

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Michaela Tomišková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Metabolismus železa během erythropoézy

Bakalářská práce

2024

Michaela Tomišková

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Iron Metabolism in Hematopoiesis

Bachelor thesis

2024

Michaela Tomišková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Michaela Tomišková**
Osobní číslo: **C21237**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Metabolismus železa během erythropoézy**
Téma práce anglicky: **Iron Metabolism in Hematopoiesis**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na metabolismus železa během hematopoézy. V rámci tohoto tématu se nejprve zaměřte na popis hematopoézy, erythropoézy a stavby kostní dřeně. Následně se především zaměřte na popis transportu, inkorporace a skladování železa v kostní dřeni a v jednotlivých stádiích hematopoézy, včetně uvedení přehledu nejdůležitějších proteinů začleněných do metabolismu železa.
2. Ke zpracování kompilace využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *ScienceDirect*, *HighWire*, *NCBI Pubmed*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Metabolismus železa během erythropoézy jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 01. 07. 2024

Michaela Tomišková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych chtěla poděkovat vedoucímu doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, PhD. za trpělivost, cenné rady a poznámky, které mi během psaní bakalářské práce dal. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, příteli a přátelům za podporu a trpělivost, kterou mi během psaní této práce a celého studia věnovali a byli mi oporou.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se věnuje metabolismu železa během erythropoézy a významu faktorů, které mají zásadní vliv na tento proces. V úvodní části se práce zabývá seznámením s průběhem samotné erythropoézy a jednotlivých stádií při vývoji erytrocytů. Následně se část práce zaměřuje na hemoglobin a jeho funkci u erytrocytů. Závěrem práce je debatováno samotné železo, které se zapojuje do erythropoézy a vázání kyslíku na hemoglobin. Práce také zmiňuje různé faktory a hormony, které se procesu erythropoézy podílejí, jako je erythropoetin, hepcidin, ferroportin a jiné.

KLÍČOVÁ SLOVA

Erythropoéza, erytrocyty, hemoglobin, železo, erythropoetin, hepcidin

TITLE

Iron Metabolism In Hematopoiesis

ANNOTATION

This bachelor thesis focuses on iron metabolism in hematopoiesis and the importance of factors that have a major influence on this process. In the introductory part, the thesis deals with the erythropoiesis and the different stages in the development of erythrocytes. Subsequently, part of the thesis focuses on hemoglobin and its function in erythrocytes. The thesis concludes with a discussion of iron itself, which is involved in erythropoiesis and the binding of oxygen to haemoglobin. The thesis also discusses the various factors and hormones involved in erythropoiesis such as erythropoietin, hepcidin, ferroportin and others.

KEYWORDS

Erythropoiesis, erythrocytes, hemoglobin, iron, erythropoietin, hepcidin

OBSAH

| | |
|---|----|
| ÚVOD | 14 |
| 1. ERYTROPOÉZA | 15 |
| 1.1 Průběh prenatální erytropoézy..... | 15 |
| 1.2 Průběh erytropoézy v kostní dřeni..... | 17 |
| 1.3 Erytroblastické ostrůvky..... | 17 |
| 1.4 Fáze diferenciací a dozrání erytrocytů..... | 18 |
| 1.5 Regulace erytroidní diferenciací..... | 19 |
| 1.6 Období erytropoézy před závislostí na erytropoetinu | 20 |
| 1.7 Období erytropoézy závislé na erytropoetinu | 21 |
| 1.8 Erytropoetin..... | 21 |
| 2. HEMOGLOBIN | 23 |
| 2.1 Funkce a struktura hemoglobinu | 23 |
| 2.2 Přesmyk forem hemoglobinu | 25 |
| 2.3 Syntéza hemoglobinu | 26 |
| 2.4 Degradace hemoglobinu..... | 28 |
| 2.5 Transport a vazba kyslíku na hemoglobin..... | 29 |
| 3. ŽELEZO | 30 |
| 3.1 Metabolismus železa | 31 |
| 3.2 Regulace metabolismu železa | 33 |
| 3.3 Intracelulární železo | 34 |
| 3.4 Transferin | 36 |
| 3.5 Transferinový receptor 1 | 38 |
| 3.6 Regulace TfR1..... | 39 |
| 3.7 TfR1 a erytropoéza..... | 40 |
| 3.8 Transferinový receptor 2 | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 4. REGULACE ERYTROPOÉZY ŽELEZEM | 41 |
| 4.1 Homeostáza železa | 42 |
| 4.2 Heparin | 43 |
| 4.3 Ferroportin..... | 44 |
| 4.4 Erytroferon | 46 |
| 4.5 Vzájemné působení železa, kyslíku a erythropoézy..... | 47 |
| 4.6 Hypoxie | 48 |
| ZÁVĚR..... | 50 |
| CITACE | 51 |

SEZNAM OBRÁZKŮ:

| | |
|--|----|
| Obr. 1 – Místa krvetvorby u člověka v prenatálním a postnatálním období..... | 16 |
| Obr. 2 – Schéma erythropoézy..... | 19 |
| Obr. 3 – Schéma primární struktury lidského erythropoetinu..... | 22 |
| Obr. 4 – Struktura hemoglobinu..... | 24 |
| Obr. 5 – Syntéza hemu z protoporfyrinu IX..... | 27 |
| Obr. 6 – Distribuce a cirkulace železa..... | 32 |
| Obr. 7 – Regulace intracelulárního železa regulačními proteiny..... | 35 |
| Obr. 8 – Role hepcidinu v homeostáze železa | 42 |
| Obr. 9 – Erytroferon a systémová homeostáza železa | 46 |

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|--------------|---|
| 2,3-BPG | 2,3-bisfosfoglycerát |
| ALA kyselina | kyselina δ -aminolevulová |
| ARNT | arylhydrokarbonový jaderný translokátor |
| BCL11A | B-buněčný lymfom/leukémie 11a protein |
| BFU-E | burst-forming unit-erythroid |
| BMP 4; 6 | kostní morfogenetický protein 4; 6 |
| BMP-R | receptor kostního morfogenetického proteinu |
| CFU-E | erytroidní jednotky tvořící kolonie |
| CMP | myeloidní progenitor |
| DMT1 | transportér dvojmocných kovů 1 |
| KLF1 | Krüppelův podobný faktor 1 |
| EPO | erythropoetin |
| EPOR | erythropoetinový receptor |
| ERFE | erytoferron |
| FPN | ferroportin |
| GATA-1 | erytroidně transkripčně vázající faktor 1 |
| HAMP | hepcidin antimikrobiální peptid |
| HBA | dospělý hemoglobin |
| HBE | embryonální hemoglobinová podjednotka epsilon |
| HBF | fetální hemoglobin |
| HBG 1; 2 | gen hemoglobinové podjednotky gama-1; 2 protein |
| HFE | protein hemochromatózy |
| HIF 1; 2; 3 | faktor indukovaný hypoxií 1; 2; 3 |

| | |
|-----------|--|
| HJV | hemojuvelin |
| HNF-4 | hepatocytární jaderný faktor 4 |
| Holo-Tf | holo-transferin |
| IRP 1; 2 | železo regulující protein 1; 2 |
| IRE | prvky reagující na železo |
| LBD1 | LIM doménu vázající protein 1 |
| LIP | labilní zásoba železa |
| LMO2 | doména LIM 2 |
| MCV | střední objem erytrocytu |
| MEP | megakaryocytární-erytroidní progenitor |
| MPP | multipotentní progenitor |
| NADPH | nikotinamidadenindinukleotidfosfát |
| NTBI | železo nenasázaného transferinu |
| PBG | porfobilinogen |
| PHD | prolyhydroxylázová doména |
| PPIX | protoporfyrin IX |
| RES | retikuloendoteliální systém |
| SMAD 4; 5 | matky proti dekapentaplegickému homologu 4; 5 |
| STAT 5 | převodník signálu a aktivátor transkripce 5 |
| STEAP 3 | šestimembránový epiteliální antigen prostaty 3 |
| Tal1/SCL | protein 1 akutní lymfocytární leukémie T-buněk |
| TfR 1; 2 | transferinový receptor 1; 2 |
| TSAT | saturace transferinu |
| UTR | nepřekládané oblasti mRNA |

ÚVOD

Proces erythropoézy je děj probíhající v různých orgánech podle stáří organismu. Začíná ve fetálním období ve žloutkovém vaku a postupně přechází do kostní dřeně, kde probíhá od narození do úmrtí. Při erythropoéze se vyvíjí červené krvinky z myeloidních progenitorových buněk. Než se z progenitorové buňky stane zralý erytrocyt, musí projít přes řadu vývojových stádií. Na samotném procesu se podílejí hormony erythropoetin, hepcidin, ferroportin, erytroferon a mnoho dalších. Tento proces je nezbytný pro udržení homeostázy a probíhá za stálé rychlosti, pokud nedojde k patologickým procesům způsobených mutacemi genů nebo nepřímým faktorům ovlivňujícím erythropoézu. Ke správnému fungování je mimo jiné zapotřebí železa, které je zásadně důležité pro navázání kyslíku na erytrocyty a jeho distribuci do tkání. Homeostáza železa má tedy zásadní vliv na erythropoézu.

Cílem této práce je popsat průběh erythropoézy od fetálního období, přes narození, až do dospělosti a vývoj červených krvinek, funkci a vznik hemoglobinu a jeho postupné navazování na vývojová stadia erytrocytů. Jednotlivé hormony a faktory včetně železa, které mají vliv na erythropoézu a tím se podílejí i na udržování homeostázy organismu.

1. ERYTROPOÉZA

Erytropoéza je proces, při kterém se v kostní dřeni (např. lebka, obratle, žebra, pánevní kost nebo hrudní kost) v erytropoetických ostrůvcích tvoří červené krvinky neboli erytrocyty. Zahrnuje diferenciaci erytrocytárních progenitorových buněk na zralé krvinky, jejichž funkcí je přenášet kyslík z plic do tkání po celém těle. Erytropoéza je složitý proces, který je přísně regulován erytropoetinem, železem, vitamínem B₁₂ a interleukiny 3 a 4. Na zvyšování produkce nových erytrocytů se také podílí testosteron, hormony štítné žlázy a růstový hormon [1; 2].

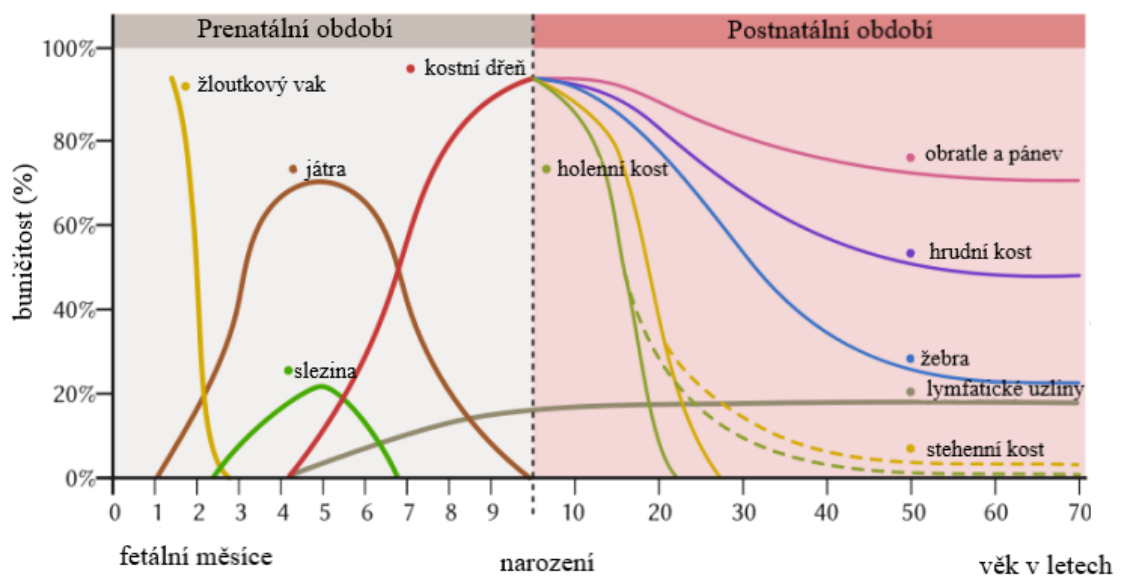
1.1 Průběh prenatální erytropoézy

Erytropoéza začíná již v brzkém embryonálním vývoji. Nedochozí k ní zde však v kostní dřeni jako u dospělého. Ze začátku probíhá ve žlutkovém vāčku, později se přesouvá do jater a sleziny a nakonec přechází do kostní dřeně. Tomuto období se říká prenatální krvetvorba [1; 3].

Během několika prvních týdnů embryonálního vývoje se erytropoéza odehrává ve žlutkovém vāčku. Toto období se nazývá mezoblastové. Žlutkový vāček je membránový útvar, který vzniká okolo devátého dne těhotenství, kdy dutinu blastocysty obrostou buňky a vytvoří exocoelomovou membránu, také známou jako Heuserova membrána. Třináctý den proliferyjí buňky hypoblastu k povrchu membrány a vzniká tak definitivní žlutkový vāček. Tato membrána se postupně během vývoje vstřebává a ve vrstvě mezodermy žlutkového vāčku se tvoří krevní ostrůvky, které obsahují primitivní erytrocytární progenitorové buňky. Tyto progenitorové buňky se diferencují v erytroblasty, které produkují embryonální hemoglobin. Embryonální hemoglobin se skládá z dvojice alfa a dvojice epsilon globinových řetězců ($\alpha\epsilon_2$) a má větší afinitu ke kyslíku než hemoglobin dospělého. Erytroblasty žlutkového vāčku mají několik charakteristik, které je odlišují od jejich pozdějších definitivních forem. Primitivní erytroblasty se diferencují v cévní síti, kde se také nadále dělí a hromadí embryonální hemoglobin. Erytroblastům žlutkového vāčku zůstávají jádra až do jejich zániku. Když dozrávají primitivní normoblasty, mají rychlejší diferenciaci, zvýšenou citlivost na erytropoetin a kratší životnost než fetální a dospělé formy erytroblastů. Tyto erytroblasty ze žlutkového vāčku se nazývají megaloblasty, a to kvůli jejich velikosti, která je dle středního objemu erytrocytu, MCV 250 fl/buňku [1; 2; 4; 5].

Mezi šestým až osmým týdnem těhotenství dochází k přesunu erythropoézy ze žloutkového vaku do jater a sleziny. Tyto orgány jsou schopny produkovat erythropoetin (EPO), což je hormon stimulující erythropoézu. Játra se stávají primárním místem erythropoézy přibližně od desátého do dvacátého osmého týdne těhotenství. Toto období nazýváme hepatolienální a může být částečně funkční až do porodu. Koncem druhého trimestru začíná medulární období, kdy se přesouvá erythropoéza do kostní dřeně, která se po porodu stává hlavním místem erythropoézy. V této fázi je produkovaným typem hemoglobinu fetální hemoglobin (HbF), který má vyšší afinitu ke kyslíku než hemoglobin dospělých (HbA). Po narození se produkce HbF postupně snižuje a je nahrazována produkcí HbA [5; 6; 8].

Erythropoézu v embryu lze rozdělit do tří fází. První fáze je mezi třetím a šestým týdnem embryogeneze, kdy žloutkový vak tvořený mezodermálními buňkami a angioplastickými buňkami produkuje trombocyty a makrofágy. Ve druhé fázi, která trvá do šestého měsíce embryonálního vývoje, jsou žloutkovým vakem produkovány progenitory myeloidních buněk a erytrocytů migrujících do jater, kde se množí a diferencují na červené krvinky. Třetí fáze je od šestého měsíce embryonálního vývoje, během této doby se centrum hematopoézy nachází v kostní dřeni a hematopoetické kmenové buňky se diferencují na červené krvinky a vstupují do krevního oběhu (Obr. 1) [2; 3; 5; 9].



Obr. 1 – Místa krvetvorby u člověka v prenatalním a postnatalním období [7; upraveno]

Fetální krvetvorbu regulují faktory jako například feritin, který reguluje přísun železa z mateřské placenty, nebo erythropoetinový receptor (EPOR), který může prodlužovat časné fáze erytrocytárního cyklu tím, že zvyšuje délku cyklu červenýchrvinek. Kromě toho

jsou pro erythropoézu rozhodující růstové faktory, jako například faktor kmenových buněk, které mají zásadní význam pro sebeobnovu a udržování zásob kmenových buněk, a tudíž normální počet erytrocytů u dospělého [3; 5; 10; 11].

1.2 Průběh erythropoézy v kostní dřeni

Erythropoéza je proces probíhající převážně v kostní dřeni dospělého jedince, při němž se z pluripotentních buněk stávají zralé červené krvinky. Každý den vznikne přibližně 20 miliard nových erytrocytů. Průběh je regulován a řízen heterogenní sítí signálních drah a transkripčních faktorů. V kostní dřeni se erytroidní progenitorové buňky diferencují na erytroblasty, které procházejí několika buněčnými děleními. Dochází k syntéze hemoglobinu a bílkovin, díky kterým jsou erytrocyty schopné přenášet kyslík. Buňky postupně zmenšují svou velikost i jádro a zvětšují cytoplasmatický objem, až se nakonec stanou retikulocyty [5; 12].

