

Received: 2003.08.27

Accepted: 2003.11.18

Published: 2004.03.08

Regulacja ogólnoustrojowej homeostazy żelaza przez hepcydynę

Regulation of body iron homeostasis by hepcidin

Paweł Lipiński, Rafał R. Starzyński

Zakład Biologii Molekularnej Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN

Streszczenie

Hepcydyna jest przeciwbakteryjnym peptydem syntetyzowanym głównie w wątrobie i uwalnianym do krążenia. Niedawno zaproponowano, że hepcydyna jest regulatorem absorpcji żelaza pokarmowego oraz uwalniania żelaza z makrofagów układu siateczkowo-śródbłonkowego. Hepcydyna jest silnym mediatorem niedokrwistości towarzyszącej stanom zapalnym. Uważa się, że przeciążenie żelazem występujące u osób chorych na dziedziczną hemochromatozę, nosicieli mutacji genu *HFE*, jest spowodowane zaburzeniem ekspresji hepcydyny. Odkrycie hepcydyny i jej roli w utrzymaniu homeostazy żelaza może wyznaczyć nowe kierunki w leczeniu niektórych zaburzeń metabolizmu żelaza u ludzi. Celem tego artykułu jest podsumowanie aktualnej wiedzy na temat funkcji i regulacji hepcydyny w metabolizmie żelaza.

Słowa kluczowe:

hepcydyna • żelazo • niedokrwistość występująca w stanie zapalnym • HFE • hemochromatoza

Summary

Hepcidin is a circulating antimicrobial peptide mainly synthesized in the liver, which has been recently proposed as a factor regulating the uptake of dietary iron and its release by reticuloendothelial macrophages. Hepcidin is a potent mediator of anemia of inflammation. Disrupted hepcidin expression is thought to mediate the pathological effects of mutations in the *HFE* gene in hereditary hemochromatosis. Discovery of the critical role of hepcidin in iron homeostasis could help in the design of new therapies for some iron metabolism disorders in humans. The aim of this review is to summarize current knowledge about the function and regulation of hepcidin in iron metabolism.

Key words:

hepcidin • iron • anemia of inflammation • HFE • hemochromatosis

Full_text PDF:

http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/4831.pdf

Word count:

3933

Tables:

-

Figures:

3

References:

68

Adres autorów:

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec, 05-552 Wólka Kosowska, ul. Postępu 1,
e-mail: P. Lipinski@ighz.pl

WSTĘP

Niektóre z hipotez na temat początków życia na Ziemi podkreślają, że pierwsze reakcje enzymatyczne przebiegały z aktywnym udziałem jonów żelaza [61]. W toku ewolucji właściwości oksydoredukcyjne żelaza zostały wykorzystane w licznych reakcjach biochemicznych u większości organizmów żywych. Tej pozytywnej selekcji żelaza jako enzymatycznego kofaktora nie zakłóciło pojawienie się w biosferze tlenu cząsteczkowego (O_2), w obecności którego termodynamicznie korzystną postacią występowania żelaza jest jon żelazowy [Fe(III)], charakteryzujący się niewielką rozpuszczalnością w płynach fizjologicznych i w konsekwencji ograniczoną biologiczną dostępnością [2]. Co więcej, oddziaływanie między jonami żelaza znajdującymi się w centrach aktywnych enzymów mitochondrialnych a tlenem stało się podstawą do wykorzystania tlenu jako źródła energii komórki. Interakcja między żelazem a tlenem w układach biologicznych ma jednak również swój negatywny wymiar. Jony żelaza niezwiązane z wyspecjalizowanymi wysokocząsteczkowymi ligandami, mogą reagować ze zredukowanymi formami O_2 . W wyniku tych reakcji powstają toksyczne wolne rodniki tlenowe [23]. Biologiczna dwuznaczność żelaza wyznacza dwa główne kierunki w homeostazie tego metalu: zachowanie ciągłości reakcji biochemicznych z udziałem jonów żelaza i ograniczenie udziału jonów żelaza w reakcjach, w których generowane są toksyczne formy tlenu. Ssaki osiągają tę równowagę dzięki funkcjonowaniu niezwykle rozbudowanego systemu białek współdziałających z sobą w obrębie organelli komórkowych, komórek oraz na poziomie całego organizmu. Należą do nich białka transportujące, magazynujące żelazo, regulujące jego stan utlenienia oraz białka sygnalizacyjne i regulatorowe.

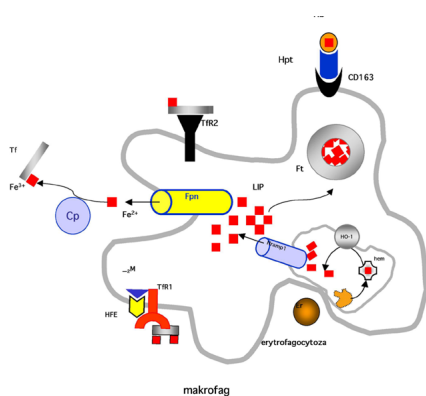
ZARYS OGÓLNUSTROJOWEJ HOMEOSTAZY ŻELAZA U CZŁOWIEKA

Funkcjonowanie ogólnoustrojowej homeostazy żelaza najlepiej poznano u człowieka i myszy. U obu tych gatunków metabolizm żelaza wykazuje wiele podobieństw [4]. Występowanie u ludzi licznych zaburzeń związanych z niedoborem lub nadmiarem żelaza [5] spowodowało, że podjęto intensywne badania naukowe mające na celu wyjaśnienie biologicznych mechanizmów tych patologii. Jednym z największych osiągnięć w ostatnich latach stało się odkrycie mutacji w genie kodującym białko HFE, należące do grupy I białek głównego kompleksu zgodności tkankowej [15]. Odkryta mutacja jest odpowiedzialna za występowanie hemochromatozy, dziedzicznej choroby objawiającej się niekontrolowaną, masową absorpcją

żelaza z przewodu pokarmowego oraz nadmiernym jego odkładaniem się w wątrobie, sercu i trzustce [13]. Identyfikacja tej mutacji stała się przełomem we wczesnej diagnozie hemochromatozy [6]. Również u myszy znaleziono wiele spontanicznych mutacji genowych, objawiających się charakterystycznymi, patologicznymi fenotypami metabolizmu żelaza [4]. Z kolei badania prowadzone na myszach zmodyfikowanych genetycznie wniosły cenne informacje na temat roli poszczególnych białek i ich współdziałania w zachowaniu równowagi żelaza w organizmie [55].

