

Received: 2013.11.14
Accepted: 2014.02.02
Published: 2014.05.14

Metabolizm hemu jako integralny element homeostazy żelaza*

Heme metabolism as an integral part of iron homeostasis

Paweł Lipiński, Rafał R. Starzyński, Agnieszka Stys, Anna Gajowiak, Robert Staroń

Zakład Biologii Molekularnej, Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu

Streszczenie

Hem jest kompleksem żelaza z protoporfiryną IX i pełni funkcję kofaktora w białkach hemowych biorących udział w licznych, istotnych dla komórki i dla całego organizmu procesach biologicznych. Dostarczenie odpowiedniej ilości żelaza do syntezy hemu jest jednym z podstawowych znamion wewnątrzkomórkowej homeostazy żelaza. Biologiczna dostępność żelaza dla dwóch głównych szlaków metabolicznych przebiegających z udziałem tego mikroelementu w komórce – syntezy hemu i biogenezy centrów żelazowo-siarkowych ([Fe-S]) jest regulowana przez potranskrypcyjny system IRP/IRE. Prawidłowy przebieg biogenezy centrów [Fe-S] jest istotny dla syntezy hemu, gdyż centra [Fe-S] determinują aktywność białka regulatorowego IRP1 oraz ferrochelatazy, białka odpowiedzialnego za włączanie jonu żelazowego do pierścienia protoporfiryny IX. Dostarczenie żelaza do syntezy hemu i hemoglobiny w prekursorach erytrocytów – erytroblastach, jest nieodzownym warunkiem ogólnoustrojowej homeostazy tego mikroelementu. Podstawowe znaczenie w tym procesie ma odzyskiwanie żelaza ze starych, fagocytowanych przez makrofagi tkankowe erytrocytów, w wyniku enzymatycznej degradacji zawartego w nich hemu oraz recyrkulacja uwolnionego żelaza do układu krążenia, skąd w kompleksie z transferyną jest dostarczane do syntezy hemu w erytroblastach. Molekularna koordynacja tych procesów opiera się na aktywności oksygenazy hemowej 1, białek IRP1 i IRP2 oraz na funkcjonowaniu osi regulatorowej hepacydyna-ferroportyna. Badania ostatnich lat wskazują na istnienie u ssaków rozbudowanego systemu białek biorących udział w wewnątrzkomórkowym i ogólnoustrojowym transporcie hemu. Biologiczna rola tego systemu ma szczególne znaczenie w przypadkach wzrostu stężenia wolnego hemu do poziomu toksycznego zarówno w skali całego organizmu (hemoliza wewnątrznaczyniowa), jak również lokalnie, w komórkach o intensywnym metabolizmie hemu, takich jak makrofagi i erytroblasty.

Słowa kluczowe:

erytroblast • erytrofagocytoza • ferroportyna • hem • IRP • IRE • oksygenaza hemowa • żelazo

Summary

Heme, a ferrous iron protoporphyrin IX complex, is employed as a prosthetic group in a number of diverse heme proteins that participate in important cellular and systemic physiological processes. Provision of an adequate amount of iron for heme biosynthesis is one of the elemental hallmarks of intracellular iron homeostasis. In the cell the bioavailability of iron for the two main iron biological pathways – heme synthesis and the biogenesis of iron-sulfur clusters ([Fe-S]) – is mainly regulated by the IRP/IRE posttranscriptional system. The biogenesis of [Fe-S] centers is crucial for heme synthesis because these co-factors determine the activity

*Artykuł opracowano w ramach projektów nr 2011/01/B/N223/00632 i nr 2012/05/E/NZ5/02126 finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki.

of IRP1 and that of ferrochelatase, an enzyme responsible for the insertion of an iron into protoporphyrin IX to produce heme. On the other hand, delivery of iron for heme and hemoglobin synthesis in erythroblasts, precursors of erythrocytes in bone marrow, is an indispensable element of body iron homeostasis. This process relies on the recovery of iron from senescent red blood cells through the enzymatic degradation of heme molecules and recycling of iron to the circulation. Molecular coordination of these processes involves the activity of heme oxygenase 1, IRP1 and IRP2 as well as the functioning of the hepcidin-ferroportin regulatory axis. Recent studies show in mammals the existence of an expanded system of proteins involved in the transport of intact heme molecules at the cellular and systemic levels. The biological role of this system is of particular importance when the concentration of free heme reaches a toxic level in the body (intravascular hemolysis) as well as locally in cells having intensive heme metabolism such as erythroblasts and macrophages.

Key words: erythroblast • erythrophagocytosis • ferroportin • heme • IRP • IRE • heme oxygenase • iron

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1102284>

Word count: 5413
Tables: –
Figures: 2
References: 112

Adres autora: dr hab. Paweł Lipiński, Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec, ul. Postępu 36a, 05-552 Magdalenka, e-mail: p.lipinski@ighz.pl

Wykaz skrótów: **ALAS** – syntaza aminolewulinowa (aminolevulinic acid synthase), **Bach1** – BRCA1-associated C-terminal helicase 1, **BMP** – białko morfogenetyczne kości (bone morphogenetic protein), **Cp** – ceruloplazmina, **DCYTB** – dwunastniczy cytochrom b (duodenal cytochrome b), **DMT1** – transporter metali dwuwartościowych (divalent metal transporter 1), **FBXL5** – F box and leucine-rich repeat protein 5, **Fech** – ferrochelataza, **FLVCR** – feline leukemia virus sub-group cellular receptor, member 2, **FPN** – ferroportyna, **Ft** – ferrytyna, **GRX5** – glutaredoksyna 5, **Hb** – hemoglobina, **HCP1** – heme carrier protein 1, **HIF** – czynnik indukowany przez hipoksję (hypoxia inducible factor), **HO** – oksygenaza hemowa, **HRG** – heme responsive gene, **Hx** – hemopeksyna, **IRE** – iron responsive element, **IRP** – iron regulatory protein, **LIP** – zmienna pula żelaza (labile iron pool), **MARE** – Maf-recognition element, **Mfrn1** – mitoferrytyna 1, **Nramp1** – natural resistance-associated macrophage protein 1, **Nrf2** – nuclear factor erythroid 2-related factor 2, **PCBP1** – poly (rC) binding protein 1, **PPIX** – protoporfiryna IX, **Tf** – transferyna, **TfR1** – receptor transferyny 1, **TNF** – czynnik martwicy nowotworu (tumor necrosis factor).

WSTĘP

Żelazo jest funkcjonalnym komponentem grup prostetycznych, takich jak: hem, centra żelazowo-siarkowe [Fe-S] oraz 1- lub 2-atomowe centra żelazowe, które determinują aktywności i funkcje wielu białek niezbędnych do prawidłowego przebiegu głównych procesów biologicznych. Hem jest związkiem żelaza z protoporfiryną IX. Jest to układ makrocycliczny, w którym cztery pierścienie pirolowe połączone są grupami metinowymi (=CH-). Jon żelaza jest skoordynowany centralnie z czterema atomami azotu pierścieni pirolowych poprzez dwa wiązania koordynacyjne i dwa kowalencyjne. Na funkcjonalną biologiczną uniwersalność hemu jako kofaktora wpływa bezpośrednie otoczenie w miejscu jego wiązania w cząsteczce białka, dzięki któremu reaktywność hemu jest dostosowana do specyfiki konkretnej reakcji. Najbardziej

istotnymi elementami tego otoczenia są: liczba pochodzących od białka osiowych ligandów, dostępność hemu dla pozabiałkowych ligandów, rozmieszczenie oraz polaryzacja i ładunek elektryczny grup występujących wokół miejsca wiązania hemu [65]. Istotnym elementem reaktywności hemu jest typ grupy hemowej (hem *b* lub hem *c*), który jest determinowany przez rodzaj podstawników w pierścieniu porfiryńowym. Hem *b* jest niekowalencyjnie związany z białkiem [65]. Hem *c* jest związany z białkiem na ogół dwoma kowalencyjnymi wiązaniami tioeterowymi utworzonymi między resztami cysteinowymi (Cys) a grupami winylowymi protoporfiryny [5]. Chociaż białka zawierające hem *c* mają różne struktury, funkcje hemu *c* są mniej zmienne niż funkcje hemu *b*. Przy tym samym typie wiązania hemu w cząsteczce białka, zakres potencjału redukującego hemu *c* (od -450 do +380 mV) jest znacznie większy od zakresu potencjału hemu *b* (od -150

do +380 mV) [102]. Hem c występuje w cytochromach c i służy do transferu elektronów zmieniając na przemian swój stan utlenienia ze zredukowanego – Fe(II) na utleniony – Fe(III).

Białka hemowe biorą udział w licznych procesach biologicznych, takich jak: transport elektronów, transport i magazynowanie tlenu, kataliza biochemiczna, detekcja stężenia gazów biologicznych (O_2 , NO, CO), regulacja ekspresji genów, regulacja rytmu dobowego oraz synteza microRNA [52]. Żelazo związane w cząsteczkach hemu stanowi największą część żelaza zawartego w organizmie – około 70%. Składa się na to żelazo występujące przede wszystkim w grupach hemowych hemoglobiny i mioglobiny. Chociaż ilościowy udział żelaza występującego w pozostałych białkach hemowych jest znacznie mniejszy (<1%), to jednak miarą jego biologicznego znaczenia są funkcje takich białek hemowych jak: katalazy, peroksydazy, syntazy tlenu azotu, cytochromy, białko DGCR8 (Di George Critical Region 8).

Dostarczenie odpowiedniej ilości żelaza do syntezy hemu w każdej komórce organizmu ma na celu zachowanie ciągłości reakcji biochemicznych przebiegających z udziałem tego kofaktora i jest jednym z podstawowych wymogów zachowania wewnątrzkomórkowej homeostazy żelaza. W skali całego organizmu główne znaczenie w homeostazie żelaza ma odzyskiwanie żelaza ze starych erytrocytów i dostarczenie tego mikroelementu do syntezy hemu, który jest następnie wbudowywany do cząsteczek hemoglobiny w erytroblastach, komórkach prekursorowych erytrocytów. Molekularna koordynacja tych procesów opiera się na potranskrypcyjnym systemie IRP/IRE [77] oraz na funkcjonowaniu osi regulatorowej hepcydyna-ferroportyna [92].

