Delatycki *et al.*, 2004). Oba subtypy jsou, stejně jako *HFE*-HH, charakteristické nízkou hladinou hepcidinu v těle. Přetížení železem vede ke kardiomyopatiím, diabetu a hypogonadismu často již před 20. rokem života (Papanikolaou *et al.*, 2004) u obou pohlaví stejnou měrou. K úmrtí dochází nejčastěji kvůli selhání srdce (Camaschella, 1998).

Kromě těchto typů HH jsou známy i další, se značně nižší frekvencí výskytu. Jsou jimi HH typu 3 způsobená mutací genu pro Tfr2 (Gao *et al.*, 2009b; Joshi *et al.*, 2015), HH typu 4 (ferroportinová choroba) způsobená mutací genu pro ferroportin (Arden *et al.*, 2003; Drakesmith *et al.*, 2005) a typu 5 způsobená mutací 5' UTR IRE sekvence těžkého řetězce ferritinu (Kato *et al.*, 2001).

Sekundárně rozvinutý nadbytek železa, také označovaný jako sekundární hemochromatóza, je pozorován při léčbě některých anemií, jako jsou  $\beta$ -talasémie a srpkovitá anemie (Roseff, 2009; Cao and Galanello, 2010). Následkem obou těchto poruch dochází k chronické anemii a pacienti s těmito chorobami jsou závislí na pravidelných transfuzích, které s sebou přinášejí riziko postupné kumulace železa v tkáních. Vzhledem k průměrnému obsahu 200 mg železa v krevní jednotce, představuje transfuze až dvě stěkrát zvýšený denní příjem železa, čímž může docházet ke zvýšení hladiny NTBI (Shander *et al.*, 2009). Sekundární akumulace železa v organismu může být zároveň vedlejším efektem některých vážných onemocnění jako například alkoholového poškození jater (ALD), některých typů hepatitid, porfyrie aj. (Aigner *et al.*, 2008; Dostálíková-Čimburová *et al.*, 2012b; Dostálíková-Čimburová *et al.*, 2014).

Není-li akumulace železa včas diagnostikována, dochází k rozvoji cirhózy až karcinomu jater, cukrovce, hypogonadismu, srdečním poruchám a mnoha dalším patologiím (Feder *et al.*, 1996; Oudit *et al.*, 2006; Batts, 2007). Z toho důvodu je při přetížení organismu železem třeba snížit hladiny železa uvnitř tkání. Nejčastěji se nadbytek železa léčí pravidelnými venepunkcemi. Standardně je odebíráno přibližně půl litru krve týdně, dle stavu zásob železa, po dobu několika měsíců až let (Camaschella, 2009).

Zatím jedinou alternativou k venepunkci je chelatace. Chelátory jsou látky, které vyvazují toxické kovy a následně jsou s nimi vyloučeny z těla ven (Nick *et al.*, 2003). Příkladem takových chelátorů železa jsou deferasirox (Yang *et al.*, 2007), deferiprone (Barman Balfour and Foster, 1999) a deferoxamine (Nick *et al.*, 2003). Pro chelátory je

dobře dostupné železo vázané na nízkomolekulární ligandy, tedy železo ve formě LIP (Weaver and Pollack, 1989) a NTBI (Breuer *et al.*, 2000). Chelátory železa jsou důležité pro přežití pacientů s těžkým přetížením železem, ale také pro pacienty s chronickou anemií, u kterých dochází k přetížení železem v důsledku nutných častých transfuzí. Bohužel, chelátory mají značné vedlejší účinky, které někteří pacienti špatně snášejí. Například deferoxamine se musí kvůli špatné orální dostupnosti a rychlé degradaci aplikovat subkutánně každých 8 – 12 hodin, infuze mohou být pro pacienty nejen časově náročné, ale také bolestivé (Poggiali *et al.*, 2012). Hlavní problém i orálních chelátorů deferipronu a deferasiroxu je rychlost rozkladu. V budoucnu by nový chelátor železa měl být schopen dobře procházet trávicím traktem, přes buněčné membrány a měl by být schopen vyvázat nadbytečné železo z tkání jako je srdce, játra, mozek a endokrinní žlázy uložené i v jiné formě než LIP a NTBI (Poggiali *et al.*, 2012).

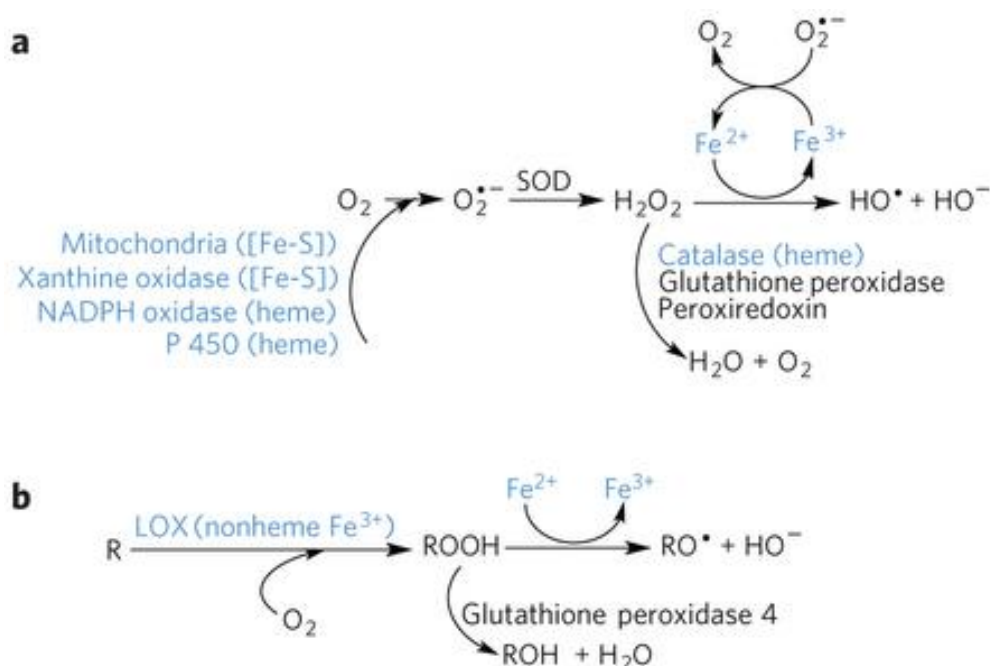
## 2.4 Nadbytek železa a mechanismus buněčného poškození

Železo nacházející se v organismu, jehož hladina překročí vazebnou kapacitu ferritinu a transferrinu, snižuje vitalitu a zhoršuje funkci jednotlivých buněk a může vést až k buněčné smrti a tkáňovému poškození. Zatím nebyl objeven mechanismus, prostřednictvím kterého by nadbytek železa aktivoval dráhy buněčných smrtí přímo. Nicméně, některé výzkumy propojují působení nadbytku železa a buněčnou smrt přes toxické působení železa na makromolekuly buňky. Pokud buňka neprodělá buněčnou smrt, velmi často dochází k nevratným změnám na jejích strukturách a ke snížení její funkčnosti. Nejvíce jsou tedy poškozeny buňky a tkáně, které jsou metabolicky velmi aktivní nebo ukládají velké množství železa.

### 2.4.1 Oxidativní stres

Důvodem toxického působení železa je jeho schopnost produkovat reaktivní kyslíkové radikály (ROS) a v buňce tím vyvolávat oxidativní stres. Pokud dojde k překročení ochranné kapacity ferritinu, stává se železo dostupné chemickým reakcím. Jednou z nejtoxičtějších forem ROS je hydroxylový radikál, na jehož vzniku se právě železnaté kationty podílí Fentonovou reakcí:  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow$  reaktivní intermediát  $\rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^\bullet + \text{OH}^-$ . V následné reakci je železo znovu redukováno na dvojmocnou podobu superoxidovým radikálem:  $\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$  (Galaris and Pantopoulos, 2008) (obr. 2.3). Superoxidový radikál vzniká například při buněčném dýchání

v mitochondriích (Vinogradov and Grivennikova, 2005). Za normálních podmínek je v buňce eliminován pomocí enzymů SOD (superoxid dismutázy) na peroxid vodíku, který je dále redukován na vodu pomocí katalázy, glutathion peroxidázy nebo peroxiredoxinu (Galaris and Pantopoulos, 2008). V případě nadbytku železa byla v některých studiích pozorována snížená aktivita těchto antioxidačních enzymů (Bartfay and Bartfay, 2000; Turoczi *et al.*, 2003). Tvorba hydroxylových radikálů byla potvrzena i v *in vivo* systémech (Burkitt and Mason, 1991; Kadiiska *et al.*, 1995).



**Obrázek 2.3: Schéma úlohy železa v metabolismu reaktivních kyslíkových radikálů (ROS)** (převzato z Dixon and Stockwell, 2014). Dráhy vzniku vybraných rozpustných (a) a lipidických (b) ROS. ROS = reactive oxygen species

Kromě hydroxylového radikálu může železitý kationt například v Kupfferových buňkách jater katalyzovat tvorbu nitroniového kationtu ( $NO_2^+$ ) z peroxodusitanu ( $ONOO^-$ ), který v buňce vzniká reakcí oxidu dusnatého (NO) se superoxidovým radikálem ( $O_2^{\bullet -}$ ) (Videla *et al.*, 2003).

Hlavní důvod toxického působení hydroxylových radikálů a nitroniových kationtů spočívá v jejich schopnosti oxidovat a modifikovat membránové lipidy, báze nukleových kyselin a proteiny (Sodum and Chung, 1988; Houglum *et al.*, 1990; Welch *et al.*, 2002; Videla *et al.*, 2003). Kromě toho může také docházet ke vzájemné vazbě DNA a proteinů (Altman *et al.*, 1995). Modifikace těchto makromolekul má mnoho následků. Například peroxidace především polynenasycených mastných kyselin v membránách ovlivňuje

endoplasmatické retikulum (Wills 1972; Valerio and Petersen, 1998), lysozomy (Mak and Weglicki, 1985) a mitochondrie (Bacon *et al.*, 1985; Bacon *et al.*, 1993; Rauen *et al.*, 2004).

## **2.4.2 Stres endoplasmatického retikula**

### **2.4.2.1 Endoplasmatické retikulum**

Endoplasmatické retikulum (ER) je organela oddělující řadu buněčných procesů od redukujícího prostředí cytoplazmy. Vysoká koncentrace vápenatých iontů a oxidující prostředí vytváří v ER prostředí podobné extracelulárnímu (Hebert and Molinari, 2007). Mezi hlavní funkce ER patří syntéza, skládání a modifikace (tvorba disulfidických můstků, glykosilace) transmembránových proteinů a proteinů určených k sekreci (cca třetina všech proteinů eukaryotické buňky). Dále se jedná o zásobní organelu vápenatých iontů a probíhá zde syntéza fosfolipidů a steroidů (Voeltz *et al.*, 2002).

Ke sbalování proteinů dochází za asistence chaperonů z rodiny HSP70 (heat shock protein 70), HSP90 (heat shock protein 90) a chaperonů lektinových. Jejich asistence je nutná nejen kvůli usnadněnému skládání peptidů, ale také aby se předcházelo jejich agregaci, která je pro ER toxická (Braakman and Hebert, 2013).

V případě HSP70 se jedná především o chaperon BiP/GRP78 (immunoglobulin binding protein; glucose regulated protein 78). HSP90 je zastoupen chaperonem GRP94 (glucose regulated protein 94). Oba chaperony rozpoznávají nesbalené, špatně sbalené či agregované proteiny na základě hydrofobního povrchu těchto proteinů. Pokud je protein správně složen, je hydrofobní část schovaná uvnitř proteinu a tyto chaperony ho nerozeznají (Blond-Elguindi *et al.*, 1993). Protein BiP se váže na peptidy a usnadňuje tak jejich správné složení již při jejich syntéze. Kromě toho jsou se syntézou nového peptidu asociovány proteiny PDI (protein disulfid isomerase), které umožňují vznik disulfidických můstků. Schopnost PDI vytvářet disulfidické můstky na peptidech je podpořena proteinem ERO1- $\alpha$  (ER oxidoreductase 1  $\alpha$ ), který udržuje PDI v oxidovaném stavu (Hebert and Molinary, 2007).

Většina vnikajících proteinů je již při syntéze na N-konci glykosilována oligosacharidem N-glykanem (Braakman and Hebert, 2013). N-glykanový řetězec je tvořen cukernými zbytky – 2× N-acetylglukosamin, 9× manóza a 3× glukóza. Ten je dále důležitý pro kontrolu proteinů dalšími chaperony – lektiny (Hebert and Molinary, 2007).

Lektinové chaperony se na rozdíl od chaperony BiP neváží přímo na hydrofobní povrchy špatně sbaleného proteinu, ale na oligosacharidovou kostru, která je hydrofilní (Hebert and Molinary, 2007). V případě lektinových chaperonů se mluví o kalnexinu a kalretikulinu. Po navázání N-glykanu na peptid je první ze tří glukóz N-glykanu odstraněna glukosidázou I, což je následováno odštěpením druhé glukózy glukosidázou II (GII) (Caramelo and Parodi, 2007). Zbylá jedna glukóza umožňuje asociaci kalnexinu a kalretikulinu s peptidem. Ve chvíli, kdy se tyto chaperony vyváží z proteinu, dochází k odštěpení poslední glukózy z N-glykanu (pomocí GII). Za předpokladu, že se protein správně sbalil, je označen k transportu do Golgiho aparátu. V případě, že peptid správnou konformaci nezaujal (na povrchu se stále vyskytuje mnoho hydrofobních aminokyselin), dochází k připojení nové glukózy a proces se může opakovat. Pokud je tento cyklus opakovan vícekrát, dochází k odštěpení manózy z N-glykanu a protein je tak označen pro degradaci drahou ERAD (ER associated protein degradation) (Hebert and Molinary, 2007). Úkolem ERAD dráhy je především transportovat špatně sbalené proteiny do cytoplasmy retrotranslokací, kde pak dochází k jejich ubikvitinilaci a degradaci proteazomem. Pokud je nesbalených či špatně sbalených proteinů v ER příliš, dochází ke stresu ER.

#### **2.4.2.2 Stres endoplasmatického retikula**

Existuje mnoho vlivů, které vedou ke stresu ER. Příkladem jsou hypoxie, nedostatek glukózy, oxidativní stres, virová infekce a právě hromadění špatně složených proteinů (Tsai and Weissman, 2010). Stres ER vede ke spuštění drah a expresi proteinů, které mají buňce pomoci stres ER překonat. Mechanismy překonávání stresu ER se souhrně označují UPR (unfolded protein response). V prvních fázích UPR dochází k zastavení translace většiny proteinů a posílení ERAD dráhy, jejíž úkol je odstranit proteiny, které jsou příčinou stresu ER (Travers *et al.*, 2000; Hampton, 2002). Pokud ovšem aktivace UPR není schopná překonat stres ER, dochází k aktivaci buněčné smrti (Logue *et al.*, 2013). UPR zahrnuje tři signální dráhy (obr. 2.4). Senzorickými proteiny na začátku těchto drah jsou molekuly ATF6 (activating transcription factor 6), IRE1 $\alpha$  (inositol requiring protein 1 $\alpha$ ) a PERK (RNA dependent protein kinase (PKR) like ER kinase) (Logue *et al.*, 2013).

Přesný mechanismus aktivace UPR je stále hledán, existuje ovšem předpoklad, že UPR je aktivována proteinem BiP. Tato teorie předpokládá, že protein BiP za normálních podmínek váže lumenální domény těchto senzorů a inhibuje tak jejich aktivaci (Sou *et al.*,

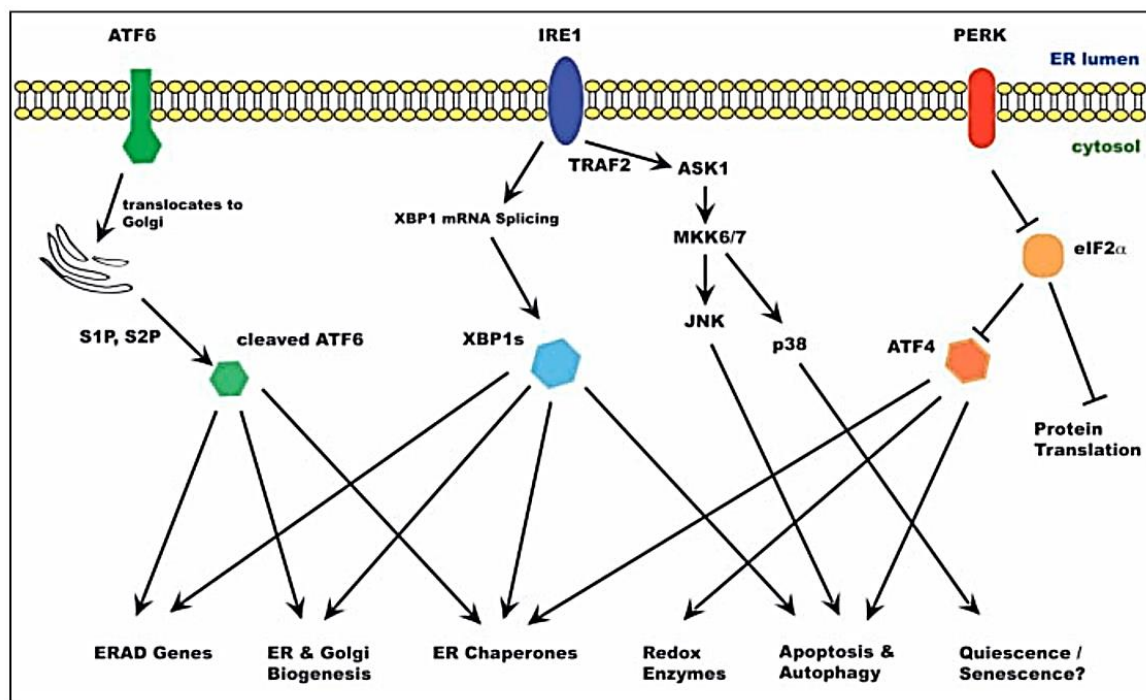


2012). V případě, že se v ER začnou hromadit špatně sbalené proteiny, dochází k uvolnění chaperonu BiP a může dojít k aktivaci těchto sensorických proteinů (Bertolotti *et al.*, 2000). Dle druhé teorie dochází k aktivaci sensorických proteinů poté, co se na jejich luminální doménu přímo vážou nesbalené proteiny (Ron and Walter, 2007).

#### 2.4.2.3 Signální dráhy „Unfolded Protein Response“

ATF6 je transmembránový protein, který je za normálních podmínek neaktivní. Jeho aktivace je blokována vazbou proteinu BiP na jeho luminální část. Po disociaci proteinu BiP při nadbytku nesbalených proteinů je protein ATF6 transportován z ER do Golgiho aparátu. Tam dochází k jeho štěpení pomocí proteáz site-1 a site-2 a uvolňuje se cytosolická doména obsahující DNA vazebnou doménu bZIP (basic leucine zipper domain) (Ye *et al.*, 2000). Transport do Golgiho aparátu je zajištěn pomocí lokalizačního signálu, který je během vazby proteinu BiP maskován (Shen *et al.*, 2002). Cytosolická část proteinu ATF6 je translokována do jádra, kde reguluje expresi chaperonů (BiP, GRP94, PDI), EDEM1 (ER degradation enhancing  $\alpha$ -mannosidase like protein 1), XBP1 (X-box binding protein 1), a transkripčního faktoru CHOP (CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein) (Logue *et al.*, 2013).

IRE1 $\alpha$  je protein, který vykazuje serin/threoninovou kinázovou a endonukleázovou aktivitu ve své cytosolické části. K aktivaci IRE1 $\alpha$  dochází poté, kdy protein BiP disociuje z jeho domény umístěné v lumen ER. Tím je umožněna dimerizace a autofosforylace proteinu IRE1 $\alpha$ . Autofosforylací je aktivována jeho endonukleázová aktivita (Lee *et al.*, 2008) a aktivovaný protein IRE1 $\alpha$  poté může vystříhnout 26 nukleotidů dlouhý intron z mRNA transkripčního faktoru XBP1. Vystřížením intronu dojde k posunutí čtecího rámce mRNA a vzniká stabilnější forma transkripčního faktoru XBP1 (Yoshida *et al.*, 2001). Ta následně může aktivovat expresi cílových proteinů UPR. Je zajímavé, že před vystřížením intronu má XBP1 opačnou funkci, reprimuje cílové geny UPR (Ron and Walter, 2007). Stabilnější XBP1 aktivuje expresi genů, které zajišťují homeostázu ER (např. BiP a jeho kofaktory ERDJ4, HEJD), komponenty ERAD dráhy (EDEM1, p58), transkripční faktory (CHOP, XBP1) (Logue *et al.*, 2013). Kromě toho může molekula IRE1 $\alpha$  aktivovat kinázu JNK (jun N-terminal kinase) (Urano *et al.*, 2000). Kináza JNK pak může stimulovat aktivaci apoptotické dráhy modulací aktivity pro-apoptotických BH3-only proteinů (Dhanasekaran and Reddy, 2008).



Obrázek 2.4: Schéma signalizačních drah aktivovaných během stresu endoplasmatického retikula (převzato z Tsai and Weissman, 2010).

Podobně jako kináza IRE1 $\alpha$  je aktivována kináza PERK. Po disociaci proteinu BiP dochází u proteinu PERK k dimerizaci následovanou autofosforylací (Bertolotti *et al.*, 2000). Hlavním substrátem proteinu PERK (serin/threoninová kináza) je eIF2 $\alpha$  (eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ ). Translační faktor eIF2 $\alpha$  je fosforylován na serinu 51 a tím dochází k inhibici translace mRNA. Hlavní úlohou tohoto procesu je snížit zatížení endoplasmatického retikula nově syntetizovanými proteiny (Harding *et al.*, 1999). Fosforylace eIF2 $\alpha$  však vede i ke zvýšení translace některých mRNA, dochází tak například ke zvýšení hladiny transkripčního faktoru ATF4 (activating transcription factor 4). Po translaci dochází k translokaci transkripčního faktoru ATF4 do jádra, kde aktivuje expresi chaperonů (Bip a GRP94), transkripčního faktoru CHOP, genů pro syntézu aminokyselin, redoxní děje a sekreci proteinů (Logue *et al.*, 2013). Všechny tři dráhy slouží preferenčně k překonání stresu ER. Ovšem v případě příliš dlouho trvajícího stresu začínají mít význam signalizace vedoucí k buněčné smrti (kapitola 2.5).

## 2.5 Buněčná smrt

Buněčná smrt je mechanismus, kterým dochází k odstranění nežádoucích buněk z organismu. Do dnešní doby bylo popsáno mnoho různých způsobů buněčné smrti. Mezi

první a doposud nejlépe popsané patří apoptóza, nekróza (Kerr *et al.*, 1972) a buněčná smrt nesoucí znaky autofagie (Tsujimoto and Shimizu, 2005).

### 2.5.1 Apoptóza

Apoptóza je buněčný proces, který se vyvinul k odstranění buněk za fyziologických podmínek. Apoptotickou buněčnou smrtí jsou odstraněny buňky, které jsou poškozené (např. radiací, kyslíkovými radikály, toxiny, hypoxií), napadené virovou infekcí či jinak nepotřebné, ale i během vývoje orgánů a např. prstů v embryogenezi. Apoptóza je však aktivována i u buněk, které nedostávají signály pro přežití (Kerr *et al.*, 1972; Elmore 2007).

Apoptotická buňka v pozdní fázi apoptózy vytváří tzv. apoptotická tělíska. Ta jsou tvořena fragmenty neporušené cytoplasmatické membrány obsahující zbytky jaderného obsahu a cytoplasmu (Kerr *et al.*, 1972). Vzniku apoptotických tělísek předchází smršťování jádra a cytoplasmu, kondenzace chromatinu a fragmentace DNA, která je štěpena na úseky dlouhé 200 párů bazí. Zmenšování obsahu uvnitř plasmatické membrány vede k tvorbě výběžků, ze kterých poté apoptotická tělíska vznikají. Ta jsou následně fagocytována ostatními buňkami (Kerr *et al.*, 1972; Elmore 2007). Na rozdíl od nekrózy tak nedochází k vylití buněčného obsahu do okolí buňky a následnému zánětu. Ke všem těmto procesům apoptózy je nutné ATP. Pokud v buňce dojde k narušení jeho tvorby a ATP je vyčerpáno, apoptóza přechází v nekrózu (Elmore 2007).

Dnes se aktivace apoptózy zcela standardně dělí na indukci vnější a vnitřní drahou (obr. 2.5). Obě dráhy vedou k aktivaci proteáz a nukleáz, které štěpí vnitřní struktury buňky. Nejvýznamnější proteázy účastníci se apoptózy jsou kaspázy. Vnější dráha je aktivována receptory smrti, např. buňkami imunitního systému po rozeznání virové nákazy (T-lymfocyty nesoucí Fas ligan) (Ashkenazi and Dixit, 1998). Vnitřní dráha je řízena mitochondriemi a proteiny z rodiny Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), jejichž aktivita a poměr mezi jejich pro-apoptotickými a anti-apoptotickými členy rozhoduje o osudu buňky (Czabotar *et al.*, 2014).

#### 2.5.1.1 Kaspázy

Kaspázy jsou hlavní efektorové molekuly apoptózy. Název kaspázy pochází z anglického „caspase“, neboli Cystein dependent ASPartate directed proteaSE. Jak název napovídá, jedná se o endoproteázy, které štěpí substrát za aspartátem a ve svém aktivním

místě obsahují cystein. Kaspázy lze rozdělit na zánětlivé a apoptotické. Apoptotické kaspázy lze dále dělit na iniciační a exekuční (efektorové). Mezi zánětlivé kaspázy patří kaspáza-1, -4, -5, -11 a kaspáza-12. Mezi iniciační kaspázy patří kaspáza-2, -8, -9 a kaspáza-10, mezi exekuční se řadí kaspáza-3, -6 a -7 (McIlwain *et al.*, 2013).

Kaspázy jsou v buňce přítomny neustále v neaktivní podobě zymogenu. Iniciační kaspázy se vyskytují v podobě monomeru, exekuční kaspázy v podobě dimeru. K aktivaci iniciačních kaspáz je třeba jejich štěpení a dimerizace, k čemuž jsou využity mnohé adaptorové proteiny a kaspázy samotné. Interakce iniciačních kaspáz s adaptorovými proteiny je zajištěna pomocí N-koncové terminální domény. Jedná se o domény CARD (caspase recruitment domain) a DED (death effector domain). Efektorové kaspázy jsou aktivovány štěpením kaspázami iniciačními (Thornberry and Lazebnik, 1998; McIlwain *et al.*, 2013).

Aktivované exekuční kaspázy štěpí substráty jako jsou proteiny cytoskeletu a proteiny ovlivňující cytoskelet, proteiny Bcl-2 rodiny, proteiny účastnící se opravy DNA, sestřihu RNA, DNA replikace a protein iCAD (inhibitor of caspase activated deoxyribonuclease) (Thornberry and Lazebnik, 1998). Důsledkem působení kaspáz dochází ke kondenzaci struktur cytoplazmy a jádra.

### **2.5.1.2 Vnější dráha indukce apoptózy**

Aktivace vnější apoptotické dráhy probíhá pomocí receptorů nazývaných receptory smrti. Příkladem těchto receptorů jsou Fas, TNFR1 (tumor necrosis factor receptor 1), TRAILR1 (TNF related apoptosis inducing ligand receptor 1) a jejich ligandy FasL (Fas ligand), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), respektive TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand). Receptory smrti jsou typické přítomností intracelulární domény zvané doména smrti (DD, death domain), která po aktivaci receptoru zprostředkovává signál k aktivaci kaspáz a indukci buněčné smrti (Ashkenazi and Dixit, 1998). Aktivace vnější dráhy indukce apoptózy začíná navázáním ligandu na příslušný receptor.

Podle zúčastněných adaptorových molekul rozlišujeme dva různé způsoby, jakým receptory smrti způsobují aktivaci kaspáz (Lavrik *et al.*, 2005). V prvním případě dochází na cytosolické části receptoru smrti k formaci tzv. DISC komplexu (death inducing signaling complex). Po aktivaci Fas a TRAIL receptorů dochází k asociaci DD receptoru s DD adaptorového proteinu FADD (Fas associated death domain). Protein FADD stejně jako kaspázy-8 a -10 obsahuje doménu DED, která u kaspázy-8 či -10 slouží právě

k navázání na DED proteinu FADD. Komplex receptoru smrti, proteinu FADD a kaspázy-8 nebo -10 se nazývá DISC. K aktivaci kaspázy-8 nebo -10 na komplexu DISC dochází autokatalyticky v důsledku vysoké lokální koncentrace kaspázy-8 nebo -10 (Ashkenazi and Dixit, 1998, Lavrik *et al.*, 2005). Aktivace kaspázy-8 může být inhibována proteinem c-FLIP (cellular FLICE inhibitory protein), který má také DED doménu a navíc vykazuje vyšší afinitu k DISC komplexu než kaspáza-8. Aby byla umožněna aktivace kaspázy-8, je v buňce nutná přítomnost nižší hladiny c-FLIP oproti hladině kaspázy-8 (Lavrik *et al.*, 2007).

Druhý případ zahrnuje asociaci receptoru smrti TNFR1 s adaptorovým proteinem TRADD (TNFR associated death domain). Protein TRADD může interagovat s dalšími signálními proteiny, jako jsou TRAF2 (TNF receptor associated protein 2), RIP1 (receptor associated protein kinase 1) a cIAP1 a cIAP2 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1 and 2). Kanonická signalizace prostřednictvím TNFR1 zahrnuje rychlou formaci receptoru TNFR1, proteinu TRADD, kinázy RIP1, proteinu TRAF2 a proteinu cIAP1 za vzniku komplexu označovaného jako komplex I, který posléze aktivuje signální dráhy podporující přežití buněk cestou aktivace NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) (Micheau and Tschopp, 2003).

Za určitých situací, například po deubiquitinaci RIP1 pomocí CYLD deubiquitinázy, dochází ke vzniku sekundárního komplexu, který funguje jako sekundární DISC. Kináza RIP1 je po ubikvitinilaci disociována z receptoru TNFR1 a pomocí její DD dochází k interakci s proteinem FADD. Díky tomu dochází k asociaci sekundárního DISC s kaspázou-8 a může dojít k autoproteolytickému štěpení a k aktivaci kaspázy-8 (Wang *et al.*, 2008). K substrátům kaspázy-8 patří mimo jiné právě i RIP1. Štěpením RIP1 dochází k blokování dráhy vedoucí od TNFR1 receptoru k aktivaci NF- $\kappa$ B (Lin *et al.*, 1999).

Aktivovaná kaspáza-8 může následně přímo štěpením aktivovat exekuční kaspázu-3, kaspázu-6, případně kaspázu-7 (McIlwain *et al.*, 2013; Czabotar *et al.*, 2014) nebo aktivovat vnitřní dráhu apoptózy štěpením proteinu Bid (BH3 interacting domain death agonist) na zkrácenou formu tBid (truncated Bid). Protein tBid následně aktivuje pro-apoptotické proteiny Bax nebo Bak a vyvolává tak vznik póru v mitochondriální membráně, uvolnění mitochondriálních pro-apoptotických proteinů a cytochromu c (McIlwain *et al.*, 2013; Czabotar *et al.*, 2014).

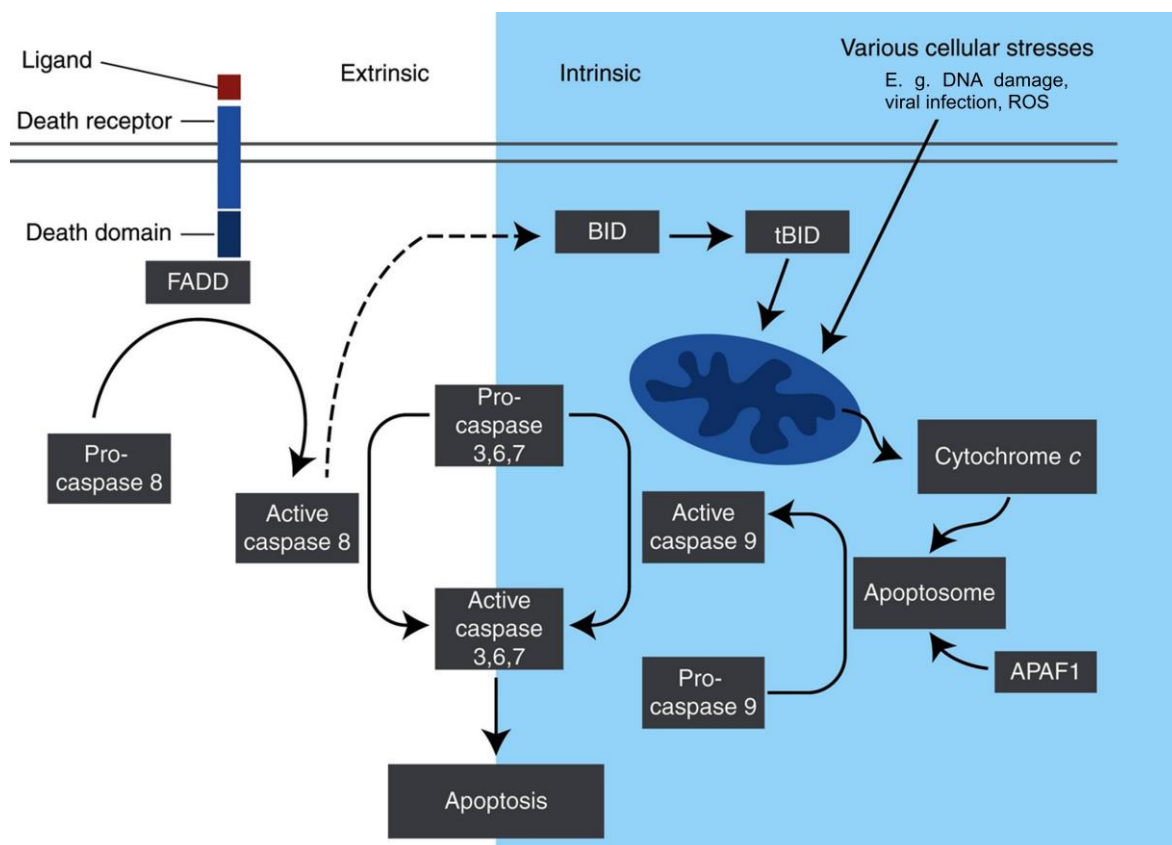
### 2.5.1.3 Vnitřní dráha indukce apoptózy

Vnitřní dráha indukce apoptózy je také často nazývána mitochondriální drahou, jelikož mitochondrie hrají společně s proteiny Bcl-2 důležitou roli v iniciaci apoptózy. Vnitřní dráha reaguje na stresové podmínky, které poškozují struktury buňky. Takové stimuly jsou např. absence faktorů pro přežití, virová infekce, poškození DNA (v důsledku UV záření, ionizujícího záření), přítomnost kyslíkových radikálů aj. (Kerr *et al.*, 1972; Elmore 2007).

Stěžejní roli v indukci vnitřní dráhy apoptózy mají proteiny rodiny Bcl-2, dělí se na pro-apoptotické (Bak, Bax, Bok), anti-apoptotické (A1, Bcl-B, Bcl-W, Bcl-XL, Bcl-2, Mcl-1) a BH3-only proteiny (Bad, Bid, Bik, Bim, Bmf, Hrk, Noxa, Puma). Anti-apoptotické Bcl-2 proteiny brání funkci pro-apoptotických proteinů Bax a Bak ve vytváření póru v mitochondriální membráně (Czabotar *et al.*, 2014), následkem čehož nedochází k vyplavení cytochromu c a pro-apoptotických proteinů jako jsou AIF (apoptosis inducing factor), endonukleáza G, Omi/HrtA2 (Omi/high temperature requirement protein A2), Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases/ direct IAP binding protein with low pI) (Uren *et al.*, 2005). Cytochrom c, společně s adaptorovým proteinem Apaf-1, ATP a kaspázou-9 tvoří v cytoplasmě strukturu zvanou apoptozom, jehož úlohou je aktivace kaspázy-9 a následně aktivace efektorových kaspáz -3, -6 a -7 (Chinnaiyan, 1999). Úlohou BH3-only proteinů je zprostředkování signálů v reakci na cytotoxické stresy. Jejich aktivita je ovlivněna transkripčně nebo post-transkripčně. Fungují jako přímé aktivátory proteinů Bak a Bax, nebo neutralizují funkci anti-apoptotických Bcl-2 proteinů. Aktivace vnitřní dráhy apoptózy tak závisí na množství proteinů rodiny Bcl-2 a poměru mezi všemi třemi členy rodiny Bcl-2 (Czabotar *et al.*, 2014).

Jednou z možností, jak aktivovat vnitřní dráhu apoptózy, je aktivita transkripčního faktoru p53. Dle závažnosti poškození DNA protein p53 buď zprostředkuje zastavení buněčného cyklu, nebo spuštění apoptózy. Jedním z mechanismů, kterým protein p53 umožňuje spustit apoptózu, je aktivace transkripce některých Bcl 2 proteinů, jako jsou Bax, Bid, Noxa, Puma. Zvýšená exprese proteinu p53 také souvisí s přítomností většího množství receptorů DR5 (death receptor 5) a Fas receptoru na povrchu buněk, které vedou k aktivaci kaspázy-8 a aktivaci vnitřní dráhy pomocí tBid. Kromě těchto proteinů ovlivňuje protein p53 také transkripci adaptorového proteinu Apaf 1 (aktivace kaspázy-9) a PIDD (aktivace kaspázy-2). Protein p53 se kromě vazby na DNA může vázat i přímo na jiné

proteiny. Může tak například vázat anti apoptotické proteiny Bcl XL (B cell lymphoma extra large) či Bcl 2 a bránit tak jejich vazbě na pro apoptotické proteiny Bcl 2 rodiny. Tím je umožněn vznik póru v mitochondriální membráně a únik molekul vedoucí k buněčné smrti (Amaral *et al.*, 2010).