Obrót żelaza w organizmie człowieka jest procesem dynamicznym, chociaż u dorosłych ludzi odbywa się niemal w cyklu zamkniętym. Charakterystyczną jego cechą jest brak fizjologicznego szlaku usuwania żelaza z organizmu. Wyjątkiem jest cykliczna utrata krwi u kobiet w wieku rozrodczym i związany z nią ubytek żelaza zawartego w hemoglobinie erytrocytów. Ten okresowy ubytek żelaza jest przyczyną zróżnicowanej całkowitej zawartości żelaza w organizmie kobiety i mężczyzny, która wynosi odpowiednio 3 i 4 g. W ciągu doby, w organizmie dorosłego mężczyzny prawie 40 mg żelaza ulega przemieszczeniu między starzejącymi się erytrocytami, wątrobą/śledzioną i prekursorami erytrocytów w szpiku kostnym. Żelazo związane z hemoglobiną erytrocytów stanowi około 2/3 żelaza całego organizmu. Starzejące się erytrocyty są wychwytywane z krążenia, fagocytowane i trawione przez komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego (osiadłe makrofagi) śledziony i wątroby. Żelazo zawarte w cząsteczkach hemu, grupach aktywnych hemoglobiny jest uwalniane przez oksygenazy hemu (HO) [32]. Uwolnione jonowe żelazo jest następnie transportowane z makrofagów przez ferroportynę (Fpn) [12] i z udziałem ferrooksydazy, ceruloplazminy (Cp) [24] wiązane przez transferynę (Tf), białko osocza, będące nośnikiem jonów żelaza do wszystkich komórek organizmu wyposażonych w receptor transferyny 1 (TfR1). W warunkach fizjologicznych ilość żelaza związanego z Tf jest utrzymywana na stałym poziomie około 4 mg. Do komórek o największej ekspresji TfR1 należą występujące w szpiku kostnym retikulocyty, komórki prekursorowe erytrocytów, charakteryzujące się intensywną syntezą hemu i hemoglobiny. Synteza hemu jest procesem wieloetapowym, przebiegającym na zmianę w mitochondriach i cytoplazmie, w którym biorą udział liczne enzymy [50]. Transport żelaza do komórek za pośrednictwem TfR1 obejmuje endocytozę kompleksu TfR1-Tf-Fe₂, odłączenie się jonów żelaza od Tf wewnątrz endosomu, a następnie ich transport za pomocą białka przenoszącego dwuwartościowe metale 1 (divalent metal transporter 1 - DMT1) [16] przez błonę endosomu do cytoplazmy. Kompleks TfR1-apoTf

powraca na błonę komórkową, gdzie następuje uwolnienie apoTf do krążenia [51]. Żelazo odzyskiwane po rozpadzie starych erytrocytów zwykle wystarcza do zaspokojenia potrzeb organizmu związanych z erytropoezą, które u dorosłych ludzi wynosi 20 mg dziennie. Mimo że reutilizacja żelaza w organizmie przez makrofagi ma podstawowe znaczenie w utrzymaniu ogólnoustrojowej homeostazy tego metalu, to metaboliczne szlaki żelaza w makrofagach, ich regulacja, rola białek w nich uczestniczących, nie są w pełni poznane. Schemat przemian metabolicznych żelaza w makrofagach przedstawiono na ryc. 1. Zaburzenie uwalniania żelaza z makrofagów występuje w przewlekłych stanach zapalnych [64], niedoborze HO-1 [31], aceruloplazminemii [26] i hipotransferynemii [57]. Skutkiem tych anomalii jest niedokrwistość z powodu niedoboru żelaza i toksyczność żelaza nadmiernie nagromadzonego w makrofagach wątroby i śledziony.



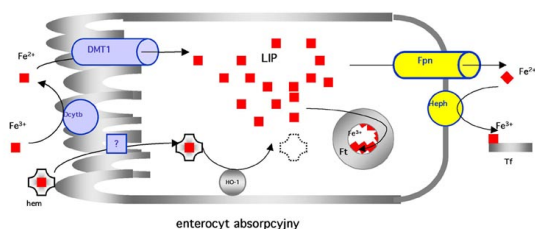
Ryc.1. Szlaki pobierania i uwalniania żelaza przez makrofagi. W wyniku fagocytozy erytrocytu makrofag pobiera około 10^9 atomów żelaza [3]. W transporcie żelaza z erytrofagosomu do cytoplazmy bierze udział białko Nrp1 (natural-resistance-associated macrophage protein-1) [9]. Receptor CD163 eliminuje z krążenia hemoglobinę (Hb) związaną z haptoglobiną (Hpt) [34]. Endocytozę kompleksu TfR1-Tf- Fe_2 omówiono szczegółowo w tekście i nie przedstawiono na rycinie w celu zachowania jej przejrzystości. Znaczenie TfR2 w transporcie żelaza do komórek nie jest do końca poznane [30]. LIP oznacza zmienną pulę jonów żelaza (labile iron pool) związanych przez niskocząsteczkowe ligandy w cytoplazmie. Żelazo zawarte w LIP jest dostępne do rekonstrukcji żelazozależnych enzymów oraz może brać udział w reakcji Fentona [29]. Bezpośrednio z tej puli żelazo transportowane jest przez ferroportynę do krążenia, może być również odkładane w cząsteczce ferrytyny

Wchłanianie żelaza z przewodu pokarmowego podlega rygorystycznej regulacji. Zdrowi dorośli ludzie wchłaniają z diety 1-4 mg żelaza dziennie (1-2 mg mężczyźni i 3-4 mg kobiety). Żelazo wchłaniane tą drogą ma na celu uzupełnienie niewielkich strat tego mikroelementu zawartego w złuszczeniach się komórkach naskórki i komórkach nabłonka jelitowego. Jednakże, o dużym potencjale pozyskiwania żelaza

poprzez wchłanianie z przewodu pokarmowego świadczą następujące dane: absorpcja żelaza u rocznego dziecka wynosi około 10 mg, u młodzieży w wieku dojrzewania 10-15 mg, u kobiety ciężarnej 20 mg. Patologiczna absorpcja, odnotowana u hemochromatyków może sięgać nawet 50 mg żelaza dziennie [48]. W wymienionych przypadkach (z wyjątkiem hemochromatozy) żelazo wchłaniane z diety ma na celu zaspokojenie potrzeb związanych ze wzrostem organizmu (przyrostem masy ciała, zwiększającą się liczbą erytrocytów) lub rozwojem płodu. Zwiększenie absorpcji żelaza obserwuje się również w sytuacjach, gdy konieczne jest uzupełnienie jego zapasów zgromadzonych w hepatocytach wątroby. Żelazo zapasowe w tych komórkach związane jest głównie z ferrytyną (Ft) i u dorosłych ludzi stanowi około 25% całkowitego żelaza organizmu [25]. Uszczuplenie tej rezerwy zdarza się w okresowym niedoborze żelaza w diecie, w ubytkach związanych z krwotokami, lub przy niewydolnej reutilizacji metalu przez makrofagi. W sytuacjach tych organizm czerpie żelazo niezbędne do utrzymania tempa erytropoezy w pierwszej kolejności z rezerwy metalu zgromadzonych w ferrytynie hepatocytów.