Produkcí erytroblastů reguluje řada cytokinů a růstových faktorů, mimo jiné erythropoetin, faktor kmenových buněk a interleukin-3. Erythropoetin podporuje diferenciaci a proliferaci erytroidních progenitorových buněk. Je produkován převážně v ledvinách a jeho zvýšená produkce je odpovědí na nízkou hladinu kyslíku v těle. Proces erythropoézy v kostní dřeni ovlivňuje také mikroprostředí neboli niché, ve kterém buňky zůstávají. Toto niché se skládá z různých typů buněk, jako jsou osteoblasty, endotelové buňky, mezenchymální stromální buňky a také složky extracelulární matrix [5].

Bylo prokázáno, že osteoblasty podílející se na tvorbě kostí regulují erythropoézu produkcí cytokinů, růstových faktorů a přímých kontaktů mezi buňkami a erytroidními progenitorovými buňkami. Endotelové buňky se na regulaci erythropoézy podílejí tím, že produkují cytokiny, růstové faktory a jsou zdrojem kyslíku a dalších živin. Mezenchymální stromální buňky podporující krvetvorbu přispívají k regulaci tím, že produkují růstové faktory a poskytují podpůrnou niku pro erytroidní progenitorové buňky [13].

1.3 Erytroblastické ostrůvky

Erytroblastický ostrůvek je označení pro jedinečné mikroprostředí v kostní dřeni, kde dochází k interakci erytroblastů s makrofágy. Erytroblastický ostrůvek je symbolizovaný centrálním makrofágem obklopeným kruhem vyvíjejících se erytroblastů. Makrofágy uvnitř erytroblastického ostrůvku hrají důležitou roli při podpoře erythropoézy, tedy diferenciaci progenitorové buňky ve zralé erytrocyty, a také pro proliferaci erytroblastů.

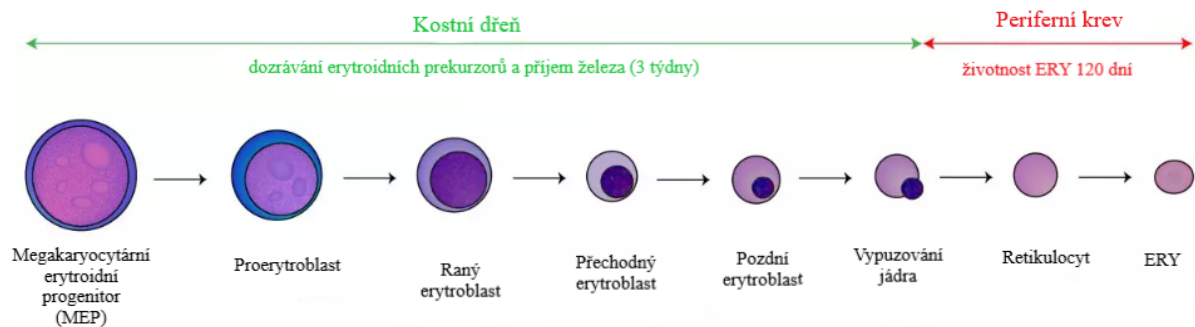
Patří sem různé faktory, jako je transferin, železo, cytokiny, erythropoetin, faktor kmenových buněk a inzulinu podobný růstový faktor 1. Přežití a diferenciaci erytroblastů v erytroblastických ostrůvcích závisí na makrofázích. Makrofágy poskytují adhezní molekuly a fagocytují vytlačená jádra a organely z erytroblastů. Úzké spojení makrofágů a erytroblastů vytváří podpůrné mikroprostředí, které stimuluje efektivní produkci funkčních erytrocytů. Dysfunkce, nebo narušení tohoto mikroprostředí může vést k poruše erythropoézy a k anémii. Stresová erythropoéza je vysoce závislá na signálech, jako je EPO/EPOR/JAK2/STAT5, a také na aktivačních signálech v erythropoetických ostrůvcích, jako je BMP4/SMAD5 a signálech integrinů [5; 14].

1.4 Fáze diferenciaci a dozrávání erytrocytů

Erythropoéza je proces probíhající ve více stupních a obvykle trvá přibližně dva až tři týdny. Zahrnuje diferenciaci hematopoetických kmenových buněk na erytroidní progenitorové buňky a megakaryocyty. Erytroidní progenitorové buňky se skládají z erytroidních jednotek BFU-E (burst-forming unit-erythroid) a erytroidních jednotek tvořících kolonie, CFU-E (colony-forming unit-erythroid). Tyto buňky se pak diferencují v erytroidní prekuzory různé morfologie [2].

Erythropoéza začíná hematopoetickou kmenovou buňkou, která se diferencuje v běžný myeloidní progenitor a poté v megakaryocytární-erytroidní progenitor. První identifikované erytroidní prekuzorové buňky v kostní dřeni jsou proerytroblasty, které se vyznačují jako velká buňka s vysokým poměrem jádra a cytoplazmy, s výrazným jádrem a modrou cytoplazmou, což je díky přítomnosti RNA [5; 2; 15].

Proerytroblasty se postupně vyvíjejí v bazofilní, v polychromatické a následně v ortochromatické normoblasty, a nakonec vznikají retikulocyty. Během tohoto procesu, kdy se z proerytroblastů stávají retikulocyty, se buňky postupně zmenšují a jejich chromatin se stává kondenzovanějším. Při přeměně na retikulocyty dochází k vypuzování jádra ven z buňky a tím dochází ke změně barvy cytoplazmy, která se mění z modré na růžovou v pozdějších stádiích vývoje na zralé erytrocyty. Také dochází ke zvýšené akumulaci hemoglobinu v buňce. Vznikající retikulocyty si zachovávají ribozomální RNA potřebnou ke tvorbě hemoglobinu. Po dvou dnech v kostní dřeni se dostávají do periferní krve, zde pak ztrácejí RNA a vzniká plně zralý erytrocyt (Obr. 2) [3; 17].



Obr. 2 – Schéma erythropoézy; ERY – erythrocyty [16; upraveno]

Na aktivaci klíčových signálních drah pro diferenciaci, proliferaci a přežívání erytroidních buněk se podílí řada vnějších faktorů. Přestože interleukin-3 je nespecifický pro diferenciaci erythrocytů, bylo prokázáno, že zvyšuje proliferaci raných progenitorů, včetně BFU-E. Faktor kmenových buněk tyrokinázový gen je exprimován v buňkách časných stádií krvetvorby. Signály z receptorů tyrozikinázy podporují proliferaci a přežívání jak BFU-E a CFU-E, tak i proerytroblastů [4].

Erythropoetin jako cytokin je hlavní pro diferenciaci erythropoézy, umožňuje přežívání a proliferaci CFU-E progenitorů a dozrávajících erytroidních buněk. Receptor pro EPO je na erytroidních buňkách exprimován velice slabě a se zráním rychle klesá. Při diferenciaci erytroidních buněk dochází k expresi velkého množství membránových povrchových antigenů, které se v průběhu vývoje erythrocytů mění [5].

1.5 Regulace erytroidní diferenciaci

Regulaci diferenciaci erythropoetických buněk lze rozdělit na čtyři hlavní období. První období zahrnuje stadia od hematopoetické kmenové buňky až po BFU-E, před vznikem závislosti buněk na erythropoetinu. Druhé období zahrnuje stadia závislá na erythropoetinu od CFU-E po časně stadium bazofilního normoblastu. Třetí období, kterému se říká terminální diferenciaci, zahrnuje období od pozdního stadia bazofilního normoblastu až po enukleaci ortochromatického normoblastu. První tři období se odehrávají v kostní dřeni a závěrečné zrání, tedy čtvrté období, nastává v cirkulující krvi, kde dozrávají retikulocyty na erythrocyty. Erytroidní progenitory erythrocytů a jejich prekurzory reagují na specifické extracelulární faktory nezbytné pro přežití a/nebo proliferaci erythrocytů. Stejně tak mají i vnitřní faktory, které řídí a posilují jejich vlastní diferenciaci. Tvorba nových erythrocytů v kostní dřeni se udržuje na základní erythropoetické rychlosti a u normálního dospělého člověka vyžaduje produkci přibližně $2 \cdot 10^{11}$ nových erythrocytů každý den. Nově

vzniklé erythrocyty nahrazují stejný počet erythrocytů, které jsou denně odstraňovány z oběhu fagocytózou makrofágy [18; 19].

Pokud se u zdravého jedince objeví krvácení, zvýšená míra destrukce erythrocytů nebo snížení počtu erythrocytů cirkulujících v krvi dochází ke vzniku akutní anémii. Takovýto stav vyvolává „stresovou erythropoézu“, při níž dochází ke zvýšené produkci erythrocytů, dokud nedojde k obnovení normálního počtu cirkulujících erythrocytů. Stresová erythropoéza zahrnuje zrychlené zvýšení produkce erythropoetinu v důsledku hypoxie, jí jsou vystaveny buňky kůry ledvin produkující erythropoetin [18; 19].

1.6 Období erythropoézy před závislostí na erythropoetinu

V tomto období poskytuje mikroprostředí kostní dřeně živiny a růstové faktory potřebné pro multipotentní progenitor, MPP. U BFU-E bylo prokázáno, že tyto erytroidní progenitory v raném stadiu vyžadují specifické růstové faktory, které podporují jejich přežití a proliferaci, včetně faktoru kmenových buněk a inzulínu podobného růstového faktoru-1. V období ještě před závislostí na erythropoetinu je diferenciaci MPP a myeloidního progenitoru (CMP) závislá na erythropoetinu do erytroidní linie a je ovlivněna relativní koncentrací intracelulárních faktorů, které regulují transkripci genů. Z toho vyplývá, že existují transkripční faktory, které řídí diferenciaci směrem k erytroidní linii, a existují také antagonistující transkripční faktory, které řídí diferenciaci směrem k neerytroidním liniím [3; 18; 19].

Myeloidní transkripční faktor PU.1 směřuje CMP k granulocytárně-makrofágové diferenciaci, zatímco erytroidně transkripčně vázající faktor 1 (GATA-1) zinkového prstu, který je součástí komplexů transkripčních faktorů, se váže na DNA obsahující (A/T)GATA(A/G) sekvenci. Interagující protein GATA-1 a především regulace jeho exprese je nezbytný pro zajištění proliferace a maturace megakaryocytů a erytroidní diferenciaci. Na megakaryocytárním-erytroidním progenitoru (MEP) se ve formě erytroidního genu objevuje další transkripční faktor se zinkovým prstem, a to erytroidně Krüppelovi podobný faktor (KLF1). KLF1 se váže na DNA obsahující sekvence CACC v regulačních oblastech mnoha erytroidně specifických genů a směřuje MEP k erytroidní diferenciaci. GATA-1 a KLF1 hrají dominantní roli v regulaci genů exprimovaných v progenitorech směrem k erytroidní diferenciaci, tedy ve stadiích BFU-E až po ortochromní erytroblast. V komplexu transkripčních faktorů s Tal1/SCL, LMO2 a LBD1 hraje GATA-1 důležitou roli v proliferaci erytroidních progenitorů, a to převážně v období závislém na

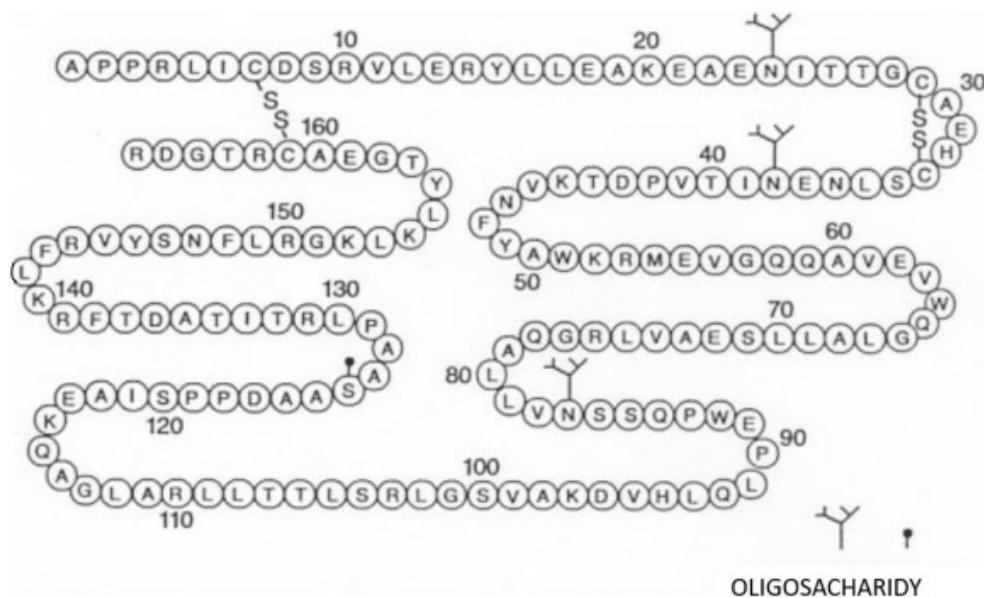
erythropoetinu. Na druhé straně KLF1 reguluje mnoho genů zapojených do terminální diferenciaci. Mezi tyto geny patří ty, které kódují různé erytrocytární membrány a membránově či skeletární proteiny, β -globiny, proteiny stabilizující α -hemoglobin a transkripční faktor BCL11A, jenž se podílí na vývojovém přechodu z γ -globinu na β -globin [18; 19].

1.7 Období erythropoézy závislé na erythropoetinu

Fáze CFU-E je první fází, ve které se erytroidní progenitory stávají závislými na erythropoetinu, a to kvůli jejich přežití. Požadavek na erythropoetin se zvýší a je rozhodujícím pro regulaci erythropoézy a také pro hlavní mechanismus kontroly zpětné vazby založené na funkci zralých erytrocytů. Navzdory požadavkům všech orgánů na dostatečný přísun kyslíku pro aerobní dýchání jsou ledviny hlavním zdrojem erythropoetinu v postnatálním životě. Obsah hemoglobinu v krvi, který je stanovován v počtu cirkulujících erytrocytů, řídí přísun kyslíku z plic do periferních tkání. Když počet erytrocytů klesnou pod normální hladinu, všechny tkáně pocítují hypoxii a ledviny jsou hlavním respondérem z hlediska tvorby erythropoetinu [18; 19].

1.8 Erythropoetin

Erythropoetin je glykoproteinový hormon, jehož hlavním úkolem je řídit tvorbu červených krvinek, jejich proliferaci, diferenciaci a přežívání erytroidních progenitorů v kostní dřeni. Hlavním cílem EPO jsou pozdní erytroidní progenitory, zejména kolonie tvořící erytroidní jednotky. EPO je in vivo rozhodující pro proliferaci a přežívání CFU-E a jejich ireverzibilní terminální diferenciaci, zatímco pro tvorbu BFU-E a jejich diferenciaci na CFU-E není nutná. Protože hlavní funkcí erytrocytů je transport kyslíku z plic do periferních tkání, je regulace produkce EPO důležitým prvkem kontroly oksličování tkání. EPO je proto jediným hematopoetickým růstovým faktorem, jehož produkce je regulována hypoxií. Je syntetizován především peritubulárními fibroblasty kůry ledvin a játry, a to především ve fetálním období a následně i v dospělosti (Obr. 3) [20; 22].



Obr. 3 – Schéma primární struktury lidského erythropoetinu [21; upraveno]

Transkripční faktory typu GATA jsou důležitými při kontrole časové i tkáňové specifity exprese EPO genů. U dospělých je malé množství erythropoetinové mRNA exprimováno jaterním parenchymem, slezinou, plicemi a mozkiem. V mozku má erythropoetin neutroprotektivní účinky, které jsou rozdílné od účinků cirkulujícího erythropoetinu na erythropoetické tkáně. Stejně jako ostatní plasmatické glykoproteiny, erythropoetin cirkuluje v krvi jako směs izoform, které se liší glykosylací, molekulovou hmotností, biologickou aktivitou a imunoreaktivitou [22].

Exprese genu EPO je indukována transkripčními faktory indukovanými hypoxií (HIF). Hlavním představitelem rodiny HIF je HIF-1, který se skládá z podjednotky α O^2 -labilní a z konstantní jaderné podjednotky β . HIF-1 se skládá ze dvou podjednotek, které jsou v jádře stabilní. Při normoxii je α -podjednotka HIF inaktivována po prolyl- a asparaginylnyl-hydroxylaci pomocí α -oxoglutarátu a Fe^{2+} -dependentních HIF specifických dioxygenáz. Zatímco HIF-1 a HIF-2 aktivují gen EPO, HIF-3 společně s GATA-2 a nukleární faktor kappa B jsou pravděpodobně inhibitory transkripce genu EPO. Signalizace EPO zahrnuje tyrosinovou fosforylaci homodimerního receptoru EPO a následnou aktivaci intracelulárních antiapoptotických proteinů, kináz a transkripčních faktorů [23].