**Obrázek 2.5:** Schéma vnější a vnitřní dráhy apoptózy (převzato a upraveno z McIlwain *et al.*, 2013). *APAF1* = apoptotic protease activating factor 1; *BID* = *BH3* interacting domain death agonist; *tBID* = truncated *BID*; *FADD* = *Fas* associated protein with death domain; *ROS* = reactive oxygen species

## 2.5.2 Nekróza

Nekróza je typem buněčné smrti, která je často srovnávána s apoptózou (kapitola 2.5.1). Na rozdíl od apoptózy není změna morfologie jádra spojena s organizovanou kondenzací chromatinu a tvorbou pravidelných fragmentů DNA. Buňky podléhající nekróze jsou rozloženy rychle a neorganizovaně a buněčný obsah je zcela vylit do okolního prostoru. Uvnitř buněk dochází k rychlému neuspořádanému rozkládání komponent cytoplasmy a jádra (Proskuryakov *et al.*, 2003; Edinger and Thompson, 2004). Probíhající nekróza je typická přítomností oxidativního stresu, vakuolizací cytoplasmy, rozrušením integrity plasmatické membrány a vypouštěním buněčného obsahu do okolí

buňky. Buněčný obsah v okolí buňky vede k aktivaci zánětlivé odpovědi tkání (Proskuryakov *et al.*, 2003; Edinger and Thompson, 2004). Mezi induktory nekrózy patří např. deplece ATP, diabetes, fyzické poškození, infekce, ischemie, působení toxinů, ale také aktivita imunitního systému (Proskuryakov *et al.*, 2003). Nekróza byla v minulosti vždy považována za zcela náhodnou a přísně neorganizovanou buněčnou smrt. Toto paradigma se však v posledních několika letech zcela změnilo. V roce 2005 se poprvé povedlo inhibovat rozvoj nekrotické buněčné smrti po ischemii mozku za pomoci inhibitoru nekrostatinu-1 (Degterev *et al.*, 2005). Jelikož možnost inhibice naznačuje organizovanost, byla poprvé diskutována existence signální dráhy vedoucí k nekroze. Programovaná buněčná smrt se znaky nekrózy byla označena termínem nekroptóza (Degterev *et al.*, 2005).

### 2.5.3 Autofagie

Autofagie (makroautofagie) je evolučně velmi starý mechanismus, kterým dochází k degradaci složek cytoplasmy (glykogen, proteiny, lipidy, nukleotidy aj.) a organel za pomoci lysozomu. Za běžných podmínek je aktivita autofagie minimální, ovšem stimuly jako limitace živin, hypoxie, poškození DNA a organel, vysoká denzita buněk či změna teploty mohou vést ke značnému nárůstu její aktivity (Levine and Kroemer, 2008). Hyperaktivace této dráhy může vést k buněčné smrti (Tsujimoto and Shimizu, 2005). Autofagie je také proces, který je spojen s diferenciací a vývojem (Mizushima and Levine, 2010). Pro autofagii je typická tvorba váčků obalených dvojitou membránou, které směřují svůj obsah k rozkladu do lysozomu, tzv. autofagozomy. Formování těchto váčků mají na starosti proteiny Atg (autophagy related), které byly poprvé objeveny a popsány u kvasinek, ovšem jsou vysoce konzervovány napříč eukaryoty (Mizushima *et al.*, 2011). Iniciací autofagie je regulovaná komplexy Atg1/ULK (unc 51 like kinase) a PI3K (fosfatidylinositol 3 kinase) kinázou třídy III – Vps34 (vesicular protein sorting 34).

Autofagie probíhá v pěti základních krocích – formování fagoforu (izolované membrány), elongace fagoforu, zrání autofagozomu, fúze autofagozomu s lysozomem a rozklad pomocí lysozomálních proteinů (Ryter *et al.*, 2014). Pro vznik autofagozomů je nutná aktivní Atg1/ULK kináza. Ta ke své aktivní podobě potřebuje být v interakci s regulačním proteinem Atg13. Ve chvíli, kdy se v okolí buňky nachází dostatečné množství živin, je protein Atg13 udržován ve fosforylované podobě pomocí kinázy mTOR (mammalian target of rapamycin), čímž je velmi snížena afinita Atg13 k Atg1/ULK.



Komplex Atg1/ULK běžně nevykazuje kinázovou aktivitu. Ovšem za podmínek nedostatku živin pro buňku, je činnost mTOR kinázy inhibována, Atg13 je defosforylován a může interagovat s Atg1/ULK. Tím dojde k aktivaci kinázové aktivity Atg1/ULK (Díaz-Troya *et al.*, 2008). Úlohou Atg1 je především stimulace proteinu Atg9, který je esenciální pro rozšiřování fagoforu (Papinski *et al.*, 2014).

Rozšiřování fagoforu a formování autofagozomu mají na starosti dva ubiquitin like konjugační systémy – Atg12-Atg5 a Atg8/LC3-PE (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 - fosftatidyl ethanolamin). Protein Atg 12 je aktivován proteinem Atg7 (E1enzym), přenesen na protein Atg10 (E2 enzym), konjugován s proteinem Atg5 a následně se formuje komplex Atg12-Atg5-Atg16 (E3 enzym). Tento komplex je přítomen na membráně po celou dobu, kdy dochází k formování autofagozomu, ale po skončení procesu se od membrány odpojuje. Je upravován proteázou Atg4 a Atg7 (E1 enzym) a přenesen na protein Atg3 (E2 enzym). Následně je komplex Atg8/LC3 spojen s PE na membráně. Vzniklý komplex Atg8/LC3-PE je součástí izolační membrány i autofagozomu. Po štěpení proteázou Atg4 vzniká komplex LC3-I, který je cytosolický, po spojení s PE se označuje jako LC3-II a je pevně vázán v membráně autofagozomu. Konjugační systémy slouží k vázání membrány vznikajícího autofagozomu. Po uzavření je autofagozom směřován k fúzi s lysozomem, kde dochází k degradaci obsahu těchto váček (Mizushima *et al.*, 2011; Reggiori *et al.*, 2012). Výběr specifických substrátů pro degradaci autofagií je zajištěn proteinem p62, který rozpoznává ubikvitinované substráty a následně se váže přímo na Atg8/LC3 a stává se tak součástí autofagozomu (Reggiori *et al.*, 2012).

Kromě těchto byly dodnes definovány další typy buněčných smrtí – anoikis (Frisch and Francis, 1994), entóza (Overholtzer *et al.*, 2007), ferroptóza (Dixon *et al.*, 2012), kornifikace (Eckhart *et al.*, 2013), mitotická katastrofa (Castedo *et al.*, 2004), netóza (Remijsen *et al.*, 2011), parthanatos (Fatokun *et al.*, 2014) a pyroptóza (Bergsbaken *et al.*, 2009).

## **2.6 Nadbytek železa, buněčné poškození a buněčná smrt**

Jedním z důsledků působení nadbytku železa je oxidativní poškození buněčných membrán a poškození mitochondrií. Oxidativní poškození mitochondrií při nadbytku železa má za následek defekty v mitochondriálním elektron transportním řetězci, v důsledku čehož lze pozorovat nižší spotřeby kyslíku a nižší tvorbu ATP (Bacon *et al.*, 1985; Bacon *et al.*, 1993; Almeida *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2009a). U *in vivo* modelu

přetížení železem byla nalezena snížená aktivita cytochrom c oxidázy (Bacon *et al.*, 1993). Při nadbytku železa dochází k vytvoření neselektivního MPT (mitochondrial permeability transition) póru v mitochondriální membráně (Rauen *et al.*, 2004). Membrána je navíc z důvodu peroxidace náchylnější k rozrušení, které společně s otevřením MPT může vést k uvolnění cytochromu c z mezimembránového prostoru (Halestrap and Pasdois, 2009). Nemůže tak nadále přenášet elektron k cytochrom c oxidáze. Cytochrom c uvolněný do cytoplasmy má navíc za následek spuštění procesů vedoucích k apoptóze či nekróze (kapitola 2.5). Ať už apoptóza, tak nekróza byly u buněk ovlivněných nadbytkem železa mnohokrát pozorovány jak na úrovni morfologie (Rauen *et al.*, 2004; Masuda *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2015), tak v případě apoptózy i prostřednictvím aktivace kaspáz (Miwa *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Taoka *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013; Gu *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; You *et al.*, 2015).

Peroxidace lipidů nadbytkem železa kromě poškozování biomembrán produkuje mimo jiné i toxické reaktivní aldehydy – malondialdehyd (MDA) a 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), které následně *in vivo* tvoří adukty s DNA (Sodum and Chung, 1988), a proteiny (Houglum *et al.*, 1990). Tyto modifikace DNA a proteinů mohou přispívat k rozvoji malignit a fibrózním změnám (Bartsch and Nair, 2004), které jsou pozorovány při nadbytku železa např. u jater (Batts, 2007), sleziny (Khan *et al.*, 1999) či srdce (Oudit *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2015). Při působení nadbytku železa *in vivo* se tyto adukty váží na proteiny mikrozomální frakce v jaterních buňkách, což může být další z příčin poškození buněk a tkání během nadbytku železa (Valerio and Petersen, 1998). Kromě toho byly pozorovány i další změny DNA. Konkrétně se u pacientů s nealkoholovou steatózou jater jednalo o modifikaci guaninu na 7,8-dihydro-8-oxo-2' deoxyguanosin (8-exodG). Výskyt této modifikace byl signifikantně spojen s nadbytkem železa. Redukce hladiny železa by tak u těchto pacientů mohla snížit pravděpodobnost rozvoje hepatocelulárního karcinomu (Fujita *et al.*, 2009). Modifikace guaninu na 8-exodG způsobuje transverzi GC na TA, která vede k rozvoji nádorových onemocnění a jiných patologií (Cheng *et al.*, 1992).

Kromě jaderné DNA dochází během oxidativního stresu ve větší míře i ke značnému poškození mitochondriální DNA (Yakes and Houten, 1997). Během nadbytku železa dochází ke kumulativnímu poškození, kdy stejně jako u jaderné DNA dochází ke vzniku 8-exodG modifikacím a navíc s časem dochází k fragmentaci. Tato poškození značně snižují spotřebu kyslíku a tvorbu ATP, jelikož kvůli poškození DNA dochází ke

snížení hladiny komponent elektron transportního řetězce (Almeida *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2009a).

Navíc se ukazuje, že peroxidace lipidů a přítomnost MDA a HNE při nadbytku železa hraje roli při expresi TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor beta) a přispívá k rozvoji fibrózy v játrech (Houglum *et al.*, 1997; Branton and Kopp, 1999). Stejně tak byl pozorován rozvoj fibrózy při zvyšujícím se množství železa u kardiomyocytů a tím spojené kardiomyopatie (Oudit *et al.*, 2006). Tvorba kolagenu v důsledku působení nadbytku železa u jater či srdce byla pozorována i v případech jiných studií (Weintraub *et al.*, 1988; Gardi *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2015)

Dále mohou být oxidativně porušeny membrány lysozomů (Mak and Weglicki, 1985). Ty následně ztrácí pevnost a může docházet k vypouštění lysozomálních enzymů do cytoplasmy. Na základě rozsahu poškození může docházet až k apoptóze (Lunova *et al.*, 2014) a nekróze (Stál *et al.*, 1990). Vypuštění lysozomálních enzymů může spouštět buněčnou smrt přes působení na mitochondrie, uvolnění cytochromu c a aktivaci vnitřní dráhy apoptózy (Zhao *et al.*, 2003).

Peroxidace membrán způsobuje také snížení funkce endoplasmatického retikula (ER). Konkrétně byly během nadbytku železa v buňce pozorovány snížené aktivity enzymů ER (zhoršená funkce p450, aminopyrin demethylázy, glukóza-6-fosfatázy) a snížená schopnost zadržovat vápenaté ionty (Valerio and Petersen, 1998). V rámci několika studií bylo také pozorováno, že při nadbytku železa se v buňkách objevují známky stresu ER (Tan *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2014). Stres ER byl pozorován u jater a srdcí potkanů s vyvolaným akutním i chronickým nadbytkem železa, kdy během hromadění železa v tkáních potkanů docházelo k vyšší aktivitě chaperonu BiP a aktivaci kaspáz (Lou *et al.*, 2009).

Dalším příkladem mechanismu indukce apoptózy v důsledku stresu ER je již dříve zmiňovaná aktivace JNK kinázy (kapitola 2.4.2.3), která vede k aktivaci pro-apoptotických BH3-only proteinů. Ty následně umožní proteinům Bak a Bax vytvořit pór v mitochondriální membráně a spustit tak vnitřní dráhu apoptózy. JNK kináza dále fosforyluje anti-apoptotické proteiny Bcl-2 a Bcl-XL, čímž přeruší jejich anti-apoptotickou funkci (Dhanasekaran and Reddy, 2008; Logue *et al.*, 2013). Dalším mechanismem indukce apoptózy v důsledku stresu ER je aktivace transkripčního faktoru CHOP, který je transkribován při delším trvání signalizací všech tří drah. CHOP je transkripční faktor obsahující bZIP doménu a jeho funkce v aktivaci apoptózy spočívá v pozitivní regulaci

expresi BH3-only proteinů (Bim, Puma) a zároveň negativně reguluje expresi anti-apoptického proteinů Bcl-2 (Teske *et al.*, 2013). Kromě CHOP transkripčního faktoru může být apoptóza během stresu ER spuštěna pomocí kaspázy-12. Při dostatečném stimulu dochází během stresu ER k expresi kaspázy-12 a zároveň dochází k translokaci kaspázy-7 z cytosolu na povrch ER. Kaspáza 7 na povrchu ER následně štěpí kaspázu-12, čímž dochází k její aktivaci vedoucí k indukci apoptózy pomocí interakce s kaspázou-9 (Rao *et al.*, 2004).

Stres ER se také ukázal být jedním z mechanismů, kterým dochází k pozitivní regulaci exprese hepcidinu. *In vitro* i *in vivo* bylo pozorováno, že stres ER indukuje expresi hepcidinu pomocí stresem ER aktivovaného transkripčního faktoru CREBH (cyclic AMP response element-binding protein H). CREBH se váže na hepcidinový promotor a aktivuje jeho expresi (Oliveira *et al.*, 2009; Vecchi *et al.*, 2009).

## 3 MATERIÁL A METODY

### 3.1 Chemikálie

2-merkaptoethanol (GIBCO, Carlsbad, USA);  
30% akrylamid/bis-akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA);  
35% kyselina chlorovodíková – HCl (Penta, Praha, Česká republika);  
APS (AppliChem, Darmstadt, Německo);  
bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA);  
citrát sodný (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA);  
CO<sub>2</sub> (Air Liquide CZ, s.r.o., Praha, ČR);  
DTT (Serva, Heidelberg, Německo);  
EDTA (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA);  
ethanol 96% (Dr. Kulich, Pharma s.r.o., Hradec Králové, ČR);  
FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA);  
fatální bovinní sérum – FBS (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA);  
glycerol (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA);  
glycin (Serva, Heidelberg, Německo);  
H<sub>2</sub>O pro tkáňové kultury;  
HEPES (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA);  
inhibitor fosfatáz PhosSTOP (Roche, Basilej, Švýcarsko);  
inhibitor proteáz c0mplete ULTRA mini (Roche, Basilej, Švýcarsko);  
KCl (Lachema, Brno, ČR);  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Lachema, Brno, ČR);  
kyselina listová (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA);  
kyselina octová (Penta, Praha, Česká republika);  
L-glutamin (Biochrom Ltd., Cambridge, UK);  
methanol 100% (Penta, Praha, Česká republika);  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA);  
NaCl (Lachema, Brno, Česká republika);  
NaHCO<sub>3</sub> 7,5 % (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA);  
NaOH (Lachner, Neratovice, ČR);  
penicilin (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA);  
ponceau S (Sigma-aldrich, St. Louis, USA);

propidium jodid (PI) (Sigma-aldrich, St. Louis, USA);  
pyruvát sodný (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA);  
RIPA (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA);  
RNáza (Sigma-aldrich, St. Louis, USA);  
RPMI-1640 (10×) (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA);  
SDS (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA);  
standard molekulových hmotností Kaleidoscope (Bio-Rad, Hercules, USA);  
streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA);  
TEMED (Carl Roth, Karlsruhe, Německo);  
TGS (Serva, Heidelberg, Německo);  
tris (Carl Roth, Karlsruhe, Německo);  
trypanová modř 0,4% (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA);  
trypsin (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA);  
tween-20 (Serva, Heidelberg, Německo)

### **3.2 Materiál**

1,5 ml a 2 ml sterilní mikrozkušavka (Corning Inc., New York, USA);  
20 ml injekční stříkačka (B. Braun, Hessen, Německo);  
96-jamková mikrotitrační destička (Brand, Wertheim, Německo);  
96-jamková mikrotitrační destička (Orange Scientific, Braine-I'Alleud, Belgie);  
aparatura pro western blot Mini Trans-blot<sup>®</sup> Cell (Bio-Rad, Hercules, USA);  
Bürkerova komůrka (Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim v. d. Rhön, Německo);  
centrifugační zkušavka 15 ml a 50 ml (Jet Bio-Filtration Co.; Guangzhou; Čína);  
filtr s póry 0,20 µm (Corning Inc., New York, USA);  
filtrační papír pro western blot Chromatography paper 3 MM (GE Healthcare, UK);  
kádinka 250 ml (Fisher Scientific, Waltham, USA);  
nitrocelulózová membrána pro western blot Protran 0,2 µm (GE Healthcare, UK); Petriho  
miska 60 mm a 100 mm (Orange Scientific, Braine-I'Alleud, Belgie);  
plastová pipeta (Orange Scientific, Braine-I'Alleud, Belgie);  
skleněná pipeta (Brand, Wertheim, Německo);  
systém pro přípravu gelů a elektroforézu Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra Handcast System (Bio  
Rad, Hercules, USA);  
zkušavka pro FACS (Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA)

### 3.3 Přístrojové vybavení

centrifuga Eppendorf Centrifuge 5702 s rotorem A-4-38 (Eppendorf, Hamburk, Německo);  
CO<sub>2</sub> inkubátor (Nuair, Plymouth, USA);  
destilační kolona (GFL, Burgwedel, Německo);  
chlazená centrifuga Jouan BR4i s rotorem S40 či rotorem AB 1.14 (Jouan, Saint-Herblain, Francie);  
kamera Gel Logic Imaging System 4000 Pro (Carestream, Rochester, USA);  
laminární box Microbiological safety cabinet (MSC) Holten Jouan S 2010 (Jouan, Saint-Herblain, Francie);  
manuální mikropipety – biohit, eppendorf (Biohit, Göttingen, Německo; Eppendorf, Hamburk, Německo)  
minitřepačka MS2 Minishaker (IKA, Staufen, Německo);  
mrazicí box -86 °C Sanyo (Panasonic, Illinois, USA);  
inverzní mikroskop LEICA DMIL (LEICA, Wetzlar, Německo);  
pH metr InoLab s elektrodou 8102BNUWP (Thermo Scientific, Massachusetts, USA);  
pipetovací nástavec accu-jet pro (Brand, Wertheim, Německo);  
průtokový cytometr (FACS) Calibur (BD Biosciences, Heidelberg, Německo);  
překlápěcí třepačka MR-1 (BIOSAN, Riga, Lotyšsko);  
spektrofotometr (Sunrise Tecan, Männedorf, Švýcarsko),  
stolní mikrocentrifuga Combi-spin (Biosan, Riga, Litva);  
suchý termoblok MD-02 (Major Science, Saratoga, USA);  
vodní lázeň (Mettler GmbH, Schwabach, Německo);  
zdroj elektrického proudu PowerPaC HC High-Current Power Supply (Bio-Rad, Hercules, USA)

### 3.4 Komerční sady

sada pro detekci chemiluminiscence: SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminiscence Kit (Thermo Scientific, Massachusetts, USA);  
sada pro měření koncentrace proteinů: Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Massachusetts, USA)

### 3.5 Software

Carestream (verze 5.2) (Carestream, Rochester, USA);

FlowJo (verze 10) (FlowJo, LLC., Ashland, USA);

Microsoft Excel (verze 2003) (Microsoft; Washington, USA);

XRead Plus (verze V 4.20) (Sunrise Tecan, Männedorf, Švýcarsko)

### 3.6 Roztoky a média

*0,5 M tris-HCl pH 6,8:* Pro přípravu 150 ml roztoku jsme rozpustili 9,0855 g tris v cca 120 ml dH<sub>2</sub>O a pomocí HCl 35 % jsme upravili pH na hodnotu 6,8. Roztok jsme doplnili do celkového objemu 150 ml dH<sub>2</sub>O a ověřili pH. Roztok jsme skladovali při 4 °C.

*1,5 M tris-HCl pH 8,8:* Pro přípravu 200 ml roztoku jsme rozpustili 36,34 g tris v cca 180 ml dH<sub>2</sub>O a pomocí HCl 35 % jsme upravili pH na hodnotu 8,8. Roztok jsme doplnili do celkového objemu 200 ml dH<sub>2</sub>O a ověřili pH. Roztok jsme skladovali při 4 °C.

*1% roztok BSA:* 1% roztok BSA jsme získali ředěním 5% roztoku BSA v roztoku TBS v poměru 1:4. Roztok jsme krátkodobě uchovávali při 4° C.

*5% roztok BSA:* Rozpustili jsme 2 g BSA ve 40 ml roztoku TBS. Roztok jsme krátkodobě uchovávali při 4° C.

*10% roztok persíranu amonného (APS – amonium persulfate):* K přípravě 10% APS jsme rozpustili 1 g APS v 10 ml dH<sub>2</sub>O. Alikvóty roztoku jsme skladovali při -20 °C.

*10% roztok SDS:* K přípravě 10% SDS jsme rozpustili 1 g SDS v 10 ml dH<sub>2</sub>O. Roztok jsme skladovali při pokojové teplotě.

*70% roztok ethanolu:* Roztok jsme připravili smícháním 29,2 ml 96% ethanolu a 10,8 ml dH<sub>2</sub>O. Roztok jsme skladovali při 4 °C.

*Fosfátový pufr (PBS – phosphate buffered saline):* Pro přípravu 1 litru PBS jsme rozpustili 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 2,89 g NaHPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O a 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> v dH<sub>2</sub>O pro



tkáňové kultury do celkového objemu 1 litr. Připravený roztok jsme sterilizovali pomocí autoklávu a skladovali při pokojové teplotě.

*Kultivační médium:* Pro rutinní kultivaci buněčných linií jsme používali kultivační médium připravené smícháním základního média s tepelně inaktivovaným fetálním bovinním sérem (FBS) v poměru 9:1. Médium jsme krátkodobě skladovali při 4 °C.

*Kultivační médium bez 2-merkptoethanolu:* Pro přípravu 100 ml média jsme smíchali 90 ml základního média bez přidaného 2-merkptoethanolu a 10 ml FBS. Médium jsme skladovali při teplotě 4 °C.

*Kultivační médium bez 2-merkptoethanolu s 15 mM nadbytkem citrátu železitého:* Pro přípravu 100 ml média jsme smíchali 82,5 ml základního média bez přidaného 2-merkptoethanolu, 10 ml FBS a 7,5 ml 200 mM citrátu železitého. Médium jsme připravovali vždy čerstvé.

*Kultivační médium s 50 μM nadbytkem citrátu železitého:* Pro přípravu média jsme do 400 ml kultivačního média (360 ml základního média, 40 ml FBS) přidali 100 μl 200 mM roztoku citrátu železitého. Médium jsme krátkodobě skladovali při teplotě 4 °C.

*Kultivační médium se 100 μM nadbytkem citrátu železitého:* Pro přípravu média jsme do 400 ml kultivačního média (360 ml základního média, 40 ml FBS) přidali 200 μl 200 mM roztoku citrátu železitého. Médium jsme krátkodobě skladovali při teplotě 4 °C.

*Lyzační pufr:* V 17 ml RIPA pufru jsme rozpustili 2 tablety inhibitorů fosfatáz PhosSTOP a 2 tablety inhibitorů proteáz complete ULTRA mini. Alikvóty roztoku jsme skladovali při -20 °C.

*PI master mix:* Smíchali jsme 40 μl roztoku PI (1 mg/ ml), 10 μl roztoku RNázy (10 mg/ ml) a 950 μl PBS.

*Promývací roztok TBS-T:* Rozpustili jsme 0,9 ml Tween-20 v 900 ml 1× TBS.

*Roztok citrátu železitého 200 mM:* Pro přípravu 200mM zásobního roztoku citrátu železitého jsme odvážili 5400 mg  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  a 8820 mg citrátu sodného a přidali základní médium bez přidaného 2-merkptoethanolu do celkového objemu 100 ml. Po úplném rozpuštění solí jsme roztok filtrovali ve sterilních podmínkách v laminárním boxu za použití 20 ml injekční stříkačky a filtru s póry o rozměru 0,20  $\mu\text{m}$ . Zásobní roztoky citrátu železitého jsme uchovávali v 15 ml a 50 ml centrifugačních zkumavkách při teplotě 4 °C.

*Roztok Ponceau S:* Rozpustili jsme 2 mg Ponceau S ve 100 ml předem připraveného roztoku 5% kyseliny octové v  $\text{dH}_2\text{O}$ .

*Roztok trypsinu s EDTA (0,2%):* Pro přípravu 200 ml roztoku jsme rozpustili 0,4 g trypsinu a 0,04 g EDTA ve 200 ml PBS. Při laboratorní teplotě jsme 1 M roztokem NaOH upravili pH trypsinu na hodnotu 7,4. Roztok jsme sterilizovali filtrací přes filtr s póry o velikosti 0,20  $\mu\text{m}$  a skladovali při teplotě -20 °C.

*TBS (tris-buffered saline) pufr (1×):* Pro přípravu jednoho litru roztoku 1× TBS jsme smíchali 100 ml roztoku 10× TBS a 900 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ . Pomocí 35% HCl jsme upravili pH na hodnotu 7,5. Roztok jsme skladovali při 4° C.

*TBS (tris-buffered saline) pufr (10×):* Roztok jsme připravili rozpuštěním 12,14 g tris a 75,92 g NaCl v  $\text{dH}_2\text{O}$  do celkového objemu 1l. Roztok jsme skladovali při 4° C.

*Transferový pufr (1×):* Roztok jsme připravili smícháním 100 ml 10× koncentrovaného transferového pufru, 200 ml methanolu a  $\text{dH}_2\text{O}$  do celkového objemu 1l. Roztok jsme skladovali při 4° C.

*Transferový pufr (10×):* Pro přípravu 10× koncentrovaného roztoku jsme rozpustili 144 g glycinu a 30 g trisu v  $\text{dH}_2\text{O}$  do celkového objemu 1l. Roztok jsme skladovali při teplotě 4 °C.

*Tris-Glycin/SDS (TGS) elektroforetický pufr (1×):* Roztok jsme připravili smícháním 100 ml TGS (Serva, Heidelberg, Německo) s 900 ml dH<sub>2</sub>O. Roztok jsme skladovali při 4 °C.

*Vzorkový pufr (2×):* Pro přípravu vzorkového pufru jsme smíchali 2 ml 1M DTT, 0,8 ml glycerolu, 3,2 ml 10% SDS, 2 ml 0,5 M tris-HCl pH 6,8 a promíchali. Poté jsme přidali 4 mg bromfenolové modři a opět promíchali. Roztok jsme dlouhodobě skladovali při -20 °C, nebo krátkodobě při 4 °C.

*Základní médium (500 ml):* Základní médium jsme připravili smícháním chemikálií dle rozpisu v tabulce 3.1. Všechny složky byly před použitím promíchány a sterilně otevřeny. Médium jsme skladovali při 4°C po dobu max jednoho měsíce.

*Základní médium bez přidaného 2-merkptoethanolu:* Základní médium připravené dle tabulky 3.1 bez přidaného 2-merkptoethanolu.

dH <sub>2</sub> O pro tkáňové kultury	411,5 ml
RPMI-1640 (10×)	50,0 ml
200 mM L-glutamin	10,0 ml
100 mM Pyruvát sodný	5,0 ml
2,3 mM Kyselina listová	0,5 ml
Antibiotika (penicilin 6,3 mg/ml, streptomycin 10 mg/ml)	5,0 ml
7,5% NaHCO <sub>3</sub>	13,0 ml
1,5 M HEPES	5,0 ml
5 mM 2-merkptoethanol	0,5 ml

**Tabulka 3.1: Rozpis chemikálií pro přípravu 500 ml základního média.**

### 3.7 Buněčné linie

Experimenty jsme prováděli na buněčných liniích, které reprezentují dva nejvíce poškozované typy tkání při nadbytku železa v organismu, tedy s buňkami HEP-G2 reprezentujícími lidské jaterní tkáň a NES2Y reprezentujícími lidské pankreatické beta buňky. Obě buněčné linie jsou adherentní.

HEP-G2 je buněčná linie odvozená z hepatocelulárního karcinomu 15 letého argentinského chlapce. Morfologicky odpovídá jaterním parenchymálním buňkám (Aden *et al.*, 1979). Pravděpodobně se ovšem jedná o linii odvozenou z hepatoblastomu (López-Terrada *et al.*, 2009). Díky zachovalé syntéze jaterních proteinů se jedná o užitečnou buněčnou linii pro studium lidských hepatocytů (Bouma *et al.*, 1989) a to včetně studia metabolismu železa (Popovic and Templeton, 2004).

Buněčná linie NES2Y je odvozená z buněk Largenhansových ostrůvků pacienta s perzistující hyperinzulinemickou hypoglykemií (MacFarlane *et al.*, 1997). Tyto buňky konstitutivně exprimují inzulin bez odezvy na glukózu v důsledku špatné aktivity draselného kanálu (MacFarlane *et al.*, 1997). Obnovení funkce draselného kanálu v těchto buňkách vede k obnovení správné funkce těchto buněk při odpovědi na glukózu (MacFarlane *et al.*, 1999). Buňky jsou velmi snadno kultivovatelné.

## **3.8 Rozmrazování a kultivace buněčných linií**

### **3.8.1 Rozmrazování buněčných linií**

Buněčné linie byly dlouhodobě uchovávány v kultivačním médiu (viz kapitola 3.6) s přídavkem 10 % DMSO v tekutém dusíku při teplotě  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Zkumavky s buňkami jsme vyjmuli z tekutého dusíku a ihned rozmrazili ve vodní lázni při teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  tak, aby nedošlo ke kontaminaci buněk. Po rozmrazení jsme zkumavky dezinfikovali 70% ethanolem a sterilně otevřeli v laminárním boxu. Pro vyředění DMSO jsme obsah zkumavky (1 ml suspenze buněk) přenesli do 10 ml čerstvého kultivačního média připraveného v centrifugačních zkumavkách a promíchali. Sterilně uzavřené zkumavky se suspenzí buněk jsme centrifugovali při 2 500 rpm ( $959 \times g$ ) po dobu 4 minut.

Po centrifugaci a odstranění supernatantu jsme pelety obsahující živé buňky opatrně resuspendovali v 5 ml čerstvého kultivačního média a přenesli na popsané sterilní 60 mm Petriho misky. Petriho misku jsme vložili do  $\text{CO}_2$  inkubátoru ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vlhčená atmosféra s 5%  $\text{CO}_2$ ). Po 24 hodinách jsme vyměnili médium za nové. Buňky jsme poprvé pasážovali před dosažením bodu konfluence.

### **3.8.2 Kultivace buněčných linií**

Buněčné linie jsme kultivovali v inkubačním boxu při teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vysoké vzdušné vlhkosti a 5% hladině  $\text{CO}_2$ . Buňky jsme kultivovali na Petriho miskách s průměrem 60 mm a 100 mm s 5 ml, respektive s 10 ml kultivačního média a před

dosažením bodu konfluence jsme každou buněčnou linii pasážovali ve sterilních podmínkách laminárního boxu.

Při pasážování jsme z Petriho misky odsáli médium, Petriho misku s buňkami jsme opláchli 0,5 ml sterilního roztoku trypsinu s EDTA, který jsme před použitím zahřáli ve vodní lázni na teplotu 37 °C. Přidali jsme opět 0,5 ml nového roztoku trypsinu s EDTA pro rozrušení mezibuněčných spojů a fokálních adhezí a Petriho misky jsme umístili na suchý zahřívací blok (37 °C). Po uvolnění buněk do roztoku (cca 3 – 5 minut), jsme buňky resuspendovali v čerstvém kultivačním médiu a část buněk převedli na novou Petriho misku s čerstvým kultivačním médiem. V závislosti na rychlosti růstu jednotlivých buněčných linií jsme buňky ředili v poměru 1:5, 1:10 až 1:20. V závislosti na rychlosti růstu buněk jsme tuto proceduru opakovali 1 – 2× týdně. V případě potřeby jsme po 2 – 3 dnech kultivace buněk vyměnili kultivační médium za čerstvé.

### **3.9 Příprava buněk pro experimenty**

#### **3.9.1 Počítání buněk pomocí Bürkerovy komůrky**

Bürkerovu komůrku jsme používali ke stanovení koncentrace buněk v suspenzi. Před použitím jsme komůrku řádně očistili 70% roztokem ethanolu. Experimenty jsme prováděli v 96-jamkových mikrotitračních destičkách. Z jamky na 96-jamkové destičce, jsme odstranili médium a přidali 50 µl roztoku trypsinu s EDTA. Destičku jsme vložili na suchý termoblok vyhřátý na 37 °C a nechali roztok trypsinu s EDTA působit, dokud se buňky zcela neuvolnily z podkladu. Následně jsme do jamky přidali 50 µl roztoku trypanové modři, řádně promíchali a nanесли do Bürkerovy komůrky. V definovaném počtu polí komůrky jsme počítali buňky, které nebyly zbarveny do modra, tedy buňky živé.

Při zakládání experimentů jsme získaná data použili pro přepočet koncentrace buněk pro nasazení buněk na Petriho misky nebo do jamek 96-jamkové mikrotitrační destičky. Data získaná při „dose response“ experimentech a pro vytvoření růstových křivek jsme zpracovali v Programu Microsoft Excel (verze 2007), graficky znázornili průměr z několika nezávislých opakování a vynesli chybové úsečky jako hodnoty S.E.M. (z anglického standard error of the mean). Statistické vyhodnocení dat jsme provedli pomocí párového *t*-testu (Studentův *t*-test). Získané rozdíly hodnot jsme považovali za statisticky významné při hladině významnosti 5 % ( $P < 0,05$ ), respektive 0,1 % ( $P < 0,001$ ).

### 3.9.2 Vyšetí buněk pro experimenty

Při sběru buněk pro experimenty jsme postupovali stejně jako v případě pasážování (kapitola 3.8.2). Po uvolnění buněk z podkladu jsme je přenesli do sterilní centrifugační zkumavky za použití 5 – 20 ml kultivačního média. Buňky jsme řádně promíchali a část (cca 50  $\mu$ l) suspenze odebrali pro stanovení koncentrace buněk. Koncentraci buněk v roztoku jsme stanovili pomocí Bürkerovy komůrky (kapitola 3.9.1). Buňky jsme ředili na požadovanou koncentraci pro experimenty a to:  $1 \times 10^4$  buněk/ 100  $\mu$ l/ jamku 96-jamkové mikrotitrační destičky pro stanovení „dose response“ a růstových křivek (kapitola 3.10 a 3.11.3) a  $6 \times 10^5$  buněk/ 6 ml/ 60 mm Petriho misku či  $1,6 \times 10^6$  buněk/ 12 ml/ 100 mm Petriho misku pro přípravu vzorků pro western blot analýzu a analýzu buněk průtokovou cytometrií (kapitola 3.12 a 3.15). Po vyšetí byly buňky inkubovány za standardních kultivačních podmínek po dobu 24 hodin umožňující buňkám přisednutí před výměnou média za médium experimentální.

### 3.10 Experimenty odpovědi buněk na dávku – „dose response“

Namnožené buňky pro experiment jsme vyseli dle kapitoly 3.9.2 do 96-jamkových mikrotitračních destiček v koncentraci  $1 \times 10^4$  buněk/ 100  $\mu$ l/ jamku do média, ve kterém jsme je standardně kultivovali. Po 24 hodinách jsme buňkám vyměnili médium za médium experimentální: kontrola – základní médium bez přidaného 2-merkptoethanolu s 10% FBS; média s 0,5 mM až 20 mM citrátem železitým. Roztoky jsme připravili dle následující tabulky 3.2:

<b>Médium s nadbytkem citrátu železa / Rozpis pipetování roztoků</b>	
20 mM FeC	180 $\mu$ l 200 mM FeC + 180 $\mu$ l FBS + 1440 $\mu$ l média
15 mM FeC	135 $\mu$ l 200 mM FeC + 180 $\mu$ l FBS + 1485 $\mu$ l média
10 mM FeC	800 $\mu$ l 20mM FeC + 800 $\mu$ l média s 10% FBS
5 mM FeC	600 $\mu$ l 10mM FeC + 600 $\mu$ l média s 10% FBS
2 mM FeC	180 $\mu$ l 20mM FeC + 1620 $\mu$ l média s 10% FBS
1 mM FeC	800 $\mu$ l 2mM FeC + 800 $\mu$ l média s 10% FBS
0,5 mM FeC	600 $\mu$ l 1mM FeC + 600 $\mu$ l média s 10% FBS
Kontrola	1000 $\mu$ l média s 10% FBS

**Tabulka 3.2: Rozpis přípravy médií s nadbytkem citrátu železitého pro stanovení odpovědi na dávku.** Jako kontrola slouží základní médium bez přidaného 2-merkptoethanolu. *FBS = fetal bovine serum; FeC = ferric citrate*

Po 48 hodinách, respektive 96 hodinách inkubace s experimentálními médii, jsme pomocí Bürkerovy komůrky stanovili počty buněk v každé jamce s příslušnými médii.

### **3.11 Kultivace buněk s nadbytkem železa**

#### **3.11.1 Krátkodobá kultivace buněk s nadbytkem železa**

Namnožené buňky pro experiment jsme vyseli dle kapitoly 3.9.2 na 100 mm Petriho misky v koncentraci  $1,6 \times 10^6$  buněk/ 12 ml standardního kultivačního média. Po 24 hodinách jsme vyměnili médium za kultivační médium bez 2-merkptoethanolu jako kontrolu a za kultivační médium bez 2-merkptoethanolu s 15 mM nadbytkem citrátu železitého. Buňky jsme vložili do CO<sub>2</sub> inkubátoru. Po 12, 24 a 36 hodinách (buněčná linie HEP-G2), respektive 12, 24, 36 a 48 hodinách (buněčná linie NES2Y) inkubace, jsme dále postupovali dle kapitoly 3.12.