Absorpcja żelaza odbywa się w początkowym odcinku dwunastnicy. Komórkami biorącymi czynny udział w transporcie żelaza ze światła dwunastnicy do krwi są enterocyty wierzchołkowe znajdujące się w górnej części kosmków jelitowych. Enterocyty te są komórkami spolaryzowanymi, zawierającymi na przeciwnych stronach błony komórkowej różne zestawy białek odpowiedzialnych za przemieszczanie się jonów żelaza. Na błonie wierzchołkowej zwróconej w stronę dwunastnicy są to białko DMT1 [16] i feroreduktaza, cytochrom b dwunastnicy (duodenal cytochrome b - Dcytb) [38], a na błonie boczno-podstawnej, kontaktującej się ze ścianą naczyń krwionośnych występują transporter, ferroportyna (Fpn) [12] i ferooksydaza, hefajstyna (Heph) [59]. Według do niedawna jeszcze szeroko akceptowanej hipotezy ekspresja wymienionych białek jest programowana w komórkach prekursorowych enterocytów wierzchołkowych, które wysięcają krypty Lieberkühna znajdujące się pomiędzy kosmkami dwunastnicy [54, 56]. Komórki te w miarę różnicowania migrują w kierunku szczytu kosmka, gdzie osiągną status dojrzałych enterocytów absorpcyjnych. Enterocyty krypt na błonie zorientowanej w stronę naczyń krwionośnych wyposażone są w kompleks białek składający się z TfR1, białka HFE i β 2-mikroglobuliny (β 2M), który umożliwia odbiór sygnałów o przebiegu erytropoezy w szpiku kostnym i metabolizmie żelaza w wątrobie, a więc procesów decydujących o ilości żelaza wchłanianej z diety. Hipoteza regulacji absorpcji żelaza z udziałem enterocytów krypt stała się niezwykle atrakcyjna wkrótce po

odkryciu hepcydyny. Peptyd ten uznano za brakującą dotychczas ogniwo w regulacji absorpcji, cząsteczkę przenoszącą do enterocytów krypty informacje o *status quo* żelaza w organizmie [17]. Ostatnie wyniki badań zdecydowanie przemawiają jednak za tym, że regulacja absorpcji żelaza odbywa się, owszem przez hepcydynę, ale na poziomie dojrzałych enterocytów wierzchołkowych [18, 45]. Szczegóły nowej hipotezy będą omówione w dalszej części pracy. Funkcjonowanie poszczególnych białek enterocyty absorpcyjnego w transporcie żelaza z przewodu pokarmowego do krwi przedstawiono na ryc. 2.



Ryc. 2. Białka uczestniczące w transporcie żelaza przez enterocyt absorpcyjny. Funkcje wyszczególnionych białek opisano w tekście. Szlak absorpcji żelaza w postaci hemu nie został dotychczas poznany. W enterocytach absorpcyjnych wykazano jednak konstytutywną aktywność HO-1, niezbędną do uwolnienia żelaza jonowego z cząsteczki hemu [58]. Jony żelaza transportowane przez błonę wierzchołkową enterocyty zasila LIP (opis ryc.1), skąd następnie transportowane są przez błonę boczno-podstawną do krążenia. Poziom jonów żelaza zawartych w LIP, a tym samym podlegających transportowi do krążenia może być regulowany przez ferrytynę

Istotą zachowania ogólnoustrojowej homeostazy żelaza jest dopasowanie jego endo- i egzogennej podaży do popytu związanego głównie z potrzebami erytropoezy. Ponieważ komórki pełniące różne funkcje w metabolizmie żelaza w organizmie są od siebie oddalone, od dawna sugerowano istnienie czynników humoralnych, cząsteczek sygnalizacyjnych, których funkcje biologiczne polegałyby na koordynowaniu metabolizmu żelaza w tych komórkach. Dzięki przypadkowemu odkryciu Nicolasa i współpr. w 2001 roku taką funkcję przypisano hepcydynie [41].

KRÓTKA HISTORIA BADAŃ NAD HEPCYDYNĄ

Hepcydynę (HAMP), którą pierwotnie nazwano LEAP-1 (liver-expressed antimicrobial peptide) po raz pierwszy wyizolowano z ultrafiltratu krwi [33] i z moczu ludzi [47]. Opisano ją jako kationowy peptyd należący do rodziny defensyn, o stosunkowo szerokim zakresie aktywności przeciwgrzybiczej i bakterio-bójczej [33, 47]. Po raz pierwszy powiązali hepcydynę z metabolizmem żelaza Pigeon i współpr., którzy

stwierdzili zwiększoną ekspresję mRNA HAMP w wątrobach myszy nastrzykiwanych dekstranem żelaza oraz u myszy karmionych dietą wzbogaconą żelazem [49]. Autorzy ci zaproponowali dla LEAP-1 nową nazwę - hep-cidin, odzwierciedlającą główne miejsce syntezy peptydu w organizmie (hep-atocyte), a także jej pierwotnie odkrytą, mikrobójczą (-cidin), funkcję biologiczną. Przełomem w badaniach nad hepcydyną okazały się prace Nicolasa i współpr., którzy na dwóch przeciwstawnych modelach genetycznie zmodyfikowanych myszy – na myszach z nieczynnym genem *HAMP* [41] i na myszach transgenicznym z nadekspresją tego genu [42] wykazali wiodącą rolę hepcydyny w regulacji ogólnoustrojowej homeostazy żelaza. Ważnym krokiem potwierdzającym rolę hepcydyny w regulacji absorpcji żelaza z przewodu pokarmowego było zidentyfikowanie dwóch mutacji w genie *HAMP* u osób cierpiących na nowy rodzaj hemochromatozy wieku młodzieńczego (*juvenile hemochromatosis*) (chorzy nie przekraczali 30 roku życia; klasyczna hemochromatoza związana z mutacją genu *HFE* objawia się zwykle w 5. dekadzie życia [6]) o wyjątkowo drastycznych objawach toksyczności żelaza [53]. Obecnie badania nad hepcydyną koncentrują się wokół wyjaśnienia biologicznych mechanizmów działania tego peptydu, a także nad możliwością jego leczniczego zastosowania u pacjentów z zaburzeniami metabolizmu żelaza.

STRUKTURY GENU I CZĄSTECZKI HEPCYDYNY

U człowieka gen *HAMP* leży na chromosomie 19q13 [20]. U myszy występują dwie kopie genu *HAMP1* i *HAMP2* leżące na chromosomie 11 [28]. Gen *HAMP* ma długość 2,5 kb. W części kodującej występują 3 eksony, które transkrybowane są na mRNA o długości 400 zasad. Głównym miejscem syntezy hepcydyny jest wątroba i w znacznie mniejszym stopniu serce i trzustka [47, 49]. U myszy, w trzustce ekspresja genu *HAMP2* jest znacznie większa niż genu *HAMP1* [28]. Analiza sekwencji w regionie 5' flankującym ludzkiego i mysiego genu *HAMP* pozwoliła zidentyfikować sekwencje wiążące czynniki transkrypcyjne swoiste dla wątroby: C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) i HNF4 (hepatocyte nuclear factor 4), odpowiedzialne za ekspresję genu *HAMP* [10]. Wykazano, że czynnik C/EBP α bierze udział w indukcji genów *HAMP1* i *HAMP2* przez żelazo [10].