V lidském organismu neexistují žádné předem vytvořené zásoby erythropoetinu, jeho produkce je regulována hypoxií, která vede k indukované expresi genu EPO 3' zesilovačem, přičemž mechanismy změny exprese erythropoetinu v ledvinách a játrech se liší. Ledvinové buňky reagují na hypoxii buď úplně nebo vůbec, zatímco hepatocyty reagují odstupňovaně. Řízení exprese EPO genu zahrnuje složité interakce mezi DNA a jadernými

proteiny. Na 3' zesilovač se vážou proteiny HIF-1 alfa a beta. Receptor erythropoetinu patří do rodiny cytokinových receptorů a zahrnuje řetězec p66, který je při aktivaci erythropoetinem dimerizován. Vazba erythropoetinu vyvolává stimulaci tyrozinkinázy zvané Janusova kináza 2 a její aktivace poté vede k tyrozinové fosforylaci několika proteinů včetně samotného receptoru EPO [20].

3' zesilovač (enhancer) obsahuje tři různé segmenty. První je konzervovaná sekvence nacházející se poblíž 5' konce zesilovače, jenž je vazebným místem pro nový transkripční faktor označovaný jako HIF-1. Prostřední segment je méně konzervovaný a jeho pravděpodobnou rolí je indukovatelnost zesilovače erythropoetinu. Třetí část odpovídá 3' DNA sekvence, která je vazebným místem pro hepatocytární jaderný faktor 4 (HNF-4). Proteiny, které se vážou na tento zesilovač, synergicky působí na stimulaci erythropoetinu a HNF-4, který může v hypoxických buňkách zvýšit transkripční aktivaci zprostředkovanou zesilovačem erythropoetinu. Kromě toho se C-koncová část HIF-1 specificky váže na koaktivátor p300 a jeho nadměrná exprese zvyšuje hypoxickou indukci. Hypoxie tedy indukuje vznik velkého komplexu proteinů přímo nebo nepřímo vázaných na zesilovač, který následně přenáší signál na EPO promotor, čímž umožní transkripci genu [20; 22].

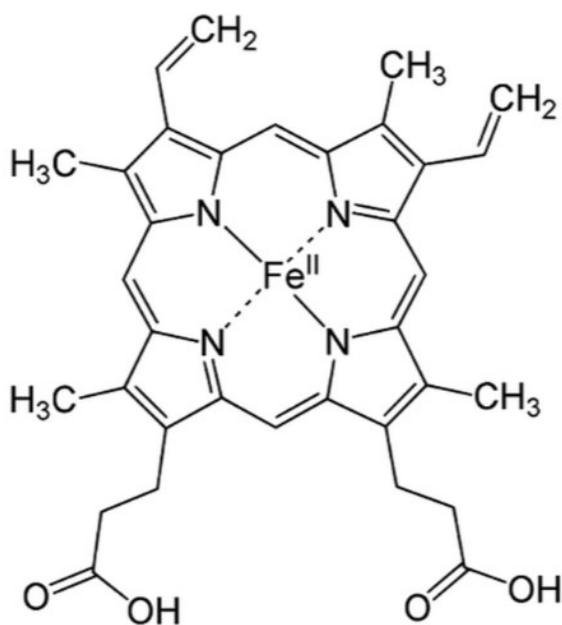
2. HEMOGLOBIN

2.1 Funkce a struktura hemoglobinu

Hemoglobin je tetramer sférického tvaru, jenž je složený ze dvou globinových řetězců α -like ($\alpha 1$ a $\alpha 2$) a dvou β -like ($\beta 1$ a $\beta 2$). Každý globinový polypeptid váže jednu molekulu železa-protoporfyrinu-IX (PPIX). Molekula hemu je amfipatická, což znamená, že obsahuje dvě nabitě propionátové skupiny, které interagují s vodou a/nebo polárními postranními řetězci aminokyselin na povrchu globinu, a zbytek molekuly hemu je převážně hydrofobní povahy a váže se v hydrofobním nitru globinu, obklopen apolárními postranními řetězci. Každý hem má centrální atom železa, který je koordinován čtyřmi ekvatoriálními N ligandy z každého ze čtyř pyrrolových kruhů porfyrinu. Hem je vázán k proteinu prostřednictvím koordinované kovalentní vazby z axiálního N ligandu, kterou zajišťuje imidazolový postranní řetězec histidin F8, spolu s četnými nekovalentními interakcemi mezi porfyrinem a globinem. Zatímco atom železa hemu vytváří koordinovanou kovalentní vazbu s dvouatomovými plynnými ligandy, jako jsou kyslík, oxid uhelnatý, oxid dusnatý, oxid dusičitý a sirovodík, záhyb globinu poskytuje základní prostředí pro dosažení reverzibilní

a selektivní vazby ligandů. Rovina porfyriu rozděluje hemovou kapsu na dvě oblasti. Postranní řetězec histidinu F8 koordinující železo zaujímá místo v proximální hemové kapse, přičemž diatomické ligandy se vážou na opačné straně porfyriu, což je distální hemová kapsa. Díky tomu je možný přenos, vázání a uvolňování kyslíku z plic do tkání [18; 24; 26; 27; 28].

Podjednotky α a β jsou tvořeny 7, resp. 8 šroubovicemi, které se nazývají A-H. Tyto šroubovice jsou spojeny nehelikálními úseky, které se označují jako rohy. Každá podjednotka má vazebnou kapsu pro hem tvořenou šroubovicemi E a F. Hem se skládá ze železnatého iontu, který je držen uprostřed porfyriu a je koordinován čtyřmi atomy dusíku porfyriinového kruhu. Železo je také kovalentně ukotveno k hemoglobinu v proximální kapse pro hem pomocí imidazolu z histidinového zbytku umístěného na šroubovici F. Tento histidinový zbytek je znám jako proximální histidin nebo histidin F8. Ten umožňuje, že železo váže kyslík nebo jiné plyny v distální kapse hemu pomocí kovalentní vazby, která je navázána na hemovou kapsu (Obr. 4) [24; 27].



Obr. 4 – Struktura hemoglobinu [25]

Funkce hemoglobinu vysvětluje rovnováha mezi dvěma klasickými stavy: napjatým (T) stavem, ve kterém je hemoglobin nevázaný a vykazuje nízkou afinitu ke kyslíku, a uvolněným (R) stavem vázaného hemoglobinu, který vykazuje vysokou afinitu ke kyslíku, což poskytuje strukturální základ pro kooperativní efekty, které usnadňují účinný příjem a uvolňování kyslíku in vivo. Rovnováhu mezi stavy T a R ovlivňují endogenní heterotropní ligandy, jako je 2,3-bisfosfoglycerát (2,3-BGP), protony, oxid uhličitý, chloridy

nebo syntetické alosterické efektoři, které modulují afinitu hemoglobinu ke kyslíku, a to buď stabilizací stavu R hemoglobinu, nebo stabilizací stavu T hemoglobinu [24; 27; 28].

V lidské krvi existuje několik různých forem normálního hemoglobinu. Procentuální zastoupení jednotlivých typů hemoglobinu závisí na stupni vývoje. Během těhotenství plod produkuje především fetální hemoglobin. HbF se skládá ze dvou podjednotek alfa a dvou podjednotek gama-globinu. HbF má větší afinitu ke kyslíku než HbA, což umožňuje proudění kyslíku z mateřského do fetálního oběhu přes placentu. Produkce HbF po narození výrazně klesá, do dvou let dosahuje nízkých, téměř dospělých hodnot a nakonec tvoří 2 až 3 % hemoglobinu u dospělých. HbA, nejběžnější forma hemoglobinu u dospělých, se skládá ze dvou alfa a dvou beta-globinových podjednotek. Na rozdíl od HbF produkce HbA po narození prudce vzroste a nakonec tvoří 95-98 % hemoglobinu u dospělých. HbA2 je méně častá forma hemoglobinu u dospělých. Skládá se ze dvou alfa a dvou delta-globinových podjednotek a tvoří 1 až 3 % hemoglobinu u dospělých [29].

2.2 Přesmyk forem hemoglobinu

Postupná exprese genu pro globin v embryonálním, fetálním a dospělém věku během vývoje je daná prostřednictvím dvou hemoglobinových přepínačů, které jsou zprostředkovány změnami expresí exprimovaných genů pro β -like globin. U člověka existuje několik funkčních β -like globinových genů: embryonální (HBE), fetální (HBG1, HBG2) a dospělé. Nejdříve dojde k přeměně exprese embryonálního globinu, který v počátku převažuje, v primitivních erytroidních buňkách na fetální globiny, které nastupují spolu s definitivní erytropoézou. Po narození začíná být exprese fetálních globinů nahrazována v erytroidních buňkách dospělými globiny. α -like globin existuje ve dvou funkčních globinových genech, a to HBA1 a HBA2. Embryonální globin je exprimován pouze primitivními erytroidními buňkami, dospělé globiny HBA1 a HBA2 jsou exprimovány ve všech fázích erytropoézy. Za klíčový regulátor přepnutí hemoglobinu z fetálního na dospělé a k utlumení HbF je označován transkripční regulátor BCL11A. Mechanismus, kterým BCL11A tlumí HbF, je dosud nejasný. Pravděpodobně jde o přímou modifikaci chromatinu a/nebo změny interakcí na dlouhé vzdálenosti [3; 24].

Pochopení molekulární podstaty přechodu z fetálního na dospělý hemoglobin je v této oblasti dlouhodobě předmětem zájmu vzhledem k jeho terapeutickému významu. Existují významné klinické důkazy o tom, že zvýšená produkce fetálního hemoglobinu snižuje závažnost onemocnění u β -talasemie a srpkovité anémie [27].

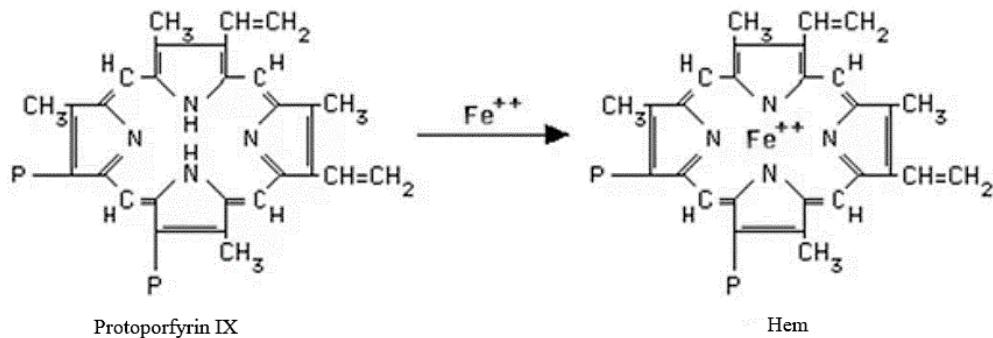
2.3 Syntéza hemoglobinu

Hemoglobin se začíná s vysokou rychlostí syntetizovat v bazofilním a polychromatickém normoblastu. Syntéza hemoglobinu přetrvává na relativně stabilních komplexech ribozom-globinové mRNA. Po vytlačení jader z ortochromatického normoblastu vzniká retikulocyt, který stále obsahuje aktivní polyribozomy syntetizující globin a i mitochondrie, které produkují hem. Homeostáza hemu je vysoce koordinovaný proces během erytropoézy vyznačující se dramatickým nárůstem syntézy hemu, jenž je nezbytný pro správnou hemoglobinizaci erytrocytů [24; 27; 30].

Syntéza probíhá třemi nezávislými, ale přísně koordinovanými cestami. První je exprese globinových genů (α , β , γ , δ , ϵ , ζ), která je specifická pro vývojová stádia erytrocytů; druhou je syntéza hemu, která vyžaduje syntézu protoporfyrinu IX; a třetí je dodávka železa z tkáňového faktoru v plasmě do mitochondriální ferrochelátázy, což je enzym katalyzující inkorporaci železa do protoporfyrinu IX. Přestože se na syntéze hemoglobinu podílejí tři zcela odlišné dráhy, ve vyvíjejících se erytroblastech a retikulocytech nedochází k hromadění prakticky žádných meziproductů, jako například globinových řetězců, meziproductů syntézy PPIX, nebo železa. Dosaženo je to řadou mechanismů negativní a pozitivní zpětné vazby, v nichž hraje klíčovou roli hem. Obecně platí, že v erytroidních buňkách hem inhibuje získávání železa v buňkách, a tudíž i syntézu hemu, a je nezbytný pro syntézu globinu. Hem ale také stimuluje transkripci globinových genů a je zapojený do podpory některých dalších aspektů erytroidní diferenciaci [24; 27].

Syntéza hemu probíhá v několika krocích. Tento proces zajišťuje osm enzymů, z nichž čtyři pracují v mitochondriích a čtyři v cytosolu. Proces začíná v mitochondriích, kde ALA-syntáza spojuje glycin a sukcinylkoenzym A za vzniku kyseliny aminolevulinové (ALA). První kroky syntézy probíhají v cytosolu. Dále ALA-dehydratáza spojí dvě molekuly ALA a vytvoří porfobilinogen (PBG). V následném kroku porfobilinogen-deamináza odebírá čtyři molekuly PBG a vytváří hydroxymethylbilan. Dále uroporfyrinogen III-(ko)syntáza odebírá hydroxymethylbilan a produkuje uroporfyrinogen III. V posledním kroku, který se odehrává v cytosolu, uroporfyrinogen-dekarboxyláza odebírá

uroporfyrinogen III a produkuje koproporfyrinogen III. Poslední tři kroky syntézy hemu probíhají v mitochondriích. Koproporfyrinogen III se pak koproporfyrinogen-oxidázou přemění na protoporfyrinogen IX. Předposlední krok nastává, když protoporfyrinogen-oxidáza přemění protoporfyrinogen IX na protoporfyrin IX. Posledním krokem syntézy hemu je přidání železa k protoporfyrinu IX pomocí ferrochelátázy, čímž vzniká molekula hemu (Obr. 5) [29].



Obr. 5 – Syntéza hemu z protoporfyrinu IX [43; upraveno]

V erytroidních buňkách je železo jak substrátem pro syntézu hemoglobinu, tak se podílí na jejich regulaci. Komplex železo-PPIX zvyšuje transkripci globinových genů, je nezbytný pro translaci globinu a dodává prostetickou skupinu pro sestavení hemoglobinu. Kromě toho se hem může podílet na expresi v transkripční i translační úrovni mnoha dalších erytroidně specifických proteinů. Velké množství hemového železa je recyklováno pro opětovné zabalení do hemoglobinů erytrofagocytózou v makrofázích retikuloendoteliálního systému [24; 30].

Produkce globinového řetězce probíhá v cytosolu erytrocytů tak i v jejich prekurzorů a děje se prostřednictvím genetické transkripce a translace. Geny pro řetězec alfa se nacházejí na chromozomu 16 a geny pro řetězec beta na chromozomu 11. Syntéza hemu probíhá jak v cytosolu, tak i v mitochondriích erytrocytů. Začíná glycinem a sukcinylkoenzymem A a končí tvorbou protoporfyrinového kruhu IX. Vazbou protoporfyrinu na ion Fe^{2+} vzniká konečná molekula hemu [29].

2.4 Degradace hemoglobinu

Makrofágy fagocytují miliardy senescentních nebo poškozených erytrocytů z oběhu denně a ty jsou následně odstraňovány především enzymy ve slezině, játrech a kostní dřeni. V těchto tkáních jsou erytrocyty sekvestrovány fagocytujícími buňkami, které vystylají sinusoidy a jsou součástí retikuloendoteliálního systému (RES). RES je enzymový systém zodpovědný za zahájení přeměny hemu na žlučové barvivo. Z hemoglobinu se odštěpí proteinová složka globinu a nebílkovinná složka tedy hem. Obě složky se odbourávají postupně v několika krocích a velká část je znovu využívána na tvorbu nových erytrocytů. Globinové řetězce se proteolyticky štěpí na aminokyseliny, které se využijí pro tvorbu nových bílkovin. Enzymový komplex hem-oxygenáza je lokalizován v mikrosomální frakci metazoálních tkání, vyžaduje smíšenou funkční oxidaci s cytochromem P450 jako terminální oxidázou I a přeměňuje hem na biliverdin. Hem je rozštěpen v cytosolu na porfyrin enzymem hemoxygenázou a molekulou kyslíku za spotřeby NADPH (nikotinamidadeninindinukleotidfosfátu) tím, že se uvolní jeden methylenový můstek ve formě oxidu uhličitého. Zároveň dojde k uvolnění trojmocného železa, které se naváže na transferin, plasmatickou transportní bílkovinu, a je krví rozváděno po těle. Trojmocné železo se z části naváže v játrech, slezině a kosterní svalovině na zásobní bílkovinu feritin, odkud je dle potřeby uvolňováno zpět do krve a transportováno na transferinu do červené kostní dřeni, kde se využívá k tvorbě nových erytrocytů. Zbylá část hemu je přeměňována na tetrapyrrol biliverdin, který obsahuje dvojně konjugované vazby a díky němuž má zelenou barvu. Další redukcí enzymem biliverdinreduktázou vzniká biliverdin, žlučové barvivo, které je hlavním degradačním produktem katabolismu hemu. Konjugovaný bilirubin je špatně rozpustný ve vodě i krvi, a tak se váže na albumin, čímž vzniká nekonjugovaný bilirubin a v této podobě je transportován krví do jater. V játrech se na tento komplex naváže kyselina glukuronová a vznikne bilirubinglukuronid za katalýzy glukuronyltransferázou. Vytvořený bilirubinglukuronid se vyloučí do žluče, odkud se dostane do střeva. Ve střevě dojde k dekonjugaci a následnou činností bakterií k redukcí bilirubinu na urobilinogen a sterkobilinogen. Část urobilinogenu je resorbována ze střeva zpět do krve a následně se dostává do moče. Urobilinogen a sterkobilinogen jsou ve střevě přeměňováni bakteriemi na urobilin a sterkobilin, které jsou následně vyloučeny stolicí. Kromě toho tento systém podléhá adaptivní regulaci v reakci na substrátovou zátěž, například v játrech se aktivita hem-oxygenázy zvyšuje po indukované hemolýze [30; 31; 32; 33].