#### **3.11.2 Dlouhodobá kultivace buněk s nadbytkem železa**

Rozmrazili jsme obě buněčné linie HEP-G2 a NES2Y dle postupu popsaném v kapitole 3.8.1. V průběhu 3. – 6. pasáže jsme obě buněčné linie převedli ze standardního kultivačního média zároveň na kultivační médium s 50  $\mu$ M a 100  $\mu$ M nadbytkem citrátu železitého. Médium s 10% FBS bez nadbytku železa, s 50  $\mu$ M a 100  $\mu$ M citrátem železitým, jsme pasážovali a kultivovali za stejných podmínek. Všechny tři varianty kultivovaných buněk jsme sklízeli po 1 až 4 měsících dle kapitoly 3.12.

#### **3.11.3 Růstová křivka dlouhodobě kultivovaných buněk s nadbytkem železa**

Po pěti měsíční kultivaci jsme porovnali růstové schopnosti buněk. Každou buněčnou linii jsme vyseli dle kapitoly 3.9.2 do média, ve kterém jsme je dlouhodobě kultivovali v koncentraci  $1 \times 10^4$  buněk/ 100  $\mu$ l/ jamku. Po 24, 48 a 72 hodinách od nasazení jsme množství buněk v jamkách stanovili počítáním na Bürkerově komůrce (kapitola 3.9.1).

### **3.12 Příprava buněčných lyzátů a vzorků pro SDS-PAGE**

#### **3.12.1 Sklizení buněk a tvorba proteinových lyzátů**

Po uplynutí doby kultivace příslušného experimentu jsme v případě krátkodobé kultivace odebrali médium do 15 ml centrifugační zkumavky (kultivace na 60 mm Petriho miskách), respektive 50 ml centrifugační zkumavky (kultivace na 100 mm Petriho

miskách), která byla připravena v ledové lázni. Buňky jsme opláchli roztokem trypsinu s EDTA, přidali nový roztok trypsinu s EDTA pro rozrušení mezibuněčných spojů a fokálních adhezí a misky umístili na suchý termoblok vyhřátý na 37 °C. Po uvolnění buněk jsme je resuspendovali v PBS vychlazeném na 4 °C, přidali k médiu ve zkumavce a zkumavku doplnili PBS na 8 ml (respektive 20 ml). Suspenzi buněk jsme centrifugovali při 4 °C při 2000 rpm/ 721 × g po dobu 10 minut, slili supernatant a peletu resuspendovali v 1 ml vychlazeném PBS. Znovu jsme doplnili objem pomocí vychlazeného PBS a podruhé centrifugovali za stejných podmínek. Poté jsme peletu resuspendovali v 2 × 0,5 ml PBS, přenesli do 1,5 ml mikrozkuvek a centrifugovali při 4 °C při 8000 rpm/ 5591 × g po dobu 8 minut. Supernatant jsme odsáli do stavu suché pelety a dle velikosti pelety přidali 30 – 50 µl lyzačního pufru. Lyzovali jsme na třepačce po dobu nezbytně nutnou k narušení buněk a mikrozkuvku s lyzovanými buňkami jsme vložili minimálně na 1 hodinu do -80 °C. Po zamrazení jsme lyzát opětovně rozpustili na ledu, protřepali na třepačce a centrifugovali při 4 °C při 14000 rpm/ 17123 × g po dobu 30 minut. Supernatant obsahující rozpuštěné proteiny jsme přenesli do nové mikrozkuvky. Koncentraci proteinů jsme stanovili pomocí BCA metody a proteinové lyzáty uložili do -80 °C.

### 3.12.2 Měření koncentrace proteinů metodou BCA

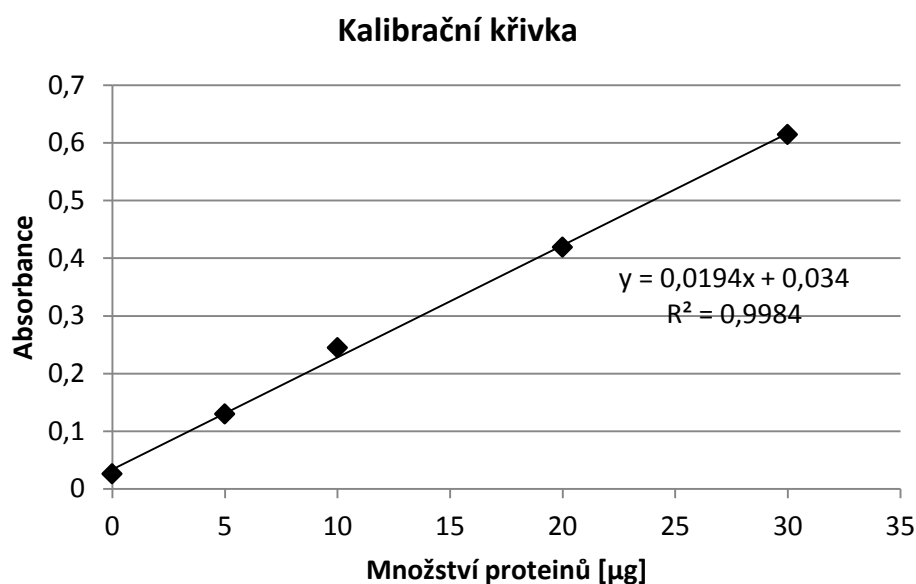
Měření koncentrace proteinů v roztoku pomocí kyseliny bicinchoninové (BCA) je standardně používaná metoda, která využívá redukci měďnatých iontů na měďné při reakci s peptidickými vazbami proteinů. Množství reakcí proporčně odpovídá množství peptidů v roztoku. Vzniklé měďné ionty jsou vázány kyselinou bicinchoninovou, čímž dochází k barevné změně na fialovou, jejíž intenzita odpovídá různé koncentraci proteinů v roztoku (Smith *et al.*, 1985).

Pro zjištění koncentrace proteinů v našich vzorcích jsme postupovali následovně. Připravili jsme vzorky pro body kalibrační křivky dle tabulky 3.3. Proteinové lyzáty jsme ředili 10×, tedy 1,5 µl lyzátu a 13,5 µl dH<sub>2</sub>O. Následně jsme k připraveným vzorkům přidali 300 µl roztoku z BCA sady (roztoky A:B smíchané v poměru 50:1), promíchali a inkubovali při 37 °C po dobu 30 minut. Po 30 minutách jsme vzorky přenesli v tripletu na 96-jamkovou mikrotitrační destičku a měřili spektrofotometrem při vlnové délce 570 nm. Na základě kalibrační křivky (příklad viz obr. 3.1) jsme počítali koncentraci proteinů v proteinových lyzátech za použití programu Microsoft Excel (verze 2007).



Množství proteinů	dH <sub>2</sub> O	BSA (2μg/μl)
0 μg	15 μl	–
5 μg	12,5 μl	2,5 μl
10 μg	10 μl	5 μl
20 μg	5 μl	10 μl
30 μg	–	15 μl

Tabulka 3.3: Rozpis pro tvorbu kalibrační křivky.



Obrázek 3.1: Příklad kalibrační křivky naměřené z reálných dat.

### 3.13 SDS-PAGE (SDS-Polyakrylamidová gelová elektroforéza)

#### 3.13.1 Příprava vzorků a provedení SDS-PAGE

Proteinové lyzáty jsme rozpustili na ledu. Dle hodnot koncentrací proteinů zjištěných BCA metodou jsme připravili vzorky tak, aby v každém bylo 15 μg proteinů. Lyzáty jsme na stejný objem ředili RIPA pufrem. Následně jsme přidali 2× koncentrovaný vzorkový pufr o stejném objemu jako byl objem naředěného vzorku. Připravené vzorky jsme řádně promíchali, krátce točili na stolní centrifuze a denaturovali v suchém termobloku při 95 °C po dobu 10 minut.

Pro přípravu gelů jsme složili aparaturu umožňující tvorbu gelů o tloušťce 1,00 mm. Dle rozpisu v tabulce 3.4 jsme připravili 12% separační gel, jemně promíchali

a ihned nanесли mezi skla aparatury 1,5 – 2 cm pod horní okraj. Roztok jsme převrstvili 70% ethanolem, aby nedocházelo k přístupu vzdušného kyslíku, který inhibuje polymeraci. Po 30 – 45 minutách, kdy byl gel zcela polymerován, jsme odstranili ethanol a dle rozpisu v tabulce 3.4 připravili 4% zaostřovací gel. Ten jsme nanесли nad separační gel a mezi skla jsme vsadili hřebínek pro tvorbu 15 jamek.

Připravené gely jsme přenesli do aparatury pro elektroforézu. Do aparatury jsme přes prostor mezi skly s gely nalili TGS elektroforetický pufr až po vyznačenou rysku. Do jedné z jamek jsme nanесли 2  $\mu$ l standardu molekulových hmotností, který byl zředěný vzorkovým pufrem a RIPA pufrem na stejný objem jako ostatní vzorky. Do zbylých jamek jsme nanесли připravené řádně promíchané vzorky. Po nanesení všech vzorků jsme k aparatuře připojili zdroj elektrického proudu. Elektroforéza proteinů probíhala při napětí 120 V. Po dokončení elektroforézy jsme gely před dalším zpracováním ekvilibrovali 15 – 20 minut v transferovém pufre.

<b>Roztok</b>	<b>12% (separační) gel</b>	<b>4% (zaostřovací) gel</b>
dH <sub>2</sub> O	2,01 ml	1,83 ml
0,5 M tris–HCl pH 6,8	–	750 $\mu$ l
1,5 M tris–HCl pH8,8	1,50 ml	–
10% SDS	60 $\mu$ l	30 $\mu$ l
30% akrylamid/bis–akrylamid	2,40 ml	399 $\mu$ l
TEMED	3 $\mu$ l	3 $\mu$ l
10% APS	30 $\mu$ l	15 $\mu$ l

**Tabulka 3.4: Složky 12% separačního a 4% zaostřovacího gelu.** Pořadí v tabulce je stejné jako při pipetování.

### 3.14 Western blot

#### 3.14.1 Provedení western blotu

Po ekvilibraci gelů se separovanými proteiny, jsme sestavili blotovací „sendvič“ v následujícím uspořádání – těsnící houbička, 2 $\times$  filtrační papír, nitrocelulózová membrána, separační gel s rozdělenými proteiny, 2 $\times$  filtrační papír, těsnící houbička. Sestavený „sendvič“ jsme uzavřeli do blotovací kazety, umístili do blotovací aparatury, přidali chladící vložku předchlazenou na -20 °C a zalili transferovým pufrem. Transfer proteinů z gelů na nitrocelulózovou membránu probíhal při proudu 250 mA po dobu 180 minut.

Po ukončení western blotu jsme proteiny navázané na membráně obarvili pomocí barvicího roztoku Ponceau S a pomocí standardu molekulových hmotností jsme nařezali membránu na části zahrnující oblast s navázanými sledovanými proteiny. Následně jsme Ponceau S vymyli v roztoku TBS-T 3× po dobu 5 minut. Po odmytí jsme membránu blokovali 5% roztokem BSA v TBS po dobu 20 – 30 minut (dle detekovaného proteinu) a přebytek blokačního agens odmyli 3× po dobu 5 minut pomocí roztoku TBS-T.

### **3.14.2 Imunodetekce proteinů**

Po blokování a promytí membrán jsme na membrány nanесли primární protilátky ředěné v 1% roztoku BSA v TBS na potřebnou koncentraci (viz tabulka 3.5). Membrány jsme s primárními protilátkami inkubovali ve vlhké komůrce při 4°C přes noc. Druhý den jsme membrány promyli 3× po dobu 5 minut roztokem TBS-T a inkubovali při pokojové teplotě 2 hodiny s příslušnými sekundárními protilátkami za konstantního kývání. Sekundární protilátky jsme rovněž naředili v 1% roztoku BSA v TBS (viz tabulka 6). Po 2 hodinách inkubace jsme membrány opět promyli 3× po dobu 5 minut roztokem TBS-T.

Pro vývoj signálu jsme smíchali luminol a peroxid vodíku z chemiluminiscenční sady (SuperSignal® West Pico Chemiluminescence Kit) v poměru 1:1 a nanесли na membránu. Díky reakci s křenovou peroxidázou navázanou na sekundární protilátce došlo k emisi signálu, který jsme zaznamenali pomocí kamery Gel Logic Imaging Systém 4000 Pro s programem Carestream (verze 5.2). Doba expozice závisela na intenzitě signálu.

## **3.15 Průtoková cytometrie**

Dlouhodobě kultivované buňky (kapitola 3.11) jsme sklízeli dle postupu 3.7.2. Po promytí chlazeným PBS jsme buňky resuspendovali v 1 ml vychlazeném PBS a odebrali 100 µl roztoku s buňkami (cca  $5 \times 10^5$  buněk) do 1 ml ledově vychlazeného 70% ethanolu (-20 °C) ve FACS zkumavkách. Tyto buňky jsme opatrně třepali a postupně přidali další 1 ml 70% ledově vychlazeného ethanolu. Buňky jsme fixovali při teplotě 4 °C minimálně jednu hodinu. Před měřením jsme buňky v ethanolu centrifugovali 2000 rpm/ 721 × g při 4 °C po dobu 10 minut, promyli v 1 ml chlazeného PBS a opět centrifugovali při stejném nastavení. Následně jsme buňky resuspendovali v roztoku 500 µl PI master mixu a inkubovali 40 minut při 37 °C ve tmě v inkubátoru. Obsah DNA v buňkách jsme analyzovali pomocí průtokového cytometru měřením na kanálu FL-2 a zpracovali programem FlowJo vz. 10.

<b>Primární profilátka</b>	<b>typ</b>	<b>Hostitelský organismus</b>	<b>katalogové číslo</b>	<b>výrobce</b>	<b>ředění</b>
Anti-Actin	Monoklonální	Myš	A3853	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA	1:1000
Anti-Caspase-2	Monoklonální	Králík	ab32021	Abcam, Cambridge, UK	1:500
Anti-Cleaved Caspase-2	Polyklonální	Králík	GTX86954	GeneTex, Irvine, USA	1:300
Anti-Caspase-3	Polyklonální	Králík	#9662	Cell Signaling Technology®, Danvers MA, USA	1:500
Anti-Cleaved Caspase-3	Polyklonální	Králík	#9661	Cell Signaling Technology®, Danvers MA, USA	1:500
Anti-Caspase-6	Polyklonální	Králík	#9762	Cell Signaling Technology®, Danvers MA, USA	1:500
Anti-Cleaved Caspase-6	Polyklonální	Králík	#9761	Cell Signaling Technology®, Danvers MA, USA	1:500
Anti-Caspase-7	Polyklonální	Králík	#9492	Cell Signaling Technology®, Danvers MA, USA	1:500
Anti-Cleaved Caspase-7	Polyklonální	Králík	#9491	Cell Signaling Technology®, Danvers MA, USA	1:500
Anti-Caspase-8	Monoklonální	Myš	#9746	Cell Signaling Technology®, Danvers MA, USA	1:500
Anti-Cleaved Caspase-8	Monoklonální	Králík	#9496	Cell Signaling Technology®, Danvers MA, USA	1:500
Anti-Caspase-9	Polyklonální	Králík	#9502	Cell Signaling Technology®, Danvers MA, USA	1:500
Anti-Cleaved Caspase-9	Polyklonální	Králík	#9505	Cell Signaling Technology®, Danvers MA, USA	1:500
Anti-BiP	Králík	Králík	#3177	Cell Signaling Technology®, Danvers MA, USA	1:500
Anti-Calnexin	Monoklonální	Králík	#2679	Cell Signaling Technology®, Danvers MA, USA	1:500
Anti-Ero 1- $\alpha$	Polyklonální	Králík	#3264	Cell Signaling Technology®, Danvers MA, USA	1:500
Anti-IRE1 $\alpha$	Králík	Králík	#3294	Cell Signaling Technology®, Danvers MA, USA	1:500
Anti-pIRE1 $\alpha$ (phospho S724)	Polyklonální	Králík	ab48187	Abcam, Cambridge, UK	1:500
anti-PDI	Monoklonální	Králík	#3501	Cell Signaling Technology®, Danvers MA, USA	1:500
anti-CHOP	Monoklonální	Myš	#2895	Cell Signaling Technology®, Danvers MA, USA	1:300
anti-PERK	Monoklonální	Králík	#5683	Cell Signaling Technology®, Danvers MA, USA	1:500
Anti-pelf2 $\alpha$ (phospho Ser51)	Polyklonální	Králík	#9721	Cell Signaling Technology®, Danvers MA, USA	1:1000

**Tabulka 3.5: Přehled používaných primárních profilátok při imunodetekce (část 1).**

Primární profílátka	typ	Hostitelský organismus	katalogové číslo	výrobce	ředění
Anti-SLC11A2 (DMT1)	Polyklonální	Králík	SAB210216 <sup>4</sup>	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA	1:300
Anti-IRP1	Monoklonální	Králík	ab126595	Abcam, Cambridge, UK	1:500
Anti-IREB2/IRP2	Polyklonální	Králík	ab80339	Abcam, Cambridge, UK	1:500
Anti-TfR1	Polyklonální	Králík	ab84036	Abcam, Cambridge, UK	1:500
Anti-SLC40A1 (Ferroportin)	Polyklonální	Králík	ab85370	Abcam, Cambridge, UK	1:500
Anti-FTL	Polyklonální	Králík	F8556	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA	1:1000
Anti-LC3B	Polyklonální	Králík	#2775	Cell Signaling Technology®, Danvers MA, USA	1:500
Anti-p62	Monoklonální	Králík	ab109012	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
Anti-mTOR	Polyklonální	Králík	T2949	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA	1:500
Anti-HIF1 $\alpha$	Polyklonální	Myš	ab16066	Abcam, Cambridge, UK	1:500
Anti-HIF2 $\alpha$	Polyklonální	Králík	E5408	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA	1:500
Anti-Glutathione Reductase	Polyklonální	Králík	ab16801	Abcam, Cambridge, UK	1:500
Anti-SOD1	Monoklonální	Králík	ab51254	Abcam, Cambridge, UK	1:500
Anti-SOD2					1:500

Tabulka 3.5: Přehled používaných primárních profíláték při imunodetekce (část 2).

Sekundární profílátka	typ	Hostitelský organismus	katalogové číslo	výrobce	ředění
Anti-rabbit IgG, HRP-linked		Koza	#7074	Cell Signaling Technology®, Danvers MA, USA	1:5000
Anti-mouse IgG, HRP-linked		Kůň	#7076	Cell Signaling Technology®, Danvers MA, USA	1:5000

Tabulka 3.6: Přehled používaných sekundárních profíláték při imunodetekci.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Krátkodobá kultivace buněk s vysokými koncentracemi citrátu železitého

Cílem této části diplomové práce bylo určit vliv vysokého nadbytku železa na buněčné procesy, zejména oxidativní stres, stres endoplasmatického retikula, autofagii či apoptózu. Pro studium zmíněných procesů jsme vytvořili buněčný model krátkodobého působení vysokých dávek železa u lidských buněčných linií jaterních buněk HEP-G2 a beta buněk NES2Y. Použili jsme takové koncentrace citrátu železitého, které u obou linií způsobují snížení počtu buněk pod inokulum v horizontu 96 hodin od jejich ošetření. Pro ověření správnosti vytvořeného buněčného modelu s akutním přetížením železem jsme sledovali hladiny vybraných proteinů účastnících se homeostáze železa.

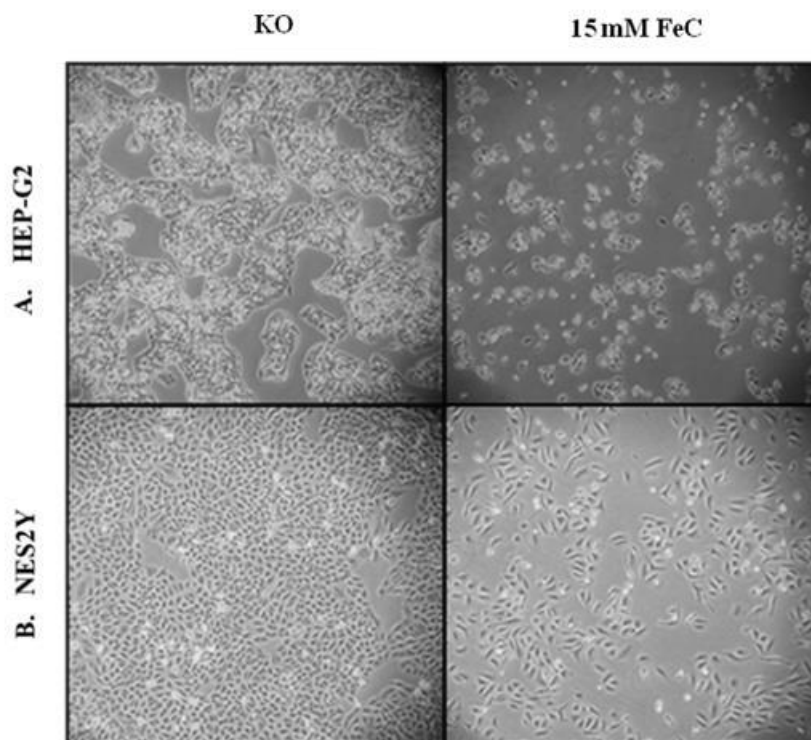
#### 4.1.1 Vliv krátkodobého nadbytku železa na růst a přežívání buněk

Buňky linií HEP-G2 a NES2Y, jsme vyseli na 96-jamkovou mikrotitrační destičku v koncentraci  $1 \times 10^4$  buněk/ jamku v celkovém objemu 100  $\mu$ l kultivačního média. Po 24 hodinách umožňujících buňkám přisednutí jsme kultivační médium vyměnili za 100  $\mu$ l kultivačního média bez merkaptoethanolu obsahující navíc 0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 5 mM; 10 mM; 15 mM či 20 mM citrát železitý. Kontrolní buňky byly kultivovány v kultivačním médiu bez merkaptoethanolu bez přidaného citrátu železitého. Pomocí Bürkerovy komůrky jsme stanovili počet živých buněk 48 hodin, respektive 96 hodin po aplikaci citrátu železitého. Hodnoty počítání jsme zanesli do grafu jako průměr všech nezávislých biologických opakování  $\pm$  S.E.M. (graf 4.1).

U obou buněčných linií jsme pozorovali snížené množství buněk po aplikaci nadbytku citrátu železitého oproti kontrole, které se projevovalo již po 48 hodinách kultivace. U buněčné linie HEP-G2 docházelo k poklesu v počtu buněk již u nejnižší použité koncentrace citrátu železitého (0,5 mM), u buněčné linie NES2Y při koncentracích vyšších než 1 mM citrát železitý. Při nadbytku citrátu železitého o koncentraci 10 mM, 15 mM a 20 mM docházelo u buněčné linie HEP-G2 ke snížení počtu buněk pod inokulum v 48 i 96 hodinách po aplikaci. Stejný efekt jsme zaznamenali u buněčné linie NES2Y, u které docházelo ke snížení počtu buněk pod inokulum při působení citrátu železitého o koncentraci 15 mM a 20 mM. U obou buněčných linií jsme pozorovali v 96 hodinách od aplikace citrátu železitého o koncentraci 20 mM smrt všech (HEP-G2) či téměř všech (NES2Y) buněk. Pro následné experimenty s nadbytkem citrátu železitého jsme na základě

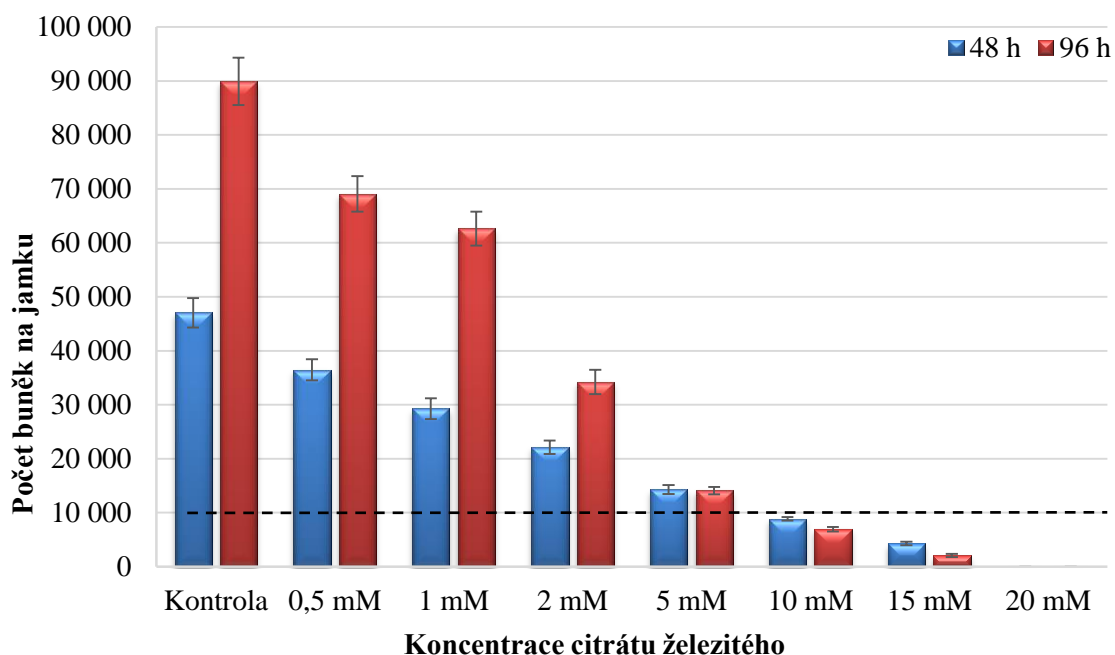
těchto výsledků zvolili koncentraci 15 mM citrát železitý v médiu pro kultivaci obou buněčných linií. Tato koncentrace vedla u obou linií ke snížení množství buněk pod inokulum již ve 48 hodinách po aplikaci.

Efekt 15 mM citrátu železitého na proliferaci buněk HEP-G2 a NES2Y 48 hodin po ošetření ve srovnání s kontrolou je zachycen na obr. 4.1. Množství buněk po 48 hodinách působení 15 mM citrátu železitého je výrazně nižší než u buněk kontrolních.

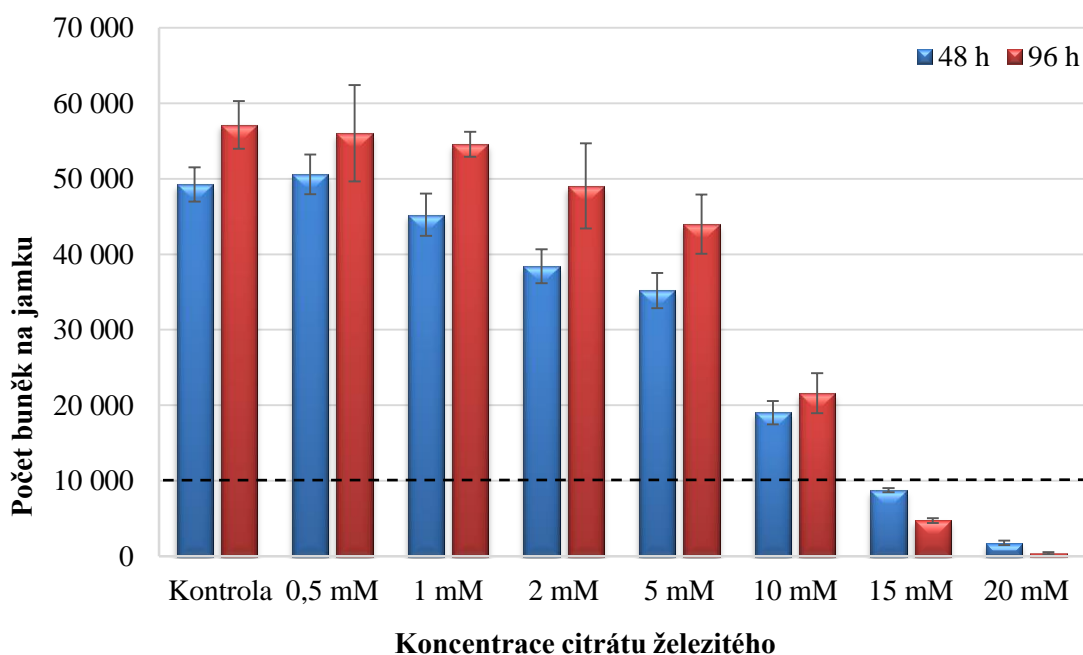


**Obrázek 4.1: Buňky linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B) po 48 hodinách od aplikace 15 mM citrátu železitého.** Buňky linií HEP-G2 (B) a NES2Y (A) jsme vyseli na 60 mm Petriho misky v koncentracích  $6 \times 10^5$ / 6 ml do standardního kultivačního média. Po 24 hodinách jsme médium vyměnili za kultivační médium bez merkaptoethanolu s 15 mM nadbytkem citrátu železitého (15mM FeC) a bez přidaného citrátu železitého (Kontrola – KO). V čase 48 hodin po výměně médií jsme aktuální stav buněk vyfotili fotoaparátem Canon PowerShot G9 připojeným k inverznímu mikroskopu. *FeC = ferric citrate*

### A. HEP-G2



### B. NES2Y



**Graf 4.1: Růst a přežívání buněk linií HEP-G2 (A) a NES2Y (B) v závislosti na dávce citrátu železitého („dose response“).** Buňky jsme vyseli do sterilní 96-jamkové mikrotitrační destičky v koncentraci  $1 \times 10^4$  buněk/ 100  $\mu$ l/ jamku. Po 24 hodinách umožňujících přisednutí buněk jsme na buňky aplikovali citrát železitý o koncentracích 0,5; 1; 2; 5; 10; 15 a 20 mM v základním médiu bez přidaného merkaptoethanolu. Kontrolní médium neobsahovalo žádný přidaný citrát železitý. Ve 48 a 96 hodin od aplikace jsme za pomoci Bürkerovy komůrky stanovili množství živých buněk na jamku. Prerušovaná čára představuje inokulum. Výsledky jsou prezentovány jako průměr výsledků z min. čtyř nezávislých měření  $\pm$  S.E.M.



#### **4.1.2 Vliv krátkodobého nadbytku železa na hladiny vybraných proteinů homeostáze železa**

Pro ověření správnosti vytvořeného modelu buněk s přetížením železem jsme metodou western blot a imunodetekce sledovali vliv 15 mM citrátu železitého na hladiny vybraných proteinů homeostáze železa u linií HEP-G2 a NES2Y. Sledovali jsme proteiny účastníci se regulace vnitřní homeostáze železa – IRP1 a IRP2 (iron regulatory protein 1, 2), proteiny účastníci se transportu železa přes membránu – DMT1 (divalent metal transporter 1), transferrinový receptor 1 (TfR1), ferroportin a protein účastníci se intracelulárního skladování železa – ferritin, lehký řetězec.

U obou buněčných linií jsme detekovali pokles hladin proteinů IRP1, IRP2 a TfR1. Stejně tak jsme pozorovali u obou buněčných linií 12 hodin po aplikaci nadbytku železa snižování hladiny importéru železnatých kationtů DMT1 (obr. 4.2) a u linie NES2Y růst hladiny železnatého exportéru ferroportinu, jehož exprese se zvyšovala s časem po aplikaci nadbytku železa (obr. 4.2 B). Naproti tomu u buněčné linie HEP-G2 docházelo u ferroportinu k poklesu jeho hladiny (obr. 4.2 A).

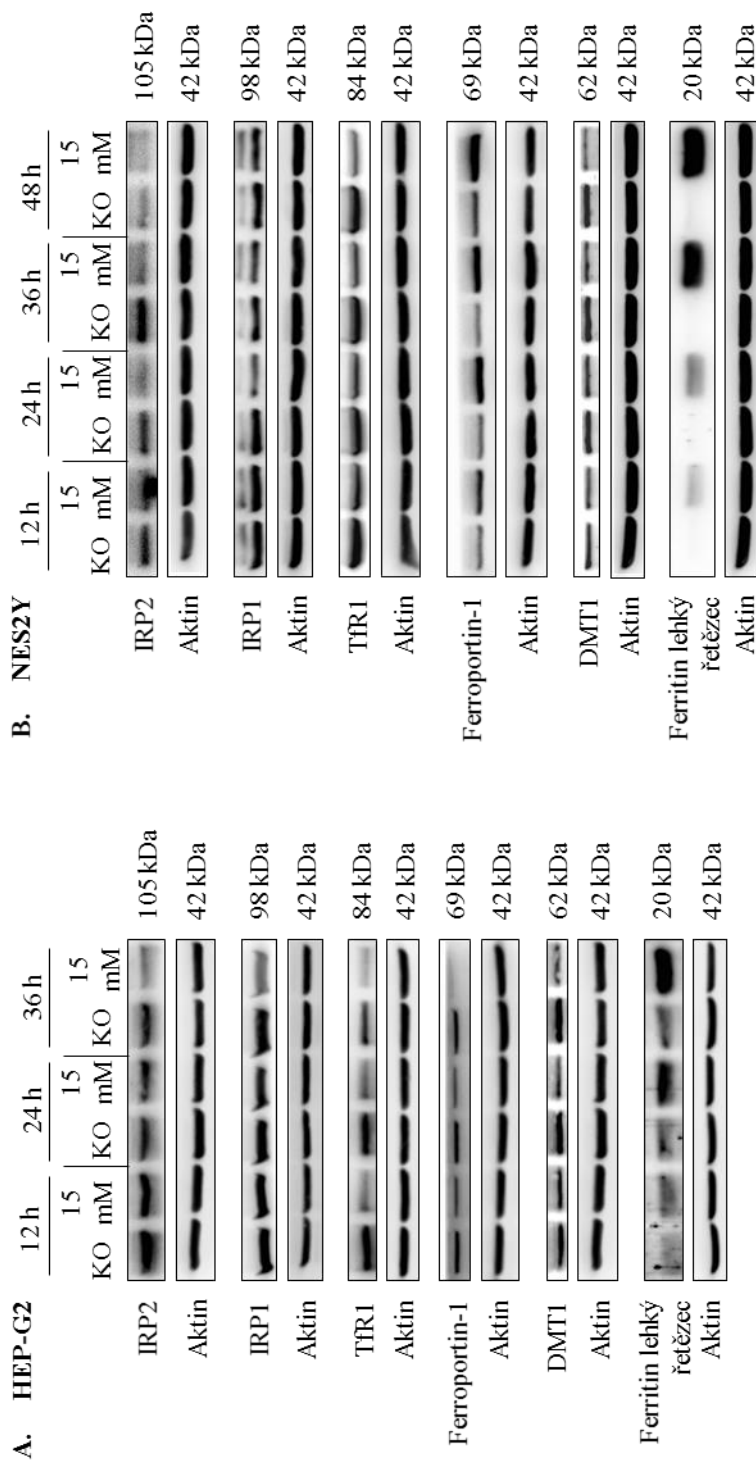
#### **4.1.3 Vliv krátkodobého nadbytku železa na hladiny vybraných proteinů účastníci se odpovědi na oxidativní stres**

Testovali jsme proteiny účastníci se ochrany buňky před vlivy oxidativního stresu – SOD1 a SOD2 (superoxide dismutase 1/2), glutathion reduktázu, a proteiny HIF1 $\alpha$  a HIF2 $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ /2 $\alpha$ ).

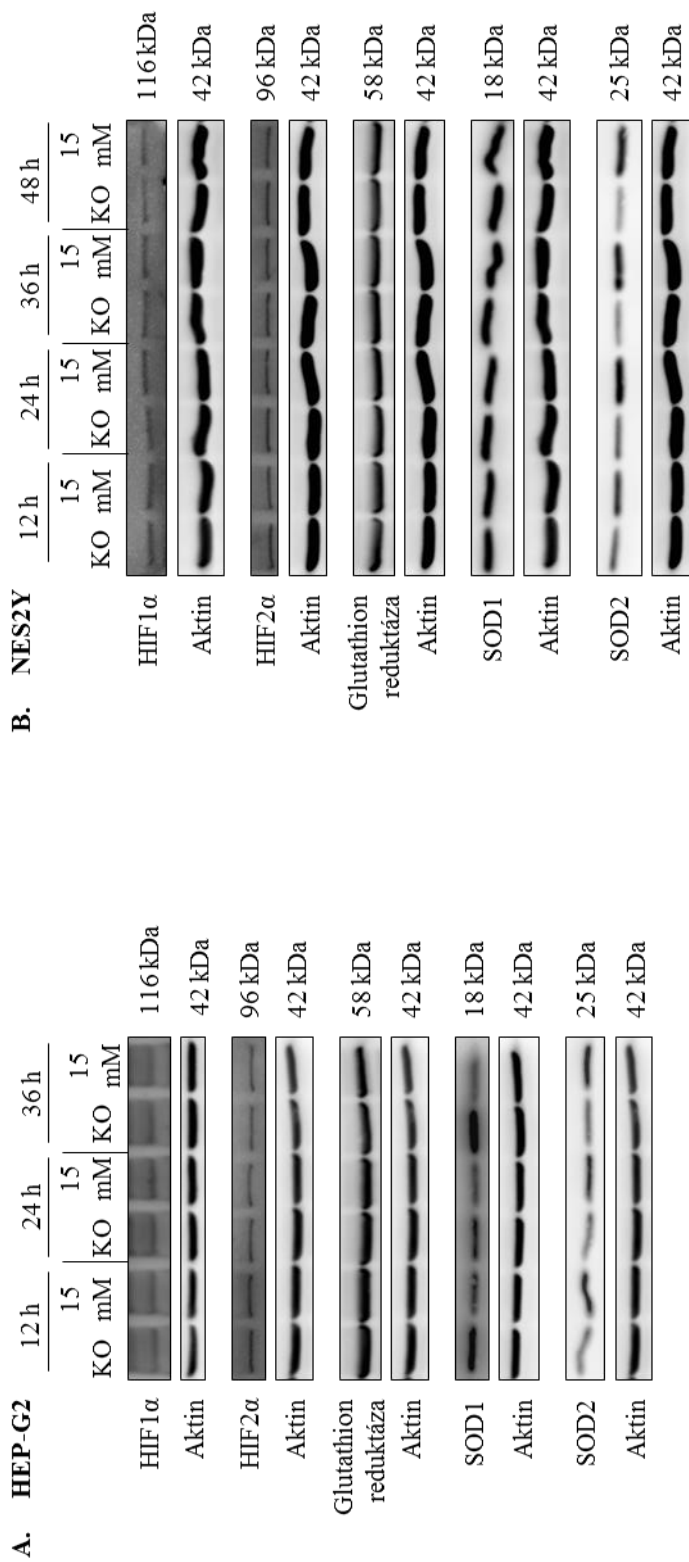
Během kultivace buněk v 15 mM nadbytku železa nedocházelo ke změně hladin proteinů HIF1 $\alpha$  nebo HIF2 $\alpha$  ani glutathion reduktázy. U obou buněčných linií jsme však pozorovali zvyšující se hladiny proteinu SOD2 (obr. 4.3). Hladina proteinu SOD1 v případě linie HEP-G2 v čase klesala, u linie NES2Y se s časem neměnila (obr. 4.3).