SYNTEZA HEMU – PROCES REGULOWANY DOSTĘPNOŚCIĄ ŻELAZA W KOMÓRCIE

ABC wewnątrzkomórkowej homeostazy żelaza

W większości komórek ssaków homeostaza żelaza jest wynikiem skoordynowanego przebiegu kilku procesów: transportu żelaza do komórki i do poszczególnych organeli, jego magazynowania oraz transportu do środowiska pozakomórkowego. Procesy te mają zapewnić optymalne wykorzystanie żelaza do syntezy hemu i centrów [Fe-S] oraz ograniczyć jego toksyczność. Uczestniczą w nich liczne białka, spośród których do najlepiej poznanych należą: receptor transferyny 1 (TfR1), białko, dzięki któremu zdecydowana większość komórek ssaków w procesie endocytozy pobiera żelazo związane z transferyną (Tf) [72], DMT1 (divalent metal transporter 1), transporter żelaza z endosomu do cytoplazmy [2], ferrytyna (Ft), białko magazynujące żelazo, wszechobecne w komórkach organizmów żywych [35] oraz ferroportyna (FPN), transporter żelaza jonowego z komórek do środowiska pozakomórkowego [28] (ryc. 1). Niedawno zidentyfikowanym białkiem transportującym żelazo z cytoplazmy do mitochondriów jest mitoferrytyna 2, występująca we wszystkich typach

komórek ssaków [83]. Stałą frakcją żelaza w komórkach jest cytoplazmatyczna, zmienna pula żelaza (labile iron pool - LIP) [39]. LIP występuje również w mitochondriach, endosomach, lizosomach i w jądrze komórkowym [67] i jest frakcją jonów Fe(II) i Fe(III) związanych z różnymi niskocząsteczkowymi ligandami, wykazującymi niewielkie powinowactwo do tych postaci jonowego żelaza. Cytoplazmatyczny LIP jest pulą, która leży na skrzyżowaniu komórkowych szlaków metabolicznych żelaza. Jest zasilana przez żelazo transportowane do komórki oraz przez żelazo pochodzące z rozpadu wewnątrzkomórkowych białek wiążących ten metal. Z puli tej pobierane jest żelazo do syntezy hemu i centrów [Fe-S] oraz żelazo transportowane poza komórkę. Ponieważ LIP jest głównym źródłem żelaza czynnego w generowaniu rodnika wodorotlenowego (hydroxyl radical - $\cdot OH$) w reakcji Fentona [49], w warunkach fizjologicznych jego stężenie w tej puli jest utrzymywane na możliwie najniższym poziomie (w zależności od typu komórki 0,1-1,2 μM [39]), takim jednak, który zapewnia płynny przebieg reakcji biochemicznych, dla których niezbędny jest ten metal. Głównym białkiem regulującym poziom LIP jest ferrytyna, zachowane w ewolucji, cytoplazmatyczne białko, którego cząsteczka przypomina wydrażoną kulę, we wnętrzu której deponowane jest żelazo w postaci polimeru uwodnionego tlenu żelazowego, stanowiącego mineralny rdzeń ferrytyny. Białkowa powłoka ferrytyny jest heteropolimerem składającym się z 24 podjednostek dwóch typów – H (heavy) i L (light), zróżnicowanych funkcjonalnie i kodowanych przez dwa geny. Podjednostka H ferrytyny ma aktywność ferroksozydazową i bierze udział w utlenianiu Fe(II) do Fe(III), co stanowi pierwszy etap wiązania żelaza przez cząsteczkę ferrytyny. W podjednostce L znajduje się specyficzne miejsce, w którym zawiązuje się mineralny rdzeń ferrytyny [35]. Wykazano, że w komórkach ze zwiększoną ekspresją podjednostki H lub w komórkach, w których zahamowano aktywność lizosomów (miejsce degradacji ferrytyny) [47], poziom LIP jest niski [69]. Zahamowanie syntezy ferrytyny w komórce prowadzi do wzrostu stężenia LIP [40]. Żelazo jest dostarczane do ferrytyny z udziałem białka opiekuńczego PCBP1 (poly (rC) binding protein 1). W komórkach pozbawionych PCBP1 występuje zaburzenie inkorporacji żelaza do cząsteczek ferrytyny, co pociąga za sobą wzrost poziomu żelaza w LIP [85]. Wahania stężenia żelaza w LIP, które stanowi zaledwie 3-5% całkowitego żelaza zawartego w komórce są wskaźnikiem komórkowego niedoboru lub nadmiaru tego pierwiastka i czułym impulsem oddziałującym na systemy regulujące wewnątrzkomórkową homeostazę żelaza, a wśród nich na system IRP/IRE.

Bez względu na typ komórek, kontrola syntezy podjednostek ferrytyny, receptora transferyny 1 i DMT1 odbywa się głównie poprzez potranskrypcyjny mechanizm IRP/IRE hamujący translację lub regulujący stabilność kodujących te białka mRNA. Ekspresja genu *Slc40A1* kodującego ferroportynę jest regulowana na kilku poziomach – transkrypcyjnie (głównie przez hem) i potranskrypcyjnie przez białka IRP [4] (choć w enterocytach dwunastnicy istnieje alternatywny wariant genu *Slc40A1*

niezawierający sekwencji IRE niezbędnej do tej regulacji [111]). Niezależnie stężenie ferroportyny na błonie komórkowej jest regulowane przez hepcydynę (patrz niżej) [4]. Elementami potranskrypcyjnego mechanizmu IRP/IRE są struktury RNA określane jako sekwencje reagujące na jony żelaza (iron responsive elements; IRE) oraz dwa cytoplazmatyczne białka kontrolujące homeostazę żelaza (iron regulatory proteins; IRP1 i IRP2) [77] (ryc. 1). IRP1 jest białkiem dwufunkcyjnym, które występuje w cytoplazmie jako akonitaza, enzym zawierający katalityczne centrum [4Fe-4S] (holo-IRP1) lub jako białko wiążące się do IRE, pozbawione tego centrum (apo-IRP1) [90,101]. Dwie aktywności IRP1 wzajemnie się wykluczają i są przeciwnie regulowane przez jony żelaza zawarte w LIP. Przy niedoborze żelaza dominującą postacią IRP1 w komórce jest apo-IRP1, które wiąże się do sekwencji IRE w regionie 5'UTR mRNA podjednostek ferrytyny i ferroportyny, hamuje ich translację w wyniku zablokowania rekrutacji małej podjednostki rybosomu. Wiązanie się IRP1 do sekwencji IRE w regionie 3'UTR mRNA Tfr1 i DMT1 stabilizuje mRNA, prowadząc do wzrostu poziomu kodowanych przez nie białek. Odwrotna regulacja syntezy białek wynikająca z braku wiązania holo-IRP1 do IRE występuje, gdy stężenie żelaza w LIP w komórce jest wysokie [77,90,101]. Mimo znacznego podobieństwa IRP2 do IRP1, IRP2 nie ma centrum [Fe-S] i nie wykazuje aktywności akonitazowej [34]. Potencjał wiązania się IRP2 do IRE jest determinowany przez jego poziom w cytoplazmie, który jest regulowany przez białko FBXL5 (F box and leucine-rich repeat protein 5), inicjujące degradację IRP2 w proteasomach [79,98]. FBXL5 należy do rodziny białek adaptorowych, które wiążą specyficznie białka (wśród nich IRP2), będące substratami dla kompleksu SKP1-CUL1-F-box1 ligaz ubikwitynowych. FBXL5 ma domenę hemerytrynową, charakterystyczną dla rodziny białek wiążących żelazo i tlen u bakterii i bezkręgowców. Wiązanie żelaza przez hemerytrynę stabilizuje FBXL5, brak wiązania żelaza wywołany jego niedoborem w komórce wywołuje degradację FBXL5. Tym samym w komórkach o podwyższonym stężeniu żelaza FBXL5 wiąże się z IRP2 i ukierunkowuje jego degradację w proteasomach, co w odniesieniu do regulacji syntezy ferrytyny, ferroportyny, receptora transferyny i DMT1 ma ten sam skutek, co regulacja przez holo-IRP1. Przy niedoborze żelaza stężenie IRP2 ulega stabilizacji (ze względu na niewielkie stężenie FBXL5), co powoduje zablokowanie syntezy podjednostek ferrytyny i ferroportyny oraz stabilizację mRNA Tfr1 i DMT1, a więc analogiczny skutek do regulacji przez apo-IRP1. Zarówno przy niedoborze jak i nadmiarze jonów żelaza następstwem regulacji syntezy ferrytyny, ferroportyny, Tfr1 i DMT1 przez IRP1 i IRP2 jest szybki powrót do fizjologicznego poziomu LIP [77]. W regulacji metabolizmu żelaza w warunkach fizjologicznych *in vivo* oraz w odpowiedzi na wahania poziomu żelaza, pierwszoplanową rolę odgrywa IRP2 [61]. IRP1, którego dominującą (80-90%) postacią w komórkach jest holo-IRP1, zawierające centrum [4Fe-4S], jest białkiem odpowiedzialnym za adaptację metabolizmu żelaza do warunków stresu oksydacyjnego [62] i nitrozacyjnego [91].

Zależność regulacji metabolizmu żelaza przez system IRP/IRE, biogenezą centrów [Fe-S] a syntezą hemu

Synteza hemu i biogeneza centrów [Fe-S] to dwie główne ścieżki metaboliczne żelaza w mitochondriach, które zależą od jego biodostępności w cytoplazmie i transportu do mitochondriów. W przypadku syntezy hemu niedobór żelaza oddziałuje przede wszystkim na poziom i w konsekwencji na aktywność syntazy aminolewulinowej 2 (ALAS2), katalizującej reakcję kondensacji glicyny i bursztynyl-CoA – pierwszą spośród 8 kolejnych reakcji prowadzących do utworzenia cząsteczki hemu, przebiegających na przemian w mitochondriach i cytoplazmie (ryc. 1). ALAS2 ulega specyficznie ekspresji w komórkach erytroidalnych [71]. Ponadto u ssaków występuje ALAS1, kodowana przez odrębny gen, ulegający ekspresji we wszystkich komórkach organizmu [71]. W niepodlegającym translacji regionie 5' mRNA kodującego ALAS2 występuje funkcjonalna sekwencja IRE (nie występuje ona w mRNA ALAS1) [10,12], co zgodnie z regułą regulacji przez IRP oznacza, że w warunkach obniżonego stężenia żelaza translacja tego mRNA jest zahamowana przez apo-IRP1 i utrzymuje się na wysokim poziomie IRP2 [77]. Dowodem na to, że ekspresja ALAS2 pozostaje pod kontrolą żelaza przez system IRP/IRE są wyniki uzyskane w badaniach przeprowadzonych na myszach z nokautem genu *Irp2* (*Irp2*^{-/-}) [9]. W erytrocytach myszy o genotypie *Irp2*^{-/-} obserwowano podwyższony poziom transkryptu ALAS2 oraz obniżony poziom transkryptu Tfr1. Zmiany te były skutkiem braku blokowania translacji mRNA ALAS2 oraz destabilizacji mRNA Tfr1 pod nieobecność IRP2. W konsekwencji erytrocyty myszy *Irp2*^{-/-} charakteryzowały się prawie 100-krotnie podwyższonym poziomem wolnej lub zawierającej atom cynku protoporfiryny IX oraz obniżonym poziomem żelaza. W skali całego organizmu objawiało się to niedokrwistością mikrocytarną oraz obniżeniem stężenia hemoglobiny [9]. Główną rolę IRP zarówno w biogenezie centrów [Fe-S] i w syntezie hemu potwierdzają wyniki badań Galy i wsp., prowadzonych na myszach z selektywnym, podwójnym nokautem genów *Irp1* i *Irp2* w hepatocytach [27]. Analiza ekspresji genów potranskrypcyjnie regulowanych przez IRP w wątrobie tych myszy wykazała wzrost stężenia ferrytyny i ferroportyny oraz obniżenie Tfr1 i DMT1. Jest to profil zmian, które prowadzą do ograniczenia dostępności żelaza w cytoplazmie, co rzutuje na niedobór żelaza w mitochondriach i zaburzenie syntezy hemu i biogenezy centrów [Fe-S]. W skali całego narządu (wątroby), zawartość żelaza była zmniejszona prawie o 50%. Do pogłębienia deficytu żelaza w mitochondriach hepatocytów przyczyniła się również mniejsza efektywność transportu żelaza z cytoplazmy, będąca skutkiem obniżenia ekspresji mitoferrytyny 2. W wątrobie myszy z jednoczesnym nokautem genów *Irp1* i *Irp2* w hepatocytach obserwowano zaburzenie funkcjonowania głównych mitochondrialnych szlaków metabolicznych przebiegających z udziałem enzymów zawierających centra [Fe-S]– transportu elektronów w łańcuchu oddechowym oraz cyklu kwasów trójkarboksylowych. Stwierdzono również około 90% spadek aktywności ferrochelatazy, enzymu, którego stabilność zależy od centrum [2Fe-2S], biorącego udział w ostatnim etapie syntezy hemu, polega-