2.5 Transport a vazba kyslíku na hemoglobin

Hlavní transport kyslíku v krvi je zajištěn hemoglobinem s navázanou molekulou kyslíku, tvoří asi 98,5 %. Vazbou molekuly kyslíku na dvojmocné železo v hemu dojde k oxygenaci, vznikne oxyhemoglobin a zachová se mocenství železa. Jedna molekula hemoglobinu může vázat čtyři molekuly kyslíku. Pokud na sebe jeden ferro-hem naváže kyslík, dochází k ovlivnění vzdálenější části molekuly hemoglobinu a dojde k alosterickému efektu, který usnadní vazbu s kyslíkem na ostatní hemy. Navázání kyslíku je doprovázeno porušením iontových vazeb mezi karboxylovými konci všech čtyř podjednotek hemoglobinu. Toto usnadní následující navázání molekuly kyslíku, které poté vyžaduje přerušení menšího počtu iontových vazeb. Takovéto změny mají výrazný vliv na sekundární, terciární a kvartérní strukturu hemoglobinu. Dojde k celkovému pootočení párů α , β podjednotek vůči sobě, což vede k pevnějšímu spojení tetrameru a zvýšení afinity hemů k O_2 . Afinita hemoglobinu ke kyslíku je ovlivněna několika faktory, mezi které patří pokles pH spolu se vzestupem pCO_2 , nebo zvýšení teploty, což vede k usnadněnému uvolňování kyslíku z hemoglobinu. Opačný vliv má zvýšení pH a pokles pCO_2 spolu s poklesem teploty, což vede ke zvýšení afinity hemoglobinu ke kyslíku. Zvýšením produkce 2,3-bisfosfoglycerátu (2,3-BPG) v erytrocytech se snižuje afinita hemoglobinu ke kyslíku a usnadňuje se tak oxygenace tkání, zato úbytek 2,3-BPG má opačný efekt. 2,3-BPG se váže v centrální dutině deoxygenovaného hemoglobinu, a tím snižuje jeho schopnost vázat kyslík. Afinita hemu pro kyslík je ovlivněna také globinem [32; 33].

Konformace molekuly deoxyhemoglobinu vyjadřuje nižší afinitu hemoglobinu ke kyslíku. Bývá označena jako T stav a molekuly oxyhemoglobinu jako R stav. Mezi T stavem a R stavem existuje souvislý přechod závislý na postupném navazování nebo vyvazování kyslíku z jednotlivých podjednotek hemoglobinu. Čím více podjednotek má navázanou molekulu kyslíku, tím více se přibližuje R-formě a opačně. Vazba kyslíku totiž způsobuje lokální konformační transformaci příslušné podjednotky, která oslabí sdružování mezi ostatními podjednotkami [32; 33].

3. ŽELEZO

Železo je ze senescentních erytrocytů recyklováno makrofágy ve slezině, játrech a kostní dřeni. Železo přijato potravou je vychytáváno transportérem dvojmocných kovů 1 (DMT1) v enterocytech a prostřednictvím ferroportinu (FPN) je transportováno do portální krve. Tam se naváže na transferin a je vychytáváno hepatocyty, makrofágy a buňkami kostní dřene prostřednictvím transferinového receptoru 1 (TfR1). Přestože většina fyziologicky aktivního železa je vázána na hemoglobin, jeho hlavním úložištěm jsou játra, kde je navázané na feritin. Na vysokou zátěž železa reagují hepatocyty vylučováním peptidového hormonu hepcidinu, který je schopný se navázat na transportér železa FPN a vyvolává jeho internalizaci a degradaci, čímž je schopen řídit množství železa uvolňovaného z buněk do krve [34; 35].

Železo je přechodný kov, který má schopnost odevzdávat a přijímat elektrony v redoxních reakcích, proto je výhodné pro základní biologické procesy. Hraje zásadní roli v mnoha buněčných procesech, například v syntéze DNA, opravách nukleových kyselin, buněčném dýchání v mitochondriích, růstu a smrti buněk a přispívá k buněčné signalizaci a ochraně hostitele. Železo začleněné do hemu je hlavní složkou hemoglobinu a má zásadní význam pro přenos a zásobování erytrocytů kyslíkem. Díky schopnosti darovat a přijímat elektrony se železo v lidském těle vyskytuje ve dvou oxidačních stavech, dvojmocném a trojmocném. Železo je nezbytné pro fungování lidské fyziologie, v přítomnosti peroxidu vodíku má však potenciál být toxickým. Dvojmocné železo je schopné reagovat s peroxidem vodíku za vzniku jedné z reaktivních forem kyslíku, hydroxylového radikálu, přičemž se oxiduje na trojmocné železo. Radikály vznikající při takovýchto reakcích, které nazýváme Fentonovy nebo Fentonovy podobné, mohou způsobit v organismu oxidační poškození a vyvolat tak peroxidaci lipidů a poškození tkání [34; 36; 37].

Hydroxylový radikál je jeden z nejdominantnějších oxidantů vyskytujících se v lidském těle, který napadá bílkoviny, lipidy, nukleové kyseliny a sacharidy a vede k peroxidaci a apoptóze buněk. Jelikož je železo škodlivé při vysokých koncentracích, je nutná přísná regulace, aby se zabránilo přetížení a následnému poškození organismu. Při dlouhodobém nedostatku železa dochází ke snížení dostupnosti železa, což způsobí omezení erythropoézy v kostní dřeni a to následně vede ke středně těžké až těžké anémii. Přetrvávající nedostatek železa i bez vyvolání anémie je navíc spojen s únavou, se zhoršením kognitivních a motorických schopností jedince, defektem funkce imunitních buněk a zvýšeným rizikem onemocněním srdečním selháním [34; 35].

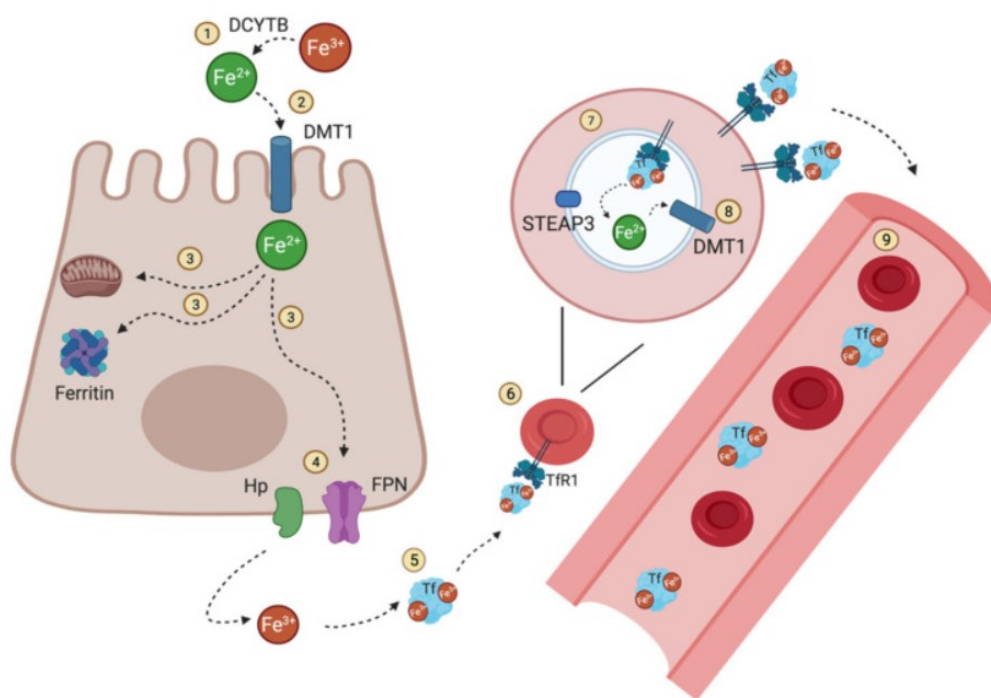
3.1 Metabolismus železa

Železo v lidském těle je z velké části spojeno s hemoglobinem erytrocytů (až z 80 %). Zbylá část je uložena v makrofázích a hepatocytech, je aktivní v jiných skupinách hemů nebo v Fe-S klastrech. Většina tohoto železa je nutná pro erythropoézu, tedy tvorbu erytrocytů schopných přenášet kyslík z plic do tkání. Protože zásoba železa v oběhu je v porovnání s denní potřebou poměrně malá, musí docházet k průběžné recyklaci železa ze starých erytrocytů, aby bylo možno dosáhnout denní potřeby železa pro udržení erythropoézy a dalších tělesných potřeb. Z potravy je vstřebáno velice malé množství, pouze 1-2 mg železa denně, které se v potravě vyskytuje ve dvou formách, a to jako hemové a nehemové železo. Ze stravy je hem přijímán v neporušeném stavu a je vstřebáván enterocyty ve střevě. Hlavním zdrojem hemového železa je hemoglobin a myoglobin obsažený v mase, zatímco zdrojem nehemového železa jsou obiloviny a zelenina [30; 34; 38].

Nehemové, tedy trojmocné železo musí být před vstřebáním redukováno na dvojmocné, aby mohlo být vstřebáno ve střevě. Trojmocné železo je redukováno na dvojmocné pomocí železo-redukujícího duodenálního cytochromu B na apikální membráně enterocytů směřujícího do lumen střeva. Takto redukované železo se dostává do krve přes apikální membránu enterocytů prostřednictvím transportéru dvojmocných kovů 1, jenž je hlavní regulační jednotkou pro vstřebávání železa v duodenu a horním ileu tenkého střeva. Železo, které bylo takto přijato, pak může být přímo využito pro vnitřní metabolické mechanismy buňky, uloženo v zásobní formě ve feritinu nebo uvolněno z buněk pro systémovou dodávku železa [34; 35].

Po vstřebání je redukované dvojmocné železo transportováno do krve prostřednictvím ferroportinu, jediného efluxního (odvodného) proteinu pro železo. Následuje oxidace hefaistinem nebo ceruloplasminem na trojmocné železo, které se naváže na hlavní plasmatický přenašeč železa, transferin, pro další využití. Transferin se skládá ze dvou vysoce afinitních vazebných míst pro trojmocné železo a funguje jako hlavní transportní glykoprotein pro železo a udržování železa v inertním stavu. Za fyziologických podmínek je velká část železa cirkulujícího v krvi vázána na transferin. V některých případech patologických stavů, kdy je vazebná kapacita transferinu překročena, může dojít ke vzniku železa nevázaného transferinem (NTBI), které bývá vychytáváno játry s toxickými důsledky [34; 39].

Erytrocytární prekurzory v kostní dřeni jsou omezeny příjmem železa vázaného na transferinu prostřednictvím transferinového receptoru 1. Jelikož prekurzory exprimují převážně vysoké hladiny TfR1, hepatocyty a další neerytroidní buňky jsou schopné využívat NTBI a další zdroje železa, protože exprimují jiné transportéry. Cirkulující železo dodáváno erytroidními prekurzory a dalšími buňkami je přijímáno prostřednictvím endocytózy, kterou zprostředkovávají receptory do jamek potažených klathrinem. TfR1 je receptorový protein, který v sobě má vysokoafinitní receptor pro transferin nesoucí dva atomy trojmocného železa (diferrický transferin) a je tvořen homodimerickým proteinem, který je stabilizován disulfidovými vazbami. Diferrický transferin se váže na TfR1 a poté je internalizován endocytózou závislou na klathrinu, tato vazba je závislá na pH. Železo vázané na transferin je uvolňováno při okyselení endosomu. V něm se železo po redukcí na dvojmocné disociuje od transferinu za pomoci šestimembránového epiteliálního antigenu prostaty (STEAP) a je exportováno do cytosolu/endosomu prostřednictvím DMT1. TfR1 je poté recyklováno zpět na povrch buňky. Železo se v tom okamžiku dostane do přechodné zásobárny železa a odtud je buď přímo využito a začleněno do hemu, nebo uloženo v cytosolickém ferritinu. Zajímavostí je, že intracelulární železo je obecně přítomno ve formě dvojmocné, zatímco extracelulární železo ve formě trojmocné. To nejspíše odráží a udržuje fyziologickou integritu buněk (Obr. 6) [34; 40; 41].



Obr. 6 – Distribuce a cirkulace železa (DCYTB – železo redukující duodenální cytochrom B, DMT1 – transportér dvojmocných kovů 1, Hp – hepaistin, FPN – ferroportin, STEAP3 – šestimembránový epiteliální antigen prostaty 3, Tf – transferin, TfR1 – transferinový receptor 1, Fe²⁺ - dvojmocné železo) [34]

Ferritin je protein složený z 24 podjednotek, které obsahují těžké (H) a lehké (L) řetězce. Sestava těchto podjednotek tak umožňuje proteinu vázat až 4500 atomů železa, a to je důvod, proč je hlavním zásobním proteinem železa v buňkách. Podjednotky vytvářejí komplex tvaru klece, který váže a uchovává ionty trojmocného železa v inertní formě, což omezuje vznik škodlivých redoxně reaktivních forem. Železo navázané na ferritinu je hlavní formou skladování železa v makrofázích a jaterních buňkách. Uvolňování železa z ferritinu je regulováno procesem feritinofágie, kdy se koaktivátor jaderného receptoru 4 přímo váže na lehký řetězec ferritinu a přenáší komplex do autolysosomu k degradaci. Během tohoto procesu se uvolní železo a stává se tak dostupným pro biosyntetické dráhy [34; 42; 43].

3.2 Regulace metabolismu železa

Lidský organismus má řadu mechanismů, kterými je schopný udržovat hladinu železa v homeostáze. Patří mezi ně řízené vstřebávání, recyklace a ukládání železa. Jelikož neexistuje žádný aktivní způsob vylučování železa z organismu, je nutné denně vstřebat přibližně 1 mg železa ze stravy. To vyrovnává nespecifické ztráty železa prostřednictvím krvácení, pocením a odlučováním epitelových buněk. Když je potřeba více železa, organismus zvýší jeho duodenální absorpci a uvolňování z makrofágů a ze zásobních buněk a bílkovin. V opačném případě, když je organismus železem přetížen, je absorpce v duodenu inhibována a skladování v zásobních bílkovinách zvýšeno, aby se zabránilo toxickým účinkům nadbytku volného železa. Každý krok potřebný k udržení homeostázy železa je přísně regulován na systémové i buněčné úrovni [37].

Hlavním regulátorem homeostázy železa je peptidový hormon hepcidin, který je exprimován především v játrech, ale exprimují ho i makrofágy, beta buňky pankreatu, ledviny, adipocyty a plíce. Expresi hepcidinu je regulována několika fyziologickými podmínkami: systémovou hladinou železa, hypoxií, anémií, erytropoézou, infekcí nebo zánětem. Hepcidin je exprimován z genu antimikrobiálního peptidu hepcidinu (HAMP), který se nachází na dlouhém raménku 19. chromozomu. Ze začátku je syntetizován jako biologicky neaktivní pre-proprotein, který se skládá ze signálního peptidu, pro-oblasti a plně aktivní sekvence. Jeho zrání nastává v buňce a probíhá proteolytickým štěpením zprostředkovaným prohormonální konvertázou furinem. Působení hepcidinu spočívá ve spouštění internalizace FPN1, která vyvolá rychlou ubikvitinaci, a jeho následnou degradaci. Zatímco přetížení železem, infekce a zánět expresi HAMP zvyšují, nedostatek železa, hypoxie, anémie a erytropoéza působí opačně [33; 37; 42].