Hepcydyna syntetyzowana jest jako 84-aminokwasowy peptyd zawierający sekwencje sygnalizacyjną niezbędną do jej ekspresji na retikulum endoplazmatycznym i sekwencję rozszczepiania prohormonów przez konwertazy. Do krążenia uwalniana jest jako peptyd o 20 lub 25 aminokwasach. Analiza sekwencji amino-

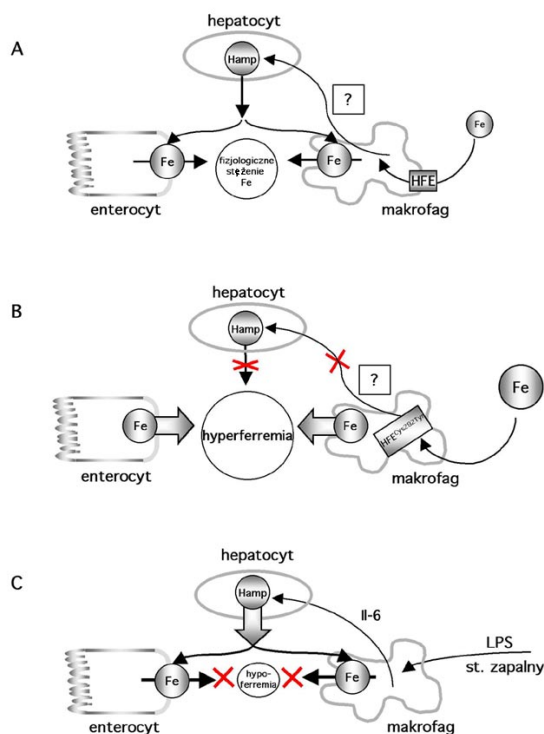
kwasowej wykazała obecność w każdej z dwóch postaci hepcydyny aż 8 cystein. U myszy hepcydyna 1 i 2 wykazują 68% identyczność sekwencji aminokwasowej [28]. Część cząsteczki hepcydyny ma postać szpilki do włosów, w której wyróżnia się pętlę i dwuramienną podstawę [27, 47]. Badania z zastosowaniem spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego wykazały, że struktura cząsteczki hepcydyny jest stabilizowana przez 4 mostki dwusiarczkowe pomiędzy cysteinami [27]. Jedno z połączeń dwusiarczkowych, leżące u podstawy pętli, występuje między sąsiadującymi z sobą cysteinami, charakteryzuje się wysoką reaktywnością chemiczną. Przypuszcza się, że odgrywa ono rolę w aktywności biologicznej hepcydyny. Hecydyna o 20 aminokwasach występuje w postaci monomerów, natomiast hepcydyna 25-aminokwasowa wykazuje tendencję do tworzenia agregatów [27].

HEPCYDYNA, PEPTYD OGRANICZAJĄCY ABSORPCJĘ ŻELAZA Z DWUNASTNICY I RECYRKULACJĘ ŻELAZA Z KOMÓREK UKŁADU SIATECZKOWO-ŚRÓDBŁONKOWEGO

Przypisanie hepcydynie funkcji czynnika hamującego absorpcję żelaza u ssaków stało się możliwe dzięki badaniom przeprowadzonym na myszach, u których całkowicie zahamowano ekspresję genu *HAMP* [41]. Niezwykłość tego odkrycia polegała na tym, że inaktywacja genu *HAMP* była niezamierzona. Okazała się ubocznym efektem ukierunkowanej mutagenyzy genu kodującego czynnik transkrypcyjny *USF2* (upstream stimulatory factor-2), leżącego na chromosomie 11, w bezpośrednim sąsiedztwie genu *HAMP*. Identyfikacji genu odpowiedzialnego za zmiany w metabolizmie żelaza u myszy *USF2*^{-/-} dokonano stosując technikę przeglądania różnicowego bibliotek cDNA, uzyskanych z wątrób myszy kontrolnych i z wątrób myszy *USF2*^{-/-}. W wyniku tej analizy wyizolowano cDNA kodujące hepcydynę. Pod względem metabolizmu żelaza fenotyp myszy *USF2*^{-/-} przypominał profil zmian obserwowany u hemochromatyków w zaawansowanym stadium choroby [6] lub u myszy z nieczynnym genem *HFE* [37]. W wątróbach, trzustkach i sercach myszy *USF2*^{-/-} stwierdzono patologicznie dużą zawartość żelaza. Odnotowano wielokrotny wzrost stężenia żelaza w osoczu oraz bliskie 100% wysycenie Tf jonami żelaza. W innym modelu myszy *USF2*^{-/-}, u których gen *HAMP* ulegał już prawidłowej ekspresji nie odnotowano żadnych zmian w metabolizmie żelaza [42]. Potwierdzenie domniemanej roli hepcydyny w regulacji absorpcji żelaza przyniosły badania z użyciem myszy transgenicznnych z nadekspresją genu *HAMP* [42]. Myszy te wykazywały drastyczny niedobór żelaza, niedokrwistość mikrocytową, a w konsekwencji zwiększoną wczesnopourodzeniową śmiertelność. Ostry niedobór żelaza u myszy z nadekspresją hepcy-

dyny widoczny był już w okresie płodowym, co skłoniło autorów do wysunięcia sugestii, że peptyd ten hamuje transport żelaza przez łożysko [42]. Potwierdzenie kluczowej roli hepcydyny w regulacji absorpcji żelaza u ssaków przyniosła analiza podłoża genetycznego niezwykle ciężkiej w skutkach hemochromatozy, występującej u członków dwóch greckich rodzin [53]. U osób tych stwierdzono marskość i zwłóknienie wątroby, hipogonadyzm, kardiomiopatię będące skutkiem toksyczności nadmiernie absorbowanego i odkładanego w organach żelaza. Jednocześnie wykazano, że chorzy byli homozygotami pod względem dwóch różnych mutacji zidentyfikowanych w regionie kodującym genu *HAMP* [53].

Status hepcydyny jako regulatora ogólnoustrojowej homeostazy żelaza nie jest jedynie związany - co zgodnie podkreślają autorzy artykułów przeglądowych [20, 44, 65] - z regulacją wchłaniania żelaza z przewodu pokarmowego. U wspomnianych już myszy z niedoborem hepcydyny, charakteryzujących się ogólnoustrojowym przeładowaniem żelazem stwierdzono stosunkowo niewielką zawartość tego metalu w śledzionie. Na podstawie tej obserwacji autorzy wysunęli przypuszczenie, że hepcydyna wpływa na zahamowanie recyrkulacji żelaza z komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego i zaproponowali model dwukierunkowego działania hepcydyny: na enterocyty i makrofagi [41]. Koncepcję tę potwierdziły badania na myszach z nadekspresją genu *HAMP*. Oznaczono u nich małe stężenie żelaza w osoczu, obniżone wartości parametrów hematologicznych typowe dla ostrej niedokrwistości oraz podwyższone stężenie żelaza w śledzionie [42]. Ogólny obraz zmian w metabolizmie żelaza zarejestrowany u tych myszy przypominał zaburzenia określane jako zespół niedokrwistości związanej z przewlekłym stanem zapalnym, występujące u ludzi i zwierząt w czasie przewlekłych chorób bakteryjnych i nowotworowych [64]. Przypuszczenia co do funkcji biologicznej hepcydyny jako głównego mediatora niedokrwistości przewlekłego stanu zapalnego znalazły oparcie w wynikach wcześniejszych badań, w których wykazano, że silnym stymulatorem genu *HAMP* jest lipopolisacharyd (LPS) ze ściany komórkowej *Escherichia coli* [49]. Wkrótce potem wykazano, że u myszy ze stanem zapalnym wywołanym iniekcją oleju terpentynowego ekspresja mRNA *HAMP* jest zwiększona 6-krotnie. Jednocześnie u myszy tych odnotowano 2-krotny spadek poziomu żelaza w osoczu [43]. Co ciekawe, u myszy, u których zainaktywowano gen *HAMP*, iniekcja oleju terpentynowego nie powodowała hipoferremii [43]. Kolejnych argumentów dostarczyły obserwacje pacjentów z gruczolakami wątroby cierpiących na ostrą, niepoddającą się leczeniu niedokrwistość