#### **4.1.4 Vliv krátkodobého nadbytku železa na hladiny vybraných proteinů účastnících se stresu endoplasmatického retikula**

Prostřednictvím metody western blot a imunodetekce markerů stresu endoplasmatického retikula (stresu ER) jsme sledovali přítomnost stresu ER v buňkách po aplikaci 15 mM citrátu železitého u buněčných linií HEP-G2 a NES2Y v řádu hodin. Mezi sledované molekuly patřily proteiny PERK (RNA dependent protein kinase (PKR) like ER kinase), IRE1 $\alpha$  (inositol requiring protein 1 $\alpha$ ), p-IRE1 $\alpha$  (fosfo Ser724), Kalnexin, BiP (binding immunoglobulin protein), Ero1-L $\alpha$  (ER oxidoreductase 1 L $\alpha$ ), PDI



**Obrázek 4.2: Vliv 15 mM citrátu železitého na hladiny proteinů účastnících se homeostáze železa u buněčné linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B).** Metodou western blotu a imunodetekce jsme sledovali expresi vybraných proteinů účastnících se homeostáze železa ve 12, 24 a 36 hodinách (HEP-G2 – A), respektive ve 12, 24, 36 a 48 hodinách (NES2Y – B) po aplikaci 15 mM citrátu železitého v kultivačním médiu bez merkaptioethanolu. Kontrolní buňky (KO) jsme kultivovali ve stejném médiu bez přidaného citrátu železitého. Aktin slouží jako kontrola proteinové nanášky. Ukázán je reprezentativní výsledek ze tří nezávislých experimentů. *IRP1* = iron regulatory protein 1; *IRP2* = iron regulatory protein 2; *TFR1* = transferrin receptor 1; *DMT1* = divalent metal transporter 1



**Obrázek 4.3: Vliv 15 mM citrátu železitého na hladiny vybraných proteinů účastnících se odpovědi na oxidativní stres u buněčné linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B).** Metodou western blotu a imunodekce jsme sledovali expresi vybraných proteinů účastnících se odpovědi na oxidativní stres na proteinové úrovni ve 12, 24 a 36 hodinách (HEP-G2 – A), respektive 12, 24, 36 a 48 hodinách (NES2Y – B) po aplikaci 15 mM citrátu železitého v kultivačním médiu bez merkaptoethanolu. Kontrolní buňky (KO) jsme kultivovali ve stejném médiu bez nadbytku železa. Aktin slouží jako kontrola nanášky. Ukázán je reprezentativní výsledek ze tří nezávislých experimentů. HIF1 $\alpha$  = hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ ; HIF2 $\alpha$  = hypoxia inducible factor 2 $\alpha$ ; SOD1 = superoxide dismutase 1; SOD2 = superoxide dismutase 2

(protein disulfid isomerase), CHOP (CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein) a fosforylovaná forma iniciačního faktoru p-eIF2 $\alpha$  (eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ , fosfo Ser51).

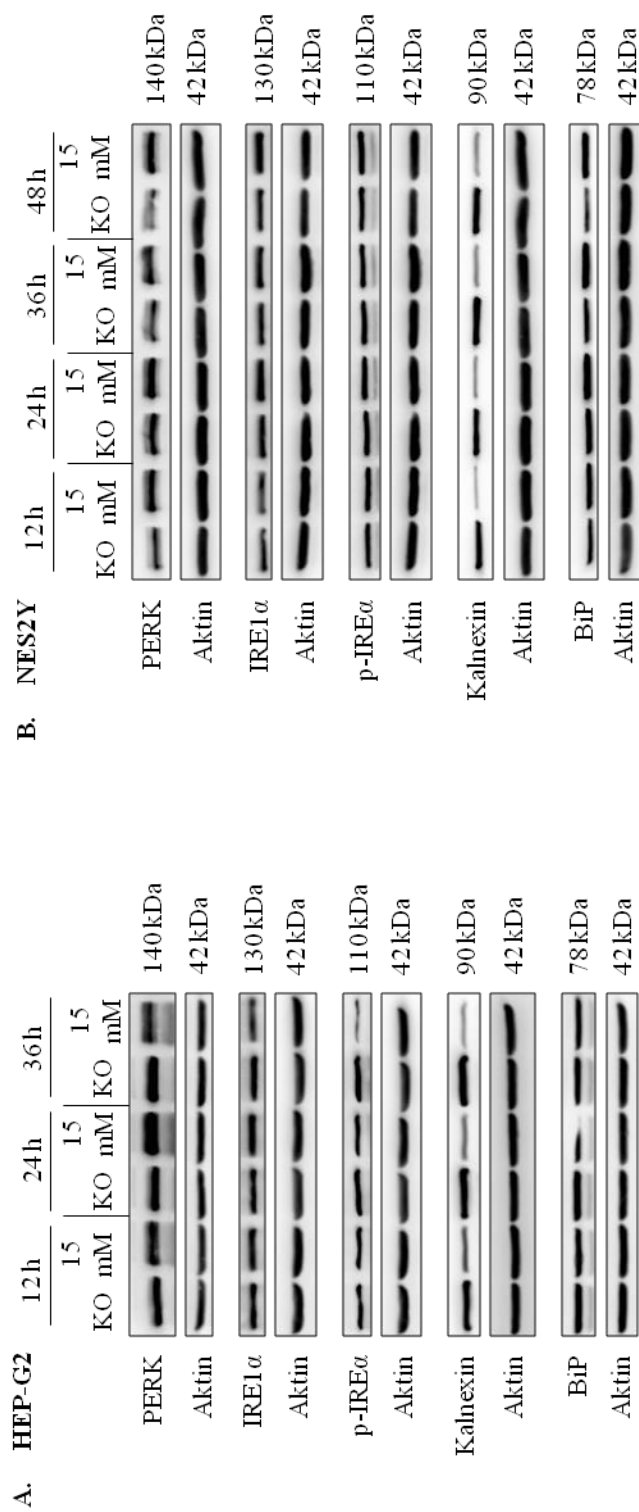
U buněčné linie HEP-G2 jsme pozorovali po ošetření buněk 15 mM citrátem železitým výrazný nárůst hladiny proteinu PERK a mírnější nárůst u proteinu IRE1 $\alpha$  (obr. 4.4 A). Dále jsme pozorovali mírně klesající hladinu fosforylované formy proteinu IRE1 $\alpha$  36 hodin po ošetření. Po aplikaci 15 mM citrátu železitého docházelo u linie NES2Y ke zvýšení hladiny obou proteinů oproti kontrole (obr. 4.4 B).

U obou linií docházelo k výraznému poklesu hladin proteinu kalnexinu a to již 12 hodin po aplikaci 15 mM citrátu železitého (obr. 4.4), hladina proteinu BiP mírně stoupala u linie NES2Y (obr. 4.4 B), u linie HEP-G2 zůstávala beze změny (obr. 4.4 A). Protein Ero1-L $\alpha$  v průběhu času klesal oproti kontrole u linie NES2Y (obr. 4.5 B), u linie HEP-G2 (obr. 4.5 A) jsme nepozorovali žádné změny v jeho expresi. U proteinu PDI, který je zpětně oxidován proteinem Ero1-L $\alpha$ , nedocházelo ani u jedné z linií ke změně hladiny v důsledku nadbytku železa. Již 12 hodin po ošetření 15 mM citrátem železitým jsme sledovali u obou buněčných linií výrazně stoupající hladinu fosforylované formy eukaryotického iniciačního faktoru 2 $\alpha$  (obr. 4.5), která u linie HEP-G2 rostla s časem. U obou buněčných linií jsme po 36 hodinách detekovali vyšší hladinu transkripčního faktoru CHOP (obr. 4.5).

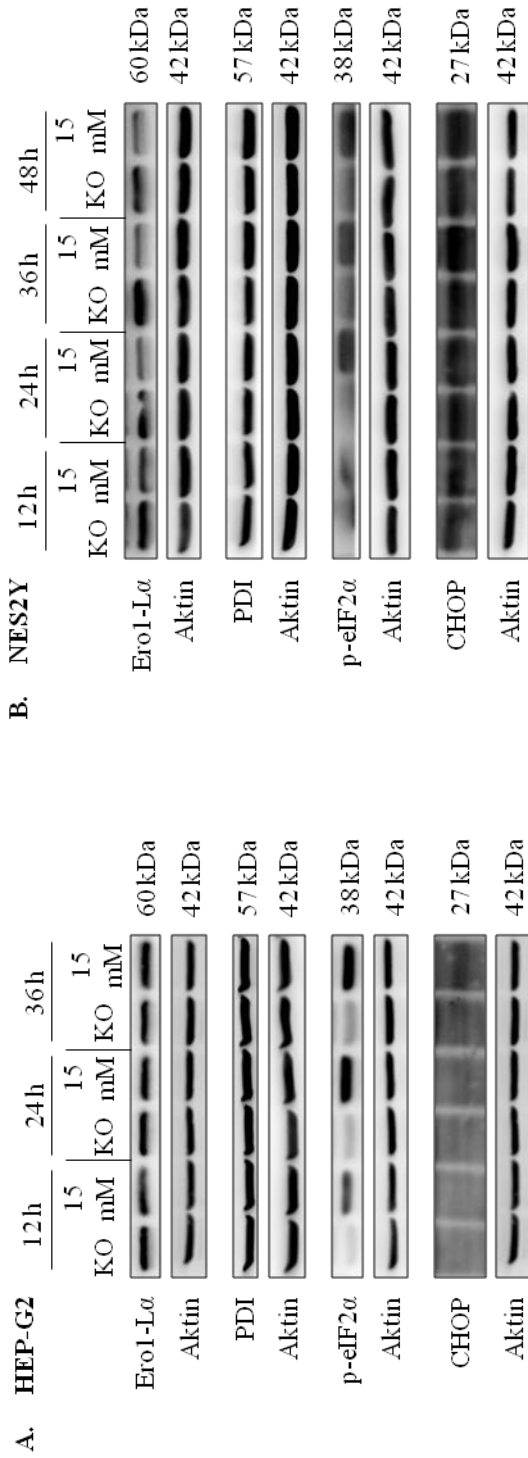
#### **4.1.5 Vliv krátkodobého nadbytku železa na přítomnost autofagie**

Přítomnost autofagie v buňkách po ošetření 15 mM citrátem železitým jsme stanovili prostřednictvím sledování exprese vybraných proteinů metodou western blot a imunodetekce. Analyzovanými proteiny autofagie byly mTOR (mammalian target of rapamycin), protein p62 a protein LC3B (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 B).

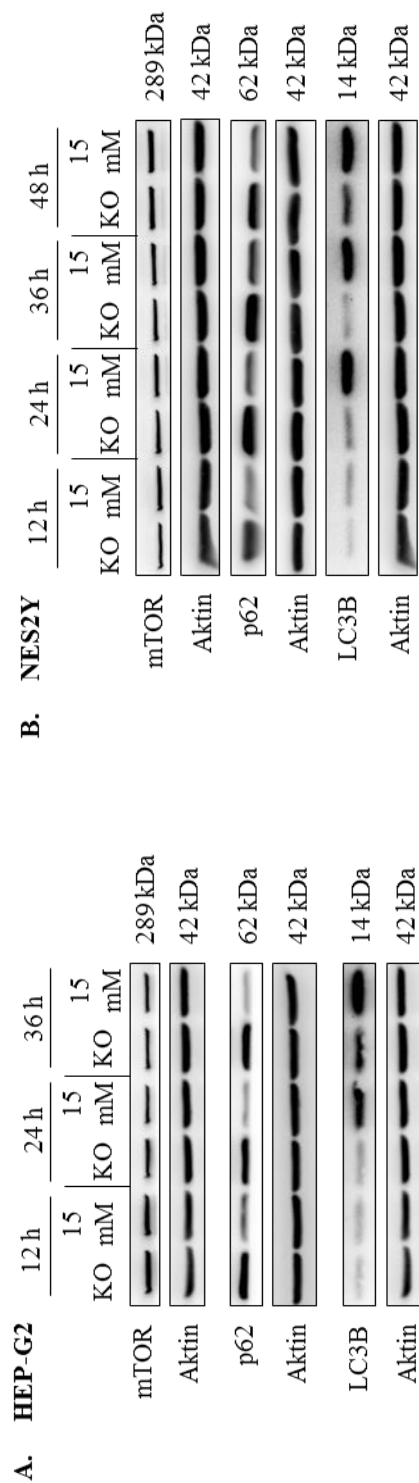
U buněčné linie HEP-G2 i NES2Y jsme zaznamenali již po 12 hodinách od aplikace 15 mM citrátu železitého snížení hladiny proteinu p62, která s postupujícím časem dále klesala. Stejně tak u obou sledovaných linií docházelo po 24 hodinách k nárůstu hladiny proteinu LC3B. Ani u jedné buněčné linie jsme nepozorovali žádné změny v hladině proteinu mTOR (obr. 4.6).



**Obrázek 4.4: Vliv 15 mM citrátu železitého na hladiny proteinů účastnících se stresu endoplasmatického retikula u buněčné linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B).** Metodou western blotu a imunodetekce jsme sledovali expresi proteinů účastnících se stresu endoplasmatického retikula na proteinové úrovni ve 12, 24 a 36 hodinách (HEP-G2 – A), respektive ve 12, 24, 36 a 48 hodinách (NES2Y – B) po aplikaci 15 mM citrátu železitého v kultivačním médiu bez merkaptoethanolu. Kontrolní buňky (KO) jsme kultivovali ve stejném médiu bez přidaného citrátu železitého. Aktin slouží jako kontrola proteinové nanašky. Ukázán je reprezentativní výsledek ze tří nezávislých experimentů. PERK = RNA dependent protein kinase (PKR); IRE1 $\alpha$  = inositol requiring protein 1 $\alpha$ ; p-IRE1 $\alpha$  = fosforylated IRE1 $\alpha$ ; BiP = binding immunoglobulin protein



**Obrázek 4.5: Vliv 15 mM citrátu železitého na hladiny proteinů účastnících se stresu endoplasmatického retikula u buněčné linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B).** Metodou western blotu a imunodetekce jsme sledovali expresi proteinů účastnících se stresu endoplasmatického retikula na proteinové úrovni ve 12, 24 a 36 hodinách (HEP-G2 – A), respektive ve 12, 24, 36 a 48 hodinách (NES2Y – B) po aplikaci 15 mM citrátu železitého v kultivačním médiu bez merkaptoethanolu. Kontrolní buňky (KO) jsme kultivovali ve stejném médiu bez přidaného citrátu železitého. Aktin slouží jako kontrola proteinové nanášky. Ukázán je reprezentativní výsledek ze tří nezávislých experimentů. *Ero1-L $\alpha$*  = *ER oxidoreductase 1*; *PDI* = *protein disulfide isomerase*; *p-eIF2 $\alpha$*  = *phosphorylated eukaryotic initiation factor 2*; *CHOP* = *CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein*



**Obrázek 4.6: Vliv 15 mM citrátu železitého na hladiny proteinů účastnících se signalizace autofagie u buněčné linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B).** Metodou western blotu a imunodetekce jsme sledovali expresi vybraných proteinů účastnících se signalizace autofagie ve 12, 24 a 36 hodinách (HEP-G2 – A), respektive 12, 24, 36 a 48 hodinách (NES2Y – B) po aplikaci 15 mM citrátu železitého v kultivačním médiu bez merkaptioethanolu. Kontrolní buňky (KO) jsme kultivovali ve stejném médiu bez přidaného citrátu železitého. Aktin slouží jako kontrola proteinové nanášky. Ukázán je reprezentativní výsledek ze dvou nezávislých experimentů. *mTOR* = mammalian target of rapamycin; *LC3B* = microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 B

#### **4.1.6 Vliv krátkodobého nadbytku železa na aktivaci apoptózy**

Aktivaci apoptotické buněčné smrti po aplikaci 15 mM citrátu železitého jsme sledovali u buněčných linií HEP-G2 a NES2Y na základě aktivace iniciačních a exekučních kaspáz. Přítomnost štěpených forem, a tedy aktivaci kaspáz, jsme sledovali na úrovni proteinů pomocí metody western blot a imunodetekce specifickými primárními protilátkami v čase 12, 24 a 36 hodin po aplikaci 15 mM citrátu železitého u buněčné linie HEP-G2, respektive 12, 24, 36 a 48 hodin u buněčné linie NES2Y.

Sledovali jsme hladiny iniciačních kaspáz – kaspázy-2, kaspázy-8 a kaspázy-9 a jejich štěpených forem a hladiny exekučních kaspáz – kaspázy-3, kaspázy-6 a kaspázy-7 a jejich štěpených forem.

##### **4.1.6.1 Vliv krátkodobého nadbytku železa na aktivaci iniciačních kaspáz**

U buněčné linie HEP-G2 docházelo u všech zkoumaných iniciačních kaspáz (tj. kaspáza-2, -8, -9) ke snížení hladiny celých forem proteinů oproti kontrole již ve 12 hodinách po aplikaci vysokého nadbytku železa (obr. 4.7 A). Hladiny sledovaných celých forem iniciačních kaspáz klesaly v čase. Ve 36 hodinách po aplikaci vysokých hladin železa byla jejich hladina nejnižší. Hladina štěpené formy kaspázy-8 byla oproti kontrole nejvyšší ve 12 hodinách, následně tato forma klesala pravděpodobně v důsledku dalšího štěpení. Dále jsme detekovali štěp kaspázy-2 (obr. 4.7 A) jehož množství se s časem zvyšovalo. Štěp kaspázy-9 se nám zvolenou metodou nepodařilo detekovat v žádném z experimentálních opakování.

U buněčné linie NES2Y docházelo již ve 12 hodinách po aplikaci vysokého nadbytku železa ke snížení hladiny iniciační kaspázy-2 a kaspázy-8 oproti kontrole (obr. 4.7 B). Hladina kaspázy-2 klesala v čase a ve 48 hodinách byla nejnižší. Po 12 hodinách jsme zároveň detekovali její štěpenou formu. Hladina kaspázy-8 se vůči kontrole snižovala již od 12 hodin po aplikaci 15 mM citrátu železitého. Detekovali jsme i štěpenou formu kaspázy-8. Hladina kaspázy-9 se v horizontu 48 hodin po aplikaci železa neměnila (obr. 4.7 B). Štěpy kaspázy-9 se nám zvolenou metodou nepodařilo detekovat v žádném z experimentálních opakování.

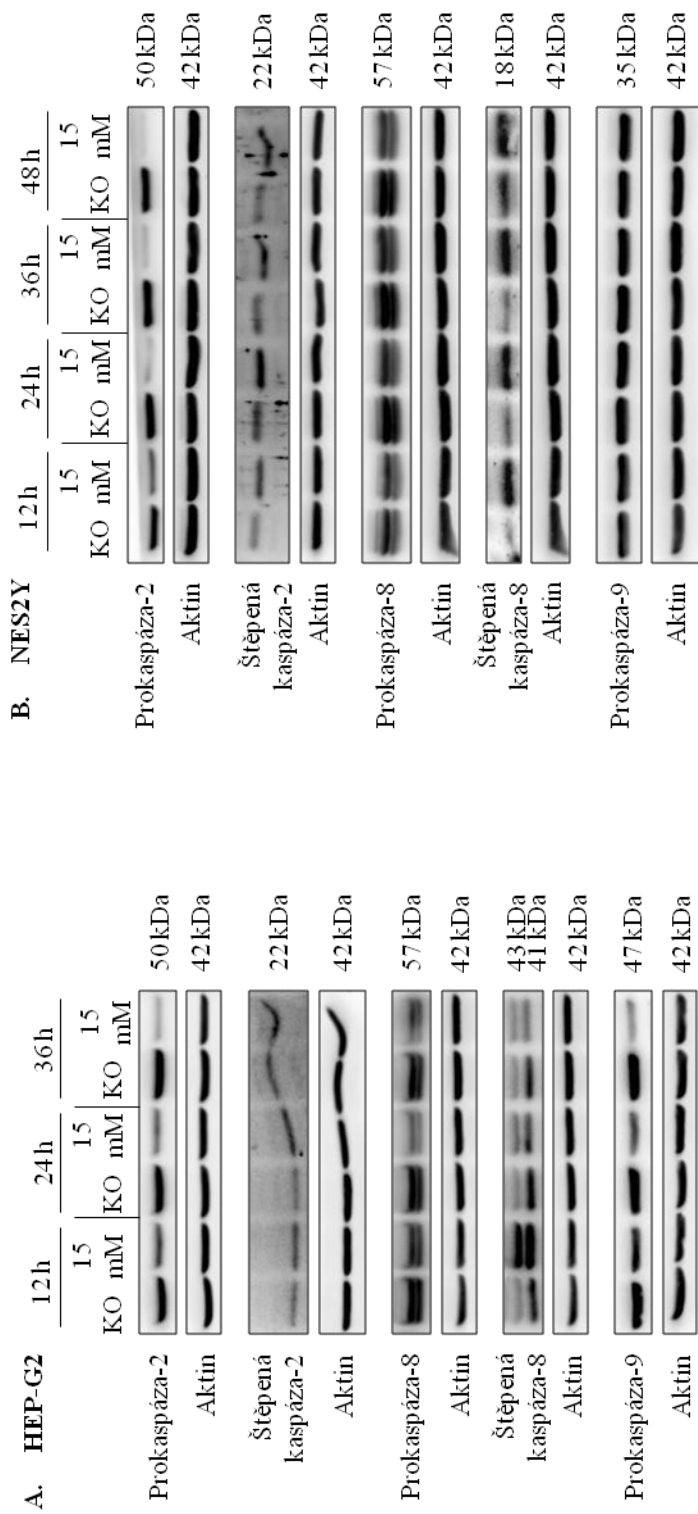
##### **4.1.6.2 Vliv krátkodobého nadbytku železa na aktivaci exekučních kaspáz**

Po aplikaci 15 mM citrátu železitého na buňky linie HEP-G2 docházelo k poklesu proteinové hladiny celé formy exekuční kaspázy-3, kaspázy-6 a kaspázy-7 (obr. 4.8. A). U všech sledovaných kaspáz klesaly hladiny celých forem oproti kontrole již ve

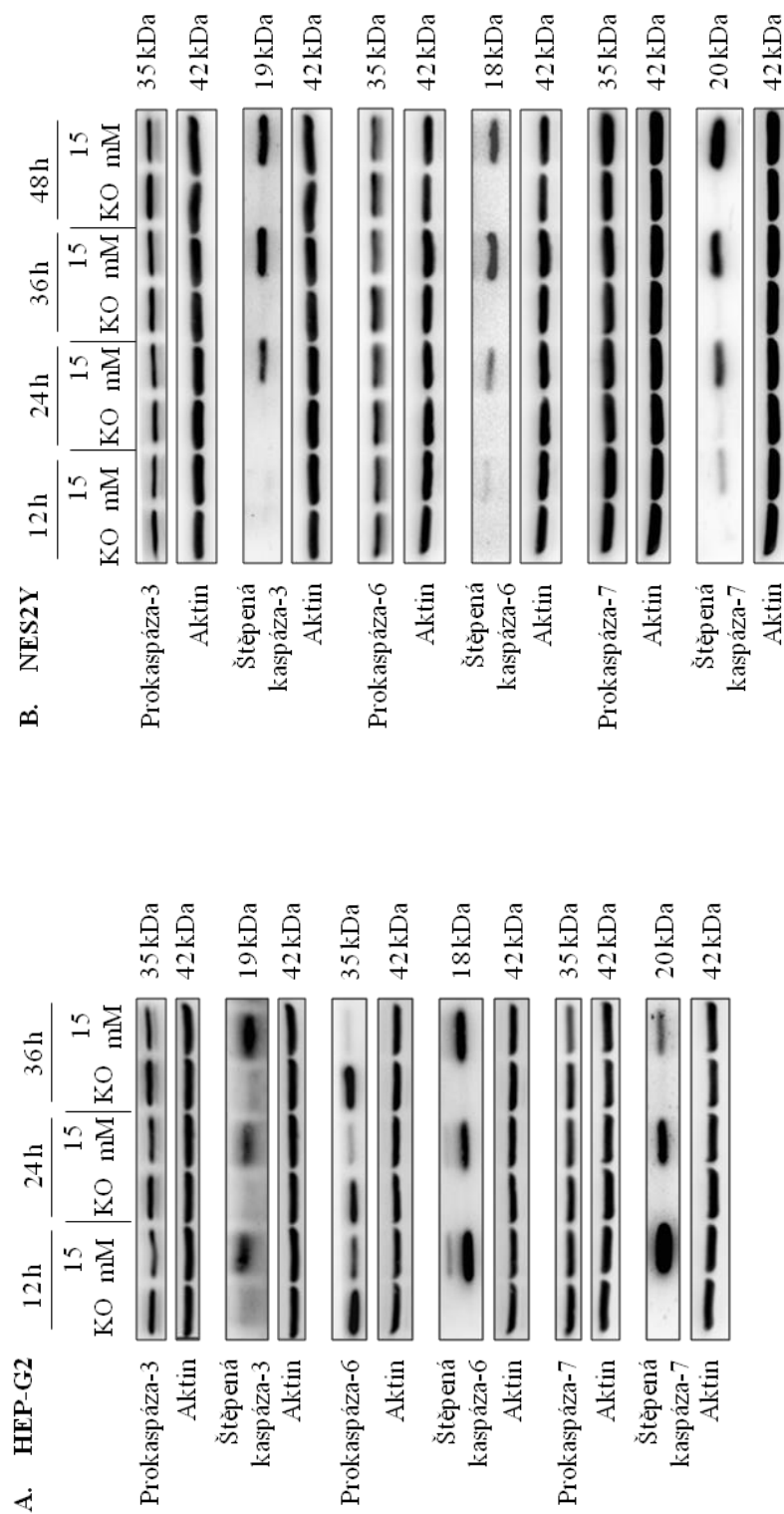


12 hodinách po aplikaci 15 mM citrátu železitého, nejvýrazněji u kaspázy-6. Hladiny štěpů exekučních kaspáz byly v případě kaspázy-6 a kaspázy-7 nejvyšší po 12 hodinách. Hladina štěpu kaspázy-3 se zvyšovala s prodlužujícím se časem kultivace buněk v přítomnosti 15 mM citrátu železitého (obr. 4.8 A).

Ke štěpení exekučních kaspáz docházelo u buněčné linie NES2Y již 12 hodin po aplikaci nadbytku železa. U celých forem kaspázy-3 a kaspázy-7 nedocházelo během 48 hodin ke změnám hladiny proteinů oproti kontrole. Hladina proteinu kaspázy-6 mírně klesala po 24 hodinách od aplikace 15 mM citrátu železitého. Hladiny štěpených forem kaspázy-3, kaspázy-6 i kaspázy-7 stoupaly v čase již 12 hodin po aplikaci 15 mM citrátu železitého (obr. 4.8 B).



**Obrázek 4.7: Vliv 15 mM citrátu železitého na proteinové hladiny iniciačních kaspáz u buněčných linií HEP-G2 (A) a NES2Y (B).** Metodou western blotu a následné imunodetekce jsme sledovali expresi iniciačních kaspáz na proteinové úrovni ve 12, 24 a 36 hodinách (HEP-G2 – A), respektive ve 12, 24, 36 a 48 hodinách (NES2Y – B) po aplikaci 15 mM citrátu železitého v kultivačním médiu bez merkaptioethanolu. Kontrolní buňky (KO) jsme kultivovali ve stejném médiu bez přídání citrátu železitého. Aktin slouží jako kontrola proteinové nanásky. Ukázán je reprezentativní výsledek ze tří nezávislých experimentů.



**Obrázek 4.8: Vliv 15 mM citrátu železitého na proteinové hladiny exekučních kaspáz u buněčné linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B).** Metodou western blotu a imunodetekce jsme sledovali expresi exekučních kaspáz na proteinové úrovni ve 12, 24 a 36 hodinách (HEP-G2 – A), respektive ve 12, 24, 36 a 48 hodinách (NES2Y – B) po aplikaci 15mM citrátu železitého v kultivačním médiu bez merkaptoethanolu. Kontrolní buňky (KO) jsme kultivovali ve stejném médiu bez přidaného citrátu železitého. Aktin slouží jako kontrola proteinové nanášky. Ukázán je reprezentativní výsledek ze tří nezávislých experimentů.

## 4.2 Dlouhodobá kultivace buněk s nadbytkem citrátu železitého

Cílem této části diplomové práce bylo stanovit vliv dlouhodobého nadbytku železa na buněčné procesy jako je oxidativní stres, stres endoplasmatického retikula či apoptóza. Pro studium zmíněných procesů jsme vytvořili buněčný model dlouhodobého působení nadbytku železa u lidských buněčných linií HEP-G2 a NES2Y. Pro potvrzení správnosti vytvořeného modelu buněk dlouhodobě přetížených železem jsme sledovali hladiny vybraných proteinů účastnící se homeostáze železa.

Buňky obou linií jsme dlouhodobě kultivovali v médiu s 50  $\mu\text{M}$  100  $\mu\text{M}$  citrátem železitým a v kontrolním médiu bez přídavku citrátu železitého. Koncentrace železa v podobě citrátu železitého odpovídají koncentracím železa, které jsou reálně naměřitelné v plasmě pacientů s chronickým nadbytkem železa. Buňky obou linií jsme sklízeli v pravidelných intervalech, tj. jednou měsíčně po dobu až pěti měsíců.

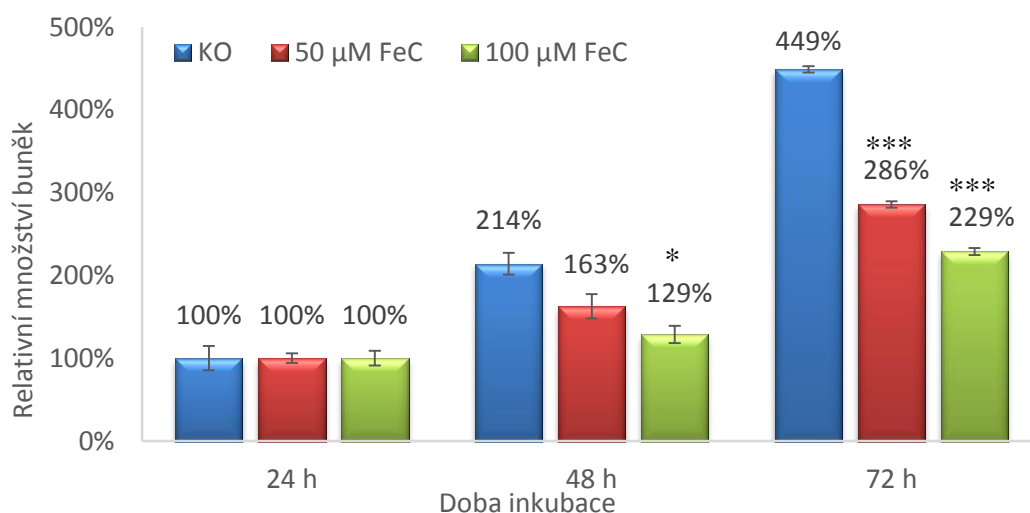
### 4.2.1 Vliv dlouhodobého nadbytku železa na růst a přežívání buněk

Buňky linií HEP-G2 a NES2Y kultivované po dobu 5 měsíců v kultivačním médiu s 50 $\mu\text{M}$  a 100 $\mu\text{M}$  citrátem železitým (FeC) a bez přidaného citrátu železitého (kontrola) jsme vyseli do 96-jamkové mikrotitrační destičky v koncentraci  $1 \times 10^4$  buněk/ jamku v celkovém objemu 100  $\mu\text{l}$  kultivačního média. Po 24, 48 a 72 hodinách od nasazení jsme pomocí Bürkerovy komůrky stanovili množství živých buněk. Hodnoty počítání jsme zanesli do grafu jako průměr všech nezávislých biologických opakování  $\pm$  S.E.M. Výsledky jsou prezentovány jako relativní množství buněk v jednotlivých časech počítání.

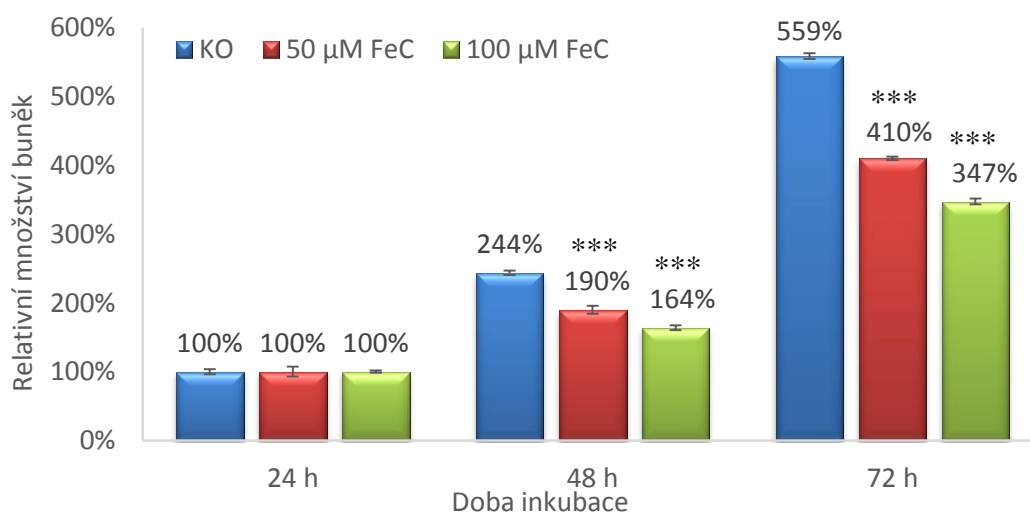
Ze získaných dat jsme zjistili, že v případě buněk linie HEP-G2 i NES2Y, dlouhodobě kultivovaných v médiu s 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  citrátem železitým, docházelo ke statisticky signifikantně nižšímu nárůstu počtu buněk vůči kontrole v čase (graf 4.2). Počet buněk dlouhodobě kultivovaných v médiu se 100  $\mu\text{M}$  citrátem železitým byl po 72 hodinách od nasazení v případě linie HEP-G2 a NES2Y až o polovinu, respektive až o třetinu nižší než počet buněk kontroly. Snížená růstová schopnost buněk linií HEP-G2 a NES2Y dlouhodobě kultivovaných v nadbytku železa je zachycena na obr. 4.9.

V souvislosti s těmito výsledky jsme dále u obou buněčných linií analyzovali buněčný cyklus pomocí průtokové cytometrie. Po srovnání výsledků z průtokového cytometru u buněk HEP-G2 a NES2Y dlouhodobě kultivovaných v médiu s citrátem železitým a buněk kontroly, jsme nezaznamenali změny v průchodu buněčným cyklem ani u jedné ze sledovaných linií (graf. 4.3).