jącym na wbudowaniu jonu Fe(II) do cząsteczki protoporfiryny IX. Konsekwencją spadku aktywności ferrochelatazy w hepatocytach z unieczynnionymi genami *Irp1* i *Irp2*, było obniżenie zawartości hemu w mitochondriach wątroby i jednocześnie podwyższenie stężenia wolnej protoporfiryny IX [27]. Podobne obserwacje poczynili Crooks i wsp. na myszach z ogólnoustrojowym nokautem genu *Irp2* [11]. Jak już wspomniano, myszy te charakteryzują się niedoborem żelaza m.in. w tkankach erytropoetycznych [9,24], do których należy śledziona. W śledzionie myszy *Irp2*^{-/-} stabilność syntetyzowanej *de novo* apo-ferrochelatazy (enzymu pozbawionego centrum [2Fe-2S]) była drastycznie obniżona. Należy przypomnieć, że centrum [2Fe-2S] nie bierze udziału w reakcji katalizowanej przez ferrochelatazę, natomiast determinuje stabilność tego enzymu. Autorzy sugerują, że prawdopodobną przyczyną obniżonego poziomu i aktywności ferrochelatazy było zaburzenie składania centrów [Fe-S] wywołane ograniczoną dostępnością żelaza [11]. Zależność między prawidłowo przebiegającym procesem biogenezy centrów [Fe-S], metabolizmem żelaza a syntezą hemu nabiera szczególnego znaczenia ze względu na to, że komórkowy potencjał wiązania się IRP1 z sekwencjami IRE na docelowych mRNA jest wyznaczany przez ilościowy stosunek apo-IRP1 do holo-IRP1, zawierającego centrum [4Fe-4S]. Składanie centrów [Fe-S] i włączanie ich do apo-białek jest niezwykle złożonym procesem, przebiegającym w mitochondriach, w którym bierze udział około 17 białek [51]. Ze względu na intensywną syntezę hemu w komórkach erytroidalnych polecamy do badań nad zależnością między biogenezą centrów [Fe-S] a syntezą hemu stał się proces erythropoezy.

Poznano kilka genów kodujących białka uczestniczące w biogenezie centrów [Fe-S], silnie ekspresowanych w komórkach erytroidalnych, których niska ekspresja zaburza przebieg erythropoezy i wpływa na występowanie niedokrwistości [109]. Wydaje się, że najlepiej poznanym jest glutaredoksyna 5 (GRX5). Glutaredoksyny zidentyfikowano początkowo jako białka biorące udział w redukcji mostków dwusiarczkowych innych białek [78]. U ludzi mutacje w genie *GRX5* (który ulega wysokiej ekspresji w erytroblastach) wywołujące utratę funkcji kodowanego białka, są przyczyną niedokrwistości syderoblastycznej, charakteryzującej się obniżoną zawartością żelaza w cytoplazmie i równoległe zwiększoną zawartością żelaza w mitochondriach erytroblastów (stąd pochodzi ich nazwa – syderoblasty), które nie jest jednak wykorzystywane do syntezy hemu [6]. Niedawne badania sugerują, że *GRX5* jest jednym z kilku białek, które tworzą rusztowanie (scaffold), służące do syntezy centrów [Fe-S] oraz że *GRX5* funkcjonuje jako białko wiążące i transportujące centra [Fe-S] do docelowych apo-białek [108]. Wyniki doświadczeń prowadzonych na komórkach HeLa i na erytroidalnych komórkach K562 z wyciszonym genem *GRX5* oraz na limfocytach pacjentów z mutacją genu *GRX5* wykazały zaburzenie biogenezy centrów [Fe-S], co objawiało się zahamowaniem aktywności akonitazy mitochondrialnej i cytoplazmatycznej (holo-IRP1) oraz aktywacją IRP1, czyli zwiększonym wiązaniem się tego białka z sekwencjami IRE. Na zwiększenie proporcji apo-IRP1 do holo-IRP1, a także na wzrost stężenia IRP2 miał wpływ niedobór żelaza w cytoplazmie komórek pozbawionych *GRX5*. Autorzy sugerują,

że podwyższenie aktywności *trans*-regulatorowej dwóch IRP wpływa na obniżenie poziomu ALAS2. Jednocześnie deficyt centrów [2Fe-2S] wpływa na destabilizację ferrochelatazy i obie te regulacje przyczyniają się do obniżenia stężenia hemu w komórkach K562 [108].

BIODEGRADACJA HEMU W MAKROFAGACH – GŁÓWNY PROCES OGÓLNUSTROJOWEJ HOMEOSTAZY ŻELAZA, ZAPEWNIĄCY DOSTĘPNOŚĆ ŻELAZA DO SYNTAZY HEMU W PROCESIE ERYTROPOEZY

ABC ogólnoustrojowej homeostazy żelaza

Charakterystycznymi cechami homeostazy żelaza u większości ssaków są brak fizjologicznego szlaku usuwania tego metalu z organizmu oraz zdolność do ponownego wykorzystania żelaza zawartego w hemoglobinie erytrocytów, które u człowieka przeżywają około 120, a u myszy około 40 dni, a następnie są fagocytowane przez makrofagi tkankowe [45]. W tych warunkach obieg żelaza u dorosłych osobników odbywa się bez konieczności uzupełniania znaczących ilości tego biometalu z diety. Z organizmu dorosłego mężczyzny ubywa dziennie około 1-2 mg żelaza (wraz ze złuszczacymi się komórkami naskórka oraz enterocytami wierzchołkowymi kosmków dwunastnicy). Ubytek ten jest uzupełniany przez absorpcję podobnej ilości żelaza z diety. U kobiet w okresie przed menopauzą, w związku z cykliczną utratą krwi w czasie miesiączkowania, absorpcja żelaza jest większa i wynosi około 4-5 mg dziennie. Należy podkreślić, że wraz z utratą 100 ml krwi (o wartości hematokrytu 45%) z organizmu ubywa około 50 mg żelaza [86]. U rosnących osobników absorpcja żelaza zwiększa się, dostosowując się do potrzeb związanych ze wzrostem masy ciała i większą objętością krwi. Absorpcja żelaza, odbywająca się głównie w dwunastnicy, jest procesem elastycznym, podlegającym jednak rygorystycznej regulacji, która ma zaspokoić zapotrzebowanie organizmu na ten mikroelement, a także ma zapobiegać wprowadzeniu nadmiaru żelaza, co odgrywa szczególną rolę np. w sytuacji dużej jego zawartości w diecie wysokorozwiniętych społeczeństw. Znaczenie restrykcyjnej kontroli ilości absorbowanego żelaza uwidacznia się najlepiej u pacjentów chorych na hemochromatozę, którzy wskutek mutacji genów odpowiedzialnych za regulację wchłaniania tego mikroelementu pobierają dziennie nawet do 50 mg żelaza, które akumuluje się w wątrobie powodując zaburzenie funkcji tego narządu [70,86]. Enterocyty absorpcyjne zaopatrujące cały organizm w żelazo, pobierają je z diety w postaci jonowej (nieorganicznej) i w postaci hemu (organicznej), uwolnionego głównie z cząsteczek hemoglobiny i mioglobiny. Enterocyty są komórkami spolaryzowanymi, które na odcinku błony komórkowej kontaktującym się ze światłem jelita zawierają zestaw dwóch białek odpowiedzialnych za transport żelaza jonowego z dwunastnicy do enterocytu: ferrireduktazę – dwunastniczy cytochrom b (duodenal cytochrome b - DCYTB) [59] oraz DMT1 [20]. Na odcinku zwróconym w stronę naczyń krwionośnych posiadają inny zestaw białek biorących udział w transporcie żelaza z enterocytu do krwiobiegu: miedziozależną ferriooksydazę – hefajstynę [102] oraz ferroportynę [60].

Molekularna regulacja ilości absorbowanego żelaza odbywa się zarówno przez czynniki ogólnoustrojowe, odzwierciedlające status żelaza w organizmie, jak również przez czynniki działające miejscowo w enterocyty. W ostatnim dziesięcioleciu zaproponowano molekularny mechanizm hamowania absorpcji żelaza przez hepcydynę, syntetyzowaną głównie w hepatocytach i uwalnianą do krążenia jako 25-aminokwasowy peptyd. Hepcydyna wiąże się z ferroportyną występującą na błonie podstawno-bocznej enterocytów. Wiązanie to indukuje fosforylację reszt tyrozynowych (Tyr) w cząsteczce ferroportyny, co jest sygnałem do przemieszczenia białka z błony komórkowej do cytoplazmy. Ferroportyna jest następnie defosforylowana, a po przyłączeniu ubikwityny transportowana do proteasomów, gdzie następuje jej degradacja [14,63]. W następstwie biodegradacji ferroportyny, jedynego transportera żelaza z enterocytów zmniejsza się ilość żelaza, które może być transportowane do krwi. Synteza hepcydyny w hepatocytach wzrasta pod wpływem żelaza (wzrostu jego zawartości w hepatocytach, a także wzrostu poziomu holotransferyny (TfFe₂) w surowicy), co wpisuje się w schemat regulacji o charakterze sprzężenia zwrotnego [29]. W indukcji ekspresji genu *Hamp*, kodującego hepcydynę przez żelazo uczestniczą ligandy BMP6 (bone morphogenetic protein 6) oraz TfFe₂, kompleks białek występujący na błonie hepatocytów złożony z receptora BMP6, Tfr1, Tfr2, białka hemochromatozy (HFE), hemojuweliny oraz czynniki transkrypcyjne z rodziny SMAD [99]. Negatywnym modulatorem ekspresji hepcydyny jest matryptaza 2, proteaza serynowa, która przez swą aktywność proteolityczną usuwa z powierzchni komórek hemojuwelinę [21].