Ryc. 3. Hipotetyczne mechanizmy regulacji ekspresji hepcydyny i dwukierunkowy, komórkowy model jej działania. **A** – stan fizjologiczny, **B** – hemochromatoza, **C** – stan zapalny. Regulacja ekspresji hepcydyny odbywa się w wątrobie na osi makrofag (komórka Kupffera) → hepatocyt. Synteza hepcydyny odbywa się w hepatocytach, ale sygnał do zmiany ekspresji genu *HAMP* pochodzi prawdopodobnie z makrofagów [20,40]. Hepcydyna wpływa na zahamowanie uwalniania żelaza do krążenia zarówno z enterocytów absorpcyjnych jak i z makrofagów układu siateczkowo-śródbłonkowego. W sytuacji fizjologicznej (**A**) żelazo za pośrednictwem białka HFE występującego na komórkach Kupffera [7] wpływa na konstytutywny poziom ekspresji hepcydyny w hepatocytach, która z kolei dostosowuje absorpcję żelaza i jego recykulację z makrofagów do potrzeb erytropoezy. W hemochromatozie (**B**), sygnał niezbędny do ekspresji genu *HAMP*, związany z podwyższonym poziomem żelaza nie jest przekazywany na skutek braku prawidłowej ekspresji białka HFE na komórkach Kupffera, spowodowanego mutacją Cys282Tyr. W efekcie następuje zahamowanie ekspresji hepcydyny, czego konsekwencją jest podwyższona absorpcja żelaza i ogólnoustrojowe obciążenie organizmu żelazem. Dotąd niezidentyfikowano mediatora pośredniczącego w przekazywaniu sygnału do syntezy hepcydyny z makrofagów do hepatocytów. Czynniki wywołujące stan zapalny (**C**), np. LPS, wpływają na uwalnianie przez makrofagi do krążenia licznych mediatorów, wśród nich IL-6, która stymuluje ekspresję hepcydyny w hepatocytach i jej uwalnianie do krążenia [40]. Następstwem indukcji genu *HAMP* jest zablokowanie wchłaniania żelaza przez enterocyty i recykulacji żelaza przez makrofagi, co prowadzi do głębokiej hipoferemii.

(refractory anemia) [63]. Niedokrwistość ta ustępowała spontanicznie w wyniku operacyjnego usunięcia gruczołka lub po przeszczepie wątroby. Stwierdzono, że główną rolę w patogenezie niedokr-

wistości u tych osób odgrywa hepcydyna nadmiernie syntetyzowana w komórkach gruczołka i uwalniana przez nie do krążenia. Niedawno zakwalifikowano hepcydynę do grupy białek ostrej fazy stanu zapalnego, którego synteza jest indukowana w hepatocytach przez interleukinę 6 (ryc. 3C) [40]. Funkcja hepcydyny jako mediatora niedokrwistości przewlekłego stanu zapalnego współgra z jej pierwotnie odkrytą funkcją kationowego peptydu lizującego komórki bakteryjne [33, 47]. Obniżenie stężenia jonów żelaza w płynach biologicznych, w tym w osoczu krwi, jest jednym z podstawowych mechanizmów obronnych ssaków uruchamianym w odpowiedzi na infekcje bakteryjne i wirusowe. Celem jest ograniczenie przez organizm gospodarza dostępności jonów żelaza niezbędnych do rozwoju chorobotwórczych mikroorganizmów [62].

REGULACJA SYNTETY HEPCYDYNY PRZEZ ŻELAZO I JEJ ZABURZENIE W HEMOCHROMATOZIE

Obserwacja Pigeon i współpr. potwierdzona następnie przez innych autorów [39, 43], wskazująca na stymulację ekspresji hepcydyny przez żelazo, wpisuje się w schemat pętli regulacyjnej, w obrębie której wysoka podaż egzogennej żelaza powoduje wzrost ekspresji hepcydyny w wątrobie, zwiększone jej uwalnianie do krążenia a następnie ograniczenie przez ten peptyd absorpcji żelaza z przewodu pokarmowego. Nie zawsze jednak wysoki poziom żelaza w wątrobie jest czynnikiem decydującym o zwiększonej syntezie hepcydyny. U myszy z niedokrwistością hemolityczną, wywołaną podaniem fenyldrazyny, ekspresja hepcydyny była mniejsza niż u myszy kontrolnych, mimo podwyższonego poziomu żelaza w wątrobie spowodowanego intensywnym usuwaniem hemoglobiny z krążenia [43]. Podobnie u myszy, które nastrzykiwano dekstranem żelaza, i u których następnie wywołano lizę erytrocytów, stwierdzono drastycznie obniżoną ekspresję mRNA *HAMP* w porównaniu z myszami kontrolnymi, którym podano tylko dekstran żelaza [43]. Z badań tych wynika, że regulacja syntezy hepcydyny w wątrobie pozostaje pod dominującą kontrolą hipotetycznego czynnika sygnalizującego wzmożone tempo erytropoezy w szpiku kostnym, którego działanie znosi stymulujący wpływ żelaza na ekspresję genu *HAMP*. Badania te stanowią istotny krok w zrozumieniu biologicznego mechanizmu występowania hemosyderozy u pacjentów chorych na talasemię [46] i syderoblastyczną anemię [11]. Inną patologią, w której stymulujące działanie żelaza na ekspresję mRNA *HAMP* ulega zniesieniu jest hemochromatoza związana z mutacją genu *HFE* (ryc. 3B). Należy zaznaczyć, że chociaż monitorowanie mutacji genu *HFE* u osób potencjalnie zagrożonych hemochromatozą