Hepcidin moduluje systémový metabolismus železa v séru a řídí saturaci transferinu tím, že inhibuje uvolňování železa z duodenálních enterocytů, makrofágů, hepatocytů a dalších buněk skladujících železo. Hepcidin tedy reguluje vyplavování železa tím, že se naváže na exportér železa FPN1 a spouští jeho internalizaci a degradaci v lysosomech. Tento mechanismus usnadňuje Janusova kináza 2, která se váže na komplex ferroportin-hepcidin, fosforyluje ferroportin a cíleně ho degraduje [42; 44].

Exprese hepcidinu játry je primárně ovlivňována transkripčními mechanismy rodiny transkripčních faktorů kostního morfogenetického proteinu (BMP) a dalšími signálními složkami, které jsou členy rodiny ligandů transformující růstový faktor- β . Hlavním regulátorem hepcidinu je BMP6, který se zvyšuje v závislosti na jaterních zásobách železa. BMP se váže na svůj receptor (BMP-R) a ko-receptor hemojuvelin (HJV), což je protein vázaný na glykosylfosfatidylinositol. Interakcí dochází k indukované fosforylaci proteinů R-SMAD a následné tvorbě aktivních transkripčních komplexů za účasti ko-regulátoru SMAD4, které se navazují na BMP v promotoru hepcidinu [34; 42].

Mezi další regulátory hepcidinu se řadí proteiny hemochromatózy (HFE), které působí jako přepínač mezi dvěma senzory holotransferinu, TfR1 a TfR2. Při vysokých koncentracích holotransferinu vytěsňují HFE z TfR1 a umožňují interakci HFE s TfR2. Komplex HFE/TfR2 pak podporuje transkripci hepcidinu neznámým mechanismem [34; 42].

3.3 Intracelulární železo

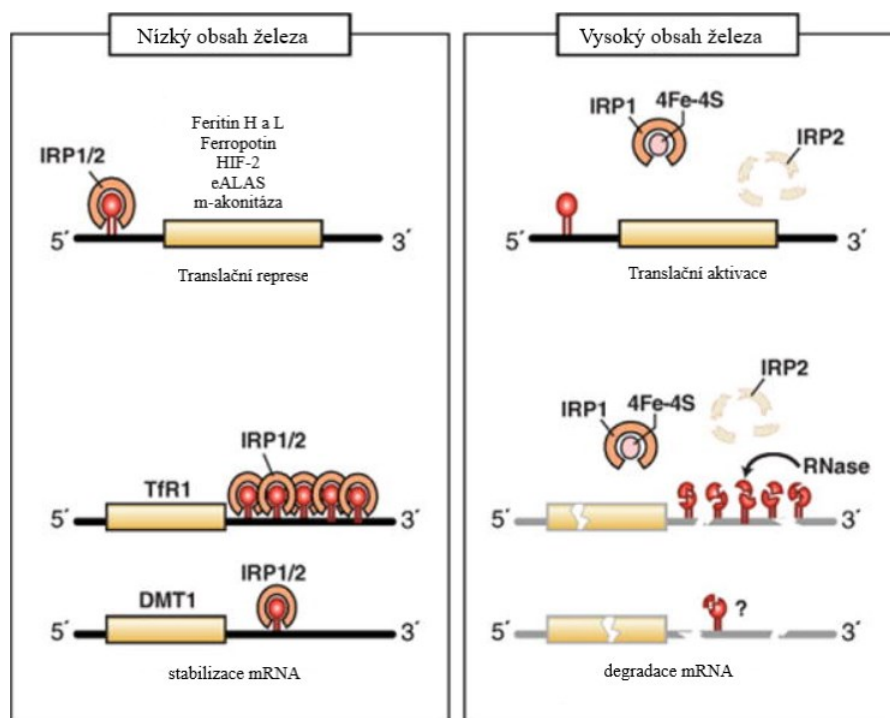
Volné železo může být pro organismus toxické, protože přispívá k tvorbě hydroxylového radikálu prostřednictvím Fentonovy reakce. Proto se musí intracelulární železo udržovat stejně pečlivě jako systémové železo. Regulační mechanismus koordinující příjem, využití, skladování a vylučování intracelulárního železa je soustředěn na regulační proteiny železa (IRP) a využívá prvky reagující na železo (IRE) [42].

Buňky získávají železo hlavně prostřednictvím transferinového receptoru 1. Po navázání Holo-Tf na TfR1 je železo vázáno na transferin a vychytáváno receptorem zprostředkovaným endocytózou do acidifikovaných endosomů. Dochází k redukci trojmocného železa na dvojmocné transmembránovou rodinou metaloreduktáz, STEAP. Transportér dvojmocného kovu 1, pak usnadňuje transport dvojmocného železa z endosomů do cytoplazmy. V buňkách jako jsou enterocyty, se DMT1 nachází také na buněčném povrchu a podílí se částečně i na transportu extracelulárního železa. Po výstupu železa

z endosomu se stává jakousi „labilní zásobou železa“ (LIP), tedy cytosolickou zásobou slabě vázaného železa, která je k dispozici pro různé interakce s jinými molekulami [42].

Některé buňky, jako například makrofágy, získávají hem nepřímo fagocytováním erytrocytů a katabolizací hemu za účelem uvolňování železa. Hepatocyty mají více mechanismů, jak do nich vstupuje železo, včetně TfR2, možného transportéru pro železo nevázaného na transferin (NTBI) a transportéru zinku Zip14. Ferroportin, umístěný na plasmatické membráně, je exprimován širokou škálou typů lidských tkání a je považován za jediného exportéra železa. Vyžaduje koordinované úsilí ferroxidáz (ceruloplasminu a/nebo hefestinu), aby napomáhaly oxidaci železa a naložení na transferin. Dvojmocné železo, které není exportováno nebo využito, se ukládá do feritinu, cytosolického proteinu, jehož hlavní funkcí je oxidovat a izolovat nadbytečné dvojmocné železo do ferrihydritového jádra [42].

Intracelulární homeostáza železa je regulována regulačními proteiny železa IRP1 a IRP2 v reakci na měnící se hladiny železa. IRP1 a IRP2 uplatňují své účinky při navázání na železo reagující prvky, cis-regulační vláskové struktury, které jsou přítomny v nepřekládaných oblastech (UTR) mRNA zapojených do metabolismu železa. mRNA kódující feritin, ferroportin, mitochondriální akonitázu a hypoxií indukovatelný faktor 2 α obsahují ve svých 5'UTR jediný IRE (Obr. 7) [34; 42].



Obr. 7 – Regulace intracelulárního železa regulačními proteiny (IRP – železo regulující protein, IRE – prvky reagující na železo, TfR1/2 – transferinový receptor 1/2, HIF – faktor indukovaný hypoxií, DMT1 – transportér dvojmocných kovů 1, RNase – Rnáza) [44; upraveno]

Když je hladina intracelulárního železa nízká, váží se regulační proteiny železa na IRE s vysokou afinitou. Translace proteinů souvisejících se železem je závislá na umístění IRE na UTR. IRE mohou být přítomny buď na 3' UTR, nebo 5' UTR cílové mRNA. Vazba IRP na 5' UTR IRE potlačuje translaci feritinu a feroportinu, zatímco vazba na 3' UTR IRE vede ke stabilizaci mRNA importu železa TfR1 a tím dojde ke zvýšení hladiny cytoplazmyckého železa. Naopak v buňkách přesycených železem se regulační účinek IRP zastaví, neváže se na IRE umístěné na 5' UTR, IRP2 je cílená na degradaci a IRP1 získává kompletní železo-sirný shluk, který brání vazbě IRE. Transkripty, které mají IRE na 3' UTR, projdou štěpením endonukleázy, což povede k následné degradaci štěpných produktů [34; 42].

3.4 Transferin

Železo je na transferin navázáno endocytózou prostřednictvím transferinového receptoru. TfR2, další receptor pro transferin, je exprimován převážně v hepatocytech a erytroidních prekurzorech a Holo-Tf dramaticky zvyšuje jeho expresi. TfR2 tvoří komplex s proteinem hemochromatózy a slouží jako součást systému sledujícího množství železa v hepatocytech. Vady TfR2 způsobují systémové přetížení železem neboli hemochromatózu prostřednictvím nižší regulace hepcidinu. V erytroidních buňkách tvoří TfR2 komplex s erytropoetinovým receptorem a reguluje erytropoézu. TfR2 usnadňuje transport železa z lyzozomů do mitochondrií v erytroblastech [40; 45].

Transferin je glykoprotein, který se skládá z jednoho polypeptidového řetězce obsahujícího zbytky aminokyselin a dvou N-vázaných komplexních glykanových řetězců. Molekulu transferinu lze rozdělit na dvě homologní domény, N-terminální doménu a C-terminální doménu s podíly sacharidů, které jsou spojeny krátkou spojovací oblastí. Transferin je produkován převážně játry a v malém množství i v mozku. Každá molekula transferinu má schopnost vázat jeden kovový iont, jako je železo, hliník, zinek nebo kadmium, s různými afinitami, avšak železo je vázáno značně silněji a je schopné vytlačit jiné kovy z vazby. Jedna molekula transferinu naváže tedy dva železité ionty. Interakce mezi trojmocným železem a transferinem je závislá na pH prostředí. Trojmocné železo se účinně naváže na transferin při pH 7,4 a disociuje se od transferinu při kyselém pH, jaké se vyskytuje v endosomech [40; 46].

Koncentrace transferinu v séru je přibližně 200–300 mg/dl a snižuje se v souvislosti s jaterní dysfunkcí nebo zánětem. Většina železa v séru je navázaná na transferin, ale může se nacházet i jako transferin s nenavázaným železem (apo-Tf) v monofेरických nebo diferických formách. Saturace transferinu (TSAT) se vypočítá vydělením koncentrace železa v séru celkovou kapacitou vazby železa, ta odráží koncentraci transferinu v séru. TSAT nižší než 20 % značí nedostatek železa, zatímco TSAT nad 50 % ukazuje na přetížení železem. Když TSAT překročí 80–85 %, objeví se v séru železo nevázané na transferin (NTBI), které je vysoce toxické, a způsobí poškození orgánů [40; 47].

Primární funkcí plasmatického transferinu je působit jako přenašeč železa v plazmě i intersticiálních tekutinách těla. Transferin akceptuje molekulu železa uvolněnou z buněk a transportuje ji do jiných buněk, kde je železo zprostředkovanými procesy převzato transferinovými receptory. Dvě vedlejší funkce transferinu jsou působit jako růstový faktor či jako bakteriostatická látka. Bylo prokázáno, že transferin je nezbytný pro buněčný růst a vývoj, tuto funkci lze však připsat schopnosti bílkoviny působit jako dárce železa. Antibakteriální funkce transferinu jsou závislé na jeho schopnosti vázat železo, které slouží k ochuzení mikroorganismů o železo [47].

Hlavním místem syntézy transferinu jsou hepatocyty. Další buňky, u nichž je prokázáno, že konstitutivně produkují transferin, jsou Sertoliho buňky, endoteliální buňky mozkových kapilár a oligodendroglialní buňky v mozku. Při kojení je z kvantitativního hlediska důležitým zdrojem transferinu také prsní žláza. Transferin je také syntetizován různými embryonálními a extraembryonálními buňkami [46].

Koncentrace sérového transferinu je regulována komplexní souhrou faktorů. Zvýšenou syntézu lze realizovat na transkripční i translační úrovni. Koncentrace transferinu v lidském séru se zvyšuje během anémie z nedostatku železa a těhotenství a snižuje se u hemochromatózy. Bylo prokázáno, že steroidní hormony a nutriční nedostatek železa stimulují syntézu transferinové-mRNA. Katabolismus sérového transferinu se během nedostatku železa nemění. Přetížení železem neovlivňuje transkripci genu transferinu [46].

3.5 Transferinový receptor 1

Železo vázané na transferinu se dostává do buněk, které jej potřebují, zprostředkovaným mechanismem TfR1. TfR1 je membránový protein, který je v buněčné membráně exprimován jako homodimer. Na povrchu buňky se Holo-Tf váže na TfR1, což iniciuje internalizaci komplexu klathrinu zprostředkovanou endocytózou. Interakce mezi TfR1 a transferinem je závislá na pH. Při pH 7,4 se TfR1 váže na Holo-Tf nasycený železem, ale neváže se na apo-Tf bez železa. A naopak při nižším pH v endosomu se TfR1 váže na apo-Tf, ale neváže se na Holo-Tf. V kyselém prostředí v endosomu dochází k disociaci trojmocného železa z transferinu. Trojmocné železo je přeměněno na dvojmocné metaloreduktázami, jako je šestimembránový epiteliální antigen prostaty 3, a poté je transportováno do cytosolu transportérem DMT1. Komplex Transferin/TfR1 v endosomu je poté transportován na povrch buňky v recyklačním endosomu a na povrchu buňky je apo-Tf uvolněn do krevního oběhu. Buňky tedy účinně inkorporují sérové železo prostřednictvím systému Transferin/TfR1 a jak TfR1, tak transferin jsou po tomto procesu znovu použity a fungují v dalším cyklu buněčného příjmu železa [40; 45; 47; 48].

Jelikož je transferin za normálních okolností v těle ve velkém nadbytku a většinou nenasyčený, může na sebe tedy navázat zvýšené množství železa v oběhu, ať už se jedná o železo vstřebané ve střevech nebo uvolněné z retikuloendoteliálních buněk. Vazba trojmocného železa na transferin proto umožňuje jeho bezpečnou distribuci do míst použití a zároveň zabraňuje vzniku toxických reaktivních forem kyslíku. TfR1 může vázat a internalizovat feritin, za fyziologických podmínek je příjem železa vázaného na transferinu prostřednictvím TfR1 hlavním zdrojem železa pro většinu buněk. Oproti tomu k příjmu železa nevázaného na transferin dochází pouze tehdy, když je překročena vazebná kapacita transferinu a vzniká zásoba cirkulujícího železa nevázaného na transferin (NTBI). TfR1 tvoří homodimer, který může na každé ze svých podjednotek vázat jednu molekulu transferinu [45; 49].

Vazebná místa pro železo sérového transferinu mají společnou strukturu, v níž je železo jako trojmocné koordinováno s postranními řetězci čtyř aminokyselinových zbytků, a to kyseliny asparagové, histidinu a dvou tyrosinových zbytků. Koordinace je doplněna uhličitanovým aniontem, který se váže bidentátním způsobem. Po navázání železa a synergického uhličitanového aniontu na transferin dochází ke snížení izoelektrického bodu proteinů. U zdravých jedinců je u transferinu obsazeno pouze 25-40 % vazebných míst pro železo, ačkoliv v případech primárního a sekundárního přetížení železem, které vzniká

například v důsledku genetické hemochromatózy, může dojít k úplnému nasycení transferinu železem a v krevní plazmě bude přítomno železo nevázané na transferin [48; 50].

Krystalová struktura komplexu TfR1-transferin a komplex tvořený TfR1 a proteinem hemochromatózy, HFE, ukázala částečné překrytí vazebných míst HFE a transferinu na TfR1, což vysvětluje úlohu HFE v detekci železa. V hepatocytech TfR1 omezuje signalizaci železa tím, že sekvestruje HFE a tím brání jeho interakci s transferinovým receptorem 2. Dojde tak ke zrušení signalizace vedoucí k syntéze hepcidinu vyvolané interakcí komplexu TfR2-HFE [49; 50].

3.6 Regulace TfR1

Za normálních podmínek je pouze 20-30 % transferinu v diferrické formě, kterou TfR1 přijímá s vysokou afinitou, ale jeho koncentrace je stále z velké části nad disociační (vazebnou) konstantou. Proto jeho interakce s TfR1 neomezuje transferin. Internalizace železa vázaného na transferin TfR1 je vysoce regulovaná omezující rychlostí vstupu železa do většiny buněk a buňky jsou tak schopny přesně kontrolovat množství železa vázaného na transferin, které získávají modulací syntézy TfR1. Exprese TfR1 je mírně regulována na více úrovních a pomocí odlišných stimulů: na posttranskripční úrovni je regulována především regulačními proteiny železa, IRP1 a IRP2. Tyto cytoplazmické proteiny, které se vážou na specifické struktury RNA zvané prvky reagující na železo, přítomné v nepřekládaných oblastech mRNA několika proteinů metabolismu železa, se vážou na pět kopií IRE ve 3' UTR TfR1 mRNA [48; 49; 51].

Aktivita regulačních proteinů železa je indukována buněčnou deprivací železa a je potlačována vyčerpáváním železa. Při nízkých hladinách buněčného železa chrání vazba IRP transkript TfR1 před působením degradujících nukleáz, což vede ke zvýšení hladiny proteinu TfR1 a následnému vychytávání železa. Důsledek vazby IRP závisí na poloze IRE, tedy v případě železa skladujících proteinů feritinu a feroportinu, jejichž IRE jsou součástí 5' UTR, vazba IRP blokuje převod proteinů prostřednictvím zasahování do ribozomové vazby. Tento mechanismus umožňuje buňce velice jemně regulovat skladování, vychytávání a uvolňování železa, a tím udržovat optimální hladinu intracelulárního železa [48; 49].