W ostatnich latach podkreśla się znaczenie systemu IRP/IRE w prawidłowym funkcjonowaniu absorpcji żelaza [25]. U myszy z podwójnym selektywnym nokautem genów *Irp1* i *Irp2* w komórkach nabłonka jelitowego stwierdzono całkowite rozregulowanie absorpcji żelaza, będące skutkiem zaburzenia ekspresji białek regulowanych przez IRP, co wpływa na naruszenie struktury kosmków jelitowych i w konsekwencji powoduje śmierć zwierząt w okresie okołourodzeniowym [26]. Niezwykle istotnym odkryciem do zrozumienia molekularnej regulacji absorpcji żelaza była identyfikacja czynnika transkrypcyjnego HIF-2α (hypoxia inducible factor-2 alpha) jako czynnika, który w warunkach niskiego stężenia tlenu indukuje transkrypcję genów kodujących białka odpowiedzialne za absorpcję żelaza – DCTYB, DMT1 i ferroportynę [57]. Okazało się także, że regulatorem ekspresji HIF-2α może być żelazo, gdyż mRNA HIF-2α ma w regionie 5'UTR funkcjonalną sekwencję IRE, co dodatkowo implikuje udział potranskrypcyjnej regulacji w kontroli absorpcji żelaza przez enterocyty [13,80]. Zgodnie z logiką regulacji potranskrypcyjnej przez system IRP/IRE, niedobór żelaza powinien wpływać na zahamowanie translacji mRNA HIF-2α. Zastanawiające w tym kontekście są wyniki badań Shaha i wsp., którzy wykazali, że HIF-2α był indukowany w dwunastnicy myszy poddanych diecie deficytowej w żelazo, co zwiększało ekspresję DCTYB i DMT1 [82]. Należy jednak pamiętać, że niedobór żelaza oddziałuje również na stabilność HIF-2α na poziomie białka przez zahamowanie aktywności hydrolazy prolinowych, żelazozależnych en-

zymów zapoczątkowujących degradację tego czynnika [19]. Tak więc regulacja poziomu HIF-2α przez żelazo w enterocytach nabłonka absorpcyjnego jest wypadkową dwóch wspomnianych mechanizmów. Zainteresowanych niezwykle złożonym zagadnieniem regulacji absorpcji żelaza przez HIF-2α i jej powiązaniem z innymi systemami regulacyjnymi odsyłamy do pracy przeglądowej Mastrogiannaki i wsp. [58].

Procesem o pierwszorzędym znaczeniu dla utrzymania ogólnoustrojowej homeostazy żelaza u ssaków jest odzyskiwanie żelaza jonowego zawartego w hemoglobinie starych erytrocytów fagocytowanych głównie przez makrofagi wątroby i śledziony, w celu jego ponownego wykorzystania (reutilizacji) do syntezy hemu i hemoglobiny w erytroblastach szpiku kostnego [45]. U dorosłego człowieka w ciągu doby makrofagi uwalniają około 20 mg żelaza jonowego czyli około 10-krotnie więcej niż ilość żelaza absorbowanego z diety. Tak więc od prawidłowego przebiegu tego procesu (jego molekularne mechanizmy zostaną omówione w następnym rozdziale) zależy przede wszystkim ilość żelaza mobilizowanego do zaspokojenia potrzeb organizmu. Komórkami o największym zapotrzebowaniu na żelazo są erytroblasty – komórki prekursorowe erytrocytów w szpiku kostnym. Dzięki dużej liczbie cząsteczek Tfr1 na błonach komórkowych [72], komórki te intensywnie pobierają żelazo związane z transferyną. Żelazo pobrane przez erytroblasty jest niemal wyłącznie wykorzystywane do syntezy hemu, który jest następnie włączany do cząsteczek hemoglobiny. Nasilenie syntezy hemu w erytroblastach jest o ponad rząd wielkości większe niż w komórkach nieerytroidalnych [71]. Wzrost natężenia erytropoezy wpływa na zmniejszenie syntezy hepcydyny przez czynniki GDF15 (growth differentiation factor 15) i TWSG1 (twisted gastrulation 1), które są syntetyzowane w erytroblastach [94,95]. Rola tej regulacji polega na zwiększeniu dostępności żelaza do syntezy hemu w erytroblastach.

W świetle przedstawionych danych hepcydyna, a także IRP są głównymi regulatorami odpowiedzialnymi za koordynację ogólnoustrojowej homeostazy żelaza, której istotnym elementem jest współdziałanie komórek o ściśle wyspecjalizowanych funkcjach związanych z transportem żelaza z przewodu pokarmowego (enterocyty), jego magazynowaniem (hepatocyty), recyrkulacją (makrofagi wątroby i śledziony) i wykorzystaniem (erytroblasty) [36].

Molekularne aspekty erytrofagocytozy, degradacji hemu i recyrkulacji żelaza hemowego przez makrofagi

Przekierowanie żelaza hemowego z fagocytowanych przez makrofagi erytrocytów do krwi jest kolejnym (po syntezie hemu) wieloetapowym procesem, w którym ściśle współdziałają ze sobą białka związane z metabolizmem hemu oraz z metabolizmem żelaza niehemowego. Erytrofagosom (fagosom zawierający pochłonięte erytrocyty) powstający w makrofagu w wyniku fuzji fragmentów błony komórkowej, błon endosomalnych, lizosomalnych oraz błon siateczki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego, zawiera dziesiątki białek, których rola w erytrofagocyto-

zie pozostaje nieznana [17]. W całym procesie recykulacji żelaza przez makrofagi udokumentowano dotychczas udział następujących białek: oksygenazy hemowej1 (heme oxygenase 1; HO1) – enzymu degradującego hem [44], HRG-1 (heme responsive gene-1) – wewnątrzkomórkowego transportera hemu [76], Nramp1 (natural resistance-associated macrophage protein 1) – transportera żelaza jonowego [88], ferrytyny, ferroportyny [46] i ceruloplazminy (Cp) – ferooksydazy zależnej od jonów miedzi [106]. Wprawdzie recykulacja żelaza hemowego przez makrofagi jest filarem, na którym opiera się ogólnoustrojowy metabolizm żelaza, wiele jej molekularnych elementów pozostaje niewyjaśnionych.

W 2005 r. Delaby i wsp. opracowali model komórkowy *in vitro* uwzględniający fizjologiczne aspekty erytrofagocytozy, który stwarza możliwość badania poszczególnych jej etapów, określenia subkomórkowego umiejscowienia katabolizmu hemu przez HO1, a także identyfikacji szlaków eksportu żelaza jonowego uwolnionego z cząsteczek hemu [15]. Na ten komórkowy model składają się makrofagi pochodzące ze szpiku kostnego myszy (bone marrow-derived macrophages) oraz współhodowane z nimi mysie erytrocyty krwi obwodowej, w których wcześniej jonami Ca(II) indukowano proces starzenia się. Po fagocytozie starych erytrocytów przez makrofagi i utworzeniu erytrofagosomu, hem uwolniony z cząsteczek hemoglobiny jest transportowany przez HRG-1 do cytoplazmy, gdzie ulega szybkiej degradacji (po około godzinie) przez HO1 (zakotwiczoną na błonie siateczki śródplazmatycznej [31]), czemu towarzyszy uwolnienie jonów Fe(II), CO i biliwerdyny. Hem nierozłożony przez HO1 wchodzi do tzw. cytoplazmatycznej zmiennej puli hemu w komórce (labile heme pool - LHP) [17] (ryc. 2), w której jego stężenie wynosi poniżej 0,1 μM [81]. Należy podkreślić, że hem będąc substratem reakcji katalizowanej przez HO1, jest jednocześnie jednym z głównych czynników indukujących ekspresję genu *Hmox1*, kodującego ten enzym [23]. Indukcja ta wymaga przemieszczenia hemu do jądra komórkowego. W jądrze hem przyłącza się do regulatora transkrypcji, białka Bach1. Pod nieobecność hemu Bach1 tworzy heterodimer z białkami Maf neutralizując ich aktywność transkrypcyjną polegającą na wiązaniu się z sekwencją wzmacniającą MARE (Maf-recognition element), występującą w promotorze genu *Hmox1*. Wiązanie się hemu z Bach1 powoduje jego odłączenie od białek Maf, umożliwiając tym samym aktywację transkrypcji [37] (ryc. 2). W większości komórek w warunkach fizjologicznych aktywność HO1 jest bardzo mała, a funkcję enzymu rozkładającego hem pełni HO2 [66]. W makrofagach fagocytujących erytrocyty ekspresja genu *Hmox1* jest podwyższona, co wynika ze stałego dopływu hemu do jądra komórkowego. Ustala się równowaga między pulą hemu rozkładanego enzymatycznie przez HO1 i pulą hemu funkcjonującego jako czynnik podtrzymujący transkrypcję genu *Hmox1* i w konsekwencji aktywność HO1.

Badania Soe-Lin i wsp. sugerują, że istotnym białkiem w recykulacji żelaza jest transporter żelaza jonowego Nramp1. Myszy z nokautem genu *Nramp1*, u których wy-

wołano hemolizę, wykazywały zwiększoną akumulację żelaza w wątrobie i śledzionie. Stwierdzono u nich również podwyższoną radioaktywność w porównaniu do myszy kontrolnych (wild-type) po podaniu do krwi retikulocytów znakowanych izotopem żelaza (^{59}Fe) [88]. Autorzy sugerują, że Nramp1 uczestniczy w transporcie do cytoplazmy żelaza jonowego pochodzącego z rozpadu hemu w erytrofagosomie. Delaby i wsp. podważyli jednak tę hipotezę [17]. Co prawda, badając poszczególne etapy erytrofagocytozy zlokalizowali Nramp1 wyłącznie na błonie erytrofagosomu, ale jednocześnie w erytrofagosomie nie stwierdzili obecności HO1, wykluczając tym samym to organellum jako miejsce degradacji hemu. Ponadto wyraźna lokalizacja transportera hemu HRG-1 na błonie erytrofagosomu jednoznacznie sugeruje, że hem jest transportowany z wnętrza erytrofagosomu do cytoplazmy, gdzie odbywa się jego degradacja. Według Delaby'ego i wsp. prawdopodobna rola Nramp1 jest związana z udziałem tego białka w dojrzewaniu erytrofagosomu oraz w procesie rozpadu erytrocytu i degradacji hemoglobiny [17].