umożliwia rozpoznanie choroby przed wystąpieniem objawów klinicznych, to mechanizm molekularny odpowiedzialny za rozregulowanie absorpcji żelaza w hemochromatozie do tej pory nie został wyjaśniony. Do prawidłowej ekspresji białka HFE na błonie komórkowej niezbędne jest jego występowanie w postaci heterodimeru z β_2M [14]. Wykazano, że heterodimer β_2M -HFE tworzy kompleks z TfR1 [66] i jest kompetytorem Tf w wiązaniu się z receptorem [36]. Skutkiem mutacji genu *HFE* jest zamiana aminokwasów w pozycji 282 (Cys282Tyr) w domenie HFE odpowiedzialnej za tworzenie heterodimeru z β_2M , i w konsekwencji zanik ekspresji HFE na błonie komórkowej [14]. Mimo że poznano mechanizm interakcji HFE z TfR1, to wpływ HFE na transport żelaza do komórki pozostaje przedmiotem kontrowersji [52, 60]. Nie wiadomo również, jaką rolę odgrywa brak ekspresji białka HFE na błonie komórkowej w zwiększonej absorpcji żelaza w hemochromatozie. Kilka zespołów badawczych stwierdziło zmniejszoną ekspresję hepcydyny zarówno u pacjentów chorych na hemochromatozę zależną od białka HFE [8, 21] jak i w oparciu o genetyczne modele imitujące hemochromatozę u myszy [1, 39, 45]. Interesujących wniosków dostarczyła analiza porównawcza ekspresji genów związanych z metabolizmem żelaza, przeprowadzona między myszami *HFE*^{-/-}, *HFE*^{S82A/S82A} (odpowiednik mutacji genu *HFE* u ludzi) a myszami z prawidłową ekspresją genu *HFE*, ale nastrzykiwanymi dekstranem żelaza [39]. Stwierdzono, że gen *HAMP* jest jednym z genów, których ekspresja jest przeciwnie regulowana w zależności od modelu przeładowania myszy żelazem. W wyniku tzw. pierwotnego przeładowania (będącego skutkiem zwiększonej absorpcji żelaza u myszy z hemochromatozą) maleje ekspresja mRNA *HAMP*. Przy wtórnym przeładowaniu żelazem (iniekcja myszy dekstranem żelaza) ekspresja mRNA *HAMP* ulega indukcji [39]. Ciekawej obserwacji dokonali Nicolas i współpracownicy, którzy u myszy *HFE*^{-/-} i *HFE*^{+/-} porównywali ekspresję mRNA *HAMP* jako pochodną zawartości żelaza w wątrobie [45]. Zarówno u homozygot jak i heterozygot odnotowano dodatnią korelację między zawartością żelaza w wątrobie a ekspresją mRNA *HAMP*. Jednakże przy tych samych poziomach żelaza w wątrobie ekspresja mRNA *HAMP* była zdecydowanie większa u myszy *HFE*^{+/-} niż u myszy *HFE*^{-/-}. Wyniki te wskazują, że odpowiedni poziom ekspresji białka HFE jest niezbędny w szlaku sygnalizacyjnym, poprzez który żelazo wpływa na zwiększenie ekspresji genu *HAMP* (ryc. 3B). W tej samej pracy wskazano również na możliwość korekty patologicznego obrazu metabolizmu żelaza u myszy z niedoborem białka HFE poprzez zwiększenie u nich ekspresji genu *HAMP*. W wyniku krzyżowania myszy *HFE*^{-/-} z myszami z konstytutywną nadekspresją genu

HAMP otrzymano potomstwo, u którego nadmierna akumulacja żelaza została zahamowana [45].

Wiele danych wskazuje na to, że chociaż komórkami syntetyzującymi hepcydynę są niemal wyłącznie hepatocyty, to sygnał do zwiększonej ekspresji genu przez żelazo pochodzi od makrofagów (ryc. 3). Farmakokinetyka dekstranu żelaza, wypróbowanego związku indukującego mRNA *HAMP*, po parenteralnym podaniu myszom, wykazuje, że 90% żelaza pochodzącego z tego preparatu jest metabolizowane przez makrofagi [22]. Badania Nemetha i współpracownicy dowiodły, że hepatocyty inkubowane z solami żelaza wykazują zmniejszoną ekspresję mRNA *HAMP*, natomiast hepatocyty hodowane w pożywce, w której uprzednio, przez 16 godzin z solami żelaza inkubowano makrofagi wykazywały zwiększoną ekspresją mRNA *HAMP* [40]. Wśród hipotetycznych czynników, poprzez które może być przekazywany sygnał do indukcji genu *HAMP* wymienia się wysycenie Tf jonami żelaza [18, 21] i żelazo osocza niezwiązane z Tf (non-transferrin-bound iron - NTBI) [21]. Według modelu zaproponowanego przez Frazera i Andersona punktem wyjścia do regulacji ekspresji hepcydyny jest ilościowa proporcja cząsteczek TfR1 na błonie komórkowej makrofagów do cząsteczek wysyczonej jonami żelaza transferryny (Tf-Fe₂), cyrkulującej w osoczu. Zmiana tej proporcji jest sygnałem odczytywanym przez drugi receptor transferryny - TfR2, który jest kompetytorem TfR1 w wiązaniu Tf-Fe₂ oraz przez HFE, które jest kompetytorem Tf-Fe₂ w wiązaniu się z TfR1. Przy nadmiarze żelaza w organizmie zwiększony poziom Tf-Fe₂ w osoczu, a także zmniejszona ekspresja TfR1 powodują, że ulega osłabieniu interakcja HFE z TfR1, zwiększa się natomiast wiązanie Tf-Fe₂ do TfR2. Większa liczba wolnych cząsteczek HFE oraz ilościowa przewaga kompleksu TfR2-Tf-Fe₂ nad kompleksem TfR1-Tf-Fe₂ stanowią sygnał do zwiększonej syntezy hepcydyny [19].

HIPOTETYCZNE MOLEKULARNE MECHANIZMY SYGNALIZACJI PRZEZ HEPCYDYNĘ

Najbardziej aktualnym zagadnieniem w badaniach nad regulacją metabolizmu żelaza przez hepcydynę jest molekularny mechanizm działania tego peptydu. Dwukierunkowe oddziaływanie hepcydyny, polegające na hamowaniu transportu żelaza przez enterocyty wierzchołkowe i hamowaniu uwalniania żelaza przez makrofagi sugeruje istnienie wspólnego mechanizmu dla dwóch typów komórek. Białkiem biorącym udział w transporcie żelaza zarówno z enterocytów wierzchołkowych jak i z makrofagów jest ferroportyna [35].

Hipotezy formułowane przez zespoły zaangażowane od początku w badania nad hepcydyną [19, 45] oraz wstępne wyniki wskazują rzeczywiście na ferroportynę jako białko, którego ekspresja ulega zahamowaniu w odpowiedzi na hepcydynę [68]. Wyniki innych badań przeprowadzonych na linii komórkowej CACO-2, modelu ludzkich komórek nabłonka jelita sugerują, że hepcydyna hamuje ekspresję białka DMT1 [67]. Niezależnie od białek aktywnych w transporcie żelaza, których ekspresja może być regulowana przez hepcydynę, zagadnieniem otwartym i dotychczas niezbadanym pozostaje wewnątrzkomórkowa sygnalizacja indukowana przez ten peptyd. Sądząc po intensywności badań nad hepcydyną (doniesienia dotyczące

tego peptydu zdominowały ostatni kongres BioIron 2003, The International BioIron Society World Congress on Iron Metabolism, May 4-9, 2003 Bethesda, Md. USA) już wkrótce można oczekiwać w tej dziedzinie nowych odkryć. Niewątpliwie nadrzędnym celem wszystkich badań jest frapująca perspektywa zastosowania hepcydyny w terapii hemochromatozy lub sterowania jej ekspresją w przewlekłych stanach zapalnych u ludzi.