3.7 TfR1 a erytropoéza

Erytroidní prekurzory, které spotřebovávají většinu železa v těle, získávají vysoké množství železa potřebného pro syntézu a proliferaci hemoglobinu internalizací diferrického transferinu. Proto konstitutivně exprimují TfR1 ve velmi vysokých hladinách a mohou dále zvýšit expresi TfR1 v reakci na nedostatek železa a zvýšenou erytropoézu. Erytroidní diferenciace je doprovázena postupně se snižující expresí TfR1, souběžně s klesající syntézou hemu. Nakonec se během zrání retikulocytů zbývající molekuly TfR1 proteolyticky štěpí a extracelulární doména dává vzniknout rozpustnému TfR1 (sTfR1) cirkulujícímu v plazmě, jehož koncentrace přísně koreluje s rychlostí erytropoézy, hmotností červených krvinek a potřebou železa [49].

3.8 Transferinový receptor 2

Transferinový receptor 2, gen detekující transferin vázaný na železo, transkripčně aktivuje hepcidin v játrech. Částečně neznámý mechanismus zahrnuje modulaci signální dráhy kostního morfogenetického BMP-SMAD. TfR2 je senzorem cirkulujícího železa také v erytroidních buňkách, kde váže receptor pro erythropoetin a inhibuje aktivaci signalizace EPO-EPOR. TfR2 vyrovnává produkci erytrocytů se systémovou homeostázou železa v závislosti na hladinách cirkulujícího železa. Nedostatek TfR2 na povrchu erytroblastů, bez ohledu na to, jakým způsobem je toho dosaženo, zvyšuje citlivost k EPO i expresi erytroferronu, ERFE. TfR2 tak propojuje erytropoézu s regulací hepcidinu prostřednictvím hladiny transferinem vázaného železa a moduluje odpověď EPO, aby přizpůsobil erytropoézu podle dostupného železa. Zároveň koordinuje požadavky na železo prostřednictvím uvolňování ERFE. Při zvýšení saturace transferinu dochází k jeho stabilizaci na plasmatické membráně jak u hepatocytů, čímž se aktivuje hepcidin, tak erytroblastů. Při poklesu saturace transferinu se TfR2 vylučuje z plasmatické membrány a/nebo se degraduje v lysosomech a zvyšuje absorpci železa i erytropoézu, aby se zabránilo anémii [52; 53].

4. REGULACE ERYTROPOÉZY ŽELEZEM

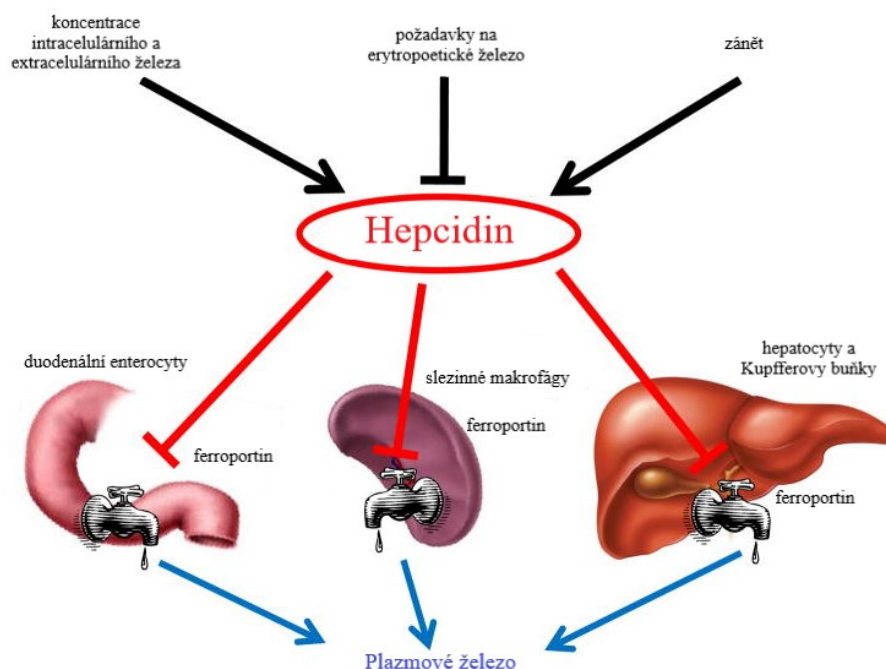
Proces erythropoézy zahrnuje tvorbu zralých erytrocytů z multipotentních kmenových buněk a dá se rozdělit do dvou fází. První fáze související s proliferací a zráním progenitorů BFU-E a CFU-E je závislá na erythropoetinu a druhá fáze procesu diferenciaci z proerytoblastů na erytrocyty je postupně méně citlivá na erythropoetin, ale je silně závislá na železe. Železo je nezbytné pro syntézu hemu a Fe-S klastrů v každé buňce organismu, ale ve větším množství je nutné pro syntézu hemoglobinu ve zralých erytoblastech. Aby se denně vytvořilo přibližně 200 miliard erytrocytů, musí být do kostní dřeně dodáno přibližně 25 mg železa. Převážnou většinu dodávají makrofágy, které recyklují železo pocházející z hemoglobinu z rozpadlých erytrocytů. Zásadní úloha železa je zřejmá vzhledem k tomu, že nedostatek železa nebo mutace v genech kódujících proteiny železa vedou k různým formám anémie [52; 54].

Železo je transportováno do oběhu transferinem a uvolňováno do erytoblastů interakcí di-ferrického transferinu s transferinovým receptorem. Různé transportéry mohou vychytávat železo podle typu buňky, přičemž nejčastější cestou je známý endosomální cyklus transferin-TFR1. Tento cyklus je nepostradatelný pro erythropoézu, protože erytoblasty nemají alternativní cesty pro import železa, na rozdíl od hepatocytů nebo buněk slinivky břišní, které mohou vychytávat i železo nevázané na transferin (NTBI) prostřednictvím ZIP14, nebo kardiomyocytů, které vychytávají NTBI pomocí dosud neznámých transportérů [52].

Železo ovlivňuje erythropoézu tím, že přispívá k regulaci tvorby EPO v ledvinách, a to prostřednictvím koordinované funkce IRP1 a hypoxií indukovaného faktoru 2–alfa, HIF–2–alfa. V ledvinách je IRP1 nejaktivnější forma, zatímco IRP2 nefunguje. IRP1 se váže na 5' IRE ledviny HIF–2–alfa v případě nedostatku železa, čímž omezuje translaci HIF a částečně potlačuje expresi erythropoetinu. Protein HIF–2–alfa je stabilní a méně se degraduje v hypoxii enzymem závislým na železe prolyl-hydroxylázou. Tato regulace je příkladem komplexní komunikace mezi železem a kyslíkem a jejich koordinace je nepostradatelná, protože cílem erythropoézy je produkce erytrocytů pro transport kyslíku [52; 54].

4.1 Homeostáza železa

Homeostáza železa a erythropoéza jsou propojeny. Na jedné straně je železo nezbytné pro konečnou erythropoézu při tvorbě hemoglobinu, na druhé straně erythropoéza může zvýšit vstřebávání železa tvorbou erytoferronu, erytroidního hormonu, který potlačuje expresi hepcidinu. Produkce erythropoetinu je ovlivňována železem prostřednictvím IRE, které kontrolují hypoxií indukovaný faktor 2–alfa. Druhý transferinový receptor, senzor železa, který se nachází v játrech i v erytroidních buňkách, moduluje citlivost erythropoetinu a je další vazbou mezi hepcidinem a erythropoézou. Když je erythropoetin snížen v nedostatku železa, je citlivost na erythropoetin zvýšena, protože druhý transferinový receptor je odstraněn z povrchu buněk. Nepřiměřená rovnováha mezi erythropoézou a železem/hepcidinem může vést k anémii, jako je tomu v případě nedostatku železa, nevhodného vychytávání železa nebo subnormální recyklace. Vadná kontrola tvorby hepcidinu může způsobit nedostatek železa, jako u recesivní poruchy anémie z nedostatku železa nebo přetížení organismu železem, které se vyznačují nadměrnou, ale neúčinnou erythropoézou (Obr. 8) [54].



Obr. 8 – Role hepcidinu v homeostáze železa [56; upraveno]

Železo je nezbytným stopovým prvkem pro téměř všechny živé organismy. Schopnost železa darovat nebo přijímat elektron v buněčném a extracelulárním prostředí z něj dělá univerzální katalytickou složku řady enzymů zapojených do bioreakcí produkujících energii a kritických biosyntetických drah. Železo se podílí na koordinaci kyslíku

v hemoglobinu i myoglobinu, v molekulách podílejících se na transportu kyslíku a jeho skladování v buňkách. V biologických systémech plní železo svou funkci ve spojení se třemi běžnými typy molekul: železo koordinované postranními řetězci proteinů, železo komplexované v porfyrinovém kruhu hemu a železo v klastrech železa a síry [55; 56].

Systémová homeostáza železa je udržována regulací střevní absorpce železa, koncentrace železa v krevní plazmě a extracelulární tekutině, distribucí železa mezi orgány a tkáněmi a množstvím železa uloženého v zásobách. Dyshomeostáza železa se může projevit jako celkový tělesný deficit, nadbytek železa a také jako špatná distribuce železa mezi tkáněmi. Tyto poruchy železa mohou být způsobeny genetickými změnami, které přímo narušují regulaci železa, nebo stavy, které ovlivňují regulaci železa nepřímo. Ovlivňují ji především kompartmenty jako červené krvinky a jejich prekurzory v erytropoetických orgánech, zásobárny v hepatocytech jater a makrofázích sleziny a jater, krevní plasma, která přenáší železo mezi tkáněmi a orgány, či absorpční enterocyty ve dvanáctníku, kterými se železo dostává do organismu, aby obvykle nahradilo malé ztráty způsobené vylučováním buněk obsahujících železo [55; 56].

4.2 Hepcidin

Hepcidin je hlavním faktorem, který hraje významnou roli v homeostáze železa a v systémové regulaci železa v metabolismu. Hepcidin degraduje ferroportin, jehož funkcí je čerpat železo z buněk, a tím zamezí vstupu železa do plazmy z absorpčních duodenálních buněk a makrofágů recyklujících železo. Gen kódující hepcidin HAMP se nachází na chromozomu 19q13. Jedná se o peptid syntetizovaný především játry, přičemž jeho nízká exprese je na více místech včetně mozku, míchy, plic, srdce, kosterních svalů, střeva, žaludku, slinivky břišní, varlat, adipocytů a makrofágů [57].

Syntéza hepcidinu je regulována různými faktory, jako například zánětem, zásobami železa v těle, hypoxií a erytropoézou, zatímco jeho uvolňování do periferní krve je zajišťováno různými proteiny, včetně hemojuvelinu, proteinu hereditární hemochromatózy či transferinového receptoru 2. Posttranslační zpracování hepcidinu je zprostředkováváno jaterní prohormonální konvertázou zvanou furin. Vzniká větší prekurzorový protein, pro-hepcidin, který prochází dvěma štěpeními a je následně rychle vyloučen z buňky. Bioaktivní a převažující formou hepcidinu je dlouhý peptid obsahující čtyři disulfidové vazby. Další dvě formy, hepcidin-22 a hepcidin-20, mají dva zkrácené aminoterminály a jsou biologicky méně aktivní [57; 58].

Regulace hepcidinu je soustředěná na receptory BMP, včetně signální dráhy a jeho doplňkového proteinu-6 z endoteliálních buněk jaterních sinusoid. Signalizace SMAD je regulována kotevními molekulami SMAD, jako je endofin. Tyto kotevní molekuly na vnitřní membráně hepatocytů stabilizují SMAD, který je následně fosforylován komplexem receptorů BMP 1 a 2. BMP se vážou na své příslušné receptory a vedou k fosforylaci cytoplasmatických SMAD1/SMAD5/SMAD8, které interagují se společným mediátorem SMAD4 a přemísťují se do jádra, kde působí jako transkripční faktory a modulují transkripci hepcidinu [57; 59].

Indukce hepcidinu je také regulována infekcí a zánětem díky uvolňování prozánětlivých cytokinů, jako jsou IL-6, IL-1 β , IL-22 a aktivin-B. IL-6 uvolňovaný makrofágy interaguje s receptorem Janusovy kinázy, který indukuje intracelulární STAT dráhu a reguluje hladinu hepcidinu. IL-1 β zvyšuje produkci hepcidinu prostřednictvím indukce exprese C/EBP δ v hepatocytech. Další cytokin, IL-22, se uplatňuje jako pozitivní regulátor hepcidinu prostřednictvím aktivace dráhy JAK/STAT3. Naopak aktivin-B stimuluje expresi hepcidinu prostřednictvím indukce dráhy BMP receptor typu I-SMAD1/5/8 [57; 60].

Za hypoxických podmínek se zvyšuje potřeba kyslíku, což vede k utlumení exprese hepcidinu. Dochází k tomu prostřednictvím různých mechanismů, které zahrnují transkripční faktory nazývané hypoxií indukovaný faktor. Během erythropoézy se zvyšuje hladina EPO indukovanou HIF, který následně zvyšuje expresi hormonu erytroferonu, což vede k inhibici hepcidinu [57].

4.3 Ferroportin

Vstřebávání a tkáňová distribuce železa je řízena především interakcí jaterního hormonu hepcidinu s ferroportinem. Ferroportin je exprimován ve tkáních, jež ukládají a přenášejí železo, a funguje jako receptor pro hepcidin a zároveň jako jediný známý buněčný exportér elementárního železa v mnohobuněčných organismech [55, 61].

Ferroportin je lidský protein, který se strukturně skládá ze dvou svazků 6-transmembránových šroubovic spojených cytoplasmatickou smyčkou, přičemž C- i N-konec se nachází v cytoplasmě. Tyto dva helixové svazky uzavírají dutinu, kterou železo pravděpodobně opouští buňku. Tvar a kompletnější charakteristiky naznačují, že ferroportin exportuje buněčné železo mechanismem střídavého přístupu, kdy ferroportin střídá

konformaci otevřenou dovnitř, která váže intracelulární železo, a konformaci otevřenou ven, která uvolňuje železo do extracelulárního prostoru [55, 62].

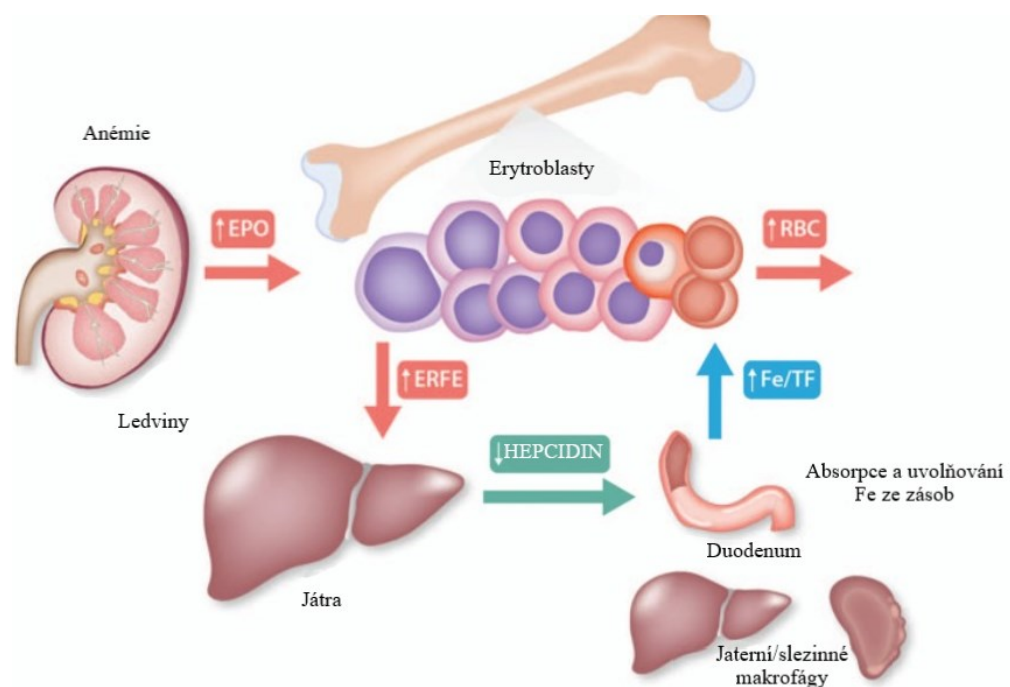
Ferroportin obsahuje dvě místa pro vazbu dvojmocných kovů, jedno v každém laloku, směřující do vnitřní dutiny ferroportinu. Způsob, jakým vazebná místa zprostředkovávají export železa, není zcela jasný. Místo v N laloku má schopnost vázat vápník, který může mít modulační úlohu při transportu železa. Přestože vápník není transportován ferroportinem, je podstatný pro jeho transportní aktivitu. Váže se přímo na ferroportin a usnadňuje konformační změny. Cytoplasmatické železo určené k exportu se dostává k ferroportinu prostřednictvím cytoplasmatického chaperonu železa jako komplex železnatého iontu s redukováným glutathionem [55, 63; 64].