Po enzymatycznym rozpadzie hemu w makrofażu, uwolnione żelazo jonowe zasila cytoplazmatyczną labilną pulę żelaza, skąd może być włączone do ferrytyny za pomocą białka PCBP1 lub transportowane przez ferroportynę do krwi. Do tej pory nie wiadomo jakie molekularne regulacje decydują o biologicznym przeznaczeniu żelaza jonowego pochodzącego z odzysku ze starych erytrocytów. Wydaje się jednak, że w większości żelazo przemieszcza się w stronę błony komórkowej, przez którą jest transportowane z udziałem ferroportyny, a następnie jest przyłączane do transferyny. W czasie erytrofagocytozy ekspresja genu *Slc40a1*, kodującego ferroportynę zwiększa się zarówno pod wpływem hemu (*via* czynnik transkrypcyjny Nrf2) oraz pod wpływem żelaza jonowego (poprzez system IRP/IRE) [16], co zapewnia wysoki poziom ferroportyny na błonie komórkowej makrofagów. Negatywna potranslacyjna regulacja ferroportyny przez hepcydynę ma drugorzędne znaczenie w warunkach fizjologicznych – prawidłowo przebiegających procesów erytropoezy i erytrofagocytozy. Auriac i wsp. zaobserwowali ciekawą zależność między umiejscowieniem ferroportyny na błonie komórkowej makrofagów i jej wrażliwością na działanie hepcydyny [3]. Stwierdzili, że ferroportyna występuje głównie we fragmentach błony komórkowej wzbogaconych w cholesterol, określanych jako tratwy lipidowe (lipid rafts). Dezintegracja tych struktur osłabia oddziaływanie między hepcydyną i ferroportyną. Ponieważ w tratwach lipidowych zlokalizowano również HO1 [104] i ceruloplazminę [56], nasuwa się przypuszczenie, że mogą to być struktury odgrywające istotną rolę w degradacji hemu i transporcie żelaza z makrofagów do środowiska pozakomórkowego (ryc. 2).

Istotnym elementem biologii wolnego hemu jest jego toksyczność związana z indukcją stresu oksydacyjnego [44]. Wynika ona z właściwości oksydacyjnych jonów żelaza i ich udziału w generowaniu rodnika hydroksylowego przez reakcję Fentona. Nie rozstrzygnięto dotychczas, czy dotyczy to tylko jonów żelaza uwolnionych po rozpadzie

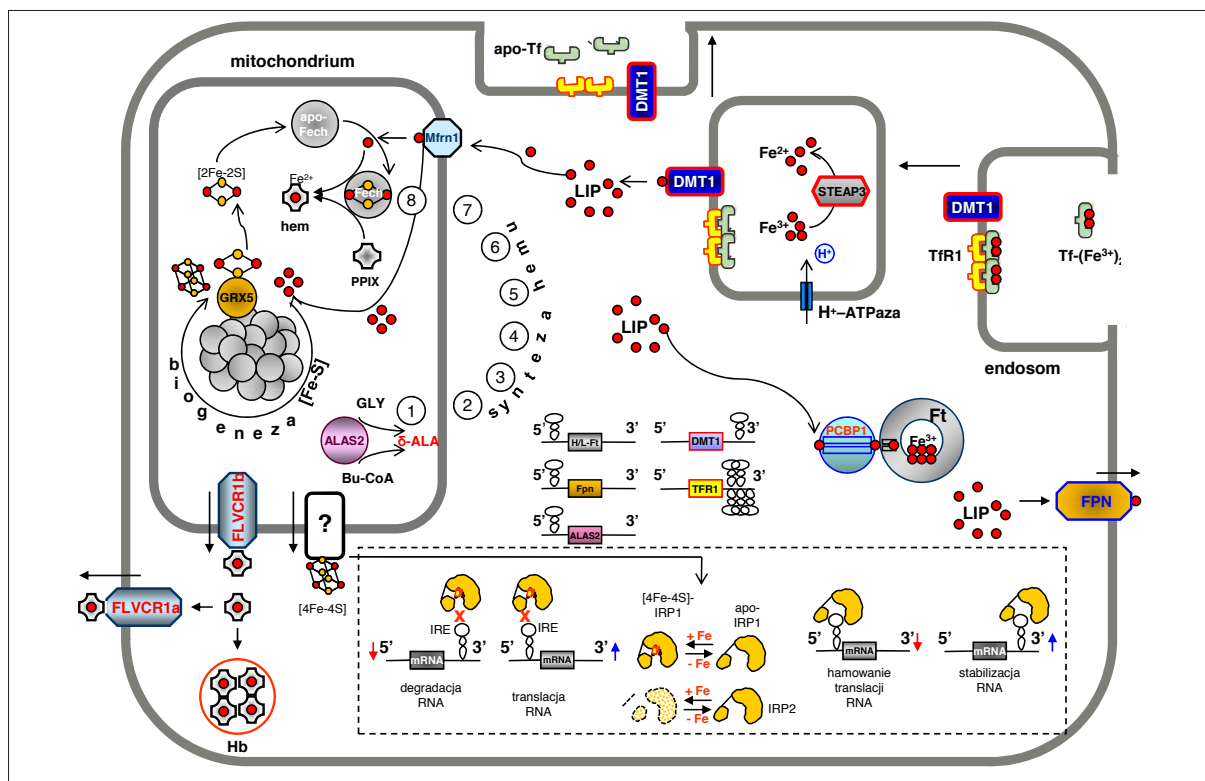
hemu, czy również żelaza zawartego w pierścieniu protoporfiryny IX. Jednym z następstw stresu oksydacyjnego wywołanego przez hem jest uwrażliwienie komórek na apoptozę indukowaną przez czynniki prozapalne, takie jak np. TNF (tumor necrosis factor) [54]. Głównym molekularnym mechanizmem jest utrzymująca się aktywność szlaku sygnalizacyjnego kinazy JNK (c-Jun N-terminal Kinase) [33,52]. Głównym enzymem zapobiegającym toksyczności hemu jest HO1 [44]. Badania na myszach z nokautem genu *Hmox1* wykazały, że brak HO1 poważnie zaburza w regulacji ogólnoustrojowego metabolizmu żelaza [48,73,89], których skutkiem jest zanik komórek Kupffera (makrofagów wątroby) i makrofagów śledziony, wywołany cytotoksycznością akumulującego się w tych komórkach hemu, co wiąże się z utratą przez te narządy funkcji recyrkulacji żelaza hemowego [48,89]. Funkcję tę przejmują u myszy z nokautem genu *Hmox1* nerki, lecz jako narząd nieprzystosowany do obrotu tak dużą ilością żelaza, wykazują nasilające się wraz z wiekiem zmiany patologiczne i dysfunkcję spowodowaną nadmierną akumulacją żelaza [48,89]. Do osiągnięcia pełnej detoksykacji hemu i jonów Fe(II), jako jednego z produktów jego rozpadu, jest konieczne sprzężenie aktywności HO1 z funkcją ferrytyny. Potwierdzają to badania, w których wykazano, że proapoptotyczne działanie hemu jest hamowane tylko wówczas, gdy aktywności HO1 towarzyszy podwyższona ekspresja ferrytyny H, mającej aktywność ferroksozydazową, dzięki której jony Fe(III) mogą być włączane do cząsteczek ferrytyny, a to hamuje aktywność kinazy JNK indukowanej przez hem i TNF [32,68].

Molekularne podstawy transportu hemu w organizmie

Niezwykle intrygującym zagadnieniem ogólnoustrojowej homeostazy żelaza u ssaków, wywołującym się na podstawie badań ostatnich lat jest obrót hemu w organizmie. Przez analogię do obrotu żelaza jonowego, którego molekularne podstawy są dobrze poznane, wśród białek obiegu hemu można wyróżnić: białko transportujące cząsteczki hemu we krwi – hemopeksynę (jej stężenie – 6,7-25 μM , jest porównywalne ze stężeniem transferryny transportującej jony żelaza – 22-31 μM) [96], receptory odpowiedzialne za transport hemu do komórek – LRP1 (LDL receptor-related protein)/CD91 [38], FLVCR2 (feline leukemia virus sub-group cellular receptor, member 2) [41,42] oraz białka transportujące hem w obrębie komórek – HRG-1 [76] i FLVCR1b [7] i do środowiska pozakomórkowego – FLVCR1a [43] i ABCG2 (ATP-binding cassette transporter) [18]. Badania na modelach myszy nokautowych dowodzą, że niektóre z tych białek, np. hemopeksyna nie są niezbędne do funkcjonowania organizmu w warunkach fizjologicznych [95]. Są jednak białka, takie jak np. FLVCR1, których brak jest letalny już na etapie rozwoju embrionalnego. Zarodki mysie z nokautem genu *Flvcr1* zamierają między 14,5 a 16,5 dniem życia prenatalnego wskutek zaburzenia procesu erytropoezy, wywołanego toksycznością wolnego hemu nadmiernie gromadzącego się w komórkach erytroidalnych [74]. Istotne dla organizmu funkcje białek trans-

portujących hem uwidoczniają się w stanach, gdy wzrasta poziom hemu zarówno w skali całego organizmu – w surowicy (hemoliza wewnątrznaczyniowa), a także miejscowo w komórkach o intensywnym metabolizmie hemu np. w makrofagach fagocytujących erythrocyty, czy we wspomnianych już erytroblastach. U myszy z nokautem genu hemopeksyny, u których wywołano hemolizę stwierdzono akumulację żelaza i peroksydację lipidów w komórkach kanalików nerkowych oraz uszkodzenie nerek [97]. W innym modelu intoksykacji hemem – po dożylnym podaniu heminy (protoporfiryny IX zawierającej żelazo w postaci jonu Fe(III)), u myszy z nokautem genu hemopeksyny stwierdzono uszkodzenie i zwiększoną przepuszczalność nabłonka naczyniowego, zwłaszcza w obrębie naczyń wątroby [100]. Hemopeksyna (Hx) jest głównym białkiem detoksykującym hem we krwi. Jest to glikoproteina syntetyzowana głównie w hepatocytach i uwalniana do krwi, gdzie z dużym powinowactwem ($K_d < 1 \text{ pmol/L}$) wiąże hem w stosunku molarnym 1:1 [97]. Kompleks Hx-hem jest usuwany z krążenia przez receptor CD91 występujący m.in. na błonie komórkowej hepatocytów i makrofagów [38]. Po endocytozie kompleksu Hx-hem-CD91, receptor CD91 odłącza się pod wpływem aktywności enzymów lizosomalnych i powraca na błonę komórkową. Dysocjacja hemu od hemopeksyny w endosomie zachodzi pod wpływem jonów miedzi [87]. Uwolniony hem jest transportowany do cytoplazmy a hemopeksyna ulega degradacji w lizosomach [38]. Wydaje się, że hemopeksyna może również uczestniczyć w recyrkulacji hemu transportowanego z makrofagów przez FLVCR1a. Badania *in vitro* wykazały, że w obecności hemopeksyny wzrasta efektywność transportu hemu z makrofagów do środowiska zewnątrzkomórkowego [107]. Obserwacje te są w pełni zgodne z sugerowaną wcześniej rolą FLVCR1 w recyrkulacji hemu z makrofagów fagocytujących erythrocyty [41]. W naszych badaniach na modelu myszy z nokautem genu *Hmox1* stwierdziliśmy występowanie FLVCR1 w naczyniach krwionośnych nerek i jednocześnie wykazaliśmy podwyższone stężenie hemopeksyny w surowicy [89], co sugeruje udział tych dwóch białek w usuwaniu nadmiaru hemu z nerek.