Po przyjęciu pracy do druku Laftah i wsp. [34a] opublikowali po raz pierwszy wyniki doświadczeń, w których wykazali zmniejszoną absorpcję żelaza u myszy, po dożylniej iniekcji syntetycznej hepcydyny.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Ahmad K.A., Ahmann J.R., Migas M.C., Waheed A., Britton R.S., Bacon B.R., Sly W.S., Fleming R.E.: Decreased liver hepcidin expression in the hfe knockout mouse. *Blood Cells Mol. Dis.* 2002, 29, 361-366.
- [2] Aisen P., Enns C., Wessling-Resnick M.: Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2001, 33, 940-959.
- [3] Andrews N. C.: Disorders of iron metabolism. *N. Engl. J. Med.* 1999, 341, 1986-1995.
- [4] Andrews N.C.: Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nature Rev.* 2000, 1, 208-216.
- [5] Andrews N.C.: Iron metabolism: iron deficiency and iron overload. *Annu. Rev. Genomics. Genet.* 2000, 01, 75-98.
- [6] Bacon B.R.: Hemochromatosis: diagnosis and management. *Gastroenterology* 2001, 120, 718-725.
- [7] Bastin J.M., Jones M., O'Callaghan C.A., Schimanski L., Mason D.Y., Townsend A.R.M.: Kupffer cell staining by an HFE-specific monoclonal antibody: implications for hereditary haemochromatosis. *Br. J. Haematol.* 1998, 103, 931-941.
- [8] Bridle K.R., Frazer D.M., Wilkins S.J., Dixon J.L., Purdie D.M., Crawford D.H.G., Subramaniam V.N., Powell L.W., Anderson G.J., Ramm G.A.: Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet* 2003, 361, 669-673.
- [9] Canonne-Hergaux F., Delaby C., Hetet G., Grandchamp B., Beaumont C.: Cellular and molecular approaches to study heme iron recycling in macrophages. 2003, The International BioIron Society World Congress on Iron Metabolism. Final Program & Abstract Book:34.
- [10] Courselaud B., Pigeon C., Inoue Y., Inoue J., Gonzalez F., Leroyer P., Gilot D., Boudjema K., Guguen-Guillouzo C., Brissot P., Loreal O., Ilyin G.: C/EBP α regulates hepatic transcription of hepcidin, an antimicrobial peptide and regulator of iron metabolism. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 41163-41170.
- [11] Cox T.C., Bottomley S.S., Wiley J.S., Bawden M.J., Matthews C.S., May B.K.: X-linked pyridoxine-responsive sideroblastic anemia due to a Thr388-to-Ser substitution in erythroid 5-aminolevulinic synthase. *N. Engl. J. Med.* 1994, 330, 675-679.
- [12] Donovan A., Brownlie A., Zhou Y., Shepard J., Pratt S.J., Moynihan J., Paw B.H., Drejer A., Barut B., Zapata A., Law T.C., Brugnara C., Lux S.E., Pinkus G.S., Pinkus J.L., Kingsley P.D., Palis J., Fleming M.D., Andrews N.C., Zon L.I.: Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 2000, 403, 776-781.
- [13] Feder J.N., Gnirke A., Thomas W., Tsuchihashi Z., Ruddy D.A., Basava A., Dormishian F., Domingo R. jr., Ellis M.C., Fullan A., Hinton L.M., Jones N.L., Kimmel B.E., Kronmal G.S., Lauer P., Lee V.K., Loeb D.B., Mapa F.A., McClelland E., Meyer N.C., Mintier G.A., Moeller N., Moore T., Morikang E., Wolff R.K.: A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat. Genet.* 1996, 13, 399-408.
- [14] Feder J.N., Tsuchihashi Z., Irrinki A., Lee V.K., Mapa F.A., Morikang E., Prass C.E., Starnes S.M., Wolff R.K., Parkkila S., Sly W.S., Schatzman R.C.: The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 14025-14048.
- [15] Feder J.N.: The hereditary hemochromatosis gene (HFE): a MHC class I-like gene that functions in the regulation of iron homeostasis. *Immunol. Res.* 1999, 20, 175-185.
- [16] Fleming M.D., Trenor C.C. 3rd, Su M.A., Foerzler D., Beier D.R., Dietrich W.F., Andrews N.C. 1: Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat. Genet.* 1997, 16, 383-386.
- [17] Fleming R.E., Sly W.S.: Hepcidin: a putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001, 98, 8160-8162.
- [18] Frazer D.M., Wilkins S.J., Becker E.M., Vulpe C.D., McKie A.T., Trinder D., Anderson G.J.: Hepcidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology* 2002, 123, 835-844.
- [19] Frazer D.M., Anderson G.J.: The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues? *Blood Cell. Mol. Dis.* 2003, 30, 288-297.
- [20] Ganz T.: Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 2003, 102, 783-788.
- [21] Gehrke S.G., Kulaksiz H., Herman T., Riedel H.-D., Veltkamp C., Stremmel V.: Expression of hepcidin in hereditary hemochromatosis: evidence for a regulation in response to the serum transferrin saturation and to non-transferrin-bound iron. *Blood* 2003, 102, 371-376.
- [22] Geisser P., Baer M., Schaub E.: Structure/histotoxicity relationship of parenteral iron preparations. *Arzneim. -Forsch./Drug Res.* 1992, 42 (II), 1439-1452.
- [23] Gutteridge J.M., Halliwell B.: Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. NY Acad. Sci.* 2000, 899, 136-47.
- [24] Harris Z.L., Durlay A.P., Man T.K., Gitlin J.D.: Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 10812-10817.
- [25] Harrison P.M., Arosio P.: The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1996, 1275, 161-203.
- [26] Hellman N.E., Kono S., Miyajima H., Gitlin J.D.: Biochemical analysis of a missense mutation in aceruloplasminemia. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 1375-1380.
- [27] Hunter H.N., Fulton D.B., Ganz T., Vogel H.J.: The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 37597-37602.
- [28] Ilyin G., Courselaud B., Troadec M. B., Pigeon C., Alizadeh M., Leroyer P., Brissot P., Loreal O.: Comparative analysis of mouse hepcidin 1 and 2 genes: evidence for different patterns of expression and co-inducibility during iron overload. *FEBS Lett.* 2003, 542, 22-26.