### A. HEP-G2



### B. NES2Y



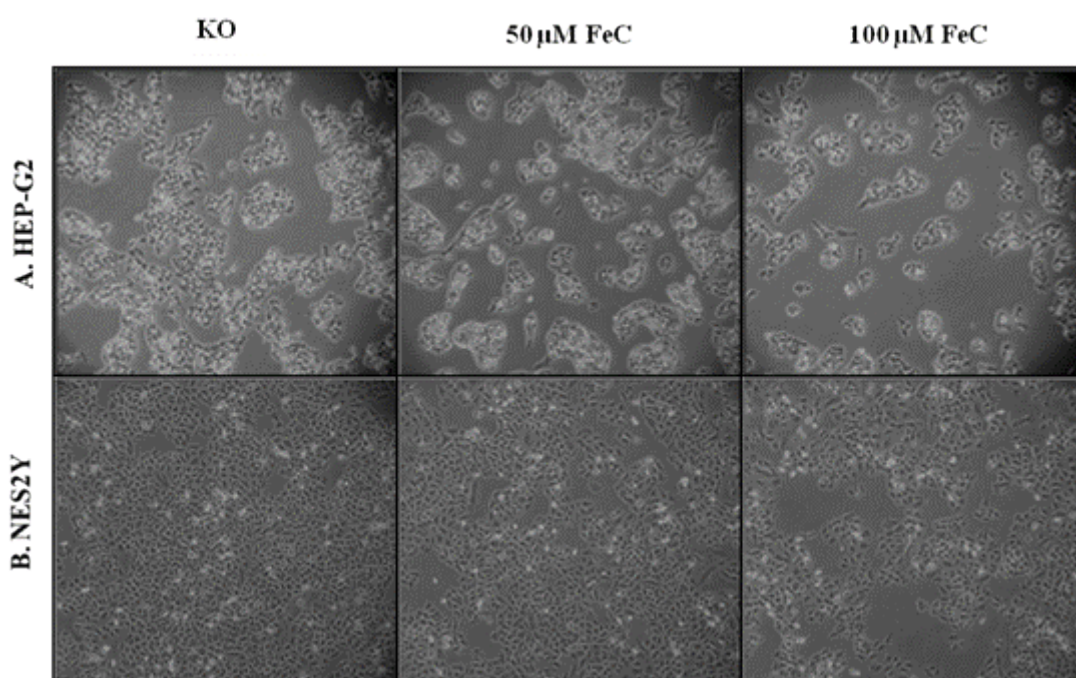
**Graf 4.2: Růst a přežívání buněk linií HEP-G2 (A) a NES2Y (B) během dlouhodobé kultivace v médiu s 50 μM a 100 μM citrátem železitým.** Buňky kultivované po dobu 5 měsíců v kulturačním médiu (KO) a v médiu s 50 μM a 100 μM citrátem železitým (FeC) jsme vyseli do sterilní 96-jamkové mikrotitrační destičky v koncentraci  $1 \times 10^4$ / 100 μl/ jamku do příslušného média. Po 24, 48 a 72 hodinách kultivace jsme za použití Bürkerovy komůrky stanovili množství živých buněk na jamku. Do grafu jsme vynesli relativní počet buněk vůči množství buněk ve 24 hodinách od nasazení. Prezentované hodnoty ukazují průměr hodnot získaných ze 6 jamek  $\pm$  S.E.M. \*, \*\*\* Statisticky signifikantní rozdíl ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$ ) při srovnání počtu buněk kultivovaných v kontrolním médiu (KO) a v médiu s citrátem železitým (FeC). *FeC = ferric citrate*

#### 4.2.2 Vliv dlouhodobého nadbytku železa na hladinu vybraných proteinů homeostáze železa

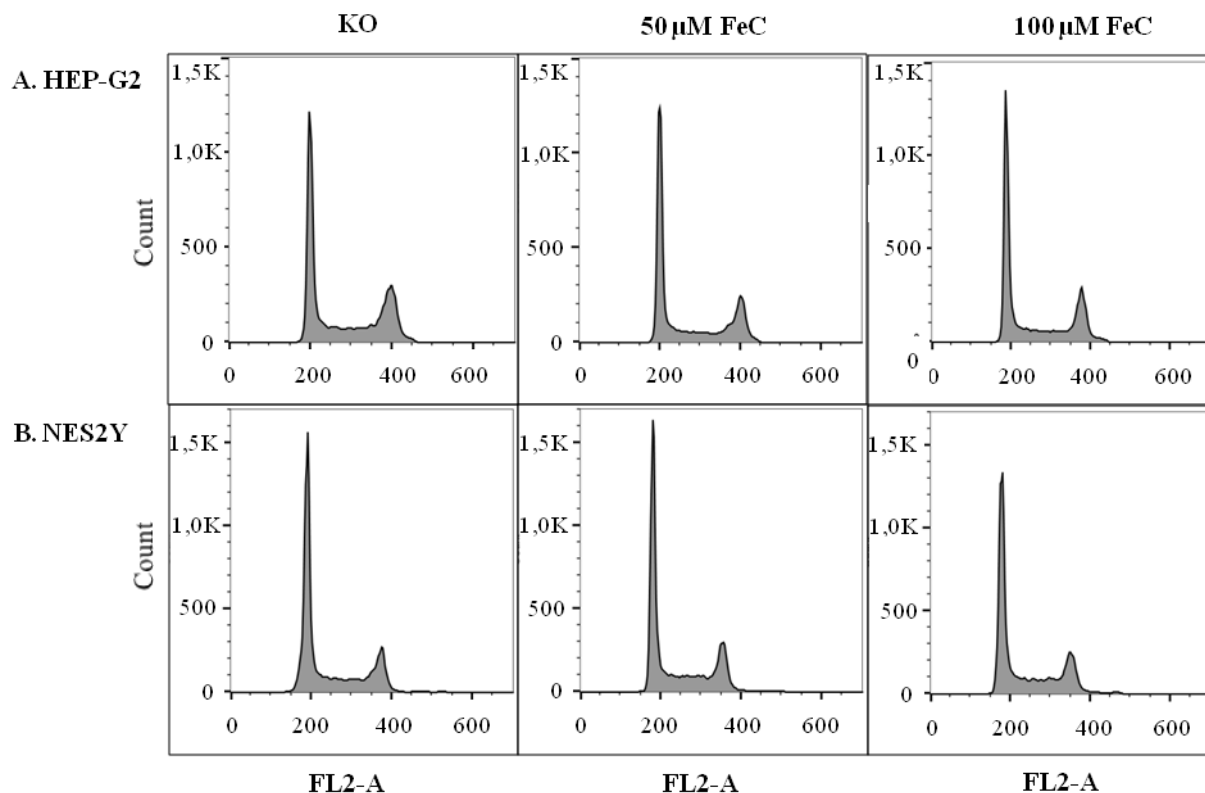
Pro ověření modelu buněk vykazujících přetížení železem jsme metodou western blot a imunodetekce pozorovali změny hladin vybraných proteinů účastnících se homeostáze železa během čtyř měsíců kultivace buněk v médiích s 50 μM a 100 μM citrátem železitým u buněčných linií HEP-G2 a NES2Y ve srovnání s kontrolními

buňkami. Mezi námi testovanými proteiny byly intracelulární regulační molekuly IRP1 a IRP2 (iron responsive element 1/2), proteiny účastníci se transportu železa přes membránu – DMT1 (divalent metal transporter 1), transferrinový receptor 1 (TfR1) a ferroportin a vazebný protein ferritin.

U buněčné linie HEP-G2 jsme pozorovali snížení hladiny proteinu TfR1 a zvýšení hladin proteinů ferritinu a ferroportinu oproti kontrole v závislosti na použité koncentraci citrátu železitého v médiu. U proteinů IRP1 a IRP2 jsme nepozorovali změnu hladiny proteinu v žádném sledovaném čase (obr. 4.10 A). U buněčné linie NES2Y jsme detekovali snížení hladiny proteinů DMT1 a TfR1 a zvýšení hladiny železo vazebného proteinu ferritinu v závislosti na použité koncentraci citrátu železitého v médiu (obr. 4.10 B). Hladiny IRP proteinů u linie NES2Y se v buňkách kultivovaných v médiu s citrátem železitým oproti buňkám kontroly v prvních měsících kultivace snižovali. V případě proteinu ferroportinu jsme nepozorovali žádné změny v jeho expresi (obr. 4. 10 B).



**Obrázek 4.9: Buňky linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B) po 5 měsících kultivace v médiu s 50 μM a 100 μM citrátem železitým.** Buňky linií HEP-G2 (A) a NES2Y (B), které byly dlouhodobě kultivovány ve standardním médiu (KO) a médiu s 50 μM a 100 μM citrátem železitým (FeC), jsme vyseli na 60 mm Petriho misky v koncentracích  $6 \times 10^5$ / 6 ml média v příslušném médiu. Po 48 hodinách jsme zaznamenali aktuální stav buněk fotoaparátem Canon PowerShot G9 připojeným k inverznímu mikroskopu. *FBS = fetal bovine serum; FeC = ferric citrate*

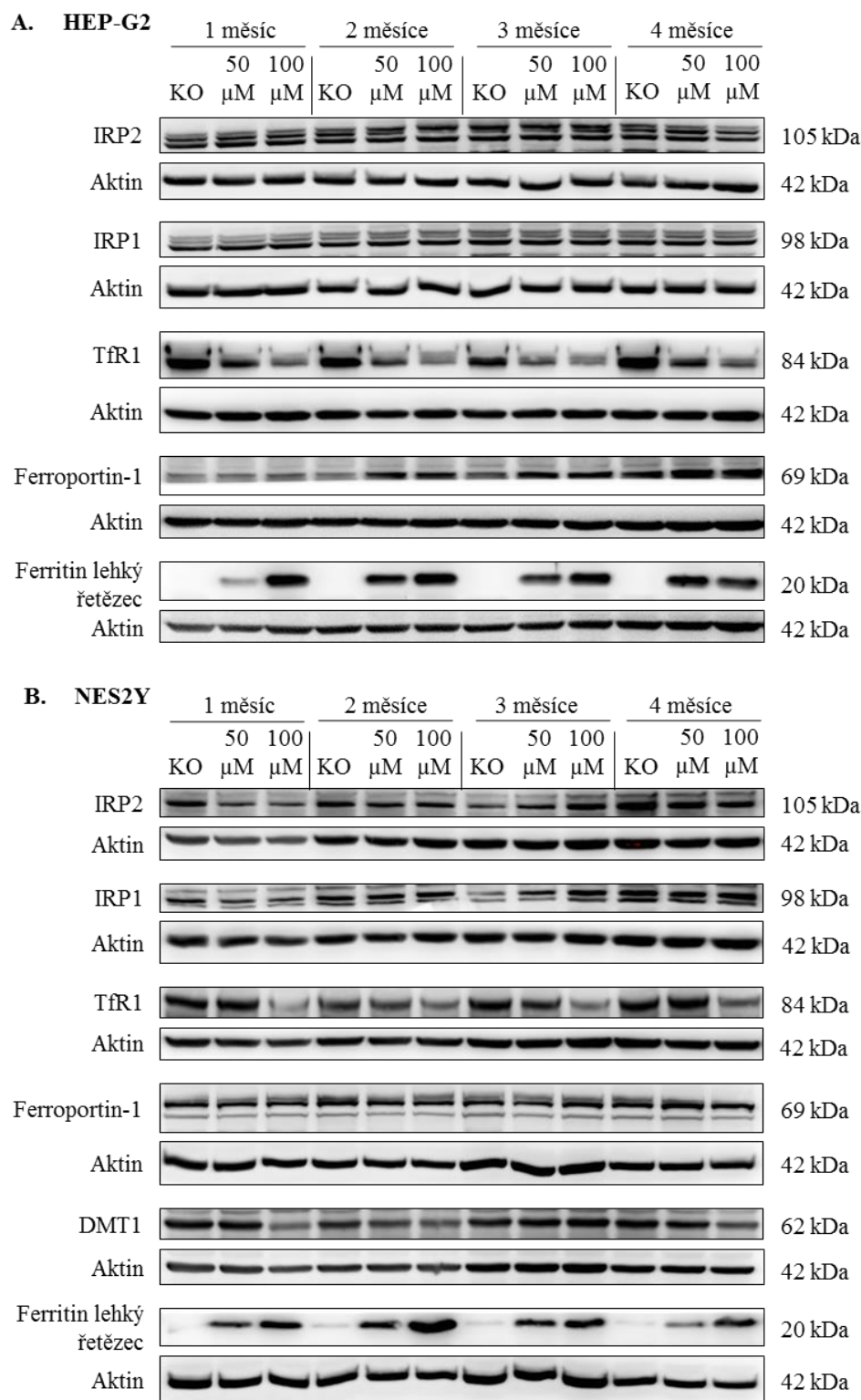


**Graf 4.3: Průběh buněčným cyklem buněk linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B) dlouhodobě kultivovaných v médiu s 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  citrátem železitým.** Buňky linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B) kultivované po dobu 5 měsíců v kulturačním médiu (KO) a médiu s 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  citrátem železitým jsme označili propidium jodidem a pomocí průtokového cytometru sledovali vliv nadbytku železa na průchod buněčným cyklem. *FeC = ferric citrate*

#### 4.2.3 Vliv dlouhodobého nadbytku železa na hladiny vybraných proteinů účastnících se odpovědi na oxidativní stres

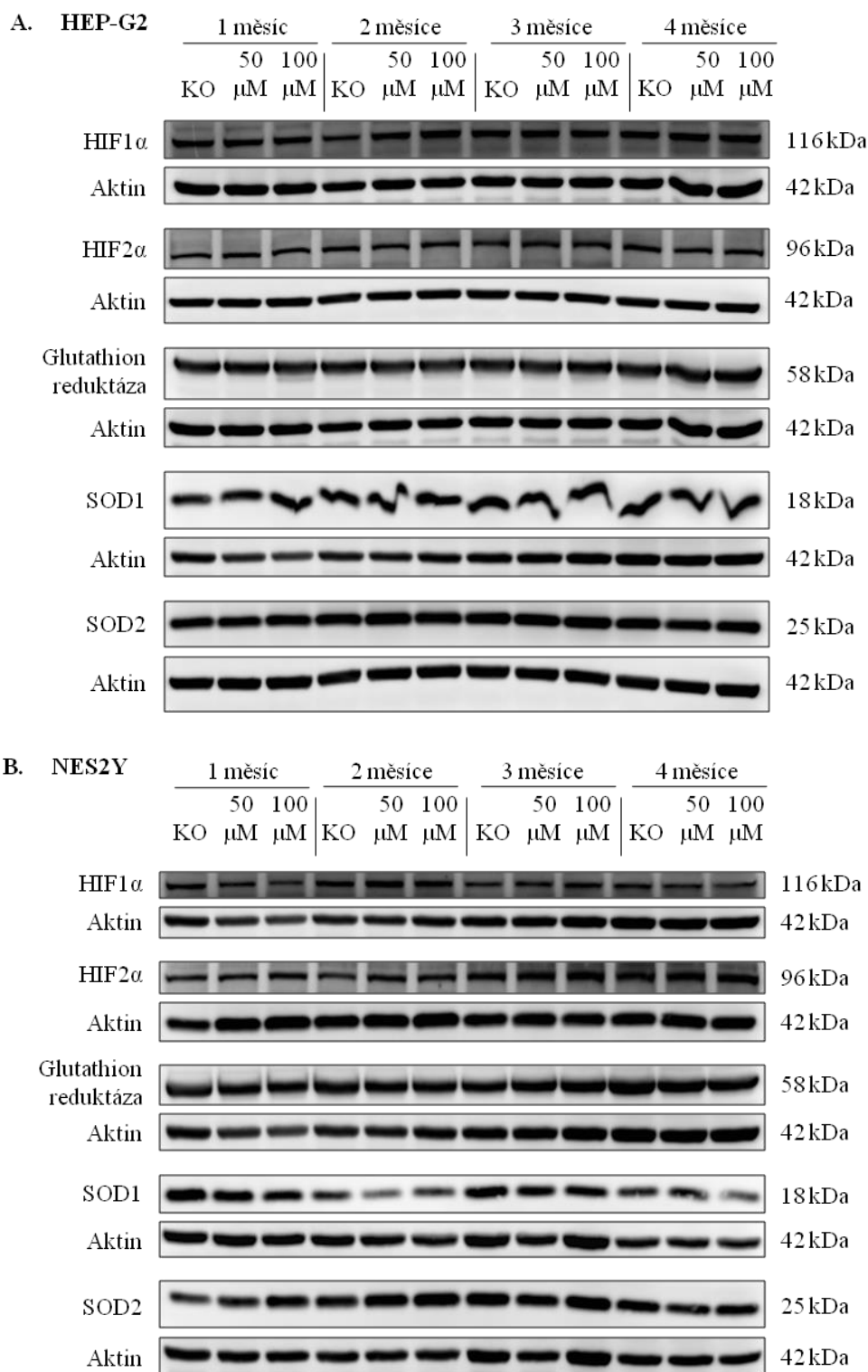
Dále jsme u buněk obou linií dlouhodobě kultivovaných v médiích s 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  citrátem železitým a u kontrol testovali expresi proteinů účastnících se obrany buňky před vlivy oxidativního stresu – proteiny SOD1 a SOD2 (superoxide dismutase 1/2), glutathion reduktázu, a proteiny HIF1 $\alpha$  a HIF2 $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ / 2 $\alpha$ ).

Během kultivace buněk linií HEP-G2 i NES2Y v médiu s 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  citrátem železitým jsme ve srovnání s kontrolou ani u jedné z linií nepozorovali změnu v expresi proteinů HIF1 $\alpha$  nebo HIF2 $\alpha$  (obr. 4.11). Stejně tak jsme ani u jedné z testovaných buněčných linií nedetkovali žádnou změnu v expresi proteinu glutathion reduktázy, SOD1 nebo SOD2 (obr. 4.11). V případě buněčné linie NES2Y jsme sice jisté změny exprese proteinu SOD1 pozorovali, ovšem tyto změny nebyly mezi jednotlivými experimentálními opakováními konzistentní.



**Obrázek 4.10: Vliv dlouhodobého nadbytku citrátu železitého na hladiny proteinů účastnících se homeostáze železa při dlouhodobé kultivaci u buněčné linie a HEP-G2 (A) NES2Y (B).** Metodou western blotu a imunodetekce jsme sledovali expresi vybraných proteinů účastnících se homeostáze železa na proteinové úrovni u buněčné linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B) po 1, 2, 3 a 4 měsících dlouhodobé kultivace v kulturačním médiu bez přídavku železa (KO) a médiu s 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  citrátlem železitém. Aktin slouží jako kontrola nanášky. Ukázán je reprezentativní výsledek ze dvou nezávislých experimentů. IRP1 = iron regulatory protein 1; IRP2 = iron regulatory protein 2; TfR1 = transferrin receptor 1; DMT1 = divalent metal transporter 1





**Obrázek 4.11: Vliv dlouhodobého nadbytku citrátu železitého na hladiny vybraných proteinů účastnících se odpovědi na oxidativní stres u buněčné linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B).** Metodou western blotu a imunodetekce jsme sledovali expresi vybraných proteinů účastnících se odpovědi na oxidativní stres na proteinové úrovni u buněčné linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B) po 1, 2, 3 a 4 měsících dlouhodobé kultivace v kultivačním médiu bez přídavku železa (KO) a médiu s 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  citrátém železitém. Aktin slouží jako kontrola nanášky. Ukázán je reprezentativní výsledek ze dvou nezávislých experimentů. *HIF1 $\alpha$*  = hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ ; *HIF2 $\alpha$*  = hypoxia inducible factor 2 $\alpha$ ; *SOD1* = superoxide dismutase 1; *SOD2* = superoxide dismutase 2

#### **4.2.4 Vliv dlouhodobého nadbytku železa na hladiny proteinů účastnících se stresu endoplasmatického retikula**

Stejně jako v případě krátkodobé kultivace buněk v nadbytku železa jsme testovali přítomnost stresu endoplasmatického retikula u dlouhodobě kultivovaných buněk v médiu s 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  citrátem železitým oproti kontrolním buňkám. Metodou western blot a imunodetekce jsme sledovali expresi proteinů PERK, IRE1 $\alpha$  s jeho fosforylovanou formou p-IRE1 $\alpha$  (fosfo Ser724), kalnexin, BiP, Ero1-L $\alpha$ , PDI, CHOP a fosforylované formy eukaryotického iniciačního faktoru eIF2 $\alpha$  (fosfo Ser51).

Ze sledovaných molekul účastnících se stresu endoplasmatického retikula jsme u buněčné linie HEP-G2 detekovali velmi mírný nárůst hladiny proteinu pouze v případě transkripčního faktoru CHOP (obr. 4.13 A). U ostatních sledovaných proteinů stresu endoplasmatického retikula jsme nepozorovali žádnou změnu v jejich expresi (obr. 4.12 A a obr. 4.13 A). U buněčné linie NES2Y jsme detekovali mírný nárůst hladiny proteinu Ero1-L $\alpha$ , ovšem hladina proteinu PDI, který je proteinem Ero1-L $\alpha$  zpětně oxidován, zůstala téměř beze změny (obr. 4.13 B). Výrazný nárůst hladiny proteinu jsme zaznamenali u proteinu IRE1 $\alpha$ . V případě jeho fosforylované formy jsme ovšem nepozorovali žádnou změnu v jeho expresi (obr. 12. B). Kromě již zmíněných změn v expresi sledovaných proteinů jsme u buněk NES2Y nezaznamenali změny v proteinových hladinách chaperonů BiP a kalnexinu, kinázy PERK, ani u transkripčního faktoru CHOP. Zároveň se neměnila hladina fosforylované formy eukaryotického iniciačního faktoru eIF2 $\alpha$  (obr. 4.12 B a obr. 4.13 B).

#### **4.2.5 Vliv dlouhodobého nadbytku železa na aktivitu iniciačních a exekučních kaspáz**

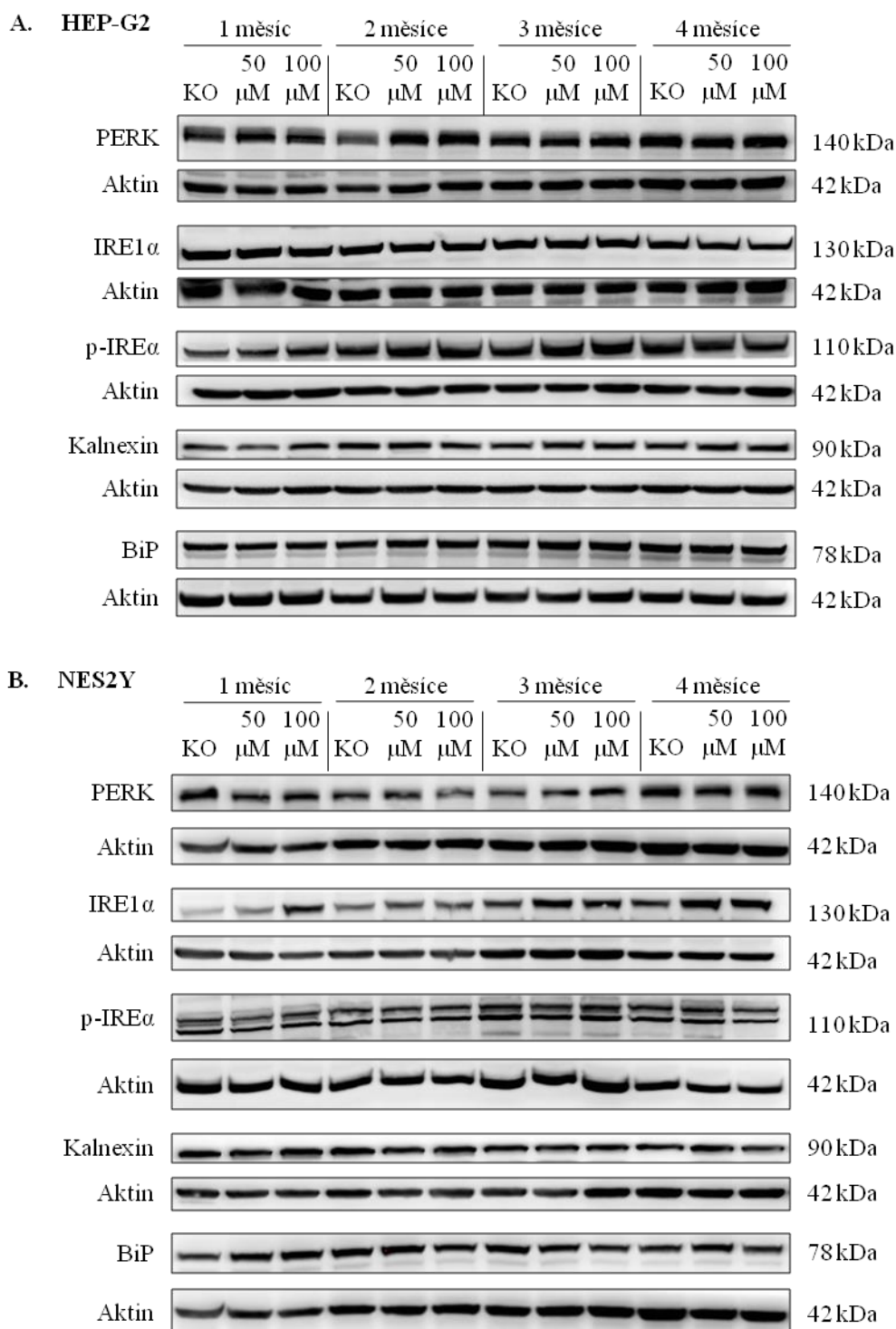
Sledovali jsme aktivaci apoptózy prostřednictvím změn v expresi a štěpení iniciačních a exekučních kaspáz u buněk dlouhodobě kultivovaných v médiu s 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  citrátem železitým ve srovnání s kontrolou. Pomocí metody western blot a imunodetekce jsme stanovili hladiny iniciační kaspázy-2, kaspázy-8 a kaspázy-9 a jejich štěpených forem, dále hladiny exekučních kaspáz – kaspázy-3, kaspázy-6 a kaspázy-7 a jejich štěpů.

Jak u buněčné linie HEP-G2, tak u buněčné linie NES2Y nedocházelo k žádným změnám v hladinách celé formy kaspázy-2 (obr. 4.14). Nicméně u linie HEP-G2 jsme již od prvního měsíce po zahájení dlouhodobé kultivace detekovali rostoucí hladinu štěpené formy kaspázy-2 v závislosti na koncentraci citrátu železitého v médiu (obr. 4.14 A).

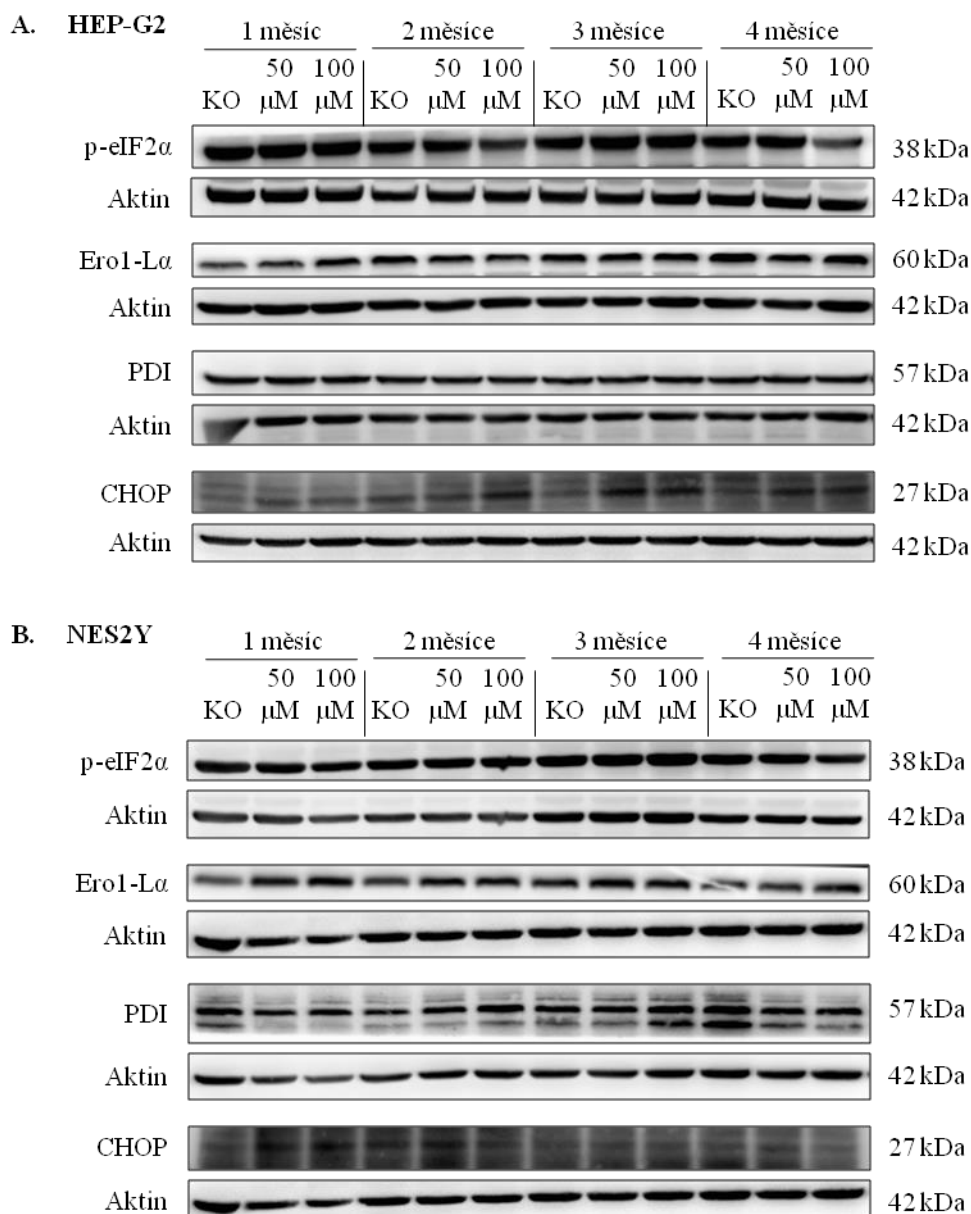
U buněčné linie NES2Y se nám štěp kaspázy-2 nepodařilo detekovat. Mírné změny v hladinách proteinu jsme pozorovali v případě celé formy kaspázy-8 u buněčné linie HEP-G2 i NES2Y (obr. 4.14). Nicméně přítomnost štěpů kaspázy-8, a tudíž její aktivaci prostřednictvím štěpení se nám nepodařilo prokázat.

U buněčné linie HEP-G2 jsme nepozorovali žádné změny v hladinách celé ani štěpené formy kaspázy-9 (obr. 4.14 A). Naproti tomu u buněk linie NES2Y jsme pozorovali snížení hladiny kaspázy-9 v závislosti na použité koncentraci citrátu železitého. U štěpu kaspázy-9 jsme nepozorovali žádné změny hladiny oproti kontrole (obr. 4.14 B).

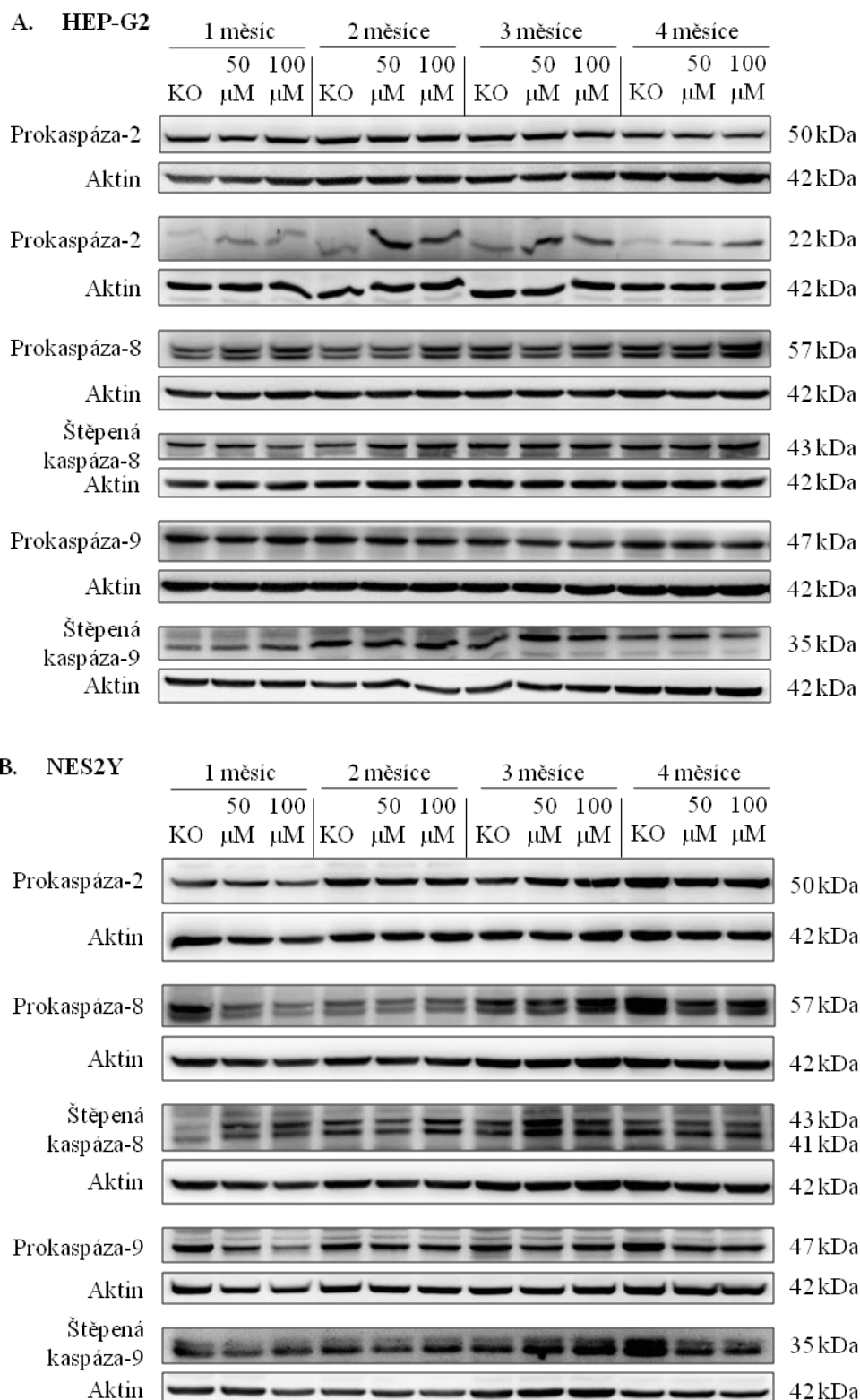
Ani u jedné buněčné linie jsme nepozorovali změny v hladinách celých forem kaspázy-3, kaspázy-6 ani kaspázy-7 během kultivace v médiu s 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  citrátem železitým ve srovnání s kontrolou (obr. 4.15). Naproti tomu jsme u obou buněčných linií detekovali zvýšené hladiny štěpených forem kaspázy-3, kaspázy-6 i kaspázy-7 v závislosti na koncentraci citrátu železitého v médiu (obr. 4.15).



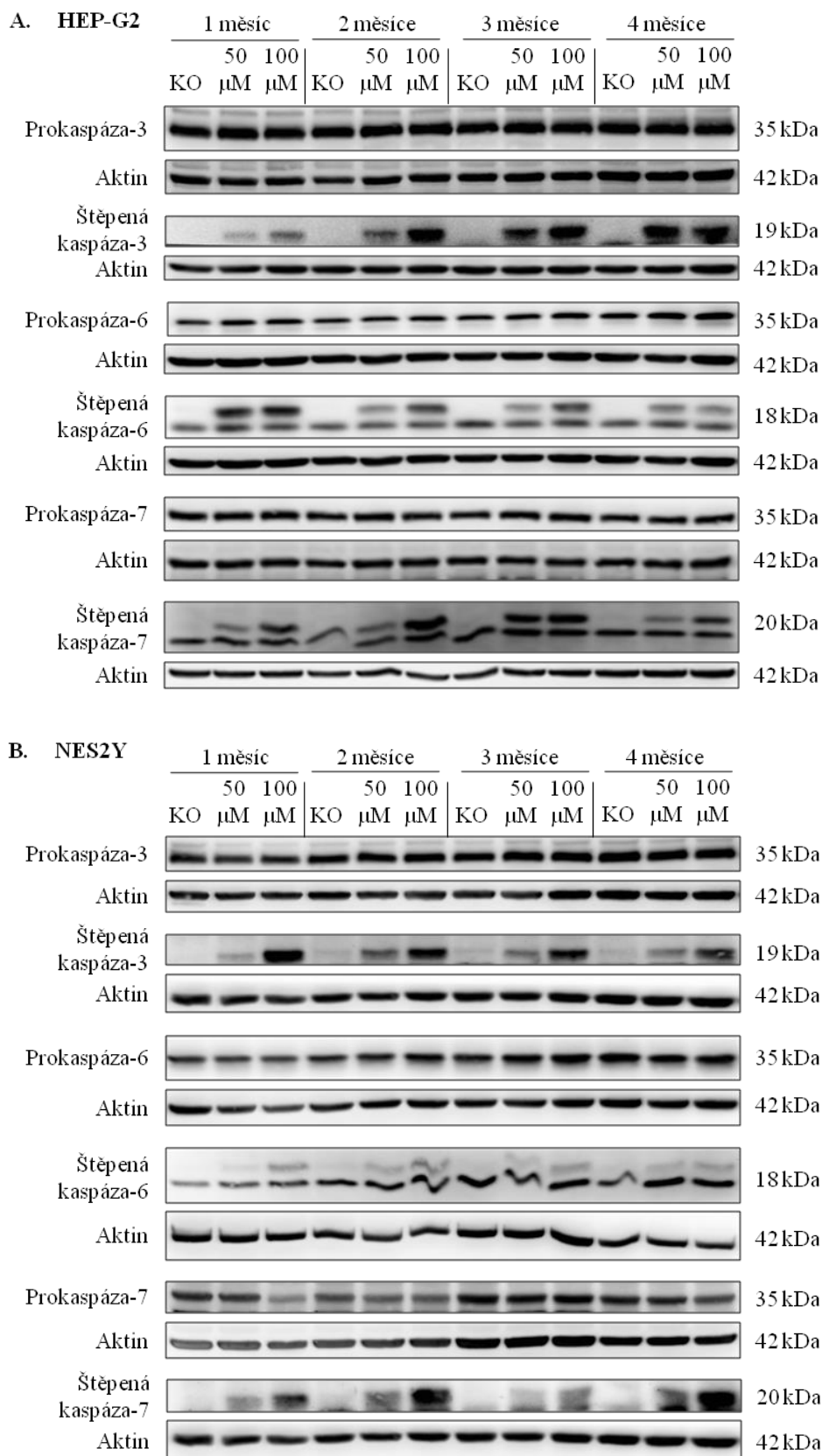
**Obrázek 4.12: Vliv dlouhodobého nadbytku citrátu železitého na hladiny proteinů účastníků se stresu endoplasmatického retikula při dlouhodobé kultivaci u buněčné linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B).** Metodou western blotu a imunodetekce jsme sledovali expresi proteinů účastníků se stresu endoplasmatického retikula na proteinové úrovni u buněčné linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B) po 1, 2, 3 a 4 měsících dlouhodobé kultivace v kultivačním médiu bez přídavku železa (KO) a médiu s 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  citrátem železitým. Aktin slouží jako kontrola nanášky. Ukázán je reprezentativní výsledek ze dvou nezávislých experimentů. *PERK* = RNA dependent protein kinase (PKR); *IRE1 $\alpha$*  = inositol requiring protein 1 $\alpha$ ; *p-IRE1 $\alpha$*  = fosforylated *IRE1 $\alpha$* ; *BiP* = binding immunoglobulin protein



**Obrázek 4.13: Vliv dlouhodobého nadbytku citrátu železitého na hladiny proteinů účastnících se stresu endoplasmatického retikula při dlouhodobé kultivaci u buněčné linie NES2Y (A) a HEP-G2 (B).** Metodou western blotu a imunodetekce jsme sledovali expresi proteinů účastnících se stresu endoplasmatického retikula na proteinové úrovni u buněčné linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B) po 1, 2, 3 a 4 měsících dlouhodobé kultivace v kultivačním médiu bez přídatku železa (KO) a médiu s 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  citrátem železitým. Aktin slouží jako kontrola nanášky. Ukázán je reprezentativní výsledek ze dvou nezávislých experimentů. *Ero1-L $\alpha$*  = *ER oxidoreductase 1 L $\alpha$* ; *PDI* = *protein disulfide isomerase*; *p-eIF2 $\alpha$*  = *phosphorylated eukaryotic initiation factor 2*; *CHOP* = *CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein*



**Obrázek 4.14: Vliv dlouhodobého nadbytku citrátu železitého na proteinové hladiny iniciačních kaspáz během dlouhodobé kultivace u buněčné linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B).** Metodou western blotu a imunodetekce jsme sledovali expresi iniciačních kaspáz na proteinové úrovni u buněk linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B) po 1, 2, 3 a 4 měsících dlouhodobé kultivace v kultivačním médiu bez přísady železa (KO) a médiu s 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  citrátem železitým. Aktin slouží jako kontrola nanášky. Ukázán je reprezentativní výsledek ze dvou nezávislých experimentů.