Tok železa z buněk je řízen hepcidinem dvěma známými mechanismy, a to okluzí otevřené konformace ferroportinu směrem ven hepcidinem a hepcidinem indukovanou endocytózou a degradací ferroportinu. Hepcidinová regulace ferroportinu endocytickým mechanismem se podobá obecné ligandem indukované endocytóze receptoru. Vyžaduje hepcidinem indukovanou konformační změnu ferroportinu, která spouští ubikvitinaci cytoplasmatického segmentu bohatého na lyzin spojujícího dvě 6-šroubovicové domény ferroportinu. Ubikvitinovaný ferroportin je pak cíleně odváděn do lysosomů a proteazomů k degradaci [61; 65].

Hepcidin se váže na C část molekuly ferroportinu, přičemž vysoce variabilní hepcidinová smyčka je z velké části extracelulární. Relativně konzervované C- a N-konce hepcidinu jsou hluboko zabudované v centrální dutině. Vazebné místo hepcidinu v C-laloku, soustředěné na thiolovém cysteinu C325, využívá ke koordinaci vazby hepcidinu atom železa. Není zcela jasný příspěvek k fyziologii hepcidinu, ale dle předpokladů tento mechanismus zajišťuje selektivitu vazby hepcidinu na molekuly ferroportinu aktivně transportující železo na rozdíl od těch, které mohou být v klidovém stavu [66; 67].

4.4 Erytroferon

Erytroferron je hlavním erytroidním regulátorem hepcidinu, homeostatického hormonu, který řídí hladinu železa v plazmě a celkové množství železa v těle. Při uvolňování erythropoetinu z ledvin dochází ke stimulaci tvorby nových erytrocytů a dochází také ke zvýšení syntézy ERFE v erytroblastech kostní dřeně. Zvýšený ERFE pak potlačuje syntézu hepcidinu, čímž mobilizuje buněčné zásoby železa pro využití při syntéze hemu a hemoglobinu. ERFE potlačuje transkripci hepcidinu inhibicí signalizace kostního morfogenetického proteinu v hepatocytech. Při neúčinné erytropoéze dochází k patologické nadprodukci ERFE rozšířenou populací erytroblastů, tím je potlačen hepcidin a dochází k přetížení železem. ERFE může být užitečným biomarkerem neefektivní erytropoézy a atraktivním cílem pro léčbu jejích systémových účinků (Obr. 9) [68; 69].



Obr. 9 – Erytroferron a systémová homeostáza železa (EPO – erythropoetin, ERFE – erytroferron, RBC – červené krvinky, Tf – transferin, Fe – železo) [70; upraveno]

ERFE má čtyřdoménovou strukturu s jedinečným N-koncem a významnou sekvenční homologií na C-konci. Globulární C-koncová doména se skládá do vysoce strukturované hlavy TNF/C1q, zatímco N-konec molekuly má prodlouženou a flexibilní sekundární strukturu. Při vysokých plasmatických koncentracích železa a vysokých jaterních zásobách železa je syntéza hepcidinu indukována aktivací kostního morfogenetického proteinu cestou SMAD1/5/8. Protože erytroferron působí na potlačení hepcidinu v reakci na zvýšenou potřebu erytropoézy, je hlavním kandidátem na podobnou roli v podmínkách dysfunkční erytropoézy spojené s přetížením železem [68; 70].

Regulace exprese hepatocytárního hepcidinu je transkripční a reaguje na stav železa prostřednictvím snímání nejméně dvou vstupů hepatocytů: na železe závislé sekrece kostních morfogenetických proteinů a koncentrace plasmatického holotransferinu. Zdrojem reagujících na železo jsou sousední jaterní sinusoidální endotelové buňky. V hepatocytech aktivují BMP ze sinusoidálních endoteliálních buněk spolu s holotransferinem snímaným transferinovými receptory 1 a 2 a přidruženým proteinem hemochromatózy dráhy, které se sbíhají k fosforylaci SMAD, konkrétně SMAD1/5/8, které tvoří komplexy se SMAD4. Komplexy SMAD působí jako transkripční faktory a interagují s elementy reagujícími na BMP v promotoru hepcidinu, čímž stimulují transkripci hepcidinu [70; 71; 72].

Signalizace ERFE probíhá prostřednictvím signální dráhy SMAD. Různé proteiny, o nichž je známo, že regulují signalizaci SMAD, lze považovat za logické kandidáty na dosud neidentifikovaný receptor ERFE nebo jiné modifikátory signalizace ERFE. Gen *TMPRSS6* kóduje proteinovou transmembránovou proteázu serin 6, známou také jako matriptáza 2, serinovou proteázu, která se podílí na regulaci exprese hepcidinu [70; 73].

4.5 Vzájemná interakce železa, kyslíku a erythropoézy

Syntéza hemoglobinu v erytroblastech vyžaduje velké množství železa, což je důvodem pro regulaci dostupnosti železa zprostředkovanou erythropoézou. Stimulovaná erythropoéza je například odpověď na krvácení, hypoxii nebo podání exogenního EPO, které vede ke zvýšené absorpci železa. Bylo prokázáno, že erytroidní regulátory silně ovlivňují homeostázu železa [74].

Osa hepcidin-ferroportin se prolíná s dalšími biologickými systémy. Absorpce železa je fyziologickým příkladem vzájemného ovlivňování IRP-hypoxie a osy hepcidin-ferroportin. V hypoxickém prostředí duodena řídí IRP1 translaci hypoxií indukovaného faktoru 2 α , který je stabilizovaný prolyl-hydroxylázou a reguluje expresi apikálních a bazolaterálních enterocytárních transportérů železa, jako je ferroportin. Při nedostatku železa je absorpce zvýšena snížením hladiny hepcidinu, který ve prospěch exportu vyčerpá železo z enterocytů, což dále stabilizuje HIF-2 α 63. Při nadbytku železa zvyšuje vysoká hladina hepcidinu množství železa v enterocytech a zhoršuje lumenální absorpci [75; 76; 77].

Železo a erytropoéza jsou propojeny na mnoha úrovních a jsou vzájemně regulovány. Železo ovlivňuje renální produkci erythropoetinu, růstového faktoru nezbytného pro proliferaci a diferenciaci erytroidních buněk. Syntéza erythropoetinu je zprostředkována HIF-2 α . Při nedostatku železa vazba IRP1 na HIF-2 α potlačuje jeho translaci a snižuje produkci erythropoetinu, čímž omezuje erytropoézu a spotřebu železa. Deprivace železa způsobí blok časných erytroidních progenitorů tím, že inaktivuje mitochondriální akonitázu. Erytroidní odpověď na restrikcii železa je optimalizována senzorem železa TfR2, partnerem receptoru erythropoetinu. Ztráta TfR2 v kostní dřeni zvyšuje citlivost erytroblastů na erythropoetin, což způsobuje erytrocytózu, zejména při nedostatku železa. Jaterní TfR2 reguluje hepcidin a mutace TfR2 způsobují hemochromatózu. Jako senzor transferinu vázaného na železo reguluje erytroidní TfR2 erytropoézu, zatímco jaterní TfR2, který kontroluje hepcidin, moduluje získávání železa podle erythropoetických potřeb [75; 77; 78; 79].

Stejně jako železo reguluje erytropoézu, platí to i naopak. Vstřebávání železa prostřednictvím erytroidního regulátoru bylo potvrzeno objevem erytroferonu. ERFE je součástí rodiny tumor-nekrotizujícího faktoru (TNF)- α , který je produkován několika tkáněmi, ale zvyšuje se v reakci na erythropoetin pouze u erytroidních prekurzorů. ERFE sekvestruje ligandy receptorů BMP, zejména BMP6/7, a inhibuje tak signalizaci BMP-SMAD a hepcidinu. ERFE však nedokáže potlačit hepcidin, když je dráha BMP nadměrně aktivní [75; 80; 81].

4.6 Hypoxie

Hypoxie spojuje homeostázu železa s erytropoézou. Transport kyslíku využívá železo přítomné v hemu erytrocytů. V podmínkách nízké dostupnosti kyslíku jsou do kostní dřeni a hematopoetického kompartmentu vysílány signály ke zvýšení produkce erytrocytů. Tyto signály jsou primárně zprostředkovány HIF, které regulují transkripci řady genů včetně erythropoetinu. HIF má α -podjednotku závislou na kyslíku, buď HIF1 α , HIF2 α nebo HIF3 α , a konstitutivně exprimovanou β -podjednotku, arylhydrokarbonový jaderný translokátor (ARNT) [82; 83; 84].

Za normoxických podmínek jsou podjednotky HIF α závislé na kyslíku degradovány enzymy, které obsahují prolylhydroxylázovou doménu (PHD). Tyto enzymy potřebují k aktivaci jak železo, tak kyslík, a tvoří tak důležitou vazbu mezi koncentrací železa a kyslíku. Aktivní PHD jsou zodpovědné za hydroxylaci HIF α na jejich prolinových

zbytcích, což je činí náchylnými k ubikvitinaci. V hypoxických podmínkách se PHD stávají neaktivními, čímž se zvyšuje stabilita HIF α . Tyto podjednotky se pak vážou na ARNT a další transkripční faktory a regulují transkripci genů v reakci na hypoxii. HIF1 α se také váže na tři elementy reagující na hypoxii v promotoru hepcidinu a snižuje jeho expresi. HIF2 α se naopak zřejmě podílí na regulaci příjmu železa, přinejmenším ve střevním epitelu [82; 85; 86].

Hypoxie může působit na homeostázu železa také nepřímo, a to přerušením exprese molekul, které se podílejí na regulaci produkce hepcidinu. Bylo prokázáno, že hypoxie a nedostatek železa zvyšují hladiny mRNA transmembránové serinové proteázy 6, také známé jako matriptáza 2. Ta je známá jako negativní regulátor hepcidinu a také tím, že štěpí membránový hemojuvelin. Štěpení HJV má za následek narušení signalizace kostního morfogenetického proteinu BMP-SMAD, což vede ke snížení transkripce hepcidinu. U pacientů s mutacemi matriptázy 2 se vyvíjí vzácná forma anémie známá jako anémie z nedostatku železa, která je charakterizována vysokou hladinou hepcidinu v důsledku konstitutivní aktivace dráhy BMP-SMAD, protože protein matriptáza 2 není schopen štěpit HJV. Další molekulou, kterou může hypoxie nepřímo ovlivňovat hepcidin, je furin. Ten štěpí HJV za vzniku rozpustného HJV, který působí jako antagonist a inhibující dráhu BMP-SMAD, což vede ke snížené expresi hepcidinu [87; 88; 89; 90].

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo popsat průběh erythropoézy jako celku a popsat její stádia. Proces erythropoézy je rozdělen do jednotlivých stádií podle stáří organismu, tedy od fetálního období přes narození a následné dospívání po dospělost.

Na tomto procesu, který je podstatný pro udržení homeostázy a také okysličování organismu, se podílí řada hormonů a faktorů. Mezi ně patří hlavně erythropoetin, což je hlavní růstový hormon tvořený ledvinami. Také je třeba zmínit hepcidin regulující homeostázu železa, která též ovlivňuje erythropoézu. Vstřebávání a tkáňová distribuce železa je řízena především interakcí hepcidinu s ferroportinem. Ferroportin je exprimován ve tkáních, která ukládají a přenášejí železo, a funguje jako receptor pro hepcidin. Erytroferron je hlavním erytroidním regulátorem hepcidinu a ovlivňuje hladinu hepcidinu podle hladiny hemu a hemoglobinu v organismu. Jedná se tedy o hormon řídící hladinu železa v plazmě a celkové množství železa v těle. Hemoglobin, který se zapojuje do erythropoézy a díky němuž je možný transport kyslíku z plic do tkání, také prochází několika stádii v závislosti na erythropoéze. Mezi proteiny, které na sebe navazují železo, jež je uvolněno z erytrocytů a jejich hemoglobinu, patří transferin. Ten na sebe navazuje volné železo díky transferinovým receptorům TfR1 a TfR2.

Erythropoéza je adaptivní proces, který se koriguje v závislosti na potřebách organismu, a to především díky mnoha faktorům a hormonům, které se na něm podílejí. Nejčastějším důvodem změn v erythropoéze jsou zvýšené nároky na kyslík nebo naopak zvýšené ztráty buď erytrocytů a tedy hemu, nebo železa.

CITACE

1. Tang, P., & Wang, H. (2023). Regulation of erythropoiesis: emerging concepts and therapeutic implications. *Hematology* (Amsterdam, Netherlands), 28(1), <https://doi.org/10.1080/16078454.2023.2250645>
2. Caulier, A. L., & Sankaran, V. G. (2022). Molecular and cellular mechanisms that regulate human erythropoiesis. *Blood*, 139(16), <https://doi.org/10.1182/blood.2021011044>
3. Nandakumar, S. K., Ulirsch, J. C., & Sankaran, V. G. (2016). Advances in understanding erythropoiesis: evolving perspectives. *British journal of haematology*, 173(2), <https://doi.org/10.1111/bjh.13938>
4. Yamane T. (2020). Cellular Basis of Embryonic Hematopoiesis and Its Implications in Prenatal Erythropoiesis. *International journal of molecular sciences*, 21(24), <https://doi.org/10.3390/ijms21249346>
5. Zivot, A., Lipton, J. M., Narla, A., & Blanc, L. (2018). Erythropoiesis: insights into pathophysiology and treatments in 2017. *Molecular medicine* (Cambridge, Mass.), 24(1), <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0011-z>
6. Baron, M. H., Vacaru, A., & Nieves, J. (2013). Erythroid development in the mammalian embryo. *Blood cells, molecules & diseases*, 51(4), <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2013.07.006>
7. Komorniczak, M., Rodak, B. F., Fritsma, G. A. (2007). *Hematology: Clinical Principles and Applications*. 3rd ed. Saunder, ISBN 9781416030065, Figure 7-1
8. Abdullah, Y., Wagner, M. C., Helm, B., Gröne, H. J., Lehmann, W. D., Boerries, M., Busch, H., Muckenthaler, M. U., Schilling, M., & Klingmüller, U. (2022). Erythropoietin-driven dynamic proteome adaptations during erythropoiesis prevent iron overload in the developing embryo. *Cell reports*, 40(12), <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111360>
9. Dzierzak, E., & Philipsen, S. (2013). Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(4), <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011601>
10. Barminko, J., Reinholt, B., & Baron, M. H. (2016). Development and differentiation of the erythroid lineage in mammals. *Developmental and comparative immunology*, 58(18), <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.012>

11. Dzierzak, E., & Philipsen, S. (2013). Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(4), <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011601>
12. Eggold, J. T., & Rankin, E. B. (2019). Erythropoiesis, EPO, macrophages, and bone. *Bone*, 119(36), <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.03.014>
13. Valent, P., Büsche, G., Theurl, I., Uras, I. Z., Germing, U., Stauder, R., Sotlar, K., Füreder, W., Bettelheim, P., Pfeilstöcker, M., Oberbauer, R., Sperr, W. R., Geissler, K., Schwaller, J., Moriggl, R., Béné, M. C., Jäger, U., Horny, H. P., & Hermine, O. (2018). Normal and pathological erythropoiesis in adults: from gene regulation to targeted treatment concepts. *Haematologica*, 103(10), <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.192518>
14. Ramos, P., Casu, C., Gardenghi, S., Breda, L., Crielaard, B. J., Guy, E., Marongiu, M. F., Gupta, R., Levine, R. L., Abdel-Wahab, O., Ebert, B. L., Van Rooijen, N., Ghaffari, S., Grady, R. W., Giardina, P. J., & Rivella, S. (2013). Macrophages support pathological erythropoiesis in polycythemia vera and β -thalassemia. *Nature medicine*, 19(4), <https://doi.org/10.1038/nm.3126>
15. Le Goff, S., Boussaid, I., Floquet, C., Raimbault, A., Hatin, I., Andrieu-Soler, C., Salma, M., Leduc, M., Gautier, E. F., Guyot, B., d'Allard, D., Montel-Lehry, N., Ducamp, S., Houvert, A., Guillonneau, F., Giraudier, S., Cramer-Bordé, E., Morlé, F., Diaz, J. J., Hermine, O., Fontenay, M. (2021). p53 activation during ribosome biogenesis regulates normal erythroid differentiation. *Blood*, 137(1), <https://doi.org/10.1182/blood.2019003439>
16. Shah D. (2022). Laborator Investigation particular for Density. Slideshare, page 18
17. Gibson, J. S., & Rees, D. C. (2018). Lipid metabolism in terminal erythropoiesis. *Blood*, 131(26), <https://doi.org/10.1182/blood-2018-05-850255>
18. Koury, M. J., Sawyer, S. T., & Brandt, S. J. (2002). New insights into erythropoiesis. *Current opinion in hematology*, 9(2), <https://doi.org/10.1097/00062752-200203000-00002>
19. Bosman, G. J., Werre, J. M., Willekens, F. L., & Novotný, V. M. (2008). Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: structural aspects and implications for transfusion. *Transfusion medicine (Oxford, England)*, 18(6), <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2008.00892.x>
20. Lacombe, C., & Mayeux, P. (1998). Biology of erythropoietin. *Haematologica*, 83(8)