- [29] Kakhlon O., Cabantchik Z.I.: The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic. Biol. Med.* 2002, 33, 1037-1046.
- [30] Kawabata H., Yang R., Hiramata T., Vuong P.T., Kawano S., Gombart A.F., Koefler H. P.: Molecular cloning of transferrin receptor 2. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 20826-20832.
- [31] Kawashima A., Oda Y., Yachie A., Koizumi S., Nakanishi I.: Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case. *Hum. Pathol.* 2002, 33, 125-130.
- [32] Kimberly K., Bonkowsky H.L.: Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. *Proc. Assoc. Am. Phys.* 1999, 111, 438-447.
- [33] Krause A., Neitz S., Magert H.J., Schultz A., Forstmann W.-G., Schultz-Knappe P., Adermann K.: LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* 2000, 480, 147-150.
- [34] Kristiansen M., Graversen J.H., Jacobsen C., Sonne O., Hoffman H.-J., Alex Law S.K., Moestrup S.K.: Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001, 409, 198-201.
- [34a] Laftah A.R., Ramesh B., Simpson R.J., Solanky N., Bahram S., Schumann K.: Effect of hepcidin on intestinal iron absorption in mice. *Blood* 2004, Jan. 29 [Epub. ahead of print].
- [35] Le N.T.V., Richardson D.R.: Ferroportin: a new iron export molecule? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2002, 34, 103-108.
- [36] Lebron J.A., West A.P., Bjorkman P.J.: The hemochromatosis protein HFE competes with transferrin for binding to the transferrin receptor. *J. Mol. Biol.* 1999, 294, 239-245.
- [37] Levy J.E., Montross L.K., Cohen D.E., Fleming M.D., Andrews N.C.: The C282Y mutation causing hereditary hemochromatosis does not produce a null allele. *Blood* 1999, 94, 9-11.
- [38] McKie A.T., Barrow D., Latunde-Dada G. O., Rolfs A., Sager G., Mudaly E., Mudaly M., Richardson C., Barlow D., Bomford A., Peters T.J., Raja K.B., Shirali S., Hediger M.A., Farzaneh F., Simpson R.J.: An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* 2001, 291, 1755-1759.
- [39] Muckenthaler M., Roy C.N., Custodio A.O., Minana B., deGraaf J., Montross L.K., Andrews N.C., Hentze M.W.: Regulatory defects in liver and intestine implicate abnormal hepcidin and Cyb5l1 expression in mouse hemochromatosis. *Nat. Genet.* 2003, 34, 102-107.
- [40] Nemeth E., Valore E.V., Territo M., Schiller G., Lichtenstein A., Ganz T.: Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 2003, 101, 2461-2463.
- [41] Nicolas G., Bennoun M., Devaux I., Beaumont C., Grandchamp B., Kahn A., Vaulont S.: Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor (USF2) knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 8780-8785.
- [42] Nicolas G., Bennoun M., Porteu A., Mativet S., Beaumont C., Grandchamp B., Siriti M., Sawadogo M., Kahn A., Vaulont S.: Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99, 4596-4601.
- [43] Nicolas G., Chauvet C., Viatte L., Danan J.L., Bigard X., Devaux I., Beaumont C., Kahn A., Vaulont S.: The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J. Clin. Invest.* 2002, 110, 1037-1044.
- [44] Nicolas G., Viatte L., Bennoun M., Beaumont C., Kahn A., Vaulont S.: Hepcidin, a new iron regulatory peptide. *Blood Cells Mol. Dis.* 2002, 29, 327-335.
- [45] Nicolas G., Viatte L., Lou D.Q., Bennoun M., Beaumont C., Kahn A., Andrews N.C., Vaulont S.: Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. *Nat. Genet.* 2003, 34, 97-101.
- [46] Olivieri N.F.: The β -thalassemias. *N. Engl. J. Med.* 1999, 341, 99-109.
- [47] Park C.H., Valore E.V., Waring A.J., Ganz T.: Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 7806-7810.
- [48] Parkkila S., Niemelä O., Britton R.S., Fleming R.E., Waheed A., Bacon B.R., Sly W.S.: Molecular aspects of iron absorption and HFE expression. *Gastroenterology* 2001, 121, 1489-1496.
- [49] Pigeon C., Ilyin G., Courselaud B., Leroyer P., Turlin B., Brissot P., Loreal O.: A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 7811-7819.
- [50] Ponka P.: Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood* 1997, 89, 1-25.
- [51] Ponka P., Lok C.N.: The transferrin receptor: role in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1999, 31, 1111-1137.
- [52] Riedel H.D., Muckenthaler M.U., Gehrke S.G., Mohr I., Brennan K., Herrmann T., Fischer B.A., Hentze M.W., Stremmel W.: HFE downregulates iron uptake from transferrin and induces iron-regulatory protein activity in stably transfected cells. *Blood* 2002, 94, 3915-3921.
- [53] Roetto A., Papanikolaou G., Politou M., Alberti F., Gitrelli D., Christakis J., Loukopoulos D., Camaschella C.: Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat. Genet.* 2003, 33, 21-22.
- [54] Roy C.N., Enns C.A.: Iron homeostasis: new tales from the crypt. *Blood* 2000, 96, 4020-4027.
- [55] Roy C.N., Andrews N.C.: Recent advances in disorders of iron metabolism: mutations, mechanisms and modifiers. *Hum. Mol. Gen.* 2001, 10, 2181-2186.
- [56] Townsend A., Drakesmith H.: Role of HFE in iron metabolism, hereditary hemochromatosis, anaemia of chronic disease, and secondary iron overload. *Lancet* 2002, 359, 786-790.
- [57] Trenor C.C. III, Campagna D.R., Sellers V.M., Andrews N.C., Fleming M.D.: The molecular defect in hypotransferrinemic mice. *Blood* 2000, 96, 1113-1118.
- [58] Uzel C., Conrad M.E.: Absorption of heme iron. *Semin. Hematol.* 1998, 35, 27-34.
- [59] Vulpe C.D., Kuo Y.M., Murphy T.L., Cowley L., Askwith C., Libina N., Gitschier J., Anderson G.J.: Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the *sla* mouse. *Nat. Genet.* 1999, 21, 195-199.
- [60] Waheed A., Grubb J.H., Zhou X.Y., Tomatsu S., Fleming R.E., Costaldi M.E., Britton R.S., Bacon B.R., Sly W.S.: Regulation of transferrin-mediated iron uptake by HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis. *Blood* 2002, 99, 3117-3122.
- [61] Wächtershäuser G.: Evolution of the first metabolic cycles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87, 200-204.
- [62] Weinberg E.D.: The development of awareness of iron-withholding defense. *Perspect. Biol. Med.* 1993, 36, 215-221.
- [63] Weinstein D.A., Roy C.N., Fleming M.D., Loda M.F., Wolfsdorf J.I., Andrews N.C.: Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood* 2002, 100, 3776-3781.
- [64] Weiss G.: Iron and anemia of chronic disease. *Kidney Int. Suppl.* 1999, 69, S12-S17.
- [65] Wessling-Resnick M.: A possible link between hepcidin and regulation of dietary iron absorption. *Nutr. Rev.* 2002, 60, 371-374.
- [66] West A. P.jr., Giannetti A.M., Herr A.B., Bennet M.J., Nangiana J.S., Pierce J.R., Weiner L.P., Snow P.M., Bjorkman P.J.: Mutational analysis of the transferrin receptor reveals overlapping HFE and transferrin binding sites. *J. Mol. Biol.* 2001, 313, 385-397.
- [67] Yamaji S., Ramesh B., Sharp P., Srai S.K. 2003: The antimicrobial peptide hepcidin decreases iron uptake by human intestinal CACO-2 cells. The International BioIron Society World Congress on Iron Metabolism. Final Program & Abstract Book: 122
- [68] Yeh K.Y., Yeh M., Glass J.: Hepcidin regulation of ferroportin 1 in the liver and intestine of the rat. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2003, [Epub ahead of print].