**Obrázek 4.15: Vliv dlouhodobého nadbytku citrátu železitého na proteinové hladiny exekučních kaspáz při dlouhodobé kultivaci u buněčné linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B).** Metodou western blotu a imunodetekce jsme sledovali expresi exekučních kaspáz na proteinové úrovni u buněk linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B) po 1, 2, 3 a 4 měsících dlouhodobé kultivace v kultivačním médiu bez přídavku železa (KO) a médiu s 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  citrátem železitým. Aktin slouží jako kontrola nanášky. Ukázán je reprezentativní výsledek ze dvou nezávislých experimentů.

## 5 DISKUZE

Dlouhodobé vystavení organismu zvýšeným koncentracím železa vede k jeho poškození. Mezi buňky a tkáně nejvíce poškozované vysokými hladinami železa patří játra (Batts, 2007) a kostní dřev (Braumann *et al.*, 1992; Chai *et al.*, 2015), které slouží jako zásobní orgány pro železo, dále buňky a tkáně srdce (Oudit *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2015), mozku (Hadzhieva *et al.*, 2014) a slinivky (Feder *et al.*, 1996; Swinkels *et al.*, 2006), jež jsou velmi metabolicky nebo energeticky aktivní a citlivé na poškození.

Známým a *in vivo* prokázaným negativním efektem nadbytku železa v buňkách je tvorba velmi reaktivních kyslíkových radikálů železnatými kationty (Burkitt and Mason, 1991; Kadiiska *et al.*, 1995) mechanismem Fentonovy reakce (Galaris and Pantopoulos, 2008), které mohou poškozovat vnitřní struktury buňky. Přesto dodnes neznáme veškeré buněčné procesy, které vedou k poškození buněk a tkání v důsledku nadbytku železa.

Cílem této diplomové práce bylo přispět k objasnění vlivu nadbytku železa na buněčné procesy vedoucí k poškození vybraných buněk a tkání. Procesy vedoucí k buněčnému poškození v důsledku působení zvýšených hladin železa na buňky jsme sledovali pomocí *in vitro* modelů buněčných linií reprezentujících lidskou jaterní tkáň – HEP-G2 (fenotyp hepatocytů) a lidské pankreatické beta buňky – NES2Y. Vysoké hladiny železa v médiu jsme simulovali pomocí přidavku vybraných koncentrací citrátu železitého do kultivačního média.

Vzhledem k tomu, že se setkáváme s pacienty s dlouhodobě, ale i akutně velmi zvýšenou hladinou železa, vytvořili jsme pro studium vlivu nadbytku železa na buněčné poškození modely odpovídající oběma stavům. Pro studium akutního vlivu vysokých hladin železa na použité buněčné linie jsme použili takové koncentrace citrátu železitého, které při krátkodobé kultivaci vedly ke snížení množství buněk pod inokulum v řádu desítek hodin. Ke studiu efektu chronického nadbytku železa jsme vytvořili model dlouhodobě kultivovaných buněk v médiu s nadbytkem citrátu železitého, jehož koncentrace odpovídají hodnotám železa naměřených v plasmě u pacientů s diagnostikovaným dlouhodobým nadbytkem železa. Tyto experimentální modely buněk ovlivněných nadbytkem železa jsme vytvořili jako součást studií, které v naší laboratoři již probíhají na vzorcích tkání od pacientů, přičemž v minulosti jsme se již podobnými studii zabývali (Balušíková *et al.*, 2009; Dostalíková-Čimburová *et al.*, 2012a; Dostalíková-Čimburová *et al.*, 2012b; Dostalíková-Čimburová, *et al.*, 2014).



## 5.1 Vytvoření buněčných modelů

Pro kultivaci buněk HEP-G2 a NES2Y v rámci testování vlivu nadbytku železa jsme prvotně používali médium s plně definovaným složením, ve kterém je 10 % fetálního bovinního séra (kapitola 3.6) nahrazeno saturovaným transferrinem jako zdrojem železa a dalšími stopovými prvky (Kovář and Franěk, 1984). Toto médium je námi rutinně používáno a je vhodné pro růst i dalších buněčných linií (Neumannova *et al.*, 1995; Kovář *et al.*, 2006). Při použití plně definovaného média s doplňkem železem saturovaného transferrinu však v rámci experimentů docházelo k problémovému růstu kontrolních buněk v tomto médiu během některých opakování (data neukázána). Z tohoto důvodu jsme i v průběhu experimentů používali standardní kultivační médium s 10 % fetálního bovinního séra, jež není plně definované (Balušíková *et al.*, 2009).

### 5.1.1 Buněčný model akutního vlivu nadbytku železa

Pro účely krátkodobé kultivace s vysokými koncentracemi citrátu železitého jsme pracovali s médiem bez přidaného 2-merkptoethanolu, jež je běžnou součástí kultivačního média (kapitola 3.6). Merkptoethanol působí jako velmi účinný antioxidant a krom jiného hojně brání výskytu hydroxylových radikálů (Petrov *et al.*, 2012), které vznikají při nadbytku železnatých iontů v buňce (kapitola 2.4.1). Merkptoethanol tak byl při krátkodobých studiích z média vynechán, neboť nežádoucí měrou zvyšoval odolnost buněk vůči nadbytku železa v médiu (data neukázána). V rámci dlouhodobé kultivace buněk v médiu s nadbytkem železa byla v médiu přítomnost 2-merkptoethanolu zachována s cílem zlepšit schopnost dlouhodobé proliferace buněk.

Na základě výsledků „dose response“ experimentů u linie HEP-G2 i NES2Y jsme v rámci pokusů s akutními vysokými dávkami železa používali přídavek 15 mM citrátu železitého do média. Jedná se o koncentraci železa v médiu, při které docházelo u obou linií ke snížení množství živých buněk pod inokulum již ve 48 hodinách po ošetření (graf 4.1). Standardně uváděný rozsah normálních hladin sérového železa u mužů je 55 – 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$  (Gomella and Haist, 2007). Horní hranice tedy odpovídá 28  $\mu\text{M}$  koncentraci železa v plasmě. Pacienti s chronickým nadbytkem železa dosahují hodnot železa nad tuto hodnotu. Příkladem jsou pacienti s 275  $\mu\text{g}/\text{dl}$  (50  $\mu\text{M}$ ), 340  $\mu\text{g}/\text{dl}$  (60  $\mu\text{M}$ ), 380  $\mu\text{g}/\text{dl}$  (68  $\mu\text{M}$ ) či 415  $\mu\text{g}/\text{dl}$  (74  $\mu\text{M}$ ) železa v plasmě<sup>3</sup> (Schauben *et al.*, 1990; Daram and Hayashi, 2005). V extrémních případech lze nalézt pacienty s naměřenými hodnotami

---

<sup>3</sup> <http://www.irondisorders.org/iron-overload1>

koncentrace železa většími než 1000  $\mu\text{g}/\text{dl}$  železa, tedy koncentrací 179  $\mu\text{M}$  železa v plasmě. Takový značný nadbytek železa v plasmě je velmi vzácný a u pacientů je nutné okamžitě započít jeho drastické snižování. Byly doloženy případy pacientů s akutní otravou železem s obsahem sérového železa např. 1,70  $\text{mg}/\text{dl}$  (0,30  $\text{mM}$ ), 6,79  $\text{mg}/\text{dl}$  (1,22  $\text{mM}$ ), ale i 20,90  $\mu\text{g}/\text{dl}$  (3,74  $\text{mM}$ ) (Robertson and Tenenbein, 2005). Námi používaná koncentrace 15  $\text{mM}$  citrátu železitého pro experimenty v řádu desítek hodin (akutní efekt nadbytku železa) byla tedy zcela relevantní.

Toto je podpořeno i jinými studiemi, které rovněž využívali buněčné modely, např. prací Li *et al.*, 2015, kde autoři kultivovali lidskou jaterní buněčnou linii HH4 v 0,1 – 10  $\text{mM}$  nadbytku citrátu železito-amonného v horizontu 12 až 72 hodin se signifikantním snížením životaschopnosti HH4 buněk především u 5  $\text{mM}$  a 10  $\text{mM}$  koncentrace citrátu. Dále prací Barisani *et al.*, 2000, kdy i po 7 dnech kultivace buněk HEP-G2 v médiu s 0,72  $\text{mM}$  citrátem železito-amonným stále pozorovali více než 90 % životaschopných buněk a 50 % buněk s nadbytkem železa. Použití vysokých dávek železa bylo popsáno i v pracích se zvířecími buněčnými liniemi. Skupina dr. Masudy kultivovala izolované ostrůvky pankreatu potkana v médiu za přítomnosti železo-sacharózového komplexu o koncentracích 0  $\text{mM}$ , 0,35  $\text{mM}$ , 1,7  $\text{mM}$  a 3,5  $\text{mM}$ . Po kultivaci přes noc pozorovali v buňkách ostrůvků přítomnost nekrózy v závislosti na použité koncentraci komplexu (Masuda *et al.*, 2014). Nižší koncentrace železa byly použity při výzkumu Yang *et al.*, 2013, ve kterém autoři ošetřili potkanní srdeční buňky linie H9c2 0,3  $\text{mM}$  železem a po 72 hodinách detekovali apoptózu, nebo v práci Chen *et al.*, 2014, kteří indukovali apoptózu u myší srdeční buněčné linie HL-1 pomocí 0,3  $\text{mM}$  a 0,6  $\text{mM}$   $\text{FeCl}_3$ .

### **5.1.2 Buněčný model chronického vlivu nadbytku železa**

Pro dlouhodobou kultivaci buněk linií HEP-G2 a NES2Y jsme používali nadbytek citrátu železitého o koncentracích 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  citrátu železitého v médiu. Jedná se o koncentrace železa, které jsou dosažitelné v lidském séru u pacientů s nadbytkem železa (Gomella and Haist, 2007) a buňky obou linií jsou v těchto médiích schopny dlouhodobé proliferace. V případě buněk obou buněčných linií jsme však již po několika měsících jejich kultivace v těchto médiích zaznamenali signifikantně snížené růstové schopnosti (obr. 4.9, graf 4.2).

V minulosti bylo pozorováno, že mírný nadbytek železa podporuje růst nádorových buněk (Hann *et al.*, 1988; Hann 1991; Weinberg, 1992; Torti and Torti, 2013). Jedno z možných vysvětlení je, že nádorové buňky jsou energeticky náročnější kvůli vysoké

aktivitě metabolismu, takže vyšší příjem mikronutrientů a zvláště železa, je nutný předpoklad pro jejich rychlejší růst (Hann *et al.*, 1988; Hann 1991; Weinberg, 1992; Torti and Torti, 2013). Naše výsledky však naznačují opačný efekt. Růst a přežívání buněk obou linií bylo v médiu s 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  citrátem železitým naopak negativně ovlivněno ve srovnání s buňkami kontroly. Při vysazení stejného počtu buněk na stejnou kultivační plochu ve stejném objemu média byl rozdíl růstu jasně zřetelný (graf 4.2). Analýzou buněčného cyklu na průtokovém cytometru jsme nezaznamenali žádné změny v průběhu buněčným cyklem ani u jedné z buněčných linií dlouhodobě kultivovaných v nadbytku železa (graf 4.3). Tyto výsledky naznačují, že k ovlivnění růstu a přežívání u buněk dlouhodobě kultivovaných v nadbytku železa pravděpodobně nedocházelo z důvodu zpomalení buněčné proliferace, ale spíše z důvodu aktivace buněčné smrti.

S vysvětlením rozdílu mezi výsledky ukazujícími růst buněk a námi získanými daty může pomoci práce autorů Kiessling *et al.*, 2009, kteří ukázali, že lymfomové buňky zabraňovaly toxickému působení železem produkovaných reaktivních kyslíkových radikálů tak, že více exprimovaly těžký řetězec ferritinu stimulovaný signalizací NF- $\kappa$ B. Po inhibici dráhy NF- $\kappa$ B docházelo u nádorových buněk ke snížení exprese ferritinu a nádorové buňky umíraly, pravděpodobně právě kvůli poškozením způsobených přítomností ROS (Kiessling *et al.*, 2009). Přežívání nebo umírání buněk během nadbytku železa tak může záviset na konkrétním stavu buněk, jako je například právě různá exprese ferritinu.

Navíc jsou během experimentů s nadbytkem železa velice důležité nastavené experimentální podmínky, neboť i přítomnost malého množství antioxidantů může zabránit buněčnému poškození a následné buněčné smrti při stejných koncentracích železa v médiu (kapitola 5.1).

## 5.2 Homeostáze železa při nadbytku citrátu železitého

Pro ověření dosaženého přetížení buněk železem, a tedy správnosti vytvořeného buněčného modelu vlivu nadbytku železa na buněčné procesy, jsme sledovali změny exprese vybraných proteinů homeostáze železa. Sledovali jsme proteiny účastníci se regulace vnitřní homeostáze železa – IRP1 a IRP2 (iron regulatory protein 1, 2), proteiny účastníci se transportu železa přes membránu – DMT1 (divalent metal transporter 1), transferrinový receptor 1 (TfR1), ferroportin a protein účastníci se intracelulárního skladování železa – ferritin, lehký řetězec.

### 5.2.1 Vliv akutních vysokých dávek železa na vybrané proteiny homeostáze železa

U obou buněčných linií jsme pozorovali snižování hladin proteinů IRP1 i IRP2 (obr. 4.2). Stejná změna hladin IRP proteinů byla pozorována například během experimentů při ošetření buněk 0,9 mM citrátem železito-amonným, kdy po 24 hodinách od ošetření docházelo k signifikantnímu poklesu obou regulačních proteinů (Guo *et al.*, 1995). Snižováním exprese těchto regulačních proteinů buňka reaguje na vysoké hladiny železa v médiu ve snaze zabránit dalšímu příjmu železa do cytoplasmy.

Po 12 hodinách od aplikace 15 mM nadbytku citrátu železitého jsme dále pozorovali změny hladin proteinů zajišťujících transport železa u obou buněčných linií. Konkrétně jsme zaznamenali snížení hladiny proteinů DMT1 a TfR1 u obou linií (obr. 4.2) a ferroportinu u linie HEP-G2 (obr. 4.2 A). U linie NES2Y se na rozdíl od buněk HEP-G2 hladina proteinu ferroportinu zvyšovala (obr. 4.2 B). V případě proteinu ferritinu sloužícího jako zásobní protein železa docházelo u obou buněčných linií k jeho zvýšené expresi (obr. 4.2). I v případě jiných studií bylo pozorováno snížení hladiny DMT1 např. při vystavování linie Caco-2 TC7 železitým kationtům. Ke snižování docházelo 24 až 72 hodin po ošetření v závislosti na dávce (Sharp *et al.*, 2002). Snižování hladiny TfR1 bylo pozorováno u mnoha pokusů studujících vliv nadbytku železa na buňky (Trinder *et al.*, 1990; Hoepken *et al.*, 2004), ale i např. u pacientů s hemochromatózou (Sciot *et al.*, 1987; Lombard *et al.*, 1990). V těchto pracích autoři ukázali, že námi sledovaný efekt snižování TfR1 po aplikaci 15 mM citrátu železitého u buněk, v jejich případě nastává již při nižším nadbytku železa. Změny hladin těchto proteinů pravděpodobně nastaly v důsledku působení již zmíněných IRP regulačních molekul, jejichž snížení má za následek sníženou translaci jak proteinu DMT1, tak TfR1 (kapitola 2.2.1).

Snížení hladiny exportéru železa ferroportinu u buněčné linie HEP-G2 může být vysvětleno působením hepcidinu. (kapitola 2.2.2). Hepcidin je exprimován především jaterní tkání (Park *et al.*, 2001) a k jeho syntéze dochází i u buněk HEP-G2 (Fein *et al.*, 2007). Snižování hladiny ferroportinu bylo také pozorováno např. u pacientů s nealkoholovou steatózou jater, u kterých docházelo k přetížení železem, které bylo doprovázeno zvýšenou expresí hladiny hepcidinu a tudíž sníženou hladinou ferroportinu (Aigner *et al.*, 2008). Ke zvýšení hladiny hepcidinu u buněk kultivovaných v nadbytku železa dochází v důsledku působení celé škály signálních kaskád, které jsou aktivovány právě vysokými hladinami železa, např. přes TfR2 (Pigeon *et al.*, 2001; Rishi *et al.*, 2015). V případě buněk linie NES2Y docházelo na rozdíl od linie HEP-G2 po ošetření nadbytkem železa ke zvýšení

exprese ferroportinu. Tento efekt byl pozorován i u jiných modelů jak na úrovni mRNA (Aydemir *et al.*, 2009), tak proteinu (Knutson *et al.*, 2003a).

Reakce buněčné linie HEP-G2 odpovídá *in vivo* funkci jaterních buněk při ochraně okolní tkáně před toxickým působením železa. Dochází k jeho zadržování v těchto buňkách pravděpodobně působením hepcidinu (viz výše). Zvýšená exprese ferroportinu u linie NES2Y naopak vede k ochraně buněk před toxickým působením železa uvnitř buňky jeho exportem ven. Vzhledem k izolaci buněčné linie od celotělové regulace sérovým hepcidinem, je regulace homeostáze železa v buňkách NES2Y řízena především systémem IRP/IRE v důsledku čehož je tedy hladina exprese ferroportinu zvyšována (kapitola 2.2.1).

Zvýšení exprese ferritinu sloužícího jako zásobní protein pro železo je v souladu se zvyšujícím se příjmem železa do buněk a dochází k němu především prostřednictvím IRP/IRE systému (Horák *et al.*, 2010).

### **5.2.2 Vliv dlouhodobě zvýšených dávek železa na vybrané proteiny homeostáze železa**

Během kultivace buněk při dlouhodobém nadbytku železa jsme u buněčné linie HEP-G2 pozorovali snižování hladiny importéru železa TfR1 a zvyšování hladiny vazebného proteinu ferritinu. Hladina proteinu ferroportinu u buněk linie HEP-G2 v důsledku nadbytku železa v médiu rovněž rostla. U regulačních proteinů IRP1 a IRP2 nedocházelo u linie HEP-G2 k viditelným změnám v hladinách proteinů během dlouhodobé kultivace v médiu s citrátem železitým (obr. 4.10 A). Stejně tak docházelo k poklesu exprese importerů železa u buněčné linie NES2Y. Na rozdíl od linie HEP-G2 docházelo u linie NES2Y k poklesu exprese regulačních proteinů IRP1 a IRP2 v prvních měsících kultivace v médiu s nadbytkem citrátu železitého. Zvyšovaly se hladiny vazebného proteinu ferritinu, hladina exportéru železa ferroportinu se u linie NES2Y neměnila (obr. 4.10 B).

Z těchto výsledků vyvozujeme, že exprese proteinů homeostáze železa v důsledku nadbytku železa závisí na buněčných typech a jejich potřebách. Rozdíl v příjmu železa a expresi proteinů účastnících se homeostáze železa v různých buněčných typech byl již dříve pozorován například v pracích Balušíková *et al.*, 2009; Lopes *et al.*, 2010 nebo diskutován v práci Eisenstein, 2000.

Mechanismus regulace exprese sledovaných molekul účastnících se homeostáze železa se zdá se neliší mezi akutním a dlouhodobým efektem působení nadbytku železa. Nicméně při dlouhodobé kultivaci jsou detekované změny v expresi mírnější. Některé

změny v expresi proteinů zaznamenané při akutním nadbytku železa jsme u dlouhodobého efektu nadbytku železa nedetekovali pravděpodobně v důsledku malých změn v expresi v kombinaci s detekčním limitem použité metody.

### **5.3 Vliv vysokých dávek železa na oxidativní stres, stres endoplasmatického retikula a autofagii**

V souvislosti s vysokými hladinami železa v buňkách jsme sledovali vybrané proteiny reagující na oxidativní stres SOD1, SOD2 (superoxid dismutase 1/2), glutathion reduktáza, HIF1 $\alpha$  a HIF2 $\alpha$  (hypoxia-inducible factors 1/2), proteiny účastnící se stresu endoplasmatického retikula PERK, IRE1 $\alpha$  a jeho fosforylovanou formu p-IRE1 $\alpha$  (fosfo Ser724), kalnexin, BiP, Ero1-L $\alpha$ , PDI, CHOP a fosforylované formy eukaryotického iniciačního faktoru p-eIF2 $\alpha$  (fosfo Ser51) a proteiny účastnící se procesu autofagie – mTOR (mammalian target of rapamycin), protein p62 a protein LC3B (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 B).

#### **5.3.1 Vliv akutních vysokých dávek železa na vybrané proteiny reagující na oxidativní stres, stres endoplasmatického retikula a účastnících se autofagie**

SOD enzymy běžně slouží k přeměně superoxidových radikálů na peroxid vodíku, který je v buňce dále redukován (Galaris and Pantopoulos, 2008). Ovšem v případě působení nadbytku železa byla v některých případech pozorována snížená aktivita nebo hladina těchto antioxidačních enzymů, stejně jako vyčerpání antioxidantů jako jsou  $\alpha$ -tokoferol, kyselina askorbová nebo retinol (Bartfay and Bartfay, 2000; Turoczi *et al.*, 2003). Glutathion reduktáza je enzym, jež slouží k redukcí glutathionu, který je důležitou molekulou v obraně buňky proti oxidativnímu stresu (Deponte, 2013). Proteiny HIF1 $\alpha$  a HIF2 $\alpha$  jsou stabilizovány během hypoxie či nedostatku železa (Koukourakis *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Peyssonnaux *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 2013).

Z našich pozorování vychází, že u obou buněčných linií nedocházelo k žádným změnám exprese proteinů HIF1 $\alpha$  a HIF2 $\alpha$  po aplikaci 15 mM citrátu železitého. Stejně tak jsme ani u jedné buněčné linie nepozorovali změnu hladiny glutathion reduktázy (obr. 4.3). Tyto proteiny tak za našich podmínek pravděpodobně nehrají roli při ochraně buňky před toxickým působením železa.

Zaznamenali jsme ovšem změny exprese u proteinů SOD1 a SOD2 (obr. 4.3). U linie HEP-G2 docházelo k poklesu exprese SOD1 oproti kontrole, u linie NES2Y se

hladina proteinu SOD1 neměnila. Hladina proteinu SOD2 rostla u obou linií. Změny hladin proteinů SOD1 i SOD2 již byly u buněk během působení nadbytku železa pozorovány, a to jak jejich snížení (Cockell *et al.*, 2005; Galleano and Puntarulo, 1994; Puukila *et al.*, 2015; Badria *et al.*, 2015), tak zvýšení (Zhao *et al.*, 1995; Abdalla *et al.*, 2011; Macco *et al.*, 2013). Snížená hladina SOD proteinů může být zapříčiněna menší absorpcí ostatních kovů kvůli vysokému importu  $Fe^{2+}$ . Takto byla v buňce pozorovaná nižší koncentrace manganu, zinku a mědi, které jsou důležité právě pro fungování SOD1 a SOD2 (Cockell *et al.*, 2005; Jouihan *et al.*, 2008). Naopak námi pozorovaná rostoucí hladina proteinu SOD2 u obou linií může být známkou vzrůstajícího oxidativního stresu v buňkách ošetřených médiem s nadbytkem železa (Zhao *et al.*, 1995; Macco *et al.*, 2013).

Změny hladin proteinů účastnících se stresu endoplasmatického retikula jsme sledovali u obou buněčných linií již 12 hodin po ošetření buněk nadbytkem železa (obr. 4.4 a 4.5). V tomto čase jsme zaznamenali zvýšené hladiny proteinů PERK a IRE1 $\alpha$  oproti kontrolním buňkám. U linie HEP-G2 docházelo po 36 hodinách po ošetření buněk nadbytkem železa k poklesu těchto proteinů vůči kontrole. Během experimentů jsme u obou linií dále sledovali přítomnost fosforylované formy eIF2 $\alpha$ , u linie HEP-G2 stoupající s časem. U obou linií jsme také pozorovali zvýšenou hladinu transkripčního faktoru CHOP 36 hodin po ošetření a u buněčné linie NES2Y v čase 12 hodin docházelo ke zvýšení exprese chaperonu BiP. Ani u jedné buněčné linie jsme ovšem nedetekovali zvyšující se hladiny fosforylované formy IRE1 $\alpha$ . Naopak u buněčné linie HEP-G2 dochází po 36 hodinách od ošetření buněk nadbytkem železa k poklesu hladiny p-IRE1 $\alpha$  oproti kontrole. Tento pokles může být vysvětlen prací Lin *et al.*, 2007, ve které autoři pozorovali během příliš dlouho trvajícího stresu endoplasmatického retikula snížení hladiny proteinů ATF6 a právě p-IRE1 $\alpha$ . Pokles p-IRE1 $\alpha$  u našich experimentů může souviset s pozorováním, že při dlouhé aktivaci štěpí p-IRE1 $\alpha$  krom ostatních substrátů i svou vlastní mRNA (Tirasophon *et al.*, 2000).

Po aplikaci 15 mM citrátu železitého jsme tak jednoznačně pozorovali známky probíhajícího stresu endoplasmatického retikula. Ke stresu endoplasmatického retikula dochází, pokud je buňka vystavena hypoxii, deprivaci glukózy, oxidativnímu stresu, virové infekci, vysokým hladinám tuků a cholesterolu nebo při mutacích specifických proteinů (Tsai and Weissman, 2010). Právě oxidativní stres vyvolaný přítomností nadbytku železa tak může být důvodem námi detekovaného stresu endoplasmatického retikula. Během stresu endoplasmatického retikula stojí proteiny PERK a IRE1 $\alpha$  na počátku signalizace UPR (unfolded protein response – kapitola 2.4.2.3). Aktivovaný protein PERK je

zodpovědný za fosforylaci eukaryotického iniciačního faktoru  $2\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ), což vede k zastavení translace většiny proteinů. Je tak odlehčen nápor nově syntetizovaných proteinů na endoplasmatické retikulum (Harding *et al.*, 1999). Zároveň však dochází k podpoření translace např. transkripčního faktoru ATF4 (activating transcription factor 4), který zajišťuje expresi transkripčního faktoru CHOP a chaperonu BiP (Harding *et al.*, 1999), což je v souladu s našimi pozorováními. Námi pozorovaná vyšší aktivita proteinů PERK a IRE1 $\alpha$  společně s fosforylací eIF2 $\alpha$ , změnou exprese chaperonu BiP, transkripčního faktoru CHOP byly také pozorovány v řadě jiných experimentů s nadbytkem železa (Petrák *et al.*, 2007; Lou *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016). Práce Lou *et al.*, 2009 zároveň propojuje stres endoplasmatického retikula s aktivací apoptózy.

Na základě našich výsledků, které jsou podpořeny pozorováním jiných výzkumných skupin zabývajících se vlivem nadbytku železa na buněčné procesy usuzujeme, že dalším mechanismem přispívajícím k poškození buněk a tkání působením nadbytku železa je signalizace reagující na stres endoplasmatického retikula. Stres endoplasmatického retikula v důsledku nadbytku železa může být buď přímou příčinou buněčného poškození nebo může vést k následným procesům poškození až smrti buňky.

Kromě stresu endoplasmatického retikula, jsme v buňkách ošetřených 15 mM nadbytkem citrátu železitého pozorovali známky probíhající autofagie. U obou linií docházelo k poklesu proteinu p62 (obr. 4.6), který je důležitý při rozpoznávání specifických substrátů určených k degradaci. Po navázání je protein p62 se substrátem naveden do váčku směřujícího do lysozomu (autofagozom) (Reggiori *et al.*, 2012). Zároveň jsme u obou linií pozorovali postupné přibývání proteinu LC3B (obr. 4.6), který je důležitý pro formování autofagozomu a rozvoj autofagie (Mizushima *et al.*, 2011). Hladina proteinu mTOR se neměnila ani u jedné námi zkoumané buněčné linie (obr. 4.6). Autofagie byla pozorována při pokusech na buněčné linii SH-SY5Y používané při studiu Parkinsonovy choroby. Po zvýšení exprese DMT1 na těchto buňkách autoři pozorovali významný nárůst železa uvnitř buněk, který vedl ke zvýšení oxidativního stresu a následně autofagie (Chew *et al.*, 2011). Dále byla autofagie pozorována při použití nanopartikulí oxidu železa na rakovinné buňky karcinomu plic A549. Partikule obsahující železo vyvolaly v buňkách oxidativní stres, který vedl ke zvýšení autofagie a k nekróze (Khan *et al.*, 2012).

Námi pozorované známky probíhající autofagie při ošetření buněk citrátem železitým jsou v souladu s pozorováním některých autorů zabývajících se nadbytkem



železa. Pravděpodobně se jedná o snahu odstranit poškozené kompartmenty a snížit tak dopad toxicity železa uvnitř buňky. Vzhledem k neměnicí se hladině proteinu mTOR však pravděpodobně nebyla signalizace autofagie spuštěna na základě vnějších signálů.

### **5.3.2 Vliv dlouhodobě zvýšených dávek železa na vybrané proteiny reagující na oxidativní stres, stres endoplasmatického retikula a účastnících se autofagie**

Rovněž u dlouhodobě kultivovaných buněk jsme testovali změny v hladinách vybraných proteinů účastnících se odpovědi na oxidativní stres, jmenovitě proteinů SOD1, SOD2, glutathion reduktázy, HIF1 $\alpha$  a HIF2 $\alpha$ . Ani u jednoho z testovaných proteinů jsme u obou buněčných linií nepozorovali žádné změny v expresi (obr. 4.11) s výjimkou SOD1 u linie NES2Y (obr. 4.11 B). Změny v expresi proteinu SOD1 však byly nekonzistentní, a tudíž nepřesvědčivé.

Změna hladiny SOD1 a SOD2 při mírném nadbytku železa však byla pozorována v experimentech Cockell *et al.*, 2005, a to v důsledku deficiencie mědi. Autoři ukázali, že samotné zvýšení hladiny železa nevede ke změnám v proteinech SOD1 i SOD2. Absence změny v expresi proteinů SOD1 a SOD2 u našich buněčných modelů tedy může být výsledek toho, že námi zvolený nadbytek železa (tedy 50  $\mu$ M a 100  $\mu$ M) nebrání v absorpci kationtů ostatních kovů prostřednictvím DMT1.

Stejně jako v případě vysokých dávek železa jsme u dlouhodobě kultivovaných buněk při dlouhodobém nadbytku železa testovali přítomnost stresu endoplasmatického retikula. Ani u jedné buněčné linie jsme však při kultivaci buněk v médiu s nadbytem železa nepozorovali signifikantní známky probíhajícího stresu endoplasmatického retikula. Možné změny v hladinách proteinů stresu endoplasmatického retikula jsme přitom zaznamenali u buněčné linie HEP-G2 pouze v případě transkripčního faktoru CHOP zvyšujícího se v závislosti na dávce citrátu železitého (obr. 4.13 A) a u linie NES2Y v případě proteinu ERO1-L $\alpha$  a IRE1 $\alpha$  opět zvyšujících se v závislosti na dávce citrátu železa (obr. 4.13 B a 4.12 B).

Jak již bylo diskutováno v kapitole 5.3.1, stres endoplasmatického retikula lze pozorovat nejen po vystavení buněk nebo modelových zvířat vysokým dávkám železa, ale také při chronickém působení nadbytku železa (Lou *et al.*, 2009; Dongiovanni *et al.*, 2013). Námi pozorované případné zvyšování hladin IRE1 $\alpha$ , ERO1-L $\alpha$  a CHOP tak může být projevem přítomnosti pouze mírného stresu endoplasmatického retikula při chronické kultivaci buněk ve dlouhodobě zvýšených hladinách železa.

Ve srovnání s akutním efektem nadbytku citrátu železitého na testované buněčné linie jsou námi testované projevy oxidativního stresu a stresu endoplasmatického retikula u dlouhodobě kultivovaných buněk minimální nebo námi použitou metodou nedetekovatelné, a tedy pravděpodobně výrazněji neovlivňují růstové schopnosti buněk během jejich dlouhodobé kultivace při nadbytku citrátu železitého.

## 5.4 Aktivace kaspáz

Pro detekci aktivace apoptózy buněk vystavených nadbytku železa jsme sledovali expresi vybraných kaspáz a jejich štěpů. Sledovali jsme proteinové hladiny iniciačních kaspáz – kaspázy-2, -8 a -9 a proteinové hladiny exekučních kaspáz – kaspázy-3, -6 a -7.

### 5.4.1 Vliv akutních vysokých dávek železa na aktivaci kaspáz

Z výsledků našich experimentů vyplývá, že použitá akutní vysoká koncentrace citrátu železitého (15 mM citrát železitý v médiu) vyvolává u buněk linií HEP-G2 a NES2Y aktivaci iniciačních i exekučních kaspáz. Tato změna se projevovala již 12 hodin po ošetření buněk. V tomto čase docházelo u obou linií k aktivaci kaspázy-8 (obr. 4.7). Společně docházelo ke zvyšování hladin štěpených forem všech tří studovaných exekučních kaspáz (kaspáza-3, kaspáza-6, kaspáza-7) (obr. 4.8), což společně se štěpením kaspázy-8 naznačuje aktivaci vnější dráhy apoptotické signalizace. Případnou pozdější aktivaci vnitřní dráhy apoptózy předpokládáme u linie HEP-G2, u které poklesla hladina celé formy kaspázy-9 po 24 hodinách. Hladina kaspázy-9 u linie NES2Y zůstala v námi testovaném časovém horizontu beze změny. Ani u jedné buněčné linie se nám nepodařilo úspěšně zachytit štěp kaspázy-9 (obr. 4.7). Předpokládaná aktivace vnější dráhy apoptózy v důsledku nadbytku železa je podpořena prací Li *et al.*, 2015, kde autoři při ošetření buněk nadbytkem železa ukázali aktivaci apoptózy vnější dráhou prostřednictvím exprese Fas ligandu. Zároveň také ukázali, že souběžně dochází ke štěpení proteinu Bid a aktivaci kaspázy-9, a tedy i k aktivaci vnitřní dráhy apoptózy.

Aktivace vnitřní dráhy apoptózy byla dále pozorována v důsledku působení nadbytku železa na myší a lidské erytroidní buňky (Taoka *et al.*, 2012) a během hromadění železa v oblasti *substantia nigra* myších mozků (You *et al.*, 2015). V obou zmíněných případech dochází ke snižování hladiny anti-apoptotického proteinu Bcl-2 a projevům apoptózy. V již zmíněných pracích na buněčných liniích HL-1 (Chen *et al.*, 2014) a H9c2 (Yang *et al.*, 2013) byla ukázána aktivace apoptózy spojená s aktivitou kaspázy-9, která odpovídá

i práci Gu *et al.*, 2014, kde během nadbytku železa docházelo nejen ke zvýšení hladiny kaspázy-9, ale i adaptového proteinu Apaf-1, který je důležitý právě pro aktivaci vnitřní dráhy. Žádný ze zmíněných autorů nepopsal aktivaci exekuční kaspázy-6 a kaspázy-7, které jsme pozorovali v našich experimentech.

#### 5.4.1.1 Aktivace kaspázy-2 během akutního nadbytku železa

Poprvé se nám povedlo ukázat aktivaci kaspázy-2 v reakci na nadbytek železa (obr. 4.7). Jak u buněčné linie HEP-G2, tak linie NES2Y docházelo již 12 hodin po ošetření 15 mM citrátem železitým ke značnému poklesu hladiny celé formy kaspázy-2 v čase. Zároveň jsme pozorovali zvýšení hladiny štěpu oproti kontrole. Stejně jako některé ostatní kaspázy, je kaspáza-2 spojena s procesem iniciace apoptózy. Ta navíc může být oddělena od vnitřní i vnější dráhy a nezávislá na aktivitě proteinu p53, jako tomu je například při poškození DNA  $\gamma$  radiací, kdy není aktivní CHK1 (checkpoint kinase 1) (Sidi *et al.*, 2008).

Známou signální dráhou, kterou kaspáza-2 aktivuje vnitřní dráhu apoptózy, je sestavení PIDDozomu, aktivace proteinu Bid a Bax a uvolnění cytochromu c z mezimembránového prostoru mitochondrií (Ho *et al.*, 2008). Svou úlohu hraje kaspáza-2 také v regulaci buněčného cyklu a opravách DNA pomocí NHEJ (non homologous end joining) (Vakifahmetoglu-Norberg and Zhivotovsky, 2010). Působení kaspázy-2 v našem našem modelu však pravděpodobně zahrnuje její aktivaci přítomností reaktivních oxidativních radikálů (ROS). Aktivace kaspázy-2 byla pozorována např. u nervových kmenových buněk po indukci tvorby ROS pomocí DMNQ (2,3-dimethoxy-1,4-naphthiquinon) (Tamm *et al.*, 2008), nebo po indukci ROS u neuroblastomu pomocí t-BOOH (tert-butylhydroperoxide) (Amoroso *et al.*, 2002). V jiné práci byla pozorována aktivace kaspázy-2 po indukci tvorby ROS uvnitř buňky, kde aktivovaná kaspáza-2 vedla k aktivaci kaspázy-3 (Kim *et al.*, 2012). Pomocí siRNA tato skupina navíc ukázala, že pro indukci apoptózy je důležitá právě aktivace kaspázy-2 a následně kaspázy-3 oproti aktivitě kaspázy-8 a kaspázy-9 (Kim *et al.*, 2012). Naše vlastní experimenty s inhibicí exprese kaspázy-2 pomocí siRNA však byly nekonzistentní (data neukázána).