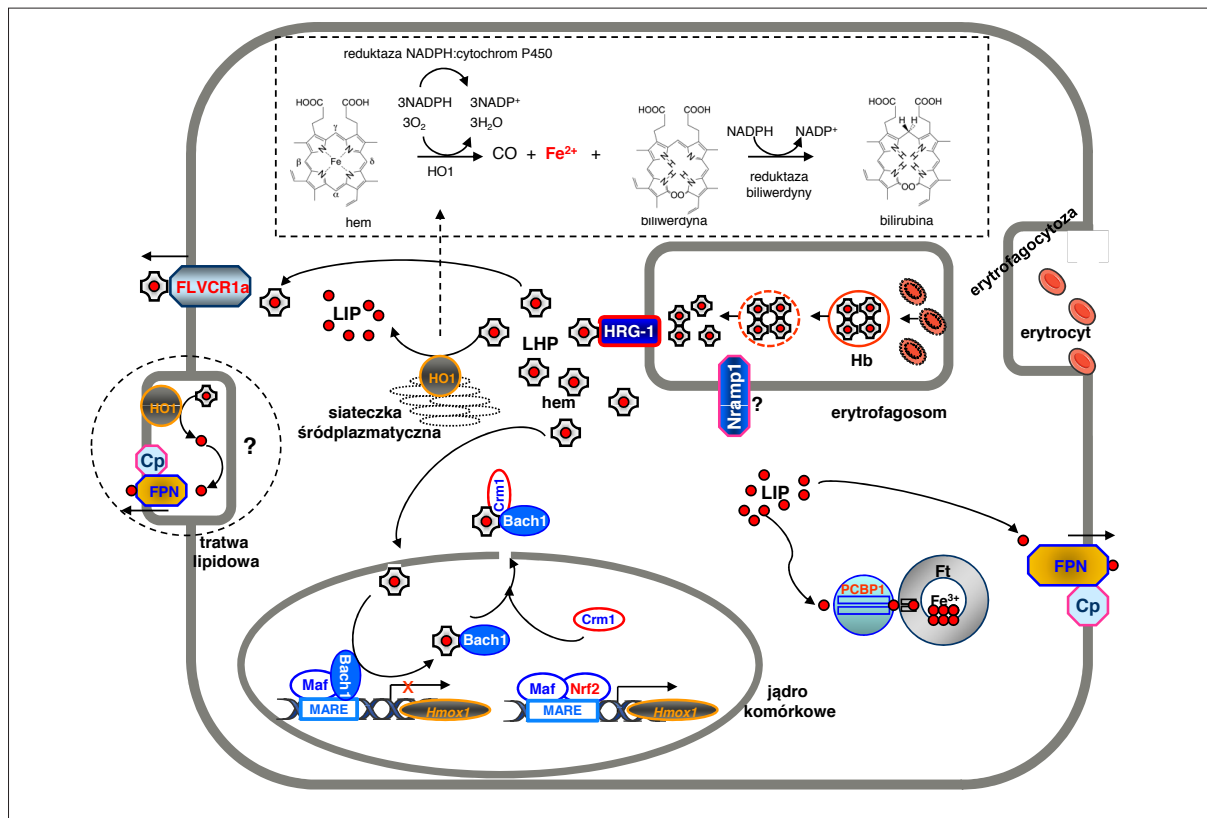
Niektórzy autorzy sugerują, że tandem FLVCR1 i hemopeksyna mogą brać udział w transporcie hemu z enterocytów absorpcyjnych [96]. Zjawisko dużej przyswajalności żelaza hemowego znajdującego się w pokarmie znane jest już od dawna. Przyswajalność żelaza hemowego z diety wynosi 25-50% (znacznie mniejsza jest przyswajalność żelaza jonowego – 1-10%) [1]. Preparaty żelaza hemowego są wykorzystywane do korekty niedoboru żelaza zarówno u ludzi [30,110], jak i zwierząt domowych [75]. Ciągłe jednak nie wiadomo, jakie molekularne mechanizmy leżą u podłoża tak dobrej przyswajalności żelaza hemowego. Teoretycznie istnieją co najmniej dwa szlaki absorpcji żelaza hemowego. W pierwszym z nich bierze udział transporter hemu – białko HCP1 (heme carrier protein 1) występujące na błonie wierzchołkowej enterocytów dwunastnicy [50,84]. Po przekroczeniu tej błony hem ulega enzymatycznemu rozkładowi przez HO1, której ekspresję stwierdzono w enterocytach [105]. Następnie żelazo



Ryc. 1. Zależność między regulacją metabolizmu żelaza przez system IRP/IRE, biogenezą centrów [Fe-S] a syntezą hemu oraz główne szlaki transportu żelaza i hemu w erytroblastach. W erytroblastach głównymi białkami uczestniczącymi w pobieraniu żelaza w procesie endocytozy są receptor transferyny 1 (TfR1) i transporter metali dwuwartościowych (DMT1). STEAP3 (six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3) jest ferrireduktazą redukującą jony Fe(III) po ich odłączeniu od Tf w endosomie [64]. Po przemieszczeniu żelaza z endosomu do cytoplazmy przez DMT1, żelazo wchodzi do zmiennej puli żelaza (LIP), a endosom wraz z kompleksem TfR1-apo-Tf ulega fuzji z błoną komórkową. Tf odłącza się od swojego receptora, który pozostaje na błonie komórkowej. Stężenie żelaza w LIP stanowi o jego biodostępności do syntezy hemu i biogenezы centrów [Fe-S] komórce. Z LIP w cytoplazmie żelazo jest transportowane do mitochondrium przez mitoferrynę 1 (Mfrn1). Żelazo zawarte w LIP, szczególnie, gdy znajduje się tam w nadmiarze, może być wiązane przy udziale białka PCBP1 przez ferrytynę. Nadmiar żelaza z LIP może być również usuwany poza komórkę przez ferroportynę (FPN). Ta sytuacja, paradoksalna w erytroblastach, komórках o dużym wykorzystaniu żelaza może mieć miejsce zanim komórki te osiągną szczyt syntezy hemu [112]. Jak dotychczas nie zidentyfikowano ferooksydazy współdziałającej z FPN w transporcie żelaza z erytroblastu. LIP oddziałuje również na aktywność trans-regulatorową białek IRP1 i IRP2. Wydzielono (obramowanie linią przerywaną) schemat funkcjonowania potranskrypcyjnej regulacji IRP/IRE mRNA zawierających sekwencję IRE w niepodlegających translacji regionach 5' i 3'. Poza ramką przedstawiono znane mRNA kodujące białka kluczowe dla wewnątrzkomórkowej homeostazy żelaza i syntezy hemu, regulowane przez IRP1 i IRP2: podjednostki H i L ferrytyny (H-Ft i L-Ft), FPN, syntazę aminolewulinową 2 (ALAS2), TfR1 i DMT1. Numery od 1 do 8 oznaczają kolejne etapy syntezy hemu. Pierwszy to reakcja kondensacji glicyny (GLY) i bursztynylo-CoA (Bu-CoA) do kwasu aminolewulinowego (δ -ALA), katalizowana przez ALAS2; ostatni to włączenie jonu Fe(II) do pierścienia protoporfiryny IX (PPIX) przez ferrochelatazę (Fech), enzym zawierający centrum [2Fe-2S]. Obie reakcje przebiegają w mitochondrium. Biogenezę centrów [Fe-S] przedstawiono bez uwzględnienia szczegółów i wyodrębnienia licznych białek biorących udział w tym procesie. Zainteresowanych Czytelników odsyłamy do pracy przeglądowej Lill i wsp. [51]. Zaznaczono jedynie glutaredoksynę 5 (GRX5), jako białko wiążące i transportujące centra [Fe-S] do docelowych apo-białek w mitochondrium. Transporter centrów [Fe-S] z mitochondrium do cytoplazmy (niezbędny do rekonstrukcji cytoplazmatycznych białek zawierających centra [Fe-S] np. holo-IRP1) nie został dotychczas poznany. Białka transportujące hem – FLVCR1a i FLVCR1b są produktami dwóch wariantów genu *Flvcr1*, powstałymi na drodze alternatywnego składowania tego genu [7,41]. Biorą one udział w usuwaniu nadmiaru hemu z mitochondriów do cytoplazmy (FLVCR1b) i z cytoplazmy poza komórkę (FLVCR1a). W cytoplazmie 4 cząsteczki hemu są wbudowywane do cząsteczki hemoglobiny (Hb), która jest tetramerem złożonym z dwóch par łańcuchów globinowych. Niektóre elementy ryciny 1 i 2 opracowano na podstawie [53]

jonowe uwolnione z cząsteczki hemu wkracza na szlak transportu żelaza z udziałem ferroportyny i hefajstyny. Drugi hipotetyczny szlak uwzględnia transport nienaruszonej cząsteczki hemu zarówno przez błonę wierzchołkową (przez HCP1), jak i przez błonę podstawno-boczną enterocyta *via* FLVCR1a. W dalszej kolejności cząsteczka hemu może być transportowana przez hemopeksynę do wątroby.

Prowadzone przez nas badania zmierzają do identyfikacji mechanizmów molekularnych leżących u podłoża absorpcji hemu. U myszy z nokautem genu *Hmox1* wywołaliśmy niedobór żelaza przez podawanie paszy o niskiej zawartości żelaza (ok. 8 ppm). Następnie do paszy tej dodaliśmy preparat żelaza hemowego (osiągając stężenie 80 ppm – o około 20% większe od standardowej zawartości żelaza w paszach dla gryzoni doświadczal-



Ryc. 2. Recykulacja żelaza hemowego oraz główne szlaki metaboliczne hemu pochodzącego z hemoglobiny (Hb) erytrocytów fagocytowanych przez makrofag wątroby lub śledziony. Na rycinie przedstawiono proces enzymatycznej degradacji hemu przy udziale oksygenazy hemowej 1 (HO1), uwolnionego z Hb w trakcie erytrofagocytozy. Po przemieszczeniu hemu przez błonę erytrofagosomu przy udziale HRG-1, hem tworzy w cytoplazmie zmienną pulę hemu (LHP). Znak zapytania przy białku Nramp1 oznacza, że rola tego białka, występującego na błonie erytrofagosomu w recykulacji żelaza hemowego nie została dotychczas poznana. Degradacja hemu odbywa się w cytoplazmie przy udziale HO1 zakotwiczonej na błonie siateczki śródplazmatycznej [28]. W obramowaniu przedstawiono schemat reakcji enzymatycznej katalizowanej przez HO1 oraz schemat następującej po niej reakcji redukcji biliwerdyny do bilirubiny, katalizowanej przez reduktazę biliwerdyny. Jony żelaza uwolnione w wyniku degradacji hemu, zasilają labilną pulę żelaza (LIP) w cytoplazmie, skąd żelazo jest transportowane poza makrofag przy udziale ferroportyny (FPN) i ceruloplazminy (Cp), utleniającej jony Fe(II) do Fe(III), dzięki czemu mogą one być związane przez transferynę. Wyróżniono trawy lipidowe jako hipotetyczne miejsce współdziałania HO1, FPN i Cp w recykulacji żelaza jonowego pochodzącego z biodegradacji hemu. W warunkach fizjologicznych większość żelaza odzyskanego z hemoglobiny starych erytrocytów jest przekierowana do krwi. Niewielka część żelaza uwolniona do LIP w wyniku degradacji hemu może być włączona do ferrytyny (Ft) z udziałem białka PCBP1. Hem zawarty w LHP, który nie został zdegradowany przez HO1, może być kierowany na inne szlaki metaboliczne, spośród których zaznaczono szlak transkrypcyjnej aktywacji genu *Hmx1*. Hem po przemieszczeniu do jądra komórkowego, wiąże się represorem transkrypcji genu *Hmx1*, białkiem Bach1. Kompleks hem-Bach1 przy udziale białka Crm1 transportowany jest poza jądro komórkowe [93]. Odblokowanie dostępu do sekwencji regulatorowej MARE w promotorze genu *Hmx1* umożliwia przyłączenie do tej sekwencji czynnika Nrf2 i indukcję transkrypcji tego genu. Rycinę przygotowano w oparciu o cytowane w pracy piśmiennictwo