21. Rahman, S. E. A., Naglah, A. M., Al-Omar, M. A., Kalmouch, A., & Amin, R. A. (2014). Haematological measurements for some new erythropoietin hormone analogues synthesized by use of a modified method. *Res Chem Intermed* 40, <https://doi.org/10.1007/s11164-013-1074-7>
22. Jelkmann W. (2011). Regulation of erythropoietin production. *The Journal of physiology*, 589(6), <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.195057>
23. Jelkmann W. (2004). Molecular biology of erythropoietin. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*, 43(8), <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.43.649>
24. Ahmed, M. H., Ghatge, M. S., & Safo, M. K. (2020). Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. *Sub-cellular biochemistry*, 94(345), https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7_14
25. Pasini, E., Corsetti, G., Romano, C., Aquilani, R., Scarabelli, T., Chen-Scarabelli, C., & Dioguardi, F. S. (2021). Management of Anaemia of Chronic Disease: Beyond Iron-Only Supplementation. *Nutrients*, 13(1), <https://doi.org/10.3390/nu13010237>
26. Gell D. A. (2018). Structure and function of haemoglobins. *Blood cells, molecules & diseases*, 70(13), <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2017.10.006>
27. Ponka, P., Koury, M., & Sheftel, A. (2014). Erythropoiesis, Hemoglobin Synthesis, and Erythroid Mitochondrial Iron Homeostasis. *The Handbook of Porphyrin Science*, chapter129(41), https://doi.org/10.1142/9789814407755_0011
28. Safo, M. K., Ahmed, M. H., Ghatge, M. S., & Boyiri, T. (2011). Hemoglobin-ligand binding: understanding Hb function and allostery on atomic level. *Biochimica et biophysica acta*, 1814(6), <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.02.01>
29. Farid, Y., Bowman, N. S., & Lecat, P. (2023). *Biochemistry, Hemoglobin Synthesis*. In StatPearls. StatPearls Publishing
30. Yuan, X., Fleming, M. D., & Hamza, I. (2013). Heme transport and erythropoiesis. *Current opinion in chemical biology*, 17(2), <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.01.010>
31. Pimstone, N. R., Tenhunen, R., Seitz, P. T., Marver, H. S., & Schmid, R. (1971). The enzymatic degradation of hemoglobin to bile pigments by macrophages. *The Journal of experimental medicine*, 133(6), <https://doi.org/10.1084/jem.133.6.1264>
32. Fontana, J., & Lavříková, P. (2013). *Metabolismus hemoglobinu a transport krevních plynů*, Praha, 3. Lékařská fakulta Univerzita Karlovy
33. Trojan, S. (2003). *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada, 800 s. ISBN 80-247-0512-5

34. Vogt, A. S., Arsiwala, T., Mohsen, M., Vogel, M., Manolova, V., & Bachmann, M. F. (2021). On Iron Metabolism and Its Regulation. *International journal of molecular sciences*, 22(9), <https://doi.org/10.3390/ijms22094591>
35. Sukhbaatar, N., & Weichhart, T. (2018). Iron Regulation: Macrophages in Control. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), 11(4), <https://doi.org/10.3390/ph11040137>
36. Wallace D. F. (2016). The Regulation of Iron Absorption and Homeostasis. *The Clinical biochemist. Reviews*, 37(2)
37. Silva, B., & Faustino, P. (2015). An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochimica et biophysica acta*, 1852(7), <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.03.011>
38. Cassat, J. E., & Skaar, E. P. (2013). Iron in infection and immunity. *Cell host & microbe*, 13(5), <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.04.010>
39. Wang, L., & Cherayil, B. J. (2009). Ironing out the wrinkles in host defense: interactions between iron homeostasis and innate immunity. *Journal of innate immunity*, 1(5), <https://doi.org/10.1159/000210016>
40. Kawabata H. (2019). Transferrin and transferrin receptors update. *Free radical biology & medicine*, 133, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.037>
41. Waldvogel-Abramowski, S., Waeber, G., Gassner, C., Buser, A., Frey, B. M., Favrat, B., & Tissot, J. D. (2014). Physiology of iron metabolism. *Transfusion medicine and hemotherapy: offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*, 41(3), <https://doi.org/10.1159/000362888>
42. Chifman, J., Laubenbacher, R., & Torti, S. V. (2014). A systems biology approach to iron metabolism. *Advances in experimental medicine and biology*, 844(201), https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2095-2_10
43. Yiannikourides, A., & Latunde-Dada, G. O. (2019). A Short Review of Iron Metabolism and Pathophysiology of Iron Disorders. *Medicines* (Basel, Switzerland), 6(3), <https://doi.org/10.3390/medicines6030085>
44. Anderson, C. P., Shen, M., Eisenstein, R. S., & Leibold, E. A. (2012). Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1823(9), <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.05.010>
45. Goodnough, L. T., Skikne, B., & Brugnara, C. (2000). Erythropoietin, iron, and erythropoiesis. *Blood*, 96(3)

46. De Jong, G., van Dijk, J. P., & van Eijk, H. G. (1990). The biology of transferrin. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 190(1-2), [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(90\)90278-z](https://doi.org/10.1016/0009-8981(90)90278-z)
47. Moos, T., & Morgan, E. H. (2000). Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier systems. *Cellular and molecular neurobiology*, 20(1), <https://doi.org/10.1023/a:1006948027674>
48. Richard, C., & Verdier, F. (2020). Transferrin Receptors in Erythropoiesis. *International journal of molecular sciences*, 21(24), <https://doi.org/10.3390/ijms21249713>
49. Gammella, E., Buratti, P., Cairo, G., & Recalcati, S. (2017). The transferrin receptor: the cellular iron gate. *Metallomics: integrated biometal science*, 9(10), <https://doi.org/10.1039/c7mt00143f>
50. Evans, R. W., Kong, X., & Hider, R. C. (2012). Iron mobilization from transferrin by therapeutic iron chelating agents. *Biochimica et biophysica acta*, 1820(3), <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.11.007>
51. Jennifer, B., Berg, V., Modak, M., Puck, A., Seyerl-Jiresch, M., König, S., Zlabinger, G. J., Steinberger, P., Chou, J., Geha, R. S., Öhler, L., Yachie, A., Choe, H., Kraller, M., Stockinger, H., & Stöckl, J. (2020). Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for human heme-albumin. *Communications biology*, 3(1), <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01294-5>
52. Camaschella, C., Pagani, A., Nai, A., & Silvestri, L. (2016). The mutual control of iron and erythropoiesis. *International journal of laboratory hematology*, 38 Suppl 1(20), <https://doi.org/10.1111/ijlh.12505>
53. Di Modica, S. M., Tanzi, E., Olivari, V., Lidonnici, M. R., Pettinato, M., Pagani, A., Tiboni, F., Furiosi, V., Silvestri, L., Ferrari, G., Rivella, S., & Nai, A. (2022). Transferrin receptor 2 (Tfr2) genetic deletion makes transfusion-independent a murine model of transfusion-dependent β -thalassemia. *American journal of hematology*, 97(10), <https://doi.org/10.1002/ajh.26673>
54. Camaschella, C., Pagani, A., Silvestri, L., & Nai, A. (2022). The mutual crosstalk between iron and erythropoiesis. *International journal of hematology*, 116(2), <https://doi.org/10.1007/s12185-022-03384-y>
55. Nemeth, E., & Ganz, T. (2021). Hepcidin-Ferroportin Interaction Controls Systemic Iron Homeostasis. *International journal of molecular sciences*, 22(12), <https://doi.org/10.3390/ijms22126493>

56. Ganz, T., & Nemeth, E. (2012). Heparidin and iron homeostasis. *Biochimica et biophysica acta*, 1823(9), <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.01.014>
57. Rana, S., & Prabhakar, N. (2021). Iron disorders and heparidin. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 523(454), <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.10.032>
58. Wang Ch., Xu X, Zhang W., Ben Dkhil S., Meng X., Liu X., Margeat O., Yartsev A., Ma W., Ackermann J., Ergang Wang E., & Fahlman M. (2017). Ternary organic solar cells with enhanced open circuit voltage, *Nano Energy*, volume 37(24-31), <https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2017.04.060>
59. Silvestri, L., Nai, A., Dulja, A., & Pagani, A. (2019). Heparidin and the BMP-SMAD pathway: An unexpected liaison. *Vitamins and hormones*, 110(71), <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2019.01.004>
60. Kanamori, Y., Murakami, M., Sugiyama, M., Hashimoto, O., Matsui, T., & Funaba, M. (2017). Interleukin-1 β (IL-1 β) transcriptionally activates heparidin by inducing CCAAT enhancer-binding protein δ (C/EBP δ) expression in hepatocytes. *The Journal of biological chemistry*, 292(24), <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.770974>
61. Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., Ward, D. M., Ganz, T., & Kaplan, J. (2004). Heparidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5704), <https://doi.org/10.1126/science.1104742>
62. Taniguchi, R., Kato, H. E., Font, J., Deshpande, C. N., Wada, M., Ito, K., Ishitani, R., Jormakka, M., & Nureki, O. (2015). Outward- and inward-facing structures of a putative bacterial transition-metal transporter with homology to ferroportin. *Nature communications*, 6, <https://doi.org/10.1038/ncomms9545>
63. Deshpande, C. N., Ruwe, T. A., Shawki, A., Xin, V., Vieth, K. R., Valore, E. V., Qiao, B., Ganz, T., Nemeth, E., Mackenzie, B., & Jormakka, M. (2018). Calcium is an essential cofactor for metal efflux by the ferroportin transporter family. *Nature communications*, 9(1), <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05446-4>
64. Philpott, C. C., Patel, S. J., & Protchenko, O. (2020). Management versus miscues in the cytosolic labile iron pool: The varied functions of iron chaperones. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1867(11), <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118830>

65. 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 metabolism*, 15(6), <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.03.017>
66. Billesbølle, C. B., Azumaya, C. M., Kretsch, R. C., Powers, A. S., Gonen, S., Schneider, S., Arvedson, T., Dror, R. O., Cheng, Y., & Manglik, A. (2020). Structure of hepcidin-bound ferroportin reveals iron homeostatic mechanisms. *Nature*, 586(7831), <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2668-z>
67. Link, C., Knopf, J. D., Marques, O., Lemberg, M. K., & Muckenthaler, M. U. (2021). The role of cellular iron deficiency in controlling iron export. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*, 1865(3), <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129829>
68. Srole, D. N., & Ganz, T. (2021). Erythroferrone structure, function, and physiology: Iron homeostasis and beyond. *Journal of cellular physiology*, 236(7), <https://doi.org/10.1002/jcp.30247>
69. Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., & Brunak, S. (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4(6), <https://doi.org/10.1002/pmic.200300771>
70. Coffey, R., & Ganz, T. (2018). Erythroferrone: An Erythroid Regulator of Hepcidin and Iron Metabolism. *HemaSphere*, 2(2), <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000035>
71. Casanovas, G., Mleczko-Sanecka, K., Altamura, S., Hentze, M. W., & Muckenthaler, M. U. (2009). Bone morphogenetic protein (BMP)-responsive elements located in the proximal and distal hepcidin promoter are critical for its response to HJV/BMP/SMAD. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 87(5), <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0447-2>
72. Wang, C. Y., Core, A. B., Canali, S., Zumbrennen-Bullough, K. B., Ozer, S., Umans, L., Zwijsen, A., & Babitt, J. L. (2017). Smad1/5 is required for erythropoietin-mediated suppression of hepcidin in mice. *Blood*, 130(1), <https://doi.org/10.1182/blood-2016-12-759423>

73. Silvestri, L., Pagani, A., Nai, A., De Domenico, I., Kaplan, J., & Camaschella, C. (2008). The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell metabolism*, 8(6), <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.09.012>
74. Ginzburg, Y., An, X., Rivella, S., & Goldfarb, A. (2023). Normal and dysregulated crosstalk between iron metabolism and erythropoiesis. *eLife*, 12, <https://doi.org/10.7554/eLife.90189>
75. Camaschella, C., Nai, A., & Silvestri, L. (2020). Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. *Haematologica*, 105(2), <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.232124>
76. Mastrogiannaki, M., Matak, P., & Peyssonnaud, C. (2013). The gut in iron homeostasis: role of HIF-2 under normal and pathological conditions. *Blood*, 122(6), <https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-427765>
77. Ghosh, M. C., Zhang, D. L., Jeong, S. Y., Kovtunovych, G., Ollivierre-Wilson, H., Noguchi, A., Tu, T., Senecal, T., Robinson, G., Crooks, D. R., Tong, W. H., Ramaswamy, K., Singh, A., Graham, B. B., Tuder, R. M., Yu, Z. X., Eckhaus, M., Lee, J., Springer, D. A., & Rouault, T. A. (2013). Deletion of iron regulatory protein 1 causes polycythemia and pulmonary hypertension in mice through translational derepression of HIF2 α . *Cell metabolism*, 17(2), <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.016>
78. Schwartz, A. J., Das, N. K., Ramakrishnan, S. K., Jain, C., Jurkovic, M. T., Wu, J., Nemeth, E., Lakhali-Littleton, S., Colacino, J. A., & Shah, Y. M. (2019). Hepatic hepcidin/intestinal HIF-2 α axis maintains iron absorption during iron deficiency and overload. *The Journal of clinical investigation*, 129(1), <https://doi.org/10.1172/JCI122359>
79. Rauner, M., Baschant, U., Roetto, A., Pellegrino, R. M., Rother, S., Salbach-Hirsch, J., Weidner, H., Hintze, V., Campbell, G., Petzold, A., Lemaitre, R., Henry, I., Bellido, T., Theurl, I., Altamura, S., Colucci, S., Muckenthaler, M. U., Schett, G., Komla Ebri, D., Bassett, J. H. D., Hofbauer, L. C. (2019). Transferrin receptor 2 controls bone mass and pathological bone formation via BMP and Wnt signaling. *Nature metabolism*, 1(1), <https://doi.org/10.1038/s42255-018-0005-8>
80. Finch C. A. (1982). Erythropoiesis, erythropoietin, and iron. *Blood*, 60(6)

81. Arezes, J., Foy, N., McHugh, K., Sawant, A., Quinkert, D., Terraube, V., Brinth, A., Tam, M., LaVallie, E. R., Taylor, S., Armitage, A. E., Pasricha, S. R., Cunningham, O., Lambert, M., Draper, S. J., Jasuja, R., & Drakesmith, H. (2018). Erythroferrone inhibits the induction of hepcidin by BMP6. *Blood*, 132(14), <https://doi.org/10.1182/blood-2018-06-857995>
82. Rishi, G., & Subramaniam, V. N. (2017). The relationship between systemic iron homeostasis and erythropoiesis. *Bioscience reports*, 37(6), <https://doi.org/10.1042/BSR20170195>
83. Wang, G. L., & Semenza, G. L. (1993). Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *The Journal of biological chemistry*, 268(29)
84. Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., & Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12), <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5510>
85. 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). *The Journal of clinical investigation*, 117(7), <https://doi.org/10.1172/JCI31370>
86. Mastrogiannaki, M., Matak, P., Keith, B., Simon, M. C., Vaulont, S., & Peyssonnaud, C. (2009). HIF-2alpha, but not HIF-1alpha, promotes iron absorption in mice. *The Journal of clinical investigation*, 119(5), <https://doi.org/10.1172/JCI38499>
87. Lakhal, S., Schödel, J., Townsend, A. R., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., & Mole, D. R. (2011). Regulation of type II transmembrane serine proteinase TMPRSS6 by hypoxia-inducible factors: new link between hypoxia signaling and iron homeostasis. *The Journal of biological chemistry*, 286(6), <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.173096>
88. Silvestri, L., Pagani, A., Nai, A., De Domenico, I., Kaplan, J., & Camaschella, C. (2008). The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell metabolism*, 8(6), <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.09.012>

89. Finberg, K. E., Heeney, M. M., Campagna, D. R., Aydinok, Y., Pearson, H. A., Hartman, K. R., Mayo, M. M., Samuel, S. M., Strouse, J. J., Markianos, K., Andrews, N. C., & Fleming, M. D. (2008). Mutations in *TMPRSS6* cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nature genetics*, 40(5), <https://doi.org/10.1038/ng.130>
90. McMahon, S., Grondin, F., McDonald, P. P., Richard, D. E., & Dubois, C. M. (2005). Hypoxia-enhanced expression of the proprotein convertase furin is mediated by hypoxia-inducible factor-1: impact on the bioactivation of proproteins. *The Journal of biological chemistry*, 280(8), <https://doi.org/10.1074/jbc.M413248200>