Při testování aktivace kaspáz u buněčné linie NES2Y po ošetření buněk 10 mM citrátem železitým, na rozdíl od námi běžně používaného 15 mM citrátu, jsme během 36 hodin nedetekovali žádné štěpy exekučních kaspáz. Ovšem již ve 12 hodinách po aplikaci 10 mM citrátu železitého docházelo k výraznému snížení hladiny celé formy kaspázy-2 (data neukázána). Ve spojení s tím, že při ošetření buněk 15 mM citrátem železitým

dochází k výrazné fosforylaci p-eIF2 $\alpha$  později než k aktivaci kaspáz, a tedy i možnému zastavení translace, usuzujeme, že kaspáza-2 může být důvodem aktivace apoptózy u buněk ošetřených vysokými koncentracemi železa.

Na základě výše zmíněných studií a našeho pozorování předpokládáme, že kaspáza-2 je aktivována ROS vznikajícími intracelulárně v důsledku nadbytku železa a její aktivita se podílí na snížení životaschopnosti takto poškozených buněk.

#### **5.4.2 Vliv dlouhodobě zvýšených dávek železa na aktivaci kaspáz**

Snížená schopnost buněk dlouhodobě proliferovat v nadbytku železa může být zapříčiněna přítomností aktivovaných kaspáz. Štěpy exekuční kaspázy-3, kaspázy-6 i kaspázy-7 jsme v buňkách detekovali již po jednom měsíci dlouhodobé kultivace (obr. 4.15). Hladina štěpů kaspáz korespondovala s rostoucí koncentrací citrátu železitého. Je ovšem zajímavé, že k aktivaci exekučních kaspáz docházelo bez známek aktivace iniciační kaspázy-8 nebo -9 (obr. 4.14).

##### **5.4.2.1 Aktivace kaspázy-2 během dlouhodobého nadbytku železa**

Jediná námi testovaná iniciační kaspáza, u které docházelo k aktivaci, je kaspáza-2 (obr. 4.14 A). Její štěp se objevoval již po prvním měsíci dlouhodobé kultivace buněk v nadbytku železa u buněčné linie HEP-G2. U buněčné linie NES2Y se nám v případě dlouhodobé kultivace buněk v médiu s nadbytkem železa nepodařilo štěp kaspázy-2 detekovat. Možná role kaspázy-2 v aktivaci apoptózy je diskutována výše v kapitole 5.4.1.1. Námi pozorované zvýšené hladiny štěpených forem exekučních kaspáz -3, -6 a -7 u obou buněčných linií, zvyšující se hladina štěpené formy iniciační kaspázy-2 u linie HEP-G2 a nejasné změny v hladinách celých či štěpených forem iniciačních kaspáz -8 a -9 podporují námi předpokládanou roli kaspázy-2 v aktivaci apoptózy během působení nadbytku železa na buněčné linie. Štěpení kaspázy-2 během dlouhodobého působení nadbytku železa (chronický efekt) na testované buněčné linie bylo stejně jako v případě krátkodobé kultivace ve vysokém nadbytku železa (akutní efekt) pozorováno poprvé.

Na základě našich výsledků předpokládáme, že přítomnost aktivovaných kaspáz u pacientů s chronickým nadbytkem železa může být vysvětlením, proč u těchto pacientů často dochází například k histologickým změnám jater, jako je rozvoj parenchymální siderózy (Özgüner and Sayin, 2002), jaterní cirhózy (Lisboa, 1971), nebo ke vzniku diabetes mellitus (Swaminathan *et al.*, 2007).

## 6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo přispět k objasnění molekulárních mechanismů vedoucích k buněčnému poškození a následné buněčné smrti v důsledku působení nadbytku železa u vybraných buněčných linií. Jako model jsme použili buňky linie HEP-G2 reprezentující lidské hepatocyty a buňky linie NES2Y reprezentující lidské pankreatické beta buňky, které představují buněčné typy nejčastěji poškozované nadměrnou akumulací železa.

[1] Pro studium akutního i dlouhodobého působení nadbytku železa se nám podařilo vytvořit vhodné buněčné modely odpovídající oběma těmto stavům. Pro studium akutního vlivu vysokých hladin železa na použité buněčné linie jsme použili takové koncentrace citrátu železitého v médiu, které při krátkodobé kultivaci vedly ke snížení množství buněk pod inokulum v řádu desítek hodin, tj. 15 mM citrát železitý v médiu. Ke studiu efektu chronického nadbytku železa jsme vytvořili model dlouhodobě kultivovaných buněk v médiu s nadbytkem citrátu železitého, jehož koncentrace odpovídají hodnotám železa běžně naměřitelných v plasmě u pacientů s diagnostikovaným dlouhodobým nadbytkem železa, tj. 50  $\mu$ M a 100  $\mu$ M citrát železitý v médiu.

[2] Na základě analýzy hladin proteinů účastnících se homeostáze železa jsme potvrdili, že buňky námi testovaných buněčných linií vykazují známky přetížení železem a to jak v případě krátkodobé, tak dlouhodobé kultivace buněk v médiích s nadbytkem železa. U obou buněčných linií jsme po krátkodobé i dlouhodobé kultivaci buněk v médiích s nadbytkem železa detekovali zvyšující se hladiny vazebného proteinu ferritinu, reagující na zvyšující se intracelulární hladiny železa. Buňky zároveň reagovali na vysoké hladiny citrátu železitého v médiu sníženou expresí importérů kationtů železa ve snaze snížit příjem železa přes plasmatickou membránu. V závislosti na buněčném typu pravděpodobně docházelo i k vyššímu exportu iontů železa z buňky prostřednictvím exportéru ferroportinu.

[3] Zjistili jsme, že krátkodobá kultivace buněk obou vybraných linií v médiu s 15 mM citrátem železitým vede ke stresu endoplasmatického retikula v buňkách. Ke změnám exprese markerů stresu endoplasmatického retikula na proteinové úrovni docházelo již po 12 hodinách od aplikace nadbytku železa. V případě dlouhodobé kultivace buněk v nadbytku železa byly změny v hladinách proteinových markerů stresu

endoplasmatického retikula minimální či námi nedetekované u obou buněčných linií. Ke stresu endoplasmatického retikula docházelo pravděpodobně v důsledku oxidativního stresu vyvolaného zvýšenou přítomností volných iontů železa v buňce. Znamky oxidativního stresu v buňkách obou linií se nám podařilo prokázat pouze u v případě akutního přetížení buněk železem. V případě dlouhodobé kultivace buněk v přítomnosti nadbytku železa se změny hladin námi testovaných markerů oxidativního stresu nepodařilo jednoznačně prokázat. V případě akutního přetížení buněk železem jsme u obou linií navíc zaznamenali přítomnost autofagie. Pravděpodobně se jednalo o snahu buněk odstranit poškozené buněčné kompartmenty a snížit tak dopad toxicity železa uvnitř buňky.

[4] U obou buněčných linií se nám v důsledku přetížení železem podařilo prokázat buněčnou smrt apoptózou. Buňky obou buněčných linií reagovali na krátkodobý nadbytek citrátu železitého aktivací iniciačních i exekučních kaspáz. Vzhledem k prvotní aktivaci kaspázy-8 a absenci aktivované kaspázy-9 předpokládáme, že při poškození buněk železem, dochází k aktivaci apoptózy pravděpodobně vnější drahou. Z exekučních kaspáz byly aktivovány kaspáza-3, -6 a -7. Štěpy exekuční kaspázy-3, kaspázy-6 i kaspázy-7 jsme detekovali i v buňkách dlouhodobě kultivovaných v médiu s nadbytkem železa a to již po jednom měsíci kultivace. Přítomnost aktivovaných exekučních kaspáz je pravděpodobně důvodem snížené schopnosti buněk dlouhodobě proliferovat v nadbytku železa. Dále jsme v případě krátkodobého i dlouhodobého působení nadbytku železa jako první detekovali štěp kaspázy-2. Její role v indukcii apoptózy v důsledku působení vysokých dávek železa bude předmětem našich dalších studií.

Na vytvořených buněčných modelech akutního i chronického efektu nadbytku železa jsme ukázali, že po vystavení buněk zvýšeným koncentracím železa v médiu dochází v případě obou buněčných linií k aktivaci kaspáz a tedy buněčné smrti apoptózou. Na rozdíl od chronického působení nadbytku železa na buňky vybraných linií jsme u buněčného modelu akutního efektu vysokých dávek železa jednoznačně pozorovali probíhající oxidativní stres a stres endoplasmatického retikula, který může být jedním z procesů přispívajícím ke smrti buněk.

V budoucnu se na vytvořených buněčných modelech budeme hlouběji zabývat rolí kaspázy-2 v procesech poškození buněk a tkání v důsledku nadbytku železa, prohloubením znalostí o nalezených drahách, především vnitřní dráhou aktivace apoptózy, a dalšími procesy, které se mohou poškození a smrti buněk v důsledku nadbytku železa účastnit.

## 7 LITERATURA

- Abboud, S., Haile, D. J., 2000. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem.* 275(26):19906-12.
- Abdalla, M. Y., Fawzia, M., Al-Maloula, S. R., El-Bannab, N., Tayyemc, R. F., Ahmadd, I. M., 2011. Increased Oxidative Stress and Iron Overload in Jordanian  $\beta$ -Thalassemic Children. *Hemoglobin.* 35(1):67-79.
- Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., Knowles, B. B., 1979. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. 282(5739):615-6.
- Aigner, E., Theurl, I., Theurl, M., Lederer, D., Haufe, H., Dietze, O., Strasser, M., Datz, Ch., Weiss, G., 2008. Pathways underlying iron accumulation in human nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr.* 87(5):1374-1383.
- Allen, K. J., Gurrin, L. C., Constantine, C. C., Osborne, N. J., Delatycki, M. B., Nicoll, A. J., McLaren, C. E., Bahlo, M., Nisselle, A. E., Vulpe, C. D., Anderson, G. J., Southey, M. C., Giles, G. G., English, D. R., Hopper, J. L., Olynyk, J. K., Powell, L. W., Gertig, D. M., 2008. Iron-overload-related disease in HFE hereditary hemochromatosis. *N Engl J Med.* 358(3):221-30.
- Almeida, A. M., Bertocini, C. R., Borecký, J., Souza-Pinto, N. C., Vercesi, A. E., 2006. Mitochondrial DNA damage associated with lipid peroxidation of the mitochondrial membrane induced by Fe<sup>2+</sup>-citrate. *An Acad Bras Cienc.* 78(3):505-14.
- Altman, S. A., Zastawny, T. H., Randers-Eichhorn, L., Cacciuttolo, M. A., Akman, S. A., Dizdaroglu, M., Rao, G., 1995. Formation of DNA-protein cross-links in cultured mammalian cells upon treatment with iron ions. *Free Radic Biol Med.* 19(6):897-902.
- Amaral, J. D., Xavier, J. M., Steer, C. J., Rodrigues, C. M., 2010. The role of p53 in apoptosis. *Discov Med.* 9(45):145-52.
- Amoroso, S., D'Alessio, A., Sirabella, R., Di Renzo, G., Annunziato, L., 2002. Ca (2+)-independent caspase-3 but not Ca (2+)-dependent caspase-2 activation induced by oxidative stress leads to SH-SY5Y human neuroblastoma cell apoptosis. *J Neurosci Res.* 68(4):454-62.
- Anderson, G. J., Frazer, D. M., McKie, A. T., Vulpe, C. D., Smith, A., 2005. Mechanisms of haem and non-haem iron absorption: lessons from inherited disorders of iron metabolism. *Biometals.* 18(4):339-48.
- Anderson, E. R., Taylor, M., Xue, X., Ramakrishnan, S. K., Martin, A., Xie, L., Bredell, B. X., Gardenghi, S., Rivella, S., Shah, Y. M., 2013. Intestinal HIF2 $\alpha$  promotes tissue-iron accumulation in disorders of iron overload with anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(50): E4922-E4930.
- Andrews, N. C., 1999. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med.* 341(26):1986-95.
- Arden, K. E., Wallace, D. F., Dixon, J. L., Summerville, L., Searle, J. W., Anderson, G. J., Ramm, G. A., Powell, L. W., Subramaniam, V. N., 2003. A novel mutation in ferroportin1 is associated with haemochromatosis in a Solomon Islands patient. 52(8):1215-7.

- Asano, T., Komatsu, M., Yamaguchi-Iwai, Y., Ishikawa, F., Mizushima, N., Iwai, K., 2011. Distinct Mechanisms of Ferritin Delivery to Lysosomes in Iron-Depleted and Iron-Replete Cells. *Mol Cell Biol.* 31(10): 2040–2052.
- Ashkenazi, A., Dixit, V. M., 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 281(5381):1305-8.
- Attieh, Z. K., Mukhopadhyay, C. K., Seshadri, V., Tripoulas, N. A., Fox, P. L., 1999. Ceruloplasmin ferroxidase activity stimulates cellular iron uptake by a trivalent cation-specific transport mechanism. *J Biol Chem.* 274(2):1116-23.
- Aydemir, F., Jenkitkasemwong, S., Gulec, S., Knutson, M., D., 2009. Iron loading increases ferroportin heterogeneous nuclear RNA and mRNA levels in murine J774 macrophages. *J Nutr.* 139(3):434-8.
- Bacon, B. R., Park, C. H., Brittenham, G. M., O'Neill, R., Tavill, A.S., 1985. Hepatic mitochondrial oxidative metabolism in rats with chronic dietary iron overload. *Hepatology.* 5(5):789-97.
- Bacon, B. R., O'Neill, R., Britton, R. S., 1993. Hepatic mitochondrial energy production in rats with chronic iron overload. *Gastroenterology.* 105(4):1134-40.
- Badria, F. A., Ibrahim, A. S., Badria, A. F., Elmarakby, A. A., 2015. Curcumin Attenuates Iron Accumulation and Oxidative Stress in the Liver and Spleen of Chronic Iron-Overloaded Rats. *PLoS One.* 10(7):e0134156.
- Bakker, G. R., Boyer, RF., 1986. Iron incorporation into apoferritin. The role of apoferritin as a ferroxidase. *J Biol Chem.* 261(28):13182-5.
- Balušíková, K., Neubauerová, J., Dostalíková-Čimbuřová, M., Horák, J., Kovář, J., 2009. Differing expression of genes involved in non-transferrin iron transport across plasma membrane in various cell types under iron deficiency and excess. *Mol Cell Biochem.* 321(1-2):123-33.
- Barman Balfour, J. A., Foster, R. H., 1999. Deferiprone: a review of its clinical potential in iron overload in beta-thalassaemia major and other transfusion-dependent diseases. *Drugs.* 58(3):553-78.
- Bartfay, W. J., Bartfay, E., 2000. Iron-overload cardiomyopathy: evidence for a free radical-mediated mechanism of injury and dysfunction in a murine model. *Biol Res Nurs.* 2(1):49-59.
- Bartsch, H., Nair, J., 2004. Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis. *Cancer Detect Prev.* 28(6):385-91.
- Barisani, D., Meneveri, R., Ginelli, E., Cassani, C., Conte, D., 2000. Iron overload and gene expression in HepG2 cells: analysis by differential display. *FEBS Lett.* 469(2-3):208-12.
- Batts, K. P., 2007. Iron overload syndromes and the liver. *Modern Pathology.* 20:31–39.
- Beaumont-Epinette, M. P., Delobel, J. B., Ropert, M., Deugnier, Y., Loréal, O., Jouanolle, A. M., Brissot, P., Bardou-Jacquet, E., 2015. Hereditary hypotransferrinemia can lead to elevated transferrin saturation and, when associated to HFE or HAMP mutations, to iron overload. *Blood Cells Mol Dis.* 54(2):151-4.
- Bekri, S., Gual, P., Anty, R., Luciani, N., Dahman, M., Ramesh, B., Iannelli, A., Staccini-Myx, A., Casanova, D., Ben Amor, I., Saint-Paul, M. C., Huet, P. M., Sadoul, J. L., Gugenheim, J., Srai, S. K., Tran, A., Le Marchand-Brustel, Y., 2006. Increased adipose tissue expression



- of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology*. 131(3):788-96.
- Bergeim, O., Kirch, E. R., 1949. Reduction of iron in the human stomach. *J Biol Chem*. 177(2):591-6.
- Bergsbaken, T., Fink, S. L., Cookson, B. T., 2009. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Curr Biol*. 19(2):99-109.
- Bermejo, F., García-López, S., 2009. A guide to diagnosis of iron deficiency and iron deficiency anemia in digestive diseases. *World J Gastroenterol*. 15(37):4638-43.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., Ron, D., 2000. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*. 2(6):326-32.
- Beutler, E., Gelbart, T., Lee, P., Trevino, R., Fernandez, M. A., Fairbanks, V. F., 2000. Molecular characterization of a case of atransferrinemia. *Blood*. 96(13):4071-4.
- Bianchetti, C. M., Yi, L., Ragsdale, S. W., Phillips, G. N. Jr., 2007. Comparison of apo- and heme-bound crystal structures of a truncated human heme oxygenase-2. *J Biol Chem*. 282(52):37624-31.
- Blond-Elguindi, S., Cwirla, S. E., Dower, W. J., Lipshutz, R. J., Sprang, S. R., Sambrook, J. F., Gething, M. J., 1993. Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell*. 75(4):717-28.
- Bonkovsky, H. L., 1991. Iron and the liver. *Am J Med Sci*. 301(1):32-43.
- Bouma, M. E., Rogier, E., Verthier, N., Labarre, C., Feldmann, G., 1989. Further cellular investigation of the human hepatoblastoma-derived cell line HepG2: morphology and immunocytochemical studies of hepatic-secreted proteins. *Cell Growth Differ*. 1(3 Pt 1):267-75.
- Braakman, I., Hebert, D., 2013. Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 5:a013201.
- Branton, M. H., Kopp, J. B., 1999. TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect*. 1(15):1349-65.
- Braumann, A., Wulfhekel, U., Düllmann, J., Nielsen, P., 1992. Iron overload of the bone marrow by trimethylhexanoyl-ferrocene in rats. *Acta Anat (Basel)*. 144(4):285-95.
- Breuer, W., Hershko, C., Cabantchik, Z. I., 2000. The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism. *Transfus Sci*. 23(3):185-92.
- Brissot, P., Ropert, M., Le Lan, C., Loréal, O., 2012. Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim Biophys Acta*. 1820(3):403-10.
- Burkitt, M. J., Mason, R. P., 1991. Direct evidence for in vivo hydroxyl-radical generation in experimental iron overload: an ESR spin-trapping investigation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88(19):8440-4.
- Cabantchik, Z. I., 2014. Labile iron in cells and body fluids: physiology, pathology, and pharmacology. *Front Pharmacol*. 5:45.
- Calzolari, A., Deaglio, S., Sposi, N. M., Petrucci, E., Morsilli, O., Gabbianelli, M., Malavasi, F., Peschle, C., Testa, U., 2004. Transferrin receptor 2 protein is not expressed in normal erythroid cells. *Biochem J*. 381(Pt 3):629-34.
- Camaschella, C., 1998. Juvenile haemochromatosis. *Baillieres Clin Gastroenterol*. 12(2):227-35.

- Camaschella, C., 2009. Diagnosis and treatment of non-HFE-haemochromatosis. In *Handbook Disorders of Iron Metabolism*, chapter 24:570-583.
- Cao, A., Galanello, R., 2010. Beta-thalassemia. *Genet Med.* 12(2):61-76.
- Caramelo, J. J., Parodi, A. J., 2007. How sugars convey information on protein conformation in the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol.* 18(6): 732–742.
- Carpenter, C. E., Mahoney, A. W., 1992. Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 31(4):333-67.
- Casey, J. L., Hentze, M. W., Koeller, D. M., Caughman, S. W., Rouault, T. A., Klausner, R. D., Harford, J. B., 1988. Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. *Science.* 240(4854):924-8.
- Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., Kroemer, G., 2004. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Cell.* 118(1):2825-37.
- Cazzola, M., Huebers, H. A., Sayers, M. H., MacPhail, A. P., Eng, M., Finch, C. A., 1985. Transferrin saturation, plasma iron turnover, and transferrin uptake in normal humans. *Blood.* 66(4):935-9.
- Cockell, K. A., Wotherspoon, A. T., Belonje, B., Fritz, M. E., Madère, R., Hidioglou, N., Plouffe, L. J., Ratnayake, W. M., Kubow, S., 2005. Limited effects of combined dietary copper deficiency/iron overload on oxidative stress parameters in rat liver and plasma. *J Nutr Biochem.* 16(12):750-6.
- Collins, F. J., Wessling-Resnick, M., Knutson, M. D., 2008. Hepcidin Regulation of Iron Transport. *J Nutr.* 138(11): 2284–2288.
- Conrad, M. E., Weintraub, L. R., Crosby, W. H., 1964. The Role of the Intestine in Iron Kinetics. *J Clin Invest.* 43(5): 963–974.
- Conrad, M. E., Cortell, S., Williams, H. L., Foy, A. L., 1966. Polymerization and intraluminal factors in the absorption of hemoglobin-iron. *J Lab Clin Med.* 68(4):659-68.
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., Adams, J. M., 2014. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15(1):49-63.
- Daram, S. R., Hayashi, P. H., 2005. Acute liver failure due to iron overdose in an adult. *South Med J.* 98(2):241-4.
- Das, S. K., Wang, W., Zhabyeyev, P., Basu, R., McLean, B., Fan, D., Parajuli, N., DesAulniers, J., Patel, V. B., Hajjar, R. J., Dyck, J. R., Kassiri, Z., Oudit, G. Y., 2015. Iron-overload injury and cardiomyopathy in acquired and genetic models is attenuated by resveratrol therapy. *Sci Rep.* 5:18132.
- Datz, C., Haas, T., Rinner, H., Sandhofer, F., Patsch, W., Paulweber, B., 1998. Heterozygosity for the C282Y mutation in the hemochromatosis gene is associated with increased serum iron, transferrin saturation, and hemoglobin in young women: a protective role against iron deficiency? *Clin Chem.* 44(12):2429-32.
- Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A., Lodish, H. F., 1983. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80(8):2258-62.

- Deaglio, S., Capobianco, A., Cali, A., Bellora, F., Alberti, F., Righi, L., Sapino, A., Camaschella, C., Malavasi, F., 2002. Structural, functional, and tissue distribution analysis of human transferrin receptor-2 by murine monoclonal antibodies and a polyclonal antiserum. *Blood*. 100(10):3782-9.
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G., D., Mitchison, T., J., Moskowitz, M., A., Yuan, J., 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*. 1(2):122-119.
- Delatycki, M. B., Allen, K. J., Gow, P., MacFarlane, J., Radomski, C., Thompson, J., Hayden, M. R., Goldberg, Y. P., Samuels, M. E., 2004. A homozygous HAMP mutation in a multiply consanguineous family with pseudo-dominant juvenile hemochromatosis. *Clin Genet*. 65(5):378-83.
- Deponte, M., 2013. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 1830(5):3217-66.
- Dhanasekaran, D. N., Reddy, E. P., 2008. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*. 27(48):6245-51.
- Díaz-Troya, S., Pérez-Pérez, M. E., Florencio, F. J., Crespo, J. L., 2008. The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy*. 4(7):851-65.
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., Stockwell, B. R., 2012. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. 149(5):1060-72.
- Dixon, S., Stockwell, B. R., 2014. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nature chem bio*. 10:9-17.
- Dongiovanni, P., Ruscica, M., Rametta, R., Recalcati, S., Liliana, S., Gatti, S., Girelli, D., Cairo, G., Magni, P., Fargion, S., Valenti, L., 2013. Dietary iron overload induces visceral adipose tissue insulin resistance. *Am J Pathol*. 186(5):1103-13.
- Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S. J., Moynihan, J., Paw, B. H., Drejer, A., Barut, B., Zapata, A., Law, T. C., Brugnara, C., Lux, S. E., Pinkus, G. S., Pinkus, J. L., Kingsley, P. D., Palis, J., Fleming, M. D., Andrews, N. C., Zon, L. I., 2000. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*. 403(6771):776-81.
- Dostalíková-Čimburová, M., Krátká, K., Balušíková, K., Chmelíková, J., Hejda, V., Hnanicek, J., Neubauerová, J., Vránová, J., Kovář, J., Horák, J., 2012a. Duodenal expression of iron transport molecules in patients with hereditary hemochromatosis or iron deficiency. *J Cell Mol Med*. 16(8):1816-26.
- Dostalíková-Čimburová, M., Krátká, K., Stránský, J., Půtová, I., Cieslarová, B., Horák, J., 2012b. Iron overload and HFE gene mutations in Czech patients with chronic liver diseases. *Dis Markers*. 32(1):65-72.
- Dostalíková-Čimburová, M., Balušíková, K., Krátká, K., Chmelíková, J., Hejda, V., Hnaníček, J., Neubauerová, J., Vránová, J., Kovář, J., Horák, J., 2014. Role of duodenal iron transporters and hepcidin in patients with alcoholic liver disease. *J Cell Mol Med*. 18(9):1840-50.
- Drakesmith, H., Schimanski, L. M., Ormerod, E., Merryweather-Clarke, A. T., Viprakasit, V., Edwards, J. P., Sweetland, E., Bastin, J. M., Cowley, D., Chinthammitr, Y., Robson, K. J.,

- Townsend, A. R., 2005. Resistance to hepcidin is conferred by hemochromatosis-associated mutations of ferroportin. *Blood*. 106(3):1092-7.
- Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E., Declercq, W., 2013. Cell death by cornification. *1833(12):3471-80*.
- Edinger, A. L., Thompson, C. B., 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*. 16(6):663-9.
- Eisenstein, R. S., 2000. Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu Rev Nutr*. 20:627-62.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 35(4):495-516.
- Fatokun, A. A., Dawson, V. L., Dawson, T. M., 2014. Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *171(8):2000-16*.
- Feder, J. N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D. A., Basava, A., Dormishian, F., Domingo, R. Jr., Ellis, M. C., Fullan, A., Hinton, L. M., Jones, N. L., Kimmel, B. E., Kronmal, G. S., Lauer, P., Lee, V. K., Loeb, D. B., Mapa, F. A., McClelland, E., Meyer, N. C., Mintier, G. A., Moeller, N., Moore, T., Morikang, E., Prass, C. E., Quintana, L., Starnes, S. M., Schatzman, R. C., Brunke, K. J., Drayna, D. T., Risch, N. J., Bacon, B. R., Wolff, R. K., 1996. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet*. 13(4):399-408.
- Fein, E., Merle, U., Eehalt, R., Herrmann, T., Kulaksiz, H., 2007. Regulation of hepcidin in HepG2 and RINm5F cells. *Peptides*. 28(5):951-7.
- Fleming, M. D., Romano, M. A., Su, M. A., Garrick, L. M., Garrick, M. D., Andrews, N. C., 1998. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(3):1148-53.
- Frazer, D. M., Inglis, H. R., Wilkins, S. J., Millard, K. N., Steele, T. M., McLaren, G. D., McKie, A. T., Vulpe, C. D., Anderson, G. J., 2004. Delayed hepcidin response explains the lag period in iron absorption following a stimulus to increase erythropoiesis. *Gut*. 53(10):1509-15.
- Fraser, T. S., Midwinter, G. R., Berger, S. B., Stocker, R., 2011. Heme oxygenase-1: a critical link between iron metabolism, erythropoiesis, and development. *Adv Hematol*. 2011:473709.
- Frisch, S. M., Francis, H., 1994. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *124(4):619-26*.
- Fujita, N., Miyachi, H., Tanaka, H., Takeo, M., Nakagawa, N., Kobayashi, Y., Iwasa, M., Watanabe, S., Takei, Y., 2009. Iron overload is associated with hepatic oxidative damage to DNA in nonalcoholic steatohepatitis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 18(2):424-32.
- Galaris, D., Pantopoulos, K., 2008. Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 45(1):1-23.
- Galleano, M., Puntarulo, S., 1994. Effect of mild iron overload on liver and kidney lipid peroxidation. *Braz J Med Biol Res*. 27(10):2349-58.
- Gao, X., Campian, J. L., Qian, M., Sun, X. F., Eaton, J. W., 2009a. Mitochondrial DNA damage in iron overload. *J Biol Chem*. 284(8):4767-75.

- Gao, J., Chen, J., Kramer, M., Tsukamoto, H., Zhang, A.S., Enns, C. A., 2009b. Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab.* 9(3):217-27.
- Gardi, C., Arezzini, B., Fortino, V., Comporti, M., 2002. Effect of free iron on collagen synthesis, cell proliferation and MMP-2 expression in rat hepatic stellate cells. *Biochem Pharmacol.* 64(7):1139-45.
- Garrick, M. D., Singleton, S. T., Vargas, F., Kuo, H. C., Zhao, L., Knöpfel, M., Davidson, T., Costa, M., Paradkar, P., Roth, J. A., Garrick, L. M., 2006. DMT1: which metals does it transport? *Biol Res.* 39(1):79-85.
- Gatter, K. C., Brown, G., Trowbridge, I. S., Woolston, R. E., Mason, D. Y., 1983. Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance. *J Clin Pathol.* 36(5):539-45.
- Gomella, L. G, Haist, A., S. 2007. *Laboratory Diagnosis: Chemistry, Immunology, Serology.* Gomella LG HS, ed. Clinician's Pocket Reference: The Scut Monkey. 11 ed. New York: McGraw-Hill.
- Gómez, M. M., Garríguez, A. C., Erce, J. A. G., Ramírez, G. R., 2005. Fisiopatología del metabolismo del hierro: implicaciones diagnósticas y terapéuticas. *Nefrología.* 25(1):9-19.
- Gu, S., Zhao, Y., Guo, J., Xu, F., Fei, C., Zhang, X., Xiao, C., Chang, C., Li, X., 2014. High expression of APAF-1 elevates erythroid apoptosis in iron overload myelodysplastic syndrome. *Tumour Biol.* 2014 Mar;35(3):2211-8.
- Gunshin, H., Starr, C. N., Drenzo, C., Fleming, M. D., Jin, J., Greer, E. L., Sellers, V. M., Galica, S. M., Andrews, N. C., 2005. Cybrd1 (duodenal cytochrome b) is not necessary for dietary iron absorption in mice. *Blood.* 106(8):2879-83.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J. L., Hediger, M. A., 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* 388(6641):482-8.
- Guo, B., Phillips, J. D., Yu, Y., Leibold, E. A., 1995. Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. *J Biol Chem.* 270(37):21645-51.
- Gurzau, E. S., Neagu, C., Gurzau, A. E., 2003. Essential metals--case study on iron. *Ecotoxicol Environ Saf.* 56(1):190-200.
- Hadzhieva, M., Kirches, E., Mawrin, C., 2014. Review: iron metabolism and the role of iron in neurodegenerative disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 40(3):240-57.
- Halestrap, A. P., Pasdois, P., 2009. The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim Biophys Acta.* 1787(11):1402-15.
- Hallberg, L., 1981. Bioavailability of dietary iron in man. *Annu Rev Nutr* 1:123-47.
- Hampton, R. Y., 2002. ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 14(4):476-82.
- Han, O., Failla, M. L., Hill, A. D., Morris, E. R., Smith, J. C. Jr., 1995. Reduction of Fe (III) is required for uptake of nonheme iron by Caco-2 cells. *J Nutr.* 125(5):1291-9.
- Han, O., Kim, E. Y., 2007. Colocalization of ferroportin-1 with hephaestin on the basolateral membrane of human intestinal absorptive cells. *J Cell Biochem.* 101(4):1000-10.

- Hann, H. W., Stahlhut, M. W., Blumberg, B. S., 1988. Iron nutrition and tumor growth: decreased tumor growth in iron-deficient mice. *Cancer Res.* 48(15):4168-70.
- Hann, H. W., Stahlhut, M. W., Menduke, H., 1991. Iron enhances tumor growth. Observation on spontaneous mammary tumors in mice. *Cancer.* 68(11):2407-10.
- Harding, C., Heuser, J., Stahl, P., 1983. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol.* 97(2):329-39.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Ron, D., 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature.* 397(6716):271-4.
- Harris, Z. L., Takahashi, Y., Miyajima, H., Serizawa, M., MacGillivray, R. T., Gitlin, J. D., 1995. Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(7):2539-43.
- Harrison, P. M., 1986. The structure and function of ferritin. *Biochemical Education.* 14(4): 154-162.
- Hebert, D. N., Molinari, M., 2007. In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev.* 87(4):1377-408.
- Hentze, M. W., Kühn, L. C., 1996. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(16):8175-82.
- Ho, L. H., Read, S. H., Dorstyn, L., Lambrusco, L., Kumar, S., 2008. Caspase-2 is required for cell death induced by cytoskeletal disruption. *Oncogene.* 27(24):3393-404.
- Hoepken, H. H., Korten, T., Robinson, S. R., Dringen, R., 2004. Iron accumulation, iron-mediated toxicity and altered levels of ferritin and transferrin receptor in cultured astrocytes during incubation with ferric ammonium citrate. *J Neurochem.* 88(5):1194-202.
- Horák, J.; Dostalíková M.; Hendrichová, M.; Chrobák, L.; Kovář, J.; Kraml, P.; Krátká, K.; Neubauerová, J.; Půtová, I.; Stránský, J.; Strítěský, J, 2010. Hemochromatóza. Praha: Grada Publishing,a.s., 232 s.
- Houglum, K., Filip, M., Witztum, J. L., Chojkier, M., 1990. Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal protein adducts in plasma and liver of rats with iron overload. *J Clin Invest.* 86(6):1991-8.
- Houglum, K., Ramm, A. G., Grawford, H. G. D., Witztum, J. L., Powell, L. W., Chojkier, M., 1997. Excess Iron Induces Hepatic Oxidative Stress and Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 in Genetic Hemochromatosis. *Hepatology.* 26(3):605-610.
- Hurrell, R., Egli, I., 2010. Iron bioavailability and dietary reference values. *Am J Clin Nutr.* 91(5):1461S-1467S.
- Chai, X., Li, D., Cao, X., Zhang, Y., Mu, J., Lu, W., Xiao, X., Li, X., Meng, J., Chen, J., Li, Q., Wang, J., Meng A., Zhao, M., 2015. ROS-mediated iron overload injures the hematopoiesis of bone marrow by damaging hematopoietic stem/progenitor cells in mice. *Scientific Reports.* 5(10181).
- Chasteen, N. D., Harrison, P. M., 1999. Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *J Struct Biol.* 126(3):182-94.

- Chen, M. P., Cabantchik, Z. I., Chan, S., Chan, G. C., Cheung, Y. F., 2014. Iron overload and apoptosis of HL-1 cardiomyocytes: effects of calcium channel blockade. *PLoS One*. 9(11):e112915.
- Cheng, K. C., Cahill, D. S., Kasai, H., Nishimura, S., Loeb, L. A., 1992. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G---T and A---C substitutions. *J Biol Chem*. 267(1):166-72.
- Cheng, L., Tang, X., Fu, P., Liu, F., 2015. Secondary haemochromatosis in a haemodialysis patient. *Singapore Med J*. 56(7):e124-6.
- Chew, K. C., Ang, E. T., Tai, Y. K., Tsang, F., Lo, S. Q., Ong, E., Ong, W. Y., Shen, H. M., Lim, K. L., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Soong, T. W., 2011. Enhanced autophagy from chronic toxicity of iron and mutant A53T  $\alpha$ -synuclein: implications for neuronal cell death in Parkinson disease. *J Biol Chem*. 286(38):33380-9.
- Chinnaiyan, A. M., 1999. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*. 1(1):5-15.
- Chowrimootoo, G., Gillett, M., Debnam, E. S., Srail, S. K., Epstein, O., 1992. Iron-transferrin binding to isolated guinea pig enterocytes and the regional localisation of intestinal iron transfer during ontogeny. *Biochim. Biophys Acta*. 1116(3):256-60.
- Illing, A. C., Shawki, A., Cunningham, C. L., Mackenzie, B., 2012. Substrate profile and metal-ion selectivity of human divalent metal-ion transporter-1. *J Biol Chem*. 287(36):30485-96.
- Joshi, R., Shvartsman, M., Morán, E., Lois, S., Aranda, J., Barqué, A., de la Cruz, X., Bruguera, M., Vagace, J. M., Gervasini, G., Sanz, C., Sánchez, M., 2015. Functional consequences of transferrin receptor-2 mutations causing hereditary hemochromatosis type 3. *Mol Genet Genomic Med*. 3(3):221-32.
- Jouihan, H. A., Cobine, P. A., Cooksey, R. C., Hoagland, E. A., Boudina, S., Abel, E. D., Winge, D. R., McClain, D. A., 2008. Iron-Mediated Inhibition of Mitochondrial Manganese Uptake Mediates Mitochondrial Dysfunction in a Mouse Model of Hemochromatosis. *Mol Med*. 14(3-4): 98–108.
- Kadiiska, M. B., Burkitt, M. J., Xiang, Q. H., Mason, R. P., 1995. Iron supplementation generates hydroxyl radical in vivo. An ESR spin-trapping investigation. *J Clin Invest*. 96(3):1653-7.
- Kakhlon, O., Cabantchik, Z. I., 2002. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free Radic Biol Med*. 33(8):1037-46.
- Kato, J., Fujikawa, K., Kanda, M., Fukuda, N., Sasaki, K., Takayama, T., Kobune, M., Takada, K., Takimoto, R., Hamada, H., Ikeda, T., Niitsu, Y., 2001. A mutation, in the iron-responsive element of H ferritin mRNA, causing autosomal dominant iron overload. *Am J Hum Genet*. 69(1):191-7.
- Kawabata, H., Yang, R., Hiramata, T., Vuong, P. T., Kawano, S., Gombart, A. F., Koeffler, H. P., 1999. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem*. 274(30):20826-32.
- Kawabata, H., Germain, R. S., Vuong, P. T., Nakamaki, T., Said, J. W., Koeffler, H. P., 2000. Transferrin receptor 2- $\alpha$  supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and in vivo. *J Biol Chem*. 275(22):16618-25.