nych) i podaliśmy go myszom w celu wyrównania deficytu. Wstępne wyniki doświadczenia sugerują, że stosując żelazo hemowe można uzupełnić niedobór żelaza u myszy wild-type, a także zmniejszyć niedobór u myszy pozbawionych HO1 [dane niepublikowane]. Istotnym elementem tego doświadczenia jest przeprowadzenie analizy ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w absorpcji żelaza jonowego i hemu oraz białka regulatorowe – hepcydynę oraz IRP1 i IRP2. W równoległym prowadzonym doświadczeniu skorygowaliśmy niedobór żelaza, tym razem występujący naturalnie, u noworodków prosiąt, podając im *per os* paszę z dodatkiem preparatu żelaza hemowego [dane niepublikowane]. Wydaje się, że poznanie mechanizmów absorpcji żelaza hemo-

wego stworzy możliwość planowania nowych strategii uzupełniania niedoboru żelaza, które jest zaburzeniem występującym u około 2 mld ludzi na świecie [8].

Wśród wielu badaczy zajmujących się homeostazą żelaza panuje niezrozumiała tendencja do stawiania granicy między metabolizmem żelaza jonowego (nieorganicznego) a metabolizmem żelaza hemowego (organicznego). Tymczasem, powszechnie wiadomo, że bez odpowiedniej dostępności jonów żelaza w komórkach, proces syntezy hemu zostaje zahamowany. Bez degradacji hemu i uwalniania jonów żelaza w makrofagach, gwałtownie maleje dostępność żelaza w organizmie. Głównym celem pracy było uwypuklenie ścisłe-

go związku między kontrolą dostępności jonów żelaza w komórce (głównie przez system IRP/IRE), a aktywnością enzymów uczestniczących w syntezie hemu, takich jak syntaza aminolewulinowa 2 i ferrochelataza. Podkreślono także ściśle współdziałanie białek metabolizmu hemu (oksygenazy hemowej 1) z białkami metabolizmu żelaza jonowego (ferroportyną i ferrytyną) w procesie odzyskiwania żelaza ze starych erytrocytów,

jego recyrkulacji i detoksyfikacji. Na koniec zwrócono uwagę na coraz liczniejsze przykłady niedawno odkrytych białek uczestniczących w transporcie hemu na poziomie komórki i w skali całego organizmu. Wydaje się, że w przyszłości badanie powiązań między obiegiem żelaza hemowego i jonowego może być skutecznym sposobem na powiększenie naszej wiedzy na temat molekularnych podstaw homeostazy żelaza.

PIŚMIENICTWO

- [1] Anderson G.J., Frazer D.M., McKie A.T., Vulpe C.D., Smith A.: Mechanisms of haem and non-haem iron absorption: lessons from inherited disorders of iron metabolism. *Biometals*, 2005; 18: 339-348
- [2] Andrews N.C.: The iron transporter DMT1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1999; 31: 991-994
- [3] Auriac A., Willemetz A., Canonne-Hergaux F.: Lipid raft-dependent endocytosis: a new route for hepcidin-mediated regulation of ferroportin in macrophages. *Haematologica*, 2010; 95: 1269-1277
- [4] Beaumont C.: Multiple regulatory mechanisms act in concert to control ferroportin expression and heme iron recycling by macrophages. *Haematologica*, 2010; 95: 1233-1236
- [5] Bowman S.E., Bren K.L.: The chemistry and biochemistry of heme c: functional bases for covalent attachment. *Nat. Prod. Rep.*, 2008; 25: 1118-1130
- [6] Camaschella C., Campanella A., De Falco L., Boschetto L., Merlini R., Silvestri L., Levi S., Iolascon A.: The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood*, 2007; 110: 1353-1358
- [7] Chiabrando D., Marro S., Mercurio S., Giorgi C., Petrillo S., Vinchi F., Fiorito V., Fagoonee S., Camporeale A., Turco E., Merlo G.R., Silengo L., Altruda F., Pinton P., Tolosano E.: The mitochondrial heme exporter FLVCR1b mediates erythroid differentiation. *J. Clin. Invest.*, 2012; 122: 4569-4579
- [8] Clark S.F.: Iron deficiency anemia: diagnosis and management. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 2009, 25: 122-128
- [9] Cooperman S.S., Meyron-Holtz E.G., Olivierre-Wilson H., Ghosh M.C., McConnell J.P., Rouault T.A.: Microcytic anemia, erythropoietic protoporphyria, and neurodegeneration in mice with targeted deletion of iron-regulatory protein 2. *Blood*, 2005; 106: 1084-1091
- [10] Cox T.C., Bawden M.J., Martin A., May B.K.: Human erythroid 5-aminolevulinic acid synthase: promoter analysis and identification of an iron-responsive element in the mRNA. *EMBO J.*, 1991; 10: 1891-1902
- [11] Crooks D.R., Ghosh M.C., Haller R.G., Tong W.H., Rouault T.A.: Posttranslational stability of the heme biosynthetic enzyme ferrochelatase is dependent on iron availability and intact iron-sulfur cluster assembly machinery. *Blood*, 2010; 115: 860-869
- [12] Dandekar T., Stripecke R., Gray N.K., Goossen B., Constable A., Johansson H.E., Hentze M.W.: Identification of a novel iron-responsive element in murine and human erythroid delta-aminolevulinic acid synthase mRNA. *EMBO J.*, 1991; 10: 903-909
- [13] Davis M.R., Shawron K.M., Rendina E., Peterson S.K., Lucas E.A., Smith B.J., Clarke S.L.: Hypoxia inducible factor-2 α is translationally repressed in response to dietary iron deficiency in Sprague-Dawley rats. *J. Nutr.*, 2011; 141: 1590-1596
- [14] De Domenico I., Ward D.M., Langelier C., Vaughn M.B., Nemeth E., Sundquist W.I., Ganz T., Musci G., Kaplan J.: The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol. Biol. Cell*, 2007; 18: 2569-2578
- [15] Delaby C., Pilard N., Hetet G., Driss F., Grandchamp B., Beaumont C., Canonne-Hergaux F.: A physiological model to study iron recycling in macrophages. *Exp. Cell Res.*, 2005; 310: 43-53
- [16] Delaby C., Pilard N., Puy H., Canonne-Hergaux F.: Sequential regulation of ferroportin expression after erythrophagocytosis in murine macrophages: early mRNA induction by haem, followed by iron-dependent protein expression. *Biochem. J.*, 2008; 411: 123-131
- [17] Delaby C., Rondeau C., Pouzet C., Willemetz A., Pilard N., Desjardins M., Canonne-Hergaux F.: Subcellular localization of iron and heme metabolism related proteins at early stages of erythrophagocytosis. *PLoS One*, 2012; 7: e42199
- [18] Desuzinges-Mandon E., Arnaud O., Martinez L., Huché F., Di Pietro A., Falson P.: ABCG2 transports and transfers heme to albumin through its large extracellular loop. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 33123-33133
- [19] Epstein A.C., Gleadle J.M., McNeill L.A., Hewitson K.S., O'Rourke J., Mole D.R., Mukherji M., Metzen E., Wilson M.I., Dhanda A., Tian Y.M., Masson N., Hamilton D.L., Jaakkola P., Barstead R. I wsp.: C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 2001; 107: 43-54
- [20] Fleming M.D., Romano M.A., Su M.A., Garrick L.M., Garrick M.D., Andrews N.C.: Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 1148-1153
- [21] Folgueras A.R., de Lara F.M., Pendás A.M., Garabaya C., Rodríguez F., Astudillo A., Bernal T., Cabanillas R., López-Otín C., Velasco G.: Membrane-bound serine protease matrilysin-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis. *Blood*, 2008; 112: 2539-2545
- [22] French C.E., Bell J.M., Ward F.B.: Diversity and distribution of hemerythrin-like proteins in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2008; 279: 131-145
- [23] Furuyama K., Kaneko K., Vargas P.D.: Heme as a magnificent molecule with multiple missions: heme determines its own fate and governs cellular homeostasis. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2007; 213: 1-16
- [24] Galy B., Ferring D., Minana B., Bell O., Janser H.G., Muckenthaler M., Schumann K., Hentze M.W.: Altered body iron distribution and microcytosis in mice deficient in iron regulatory protein 2 (IRP2). *Blood*, 2005; 106: 2580-2589
- [25] Galy B., Ferring-Appel D., Becker C., Gretz N., Gröne H.J., Schümann K., Hentze M.W.: Iron regulatory proteins control a mucosal block to intestinal iron absorption. *Cell Rep.*, 2013; 3: 844-857
- [26] Galy B., Ferring-Appel D., Kaden S., Gröne H.J., Hentze M.W.: Iron regulatory proteins are essential for intestinal function and control key iron absorption molecules in the duodenum. *Cell Metab.*, 2008; 7: 79-85
- [27] Galy B., Ferring-Appel D., Sauer S.W., Kaden S., Lyoumi S., Puy H., Kölker S., Gröne H.J., Hentze M.W.: Iron regulatory proteins secure mitochondrial iron sufficiency and function. *Cell Metab.*, 2010; 12: 194-201