- Kell, D. B., Pretorius, E., 2014. Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a leakage product from damaged cells. *Metallomics*. 6(4):748-73.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26(4):239-57.
- Khan, M. F., Wu, X., Boor, P. J., Ansari, G. A., 1999. Oxidative modification of lipids and proteins in aniline-induced splenic toxicity. *Toxicol Sci*. 48(1):134-40.
- Khan, M., Mohammad, A., Patil, G., Naqvi, S. A., Chauhan, L. K., Ahmad, I., 2012. Induction of ROS, mitochondrial damage and autophagy in lung epithelial cancer cells by iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*. 33(5):1477-88.
- Khan, A. A., Quigley, J. G., 2013. Heme and FLVCR-related transporter families SLC48 and SLC49. *Mol Aspects Med*. 34(2-3):669-82.
- Kidane, T. Z., Sauble, E., Linder, M. C., 2006. Release of iron from ferritin requires lysosomal activity. *Am J Physiol Cell Physiol*. 291(3):C445-55.
- Kiessling, M. K., Klemke, C. D., Kaminski, M. M., Galani, I. E., Krammer, P. H., Gülow, K., 2009. Inhibition of constitutively activated nuclear factor-kappaB induces reactive oxygen species- and iron-dependent cell death in cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Res*. 69(6):2365-74.
- Kikuchi, G., Yoshida, T., Noguchi, M., 2005. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun*. 338(1):558-67.
- Kim, B. M., Rode, A. B., Han, E. J., Hong, I. S., Hong, S. H., 2012. 5-Phenylselenenyl- and 5-methylselenenyl-methyl-2'-deoxyuridine induce oxidative stress, DNA damage, and caspase-2-dependent apoptosis in cancer cells. *Apoptosis*. 17(2):200-16.
- Knutson, M. D., Vafa, M. R., Haile, D. J., Wessling-Resnick, M., 2003a. Iron overload and erythrophagocytosis increase ferroportin 1 (FPN1) expression in J774 macrophages. *Blood*. 102(12): 4191 – 4197.
- Knutson, M. D., Wessling-Resnick, M., 2003b. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 38(1):61-88.
- Korantzopoulos, P., Vlachou, C., Kotsia, A., Kalantzi, K., Barbouti, A., Galaris, D., Goudevenos, J. A., 2012. Leukocyte labile iron pool in patients with systolic heart failure. *Hellenic J Cardiol*. 53(2):95-100.
- Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Simopoulos, C., Turley, H., Talks, K., Gatter, K. C., Harris, A. L., 2002. Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 53(5):1192-202.
- Kovář, J., Franěk, F., 1984. Serum-free medium for hybridoma and parental myeloma cell cultivation: a novel composition of growth-supporting substances. *Immunol Lett*. 7(6):339-45.
- Kovář, J., Neubauerová, J., Čimburová, M., Truksa, J., Balušíková, K., Horák, J., 2006. Stimulation of non-transferrin iron uptake by iron deprivation in K562 cells. *Blood Cells Mol Dis*. 37(2):95-9.



- Krause, A., Neitz, S., Mägert, H. J., Schulz, A., Forssmann, W. G., Schulz-Knappe, P., Adermann, K., 2000. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* 480(2-3):147-50.
- Kulaksiz, H., Theilig, F., Bachmann, S., Gehrke, S. G., Rost, D., Janetzko, A., Cetin, Y., Stremmel, W., 2005. The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. *J Endocrinol.* 184(2):361-70.
- Kulaksiz, H., Fein, E., Redecker, P., Stremmel, W., Adler, G., Cetin, Y., 2008. Pancreatic beta-cells express hepcidin, an iron-uptake regulatory peptide. *J Endocrinol.* 197(2):241-9
- Kuo, Y. M., Su, T., Chen, H., Attieh, Z., Syed, B. A., McKie, A. T., Anderson, G. J., Gitschier, J., Vulpe, C. D., 2004. Mislocalisation of hephaestin, a multicopper ferroxidase involved in basolateral intestinal iron transport, in the sex linked anaemia mouse. *Gut.* 53(2):201-6.
- Lakhal-Littleton, S., Wolna, M., Carr, C. A., Miller, J. J., Christian, H. C., Ball, V., Santos, A., Diaz, R., Biggs, D., Stillion, R., Holdship, P., Lerner, F., Tyler, D. J., Clarke, K., Davies, B., Robbins, P. A., 2015. Cardiac ferroportin regulates cellular iron homeostasis and is important for cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112(10):3164-9.
- Lavrik, I., Golks, A., Krammer, P. H., 2005. Death receptor signaling. *J Cell Sci.* 118(Pt 2):265-7.
- Lavrik, I. N., Golks, A., Riess, D., Bentele, M., Eils, R., Krammer, P. H., 2007. Analysis of CD95 threshold signaling: triggering of CD95 (FAS/APO-1) at low concentrations primarily results in survival signaling. *J Biol Chem.* 282(18):13664-71.
- Le Blanc, S., Garrick, M. D., Arredondo, M., 2012. Heme carrier protein 1 transports heme and is involved in heme-Fe metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol.* 302(12):C1780-5.
- Lee, J. W., Bae, S. H., Jeong, J. W., Kim, S. H., Kim, K. W., 2004. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med.* 36(1):1-12.
- Lee, K. P., Dey, M., Neculai, D., Cao, C., Dever, T. E., Sicheri, F., 2008. Structure of the dual enzyme Ire1 reveals the basis for catalysis and regulation in nonconventional RNA splicing. *Cell.* 132(1):89-100.
- Levine, B., Kroemer, G., 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 132(1):27-42.
- Li, S. W., Liu, C. M., Guo, J., Marcondes, A. M., Deeg, J., Li, X., Guan, F., 2015. Iron overload induced by ferric ammonium citrate triggers reactive oxygen species-mediated apoptosis via both extrinsic and intrinsic pathways in human hepatic cells. *Hum Exp Toxicol.* pii: 0960327115597312.
- Lin, Y., Devin, A., Rodriguez, Y., Liu, Z., 1999. Cleavage of the death domain kinase RIP by Caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev.* 13(19): 2514–2526.
- Lin, J. H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H. R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K. M., Lavail, M. M., Walter, P., 2007. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science.* 318(5852):944-9.
- Lipschitz, D. A., Cook, J. D., Finch, C. A., 1974. A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores. *N Engl J Med.* 290(22):1213-6.
- Lisboa, P. E., 1971. Experimental hepatic cirrhosis in dogs caused by chronic massive iron overload. *Gut.* 12(5):363-8.

- Liu, K. L., Chen, P. Y., Wang, C. M., Chen, W. Y., Chen, C. W., Owaga, E., Chang, J. S., 2016. Dose-related effects of ferric citrate supplementation on endoplasmic reticular stress responses and insulin signalling pathways in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes. *Food Funct.* 7(1):194-201.
- Liuzzi, J. P., Aydemir, F., Nam, H., Knutson, M. D., Cousins, R. J., 2006. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(37):13612-7.
- Logue, S. E., Gorman, A. M., Cleary, P., Keogh, N., Samali, A., 2013. Current Concepts in ER Stress-Induced Apoptosis. *J Carcinogene Mutagene.* S6:002.
- Lokeshwar, M. R., Shah, N., 2010. Iron Deficiency Anemia. [http://www.pediatriconcall.com/for-doctor/Diseases\\_a\\_z/article.aspx?artid=44](http://www.pediatriconcall.com/for-doctor/Diseases_a_z/article.aspx?artid=44)
- Lombard, M., Bomford, A. B., Polson, R. J., Bellingham, A. J., Williams, R., 1990. Differential expression of transferrin receptor in duodenal mucosa in iron overload. Evidence for a site-specific defect in genetic hemochromatosis. *Gastroenterology.* 98(4):976-84.
- Lopes, T. J., Luganskaja, T., Vujić Spasić, M., Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Schümann, K., Reich, J. G., 2010. Systems analysis of iron metabolism: the network of iron pools and fluxes. *BMC Syst Biol.* 4:112.
- López-Terrada, D., Cheung, S. W., Finegold, M. J., Knowles, B. B., 2009. Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *40(10):1512-5.*
- Lou, L. X., Geng, B., Chen, Y., Yu, F., Zhao, J., Tang, C. S., 2009. Endoplasmic reticulum stress involved in heart and liver injury in iron-loaded rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 36(7):612-8.
- Lunova, M., Goehring, C., Kuscuoglu, D., Mueller, K., Chen, Y., Walther, P., Deschemin, J. C., Vaulont, S., Haybaeck, J., Lackner, C., Trautwein, C., Strnad, P., 2014. Hcpidin knockout mice fed with iron-rich diet develop chronic liver injury and liver fibrosis due to lysosomal iron overload. *J Hepatol.* 61(3):633-41.
- Macco, R., Pelizzoni, I., Consonni, A., Vitali, I., Giacalone, G., Boneschi, F., M., Codazzi, F., Grohovaz, F., Zacchetti, D., 2013. Astrocytes acquire resistance to iron-dependent oxidative stress upon proinflammatory activation. *Journal of Neuroinflammation.* 130(10).
- Macfarlane, W. M., Cragg, H., Docherty, H. M., Read, M. L., James, R. F., Aynsley-Green, A., Docherty, K., 1997. Impaired expression of transcription factor IUF1 in a pancreatic beta-cell line derived from a patient with persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy (nesidioblastosis). *413(2):304-8.*
- MacFarlane, W. M., Chapman, J. C., Shepherd, R. M., Hashmi, M. N., Kamimura, N., Cosgrove, K. E., O'Brien, R. E., Barnes, P. D., Hart, A. W., Docherty, H. M., Lindley, K. J., Aynsley-Green, A., James, R. F., Docherty, K., Dunne, M. J., 1999. Engineering a glucose-responsive human insulin-secreting cell line from islets of Langerhans isolated from a patient with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *274(48):34059-66.*
- Mackenzie, B., Ujwal, M. L., Chang, M. H., Romero, M. F., Hediger, M. A., 2006. Divalent metal-ion transporter DMT1 mediates both H<sup>+</sup>-coupled Fe<sup>2+</sup> transport and uncoupled fluxes. *Pflugers Arch.* 451(4):544-58.

- Mak, I. T., Weglicki, W. B., 1985. Characterization of iron-mediated peroxidative injury in isolated hepatic lysosomes. *J Clin Invest.* 75(1):58-63.
- Masuda, Y., Ichii, H., Vaziri, N. D., 2014. At pharmacologically relevant concentrations intravenous iron preparations cause pancreatic beta cell death. *Am J Transl Res.* 6(1): 64–70.
- Mattman, A., Huntsman, D., Lockitch, G., Langlois, S., Buskard, N., Ralston, D., Butterfield, Y., Rodrigues, P., Jones, S., Porto, G., Marra, M., De Sousa, M., Vatcher, G., 2002. Transferrin receptor 2 (TfR2) and HFE mutational analysis in non-C282Y iron overload: identification of a novel TfR2 mutation. *Blood.* 100(3):1075-7.
- McIlwain, D. R., Berger, T., Mak, T. W., 2013. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5(4):a008656.
- McKie, A. T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T. J., Farzaneh, F., Hediger, M. A., Hentze, M. W., Simpson, R. J., 2000. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell.* 5(2):299-309.
- 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(5509):1755-9.
- Micheau, O., Tschopp, J., 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell.* 114(2):181-90.
- Miwa, C. P., de Lima, M. N., Scalco, F., Vedana, G., Mattos, R., Fernandez, L. L., Hilbig, A., Schröder, N., Vianna, M. R., 2011. Neonatal iron treatment increases apoptotic markers in hippocampal and cortical areas of adult rats. *Neurotox Res.* 19(4):527-35.
- Mizushima, N., Levine, B., 2010. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol.* 12(9):823-30.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 27:107-32.
- Monsen, E. R., 1988. Iron nutrition and absorption: dietary factors which impact iron bioavailability. *J Am Diet Assoc.* 88(7):786-90.
- Muir, A., Hopfer, U., 1985. Regional specificity of iron uptake by small intestinal brush-border membranes from normal and iron-deficient mice. *Am J Physiol* 248(3 Pt 1), G376-9.
- Nam, H., Wang, C. Y., Zhang, L., Zhang, W., Hojyo, S., Fukada, T., Knutson, M. D., 2013. ZIP14 and DMT1 in the liver, pancreas, and heart are differentially regulated by iron deficiency and overload: implications for tissue iron uptake in iron-related disorders. *Haematologica.* 98(7):1049-57
- Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., Ward, D. M., Ganz, T., Kaplan, J., 2004. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 306(5704):2090-3.
- Nemeth, E., Preza, G. C., Jung, C. L., Kaplan, J., Waring, A. J., Ganz, T., 2006. The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood.* 107(1):328-33.

- Neumannova, V., Richardson, D. R., Kriegerbeckova, K., Kovář, J., 1995. Growth of human tumor cell lines in transferrin-free, low-iron medium. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 31(8):625-32.
- Nick, H., Acklin, P., Lattmann, R., Buehlmayer, P., Hauffe, S., Schupp, J., Alberti, D., 2003. Development of tridentate iron chelators: from desferrithiocin to ICL670. *Curr Med Chem.* 10(12):1065-76.
- Nicolas, G., Viatte, L., Bennoun, M., Beaumont, C., Kahn, A., Vaulont, S., 2002a. Heparin, a new iron regulatory peptide. *Blood Cells Mol Dis.* 29(3):327-35.
- Nicolas, G., Chauvet, C., Viatte, L., Danan, J. L., Bigard, X., Devaux, I., Beaumont, C., Kahn, A., Vaulont, S., 2002b. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest.* 110(7):1037-44.
- Ohgami, R. S., Campagna, D. R., Greer, E. L., Antiochos, B., McDonald, A., Chen, J., Sharp, J. J., Fujiwara, Y., Barker, J. E., Fleming, M. D., 2005. Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet.* 37(11):1264-9.
- Ohgami, R. S., Campagna, D. R., McDonald, A., Fleming, M. D., 2006. The Steap proteins are metalloreductases. *Blood.* 108(4):1388-94.
- Oliveira, S. J., Pinto, J. P., Picarote, G., Costa, V. M., Carvalho, F., Rangel, M., de Sousa, M., de Almeida, S. F., 2009. ER stress-inducible factor CHOP affects the expression of hepcidin by modulating C/EBPalpha activity. *PLoS One.* 4(8):e6618.
- Oudit, G. Y., Trivieri, M. G., Khaper, N., Liu, P. P., Backx, P. H., 2006. Role of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in iron transport and iron-overload cardiomyopathy. *J Mol Med (Berl).* 84(5):349-64.
- Overholtzer, M., Mailleux, A. A., Mouneimne, G., Normand, G., Schnitt, S. J., King, R. W., Cibas, E. S., Brugge, J. S., 2007. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *131(5):966-79.*
- Özgüner, M., Sayin, N., 2002. Histological changes in rat liver after chronic iron-sorbitol overload. *Journal of Ankara medical school.* 24(2):49-54.
- Pak, M., Lopez, M. A., Gabayan, V., Ganz, T., Rivera, S., 2006. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood.* 108(12):3730-5.
- Papanikolaou, G., Samuels, M. E., Ludwig, E. H., MacDonald, M. L., Franchini, P. L., Dubé, M. P., Andres, L., MacFarlane, J., Sakellaropoulos, N., Politou, M., Nemeth, E., Thompson, J., Risler, J. K., Zaborowska, C., Babakaiff, R., Radoski, C. C., Pape, T. D., Davidas, O., Christakis, J., Brissot, P., Lockitch, G., Ganz, T., Hayden, M. R., Goldberg, Y. P., 2004. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet.* 36(1):77-82.
- Papinski, D., Schuschnig, M., Reiter, W., Wilhelm, L., Barnes, C. A., Maiolica, A., Hansmann, I., Pfaffenwimmer, T., Kijanska, M., Stoffel, I., Lee, S. S., Brezovich, A., Lou, J. H., Turk, B. E., Aebersold, R., Ammerer, G., Peter, M., Kraft, C., 2014. Early steps in autophagy depend on direct phosphorylation of Atg9 by the Atg1 kinase. *Mol Cell.* 53(3):471-83.
- Park, C. H., Valore, E. V., Waring, A. J., Ganz, T., 2001. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem.* 16;276(11):7806-10.

- Park, E. J., Choi, D. H., Kim, Y., Lee, E. W., Song, J., Cho, M. H., Kim, J. H., Kim, S. W., 2014. Magnetic iron oxide nanoparticles induce autophagy preceding apoptosis through mitochondrial damage and ER stress in RAW264.7 cells. *Toxicol In Vitro*. 28(8):1402-12.
- Petrák, J., Myslivcová, D., Man, P., Cmejla, R., Cmejlova, J., Vyoral, D., Elleder, M., 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(6):G1490-8.
- Petrov, L., Atanassova, M., Alexandrova, A., 2012. Comparative study of the antioxidant activity of some thiol-containing substances. *Cent Eur J Med*. 7 (2):269-273.
- Peyssonnaud, C., Zinkernagel, A. S., Schuepbach, R. A., Rankin, E., Vaulont, S., Haase, V. H., Nizet, V., Johnson, R. S., 2007. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest*. 117(7):1926-32.
- Piccinelli, P., Samuelsson, T., 2007. Evolution of the iron-responsive element. *RNA*. 13(7):952-66.
- Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P., Loréal, O., 2001. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem*. 276(11):7811-9.
- Poggiali, E., Cassinerio, E., Zanaboni, L., Cappellini, M. D., 2012. An update on iron chelation therapy. *Blood Transfus*. 10(4): 411-422.
- Popovic, Z., Templeton, D. M., 2004. Iron accumulation and iron-regulatory protein activity in human hepatoma (HepG2) cells. 265(1-2):37-45.
- Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G., Gabai, V. L., 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res*. 283(1):1-16.
- Puukila, S., Bryan, S., Laakso, A., Abdel-Malak, J., Gurney, C., Agostino, A., Belló-Klein, A., Prasad, K., Khaper, N., 2015. Secoisolariciresinol diglucoside abrogates oxidative stress-induced damage in cardiac iron overload condition. *PLoS One*. 10(3):e0122852.
- Quigley, J. G., Yang, Z., Worthington, M. T., Phillips, J. D., Sabo, K. M., Sabath, D. E., Berg, C. L., Sassa, S., Wood, B. L., Abkowitz, J. L., 2004. Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. *Cell*. 118(6):757-66.
- Raha-Chowdhury, R., Raha, A. A., Forostyak, S., Zhao, J. W., Stott, S. R., Bomford, A., 2015. Expression and cellular localization of hepcidin mRNA and protein in normal rat brain. *BMC Neurosci*. 16(1):24.
- Raja, K. B., Simpson, R. J., Peters, T. J., 1992. Investigation of a role for reduction in ferric iron uptake by mouse duodenum. *Biochim Biophys Acta*. 1135(2):141-6.
- Ramey, G., Deschemin, J. C., Durel, B., Canonne-Hergaux, F., Nicolas, G., Vaulont, S., 2010. Hepcidin targets ferroportin for degradation in hepatocytes. *Haematologica*. 95(3):501-4.
- Rao, R. V., Ellerby, H. M., Bredesen, D. E., 2004. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ*. 11(4):372-80.
- Rauen, U., Petrat, F., Sustmann, R., de Groot, H., 2004. Iron-induced mitochondrial permeability transition in cultured hepatocytes. *J Hepatol*. 40(4):607-15.
- Reggiori, F., Komatsu, M., Finley, K., Simonsen, A., 2012. Autophagy: more than a nonselective pathway. *Int J Cell Biol*. 2012:219625.

- Remijsen, Q., Kuijpers, T. W., Wirawan, E., Lippens, S., Vandenabeele, P., Vanden Berghe, T., 2011. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *18(4):581-8*.
- Rhodes, J., Beton, D., Brown, D. A., 1968. Absorption of iron instilled into the stomach, duodenum, and jejunum. *Gut. 323-324*.
- Ringeling, P. L., Cleton, M. I., Kroos, M. J., Sorber, L. W., de Bruyn, W. C., Harrison, P. M., van Eijk, H. G., 1989. Lysosomal and cytosolic ferritins. A biochemical and electron-spectroscopic study. *Biol Met. 2(2):114-21*.
- Rishi, G., Wallace, D. F., Subramaniam, V. N., 2015. Hepcidin: Regulation of the master iron regulator. *Biosci Rep. 35(3):e00192*.
- Robertson, A., Tenenbein, M., 2005. Hepatotoxicity in acute iron poisoning. *Hum Exp Toxicol. 24(11):559-62*.
- Ron, D., Walter, P., 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol. 8(7):519-29*.
- Roseff, S. D., 2009. *Immunohematology. 25(2):67-74*.
- Ross, S. L., Tran, L., Winters, A., Lee, K. J., Plewa, C., Foltz, I., King, C., Miranda, L. P., Allen, J., Beckman, H., Cooke, K. S., Moody, G., Sasu, B. J., Nemeth, E., Ganz, T., Molineux, G., Arvedson, T. L., 2012. Molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin internalization requires ferroportin lysines, not tyrosines or JAK-STAT. *Cell Metab. 15(6):905-17*.
- Rossander-Hultén, L., Brune, M., Sandström, B., Lönnerdal, B., Hallberg, L., 1991. Competitive inhibition of iron absorption by manganese and zinc in humans. *Am J Clin Nutr. 54(1):152-6*.
- Rotenberg, O. M., Maines, D. M., 1990. Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of a cDNA encoding rat heme oxygenase-2. *The journal of biological chemistry. 265(13):7501-7506*.
- Rouault, T. A., 2006. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol. 2(8):406-14*.
- Ryter, S. W., Alam, J., Choi, A. M., 2006. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev. 86(2):583-650*.
- Ryter, S. W., Mizumura, K., Choi, A. M. K., 2014. The Impact of Autophagy on Cell Death Modalities. *J Cell Biol. doi:10.1155/2014/502676*.
- Saito, H., 2012. Storage iron metabolism. *Scientific reports. 1:377*
- Salovaara, S., Sandberg, A.S., Andlid, T., 2002. Organic acids influence iron uptake in the human epithelial cell line Caco-2. *J. Agric Food Chem. 50(21):6233-8*.
- Sciot, R. I., Paterson, A. C., Van den Oord, J. J., Desmet, V. J., 1987. *Hepatology. 7(5):831-7*.
- Seery, V. L., Muller-Eberhard, U., 1973. Binding of porphyrins to rabbit hemopexin and albumin. *J Biol Chem. 248(11):3796-800*.
- Senthilnathan, D., Kalaiselvan, A., Vedha, S. A., Venuvanalingam, P., 2014. The metal delivery mechanism of transferrin and the role of bent metallocene metals towards anticancer activity – a theoretical exploration. *Rsc. Advances. 4(19):9556-63*.

- Shander, A., Cappellini, M. D., Goodnough, L. T., 2009. Iron overload and toxicity: the hidden risk of multiple blood transfusions. *Vox Sang.* 97(3):185-97.
- Sharp, P., Tandy, S., Yamaji, S., Tennant, J., Williams, M., Singh Srani, S. K., 2002. Rapid regulation of divalent metal transporter (DMT1) protein but not mRNA expression by non-haem iron in human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Lett.* 510(1-2):71-6.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., Prywes, R., 2002. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell.* 3(1):99-111.
- Schauben, J. L., Augenstein, W. L., Cox, J., Sato, R., 1990. Iron poisoning: report of three cases and a review of therapeutic intervention. *J Emerg Med.* 8(3):309-19.
- Sidi, S., Sanda, T., Kennedy, R. D., Hagen, A. T., Jette, C. A., Hoffmans, R., Pascual, J., Imamura, S., Kishi, S., Amatruda, J. F., Kanki, J. P., Green, D. R., D'Andrea, A. A., Look, A. T., 2008. Chk1 suppresses a caspase-2 apoptotic response to DNA damage that bypasses p53, Bcl-2, and caspase-3. *Cell.* 133(5):864-77.
- Siimes, M. A., Refino, C., Dallman, P. R., 1980. Manifestation of iron deficiency at various levels of dietary iron intake. *Am J Clin Nutr.* 33(3):570-4.
- Silverberg, D. S., Wexler, D., Iaina, A., 2004. The role of anemia in the progression of congestive heart failure. Is there a place for erythropoietin and intravenous iron? *J Nephrol.* 17(6):749-61.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150(1):76-85.
- Sodum, R. S., Chung, F. L., 1988. 1,N<sup>2</sup>-ethenodeoxyguanosine as a potential marker for DNA adduct formation by trans-4-hydroxy-2-nonenal. *Cancer Res.* 48(2):320-3.
- Sou, S. N., Ilieva, K. M., Polizzi, K. M., 2012. Binding of human BiP to the ER stress transducers IRE1 and PERK requires ATP. *Biochem Biophys Res Commun.* 420(2):473-8.
- Stål, P., Glaumann, H., Hultcrantz, R., 1990. Liver cell damage and lysosomal iron storage in patients with idiopathic hemochromatosis. A light and electron microscopic study. *J Hepatol.* 11(2):172-80.
- Swaminathan, S., Fonseca, V. A., Alam, M. G., Shah, S. V., 2007. The role of iron in diabetes and its complications. *Diabetes Care.* 30(7):1926-33.
- Swinkels, D. W., Janssen, M. C., Bergmans, J., Marx, J. J., 2006. Hereditary hemochromatosis: genetic complexity and new diagnostic approaches. *Clin Chem.* 52(6):950-68.
- Tamm, C., Zhivotovsky, B., Ceccatelli, S., 2008. Caspase-2 activation in neural stem cells undergoing oxidative stress-induced apoptosis. *Apoptosis.* 13(3):354-63.
- Tan, T. C., Crawford, D. H., Jaskowski, L. A., Subramaniam, V. N., Clouston, A.D., Crane, D. I., Bridle, K. R., Anderson, G. J., Fletcher, L. M., 2013. Excess iron modulates endoplasmic reticulum stress-associated pathways in a mouse model of alcohol and high-fat diet-induced liver injury. *Lab Invest.* 93(12):1295-312.
- Taoka, K., Kumano, K., Nakamura, F., Hosoi, M., Goyama, S., Imai, Y., Hangaishi, A., Kurokawa, M., 2012. The effect of iron overload and chelation on erythroid differentiation. *Int J Hematol.* 95(2):149-59.

- Teske, B. F., Fusakio, M. E., Zhou, D., Shan, J., McClintick, J. N., Kilberg, M. S., Wek, R. C., 2013. CHOP induces activating transcription factor 5 (ATF5) to trigger apoptosis in response to perturbations in protein homeostasis. *Mol Biol Cell*. 24(15):2477-90.
- Theurl, I., Theurl, M., Seifert, M., Mair, S., Nairz, M., Rumpold, H., Zoller, H., Bellmann-Weiler, R., Niederegger, H., Talasz, H., Weiss, G., 2008. Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes. *Blood*. 111(4):2392-9.
- Thornberry, N. A., Lazebnik, Y., 1998. Caspases: enemies within. 281(5381):1312-6.
- Tirasophon, W., Lee, K., Callaghan, B., Welihinda, A., Kaufman, R. J., 2000. The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response. *Genes Dev*. 14(21):2725-36.
- Torti, S. V., Torti, F. M., 2013. Iron and cancer: more ore to be mined. *Nature Reviews Cancer*. 13(5):342-355.
- Travers, K. J., Patil, C. K., Wodicka, L., Lockhart, D. J., Weissman, J. S., Walter, P., 2000. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*. 101(3):249-58.
- Trinder, D., Batey, R. G., Morgan E. H., Baker, E., 1990. Effect of cellular iron concentration on iron uptake by hepatocytes. *Am J Physiol*. 259(4 Pt 1):G611-7.
- Tsai, Y. C., Weissman, A. M., 2010. The Unfolded Protein Response, Degradation from the Endoplasmic Reticulum, and Cancer. *Genes Cancer*. 1(7): 764–778.
- Tsujimoto, Y., Shimizu, S., 2005. Another way to die: autophagic programmed cell death. *12 Suppl* 2:1528-34.
- Turoczi, T., Jun, L., Cordis, G., Morris, J. E., Maulik, N., Stevens, R. G., Das, D. K., 2003. HFE mutation and dietary iron content interact to increase ischemia/reperfusion injury of the heart in mice. *Circ Res*. 92(11):1240-6.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P., Ron, D., 2000. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*. 287(5453):664-6.
- Uren, R. T., Dewson, G., Bonzon, C., Lithgow, T., Newmeyer, D. D., Kluck, R.M., 2005. Mitochondrial release of pro-apoptotic proteins: electrostatic interactions can hold cytochrome c but not Smac/DIABLO to mitochondrial membranes. *J Biol Chem*. 280(3):2266-74.
- Vakifahmetoglu-Norberg, H., Zhivotovsky, B., 2010. The unpredictable caspase-2: what can it do? *Trends Cell Biol*. 20(3):150-9.
- Valerio, L. G. Jr., Petersen, D. R., 1998. Formation of liver microsomal MDA-protein adducts in mice with chronic dietary iron overload. *Toxicol Lett*. 98(1-2):31-9.
- Vecchi, C., Montosi, G., Zhang, K., Lamberti, I., Duncan, S. A., Kaufman, R. J., Pietrangelo, A., 2009. ER stress controls iron metabolism through induction of hepcidin. *Science*. 2009 325(5942):877-80.
- Videla, L. A., Fernández, V., Tapia, G., Varela, P., 2003. Oxidative stress-mediated hepatotoxicity of iron and copper: role of Kupffer cells. *Biometals*. 16(1):103-11.



- Vincent, J. B., Love, S., 2012. The binding and transport of alternative metals by transferrin. *Biochim Biophys Acta*. 1820(3):362-78.
- Vinogradov, A.D., Grivennikova, V. G., 2005. Generation of superoxide-radical by the NADH:ubiquinone oxidoreductase of heart mitochondria. *Biochemistry (Mosc)*. 70(2):120-7.
- Voeltz, G. K., Rolls, M. M., Rapoport, T. A., 2002. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep*. 3(10):944-50.
- Vyoral, D., Petrák, J., Hradilek, A., 1998. Separation of cellular iron containing compounds by electrophoresis. *Biol Trace Elem Res*. 61(3):263-75.
- Walters, G. O., Miller, F. M., Worwood, M., 1973. Serum ferritin concentration and iron stores in normal subjects. *J Clin Pathol*. 26(10):770-2.
- Wang, L., Du, F., Wang, X., 2008. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*. 133(4):693-703.
- Wang, Y., Wu, M., Al-Rousan, R., Liu, H., Fannin, J., Paturi, S., Arvapalli, R. K., Katta, A., Kakarla, S. K., Rice, K. M., Triest, W. E., Blough, E. R., 2011. Iron-induced cardiac damage: role of apoptosis and deferasirox intervention. *J Pharmacol Exp Ther*. 336(1):56-63.
- Wang, C. Y., Knutson, M. D., 2013. Hepatocyte divalent metal-ion transporter-1 is dispensable for hepatic iron accumulation and non-transferrin-bound iron uptake in mice. *Hepatology*. 58(2):788-98.
- Weaver, J., Pollack, S., 1989. Low-Mr iron isolated from guinea pig reticulocytes as AMP-Fe and ATP-Fe complexes. *Biochem J*. 261(3): 787-792.
- Weinberg, E. D., 1992. Roles of iron in neoplasia. Promotion, prevention, and therapy. *Biol Trace Elem Res*. 34(2):123-40.
- Weintraub, L. R., Goral, A., Grasso, J., Franzblau, C., Sullivan, A., Sullivan, S., 1988. Collagen biosynthesis in iron overload. *Ann N Y Acad Sci*. 526:179-84.
- Weiss, G., Goodnough, L. T., 2005. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med*. 352(10):1011-23.
- Welch, K. D., Davis, T. Z., Van Eden, M. E., Aust, S. D., 2002. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free Radic Biol Med*. 32(7):577-83.
- Williams, J., Moreton, K., 1980. The distribution of iron between the metal-binding sites of transferrin human serum. *Biochem J*. 185(2): 483-488.
- Wills, E. D., 1972. Effects of iron overload on lipid peroxide formation and oxidative demethylation by the liver endoplasmic reticulum. *Biochem Pharmacol*. 21(2):239-47.
- Wyman, S., Simpson, R. J., McKie, A. T., Sharp, P. A., 2008. Dcytb (Cybrd1) functions as both a ferric and a cupric reductase in vitro. *FEBS Lett*. 582(13):1901-6.
- Yakes, F. M., Van Houten, B., 1997. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(2):514-9.
- Yang, L. P., Keam, S. J., Keating, G. M., 2007. Deferasirox : a review of its use in the management of transfusional chronic iron overload. *Drugs*. 67(15):2211-30.

- Yang, M., Chan, S., Yu Ye, J., Chan, G. Ch., 2013. TPO exerts a protective effect on iron-overload induces apoptosis in cardiomyocytes via mitochondrial pathways. *Blood*. 122(21):4668 - 4668
- Ye, J., Rawson, R. B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U. P., Prywes, R., Brown, M. S., Goldstein, J. L., 2000. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell*. 6(6):1355-64.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., Mori, K., 2001. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*. 107(7):881-91.
- You, L. H., Li, F., Wang, L., Zhao, S. E., Wang, S. M., Zhang, L. L., Zhang, L. H., Duan, X. L., Yu, P., Chang, Y. Z., 2015. Brain iron accumulation exacerbates the pathogenesis of MPTP-induced Parkinson's disease. *Neuroscience*. 284:234-46.
- Zhang, L., Lee, T., Wang, Y., Soong, T. W., 2000. Heterologous expression, functional characterization and localization of two isoforms of the monkey iron transporter Nramp2. *Biochem J*. 349(Pt 1):289-97.
- Zhao, M., Matter, K., Laissue, J. A., Zimmermann, A., 1995. Copper/zinc and manganese superoxide dismutase immunoreactivity in hepatic iron overload diseases. *Histol Histopathol*. 10(4):925-35.
- Zhao, M., Antunes, F., Eaton, J. W., Brunk, U. T., 2003. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *Eur J Biochem*. 270(18):3778-86.
- Zheng, M., Du, H., Ni, W., Koch, L. G., Britton, S. L., Keep, R. F., Xi, G., Hua, Y., 2015. Iron-induced necrotic brain cell death in rats with different aerobic capacity. *Transl Stroke Res*. 6(3):215-23.
- Zimmermann, M. B., Hurrell, R. F., 2007. Nutritional iron deficiency. *Lancet*. 370(9586):511-20.

## 5.5 Ostatní zdroje:

- 1 – <http://www.who.int/nutrition/topics/ida/en/>
- 2 – <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf>
- 3 – <http://www.irondisorders.org/iron-overload1>

## 5.6 Seznam obrázků, tabulek a grafů:

**Obrázek 2.1:** Schéma transportu železa u čtyř buněčných typů.

**Obrázek 2.2:** Schéma regulace homeostáze železa pomocí IRP/IRE regulačního systému.

**Obrázek 2.3:** Schéma úlohy železa v metabolismu reaktivních kyslíkových radikálů (ROS).

**Obrázek 2.4:** Schéma signálních drah aktivovaných během stresu endoplasmatického retikula.

**Obrázek 2.5:** Schéma vnější a vnitřní dráhy apoptózy.

**Obrázek 3.1:** Příklad kalibrační křivky naměřené z reálných dat.

**Obrázek 4.1:** Buňky linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B) po 48 hodinách od aplikace 15 mM citrátu železitého.

**Obrázek 4.2:** Vliv 15 mM citrátu železitého na hladiny proteinů účastnících se homeostáze železa u buněčné linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B).

**Obrázek 4.3:** Vliv 15 mM citrátu železitého na hladiny vybraných proteinů účastnících se odpovědi na oxidativní stres u buněčné linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B).

**Obrázek 4.4:** Vliv 15 mM citrátu železitého na hladiny proteinů účastnících se stresu endoplasmatického retikula u buněčné linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B).

**Obrázek 4.5:** Vliv 15 mM citrátu železitého na hladiny proteinů účastnících se stresu endoplasmatického retikula u buněčné linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B).

**Obrázek 4.6:** Vliv 15 mM citrátu železitého na hladiny proteinů účastnících se signalizace autofagie u buněčné linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B).

**Obrázek 4.7:** Vliv 15 mM citrátu železitého na proteinové hladiny iniciačních kaspáz u buněčných linií HEP-G2 (A) a NES2Y (B).

**Obrázek 4.8:** Vliv 15 mM citrátu železitého na proteinové hladiny exekučních kaspáz u buněčné linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B).

**Obrázek 4.9:** Buňky linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B) po 5 měsících kultivace v médiu s 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  citrátem železitým.

**Obrázek 4.10:** Vliv dlouhodobého nadbytku citrátu železitého na hladiny proteinů účastnících se homeostáze železa při dlouhodobé kultivaci u buněčné linie a HEP-G2 (A) NES2Y (B).

**Obrázek 4.11:** Vliv dlouhodobého nadbytku citrátu železitého na hladiny vybraných proteinů účastnících se odpovědi na oxidativní stres u buněčné linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B).

**Obrázek 4.12:** Vliv dlouhodobého nadbytku citrátu železitého na hladiny proteinů účastnících se stresu endoplasmatického retikula při dlouhodobé kultivaci u buněčné linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B).

**Obrázek 4.13:** Vliv dlouhodobého nadbytku citrátu železitého na hladiny proteinů účastnících se stresu endoplasmatického retikula při dlouhodobé kultivaci u buněčné linie NES2Y (A) a HEP-G2 (B).

**Obrázek 4.14:** Vliv dlouhodobého nadbytku citrátu železitého na proteinové hladiny iniciačních kaspáz během dlouhodobé kultivace u buněčné linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B).

**Obrázek 4.15:** Vliv dlouhodobého nadbytku citrátu železitého na proteinové hladiny exekučních kaspáz při dlouhodobé kultivaci u buněčné linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B).

**Tabulka 3.1:** Rozpis chemikálií pro přípravu 500 ml základního média.

**Tabulka 3.2:** Rozpis přípravy médií s nadbytkem citrátu železitého pro stanovení odpovědi na dávku.

**Tabulka 3.3:** Rozpis pro tvorbu kalibrační křivky.

**Tabulka 3.4:** Složky 12% separačního a 4% zaostřovacího gelu. Pořadí v tabulce je stejné jako při pipetování.

**Tabulka 3.5:** Přehled používaných primárních protilátek při imunodetekce (část 1).

**Tabulka 3.5:** Přehled používaných primárních protilátek při imunodetekce (část 2).

**Tabulka 3.6:** Přehled používaných sekundárních protilátek při imunodetekce.

**Graf 4.1:** Růst a přežívání buněk linií HEP-G2 (A) a NES2Y (B) v závislosti na dávce citrátu železitého („dose response“).

**Graf 4.2:** Růst a přežívání buněk linií HEP-G2 (A) a NES2Y (B) během dlouhodobé kultivace v médiu s 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  citrátem železitým.

**Graf 4.3:** Průběh buněčným cyklem buněk linie HEP-G2 (A) a NES2Y (B) dlouhodobě kultivovaných v médiu s 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  citrátem železitým.