- [28] Ganz T.: Cellular iron: ferroportin is the only way out. *Cell Metab.*, 2005; 1: 155-157
- [29] Ganz T., Nemeth E.: Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1823: 1434-1443
- [30] Gonzalez-Rosendo G., Polo J., Rodriguez-Jerez J.J., Puga-Diaz R., Reyes-Navarrete E.G., Quintero-Gutierrez A.G.: Bioavailability of a heme-iron concentrate product added to chocolate biscuit filling in adolescent girls living in a rural area of Mexico. *J. Food Sci.*, 2010; 75: H73-H78
- [31] Gottlieb Y., Truman M., Cohen L.A., Leichtmann-Bardoogo Y., Meyron-Holtz E.G.: Endoplasmic reticulum anchored heme-oxygenase 1 faces the cytosol. *Haematologica*, 2012; 97: 1489-1493
- [32] Gozzelino R., Andrade B.B., Larsen R., Luz N.F., Vanoaica L., Seixas E., Coutinho A., Cardoso S., Rebelo S., Poli M., Barral-Netto M., Darshan D., Kühn L.C., Soares M.P.: Metabolic adaptation to tissue iron overload confers tolerance to malaria. *Cell Host Microbe*, 2012; 12: 693-704
- [33] Gozzelino R., Soares M.P.: Heme sensitization to TNF-mediated programmed cell death. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2011; 691: 211-219
- [34] Guo B., Yu Y., Leibold E.A.: Iron regulates cytoplasmic levels of a novel iron-responsive element-binding protein without aconitase activity. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 24252-24260
- [35] Harrison P.M., Arosio P.: The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996; 1275: 161-203
- [36] Hentze M.W., Muckenthaler M.U., Galy B., Camaschella C.: Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. *Cell*, 2010; 142: 24-38
- [37] Hira S., Tomita T., Matsui T., Igarashi K., Ikeda-Saito M.: Bach1, a heme-dependent transcription factor, reveals presence of multiple heme binding sites with distinct coordination structure. *IUBMB Life*, 2007; 59: 542-551
- [38] Hvidberg V., Maniecki M.B., Jacobsen C., Højrup P., Møller H.J., Moestrup S.K.: Identification of the receptor scavenging hemo-pein-heme complexes. *Blood*, 2005; 106: 2572-2579
- [39] Kakhlon O., Cabantchik Z.I.: The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002; 33: 1037-1046
- [40] Kakhlon O., Gruenbaum Y., Cabantchik Z.I.: Repression of ferritin expression increases the labile iron pool, oxidative stress, and short term growth of human erythroleukemia cells. *Blood*, 2001; 97: 2863-2871
- [41] Keel S.B., Doty R.T., Yang Z., Quigley J.G., Chen J., Knoblauch S., Kingsley P.D., De Domenico I., Vaughn M.B., Kaplan J., Palis J., Abkowitz J.L.: A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science*, 2008; 319: 825-828
- [42] Khan A.A., Quigley J.G.: Control of intracellular heme levels: heme transporters and heme oxygenases. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011; 1813: 668-682
- [43] Khan A.A., Quigley J.G.: Heme and FLVCR-related transporter families SLC48 and SLC49. *Mol. Aspects Med.*, 2013; 34: 669-682
- [44] Kikuchi G., Yoshida T., Noguchi M.: Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 338: 558-567
- [45] Knutson M., Wessling-Resnick M.: Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 2003; 38: 61-88
- [46] Knutson M.D., Oukka M., Koss L.M., Aydemir F., Wessling-Resnick M.: Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 1324-1328
- [47] Konijn A.M., Glickstein H., Vaisman B., Meyron-Holtz E.G., Slotki I.N., Cabantchik Z.I.: The cellular labile iron pool and intracellular ferritin K562 cells. *Blood*, 1999; 94: 2128-2134
- [48] Kovtunovych G., Eckhaus M.A., Ghosh M.C., Ollivierre-Wilson H., Rouault T.: Dysfunction of the heme recycling system in heme oxygenase 1-deficient mice: effects on macrophage viability and tissue iron distribution. *Blood*, 2010; 116: 6054-6062
- [49] Kruszewski M.: Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat. Res.*, 2003; 531: 81-92
- [50] Le Blanc S., Garrick M.D., Arredondo M.: Heme carrier protein 1 transports heme and is involved in heme-Fe metabolism. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2012; 302: C1780-C1785
- [51] Lill R., Hoffmann B., Molik S., Pierik A.J., Rietzschel N., Stehling O., Uzarska M.A., Webert H., Wilbrecht C., Mühlhoff U.: The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1823: 1491-1508
- [52] Lin Y.W., Wang J.: Structure and function of heme proteins in non-native states: A mini-review. *J. Inorg. Biochem.*, 2013; 129: 162-171
- [53] Lipiński P., Starzyński R.R., Styś A., Straciło M.: Iron homeostasis, a defense mechanism in oxidative stress. *Postępy Biochem.*, 2010; 56: 305-316
- [54] Liu Z.G., Hsu H., Goeddel D.V., Karin M.: Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*, 1996; 87: 565-576
- [55] Mangum C.P.: Oxygen transport in invertebrates. *Am. J. Physiol.*, 1985; 248: R505-R514
- [56] Marques L., Auriac A., Willemetz A., Banha J., Silva B., Canonne-Hergaux F., Costa L.: Immune cells and hepatocytes express glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin at their cell surface. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2012; 48: 110-120
- [57] Mastrogiannaki M., Matak P., Keith B., Simon M.C., Vaultont S., Peyssonnaud C.: HIF-2 α , but not HIF-1 α , promotes iron absorption in mice. *J. Clin. Invest.*, 2009; 119: 1159-1166
- [58] Mastrogiannaki M., Matak P., Peyssonnaud C.: The gut in iron homeostasis: role of HIF-2 under normal and pathological conditions. *Blood*, 2013; 122: 885-892
- [59] 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
- [60] McKie A.T., Marciani P., Rolfs A., Brennan K., Wehr K., Barrow D., Miret S., Bomford A., Peters T.J., Farzaneh F., Hediger M.A., Hentze M.W., Simpson R.J.: A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol. Cell.*, 2000; 5: 299-309
- [61] Meyron-Holtz E.G., Ghosh M.C., Iwai K., LaVaute T, Brazzolotto X., Berger U.V., Land W., Ollivierre-Wilson H., Grinberg A., Love P., Rouault T.A.: Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *EMBO J.*, 2004; 23: 386-395
- [62] Mueller S.: Iron regulatory protein 1 as a sensor of reactive oxygen species. *Biofactors*, 2005; 24: 171-181
- [63] Nemeth E., Tuttle M.S., Powelson J., Vaughn M.B., Donovan A., Ward D.M., Ganz T., Kaplan J.: Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 2004; 306: 2090-2093
- [64] Ohgami R.S., Campagna D.R., Greer E.L., Antiochos B., McDonald A., Chen J., Sharp J.J., Fujiwara Y., Barker J.E., Fleming M.D.: Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat. Genet.*, 2005; 37: 1264-1269
- [65] Paoli M., Marles-Wright J., Smith A.: Structure-function relationships in heme-proteins. *DNA Cell Biol.*, 2002; 21: 271-280
- [66] Parfenova H., Leffler C.W.: Cerebroprotective functions of HO-2. *Curr. Pharm. Des.*, 2008; 14: 443-453

- [67] Petrat F, de Groot H, Rauen U.: Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopic study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells. *Biochem. J.*, 2001; 356: 61-69
- [68] Pham C.G., Bubici C., Zazzeroni F., Papa S., Jones J., Alvarez K., Jayawardena S., De Smaele E., Cong R., Beaumont C., Torti F.M., Torti S.V., Franzoso G.: Ferritin heavy chain upregulation by NF- κ B inhibits TNF α -induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. *Cell*, 2004; 119: 529-542
- [69] Picard V., Epsztejn S., Santambrogio P., Cabantchik Z.I., Beaumont C.: Role of ferritin in the control of the labile iron pool in murine erythroleukemia cells. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 15382-15386
- [70] Pietrangelo A.: Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology*, 2010; 139: 393-408
- [71] Ponka P.: Cell biology of heme. *Am. J. Med. Sci.*, 1999; 318: 241-256
- [72] Ponka P., Lok C.N.: The transferrin receptor: role in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1999; 31: 1111-1137
- [73] Poss K.D., Tonegawa S.: Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 10919-10924
- [74] Quigley J.G., Yang Z., Worthington M.T., Phillips J.D., Sabo K.M., Sabath D.E., Berg C.L., Sassa S., Wood B.L., Abkowitz J.L.: Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. *Cell*, 2004; 118: 757-766
- [75] Quintero-Gutierrez A.G., Gonzalez-Rosendo G., Sanchez-Munoz J., Polo-Pozo J., Rodriguez-Jerez J.J.: Bioavailability of heme iron in biscuit filling using piglets as an animal model for humans. *Int. J. Biol. Sci.*, 2008; 4: 58-62
- [76] Rajagopal A., Rao A.U., Amigo J., Tian M., Upadhyay S.K., Hall C., Uhm S., Mathew M.K., Fleming M.D., Paw B.H., Krause M., Hamza I.: Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins. *Nature*, 2008; 453: 1127-1131
- [77] Rouault T.A.: The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat. Chem. Biol.*, 2006; 2: 406-414
- [78] Rouhier N., Couturier J., Johnson M.K., Jacquot J.P.: Glutaredoxins: roles in iron homeostasis. *Trends. Biochem. Sci.*, 2010; 35: 43-52
- [79] Salahudeen A.A., Thompson J.W., Ruiz J.C., Ma H.W., Kinch L.N., Li Q., Grishin N.V., Bruick R.K.: An E3 ligase possessing an iron-responsive hemerythrin domain is a regulator of iron homeostasis. *Science*, 2009; 326: 722-726
- [80] Sanchez M., Galy B., Muckenthaler M.U., Hentze M.W.: Iron-regulatory proteins limit hypoxia-inducible factor-2 α expression in iron deficiency. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2007; 14: 420-426
- [81] Sassa S.: Why heme needs to be degraded to iron, biliverdin IX α , and carbon monoxide? *Antioxid. Redox Signal.*, 2004; 6: 819-824
- [82] Shah Y.M., Matsubara T., Ito S., Yim S.H., Gonzalez F.J.: Intestinal hypoxia-inducible transcription factors are essential for iron absorption following iron deficiency. *Cell Metab.*, 2009; 9: 152-164
- [83] Shaw G.C., Cope J.J., Li L., Corson K., Hersey C., Ackermann G.E., Gwynn B., Lambert A.J., Wingert R.A., Traver D., Trede N.S., Barut B.A., Zhou Y., Minet E., Donovan A. i wsp.: Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature*, 2006; 440: 96-100
- [84] Shayeghi M., Latunde-Dada G.O., Oakhill J.S., Laftah A.H., Takeuchi K., Halliday N., Khan Y., Warley A., McCann F.E., Hider R.C., Frazer D.M., Anderson G.J., Vulpe C.D., Simpson R.J., McKie A.T.: Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*, 2005; 122: 789-801
- [85] Shi H., Bencze K.Z., Stemmler T.L., Philpott C.C.: A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science*, 2008; 320: 1207-1210
- [86] Sikorska K., Bielawski K.P., Romanowski T., Stalke P.: Hemochromatosis dziedziczna – najczęstsza choroba genetyczna człowieka. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2006; 60: 667-676
- [87] Smith A., Rish K.R., Lovelace R., Hackney J.F., Helston R.M.: Role for copper in the cellular and regulatory effects of heme-hemopexin. *Biometals*, 2009; 22: 421-437
- [88] Soe-Lin S., Apte S.S., Andriopoulos B.Jr, Andrews M.C., Schranzhofer M., Kahawita T., Garcia-Santos D., Ponka P.: Nramp1 promotes efficient macrophage recycling of iron following erythrophagocytosis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009; 106: 5960-5965
- [89] Starzyński R.R., Canonne-Hergaux F., Lenartowicz M., Krzeptowski W., Willemetz A., Styś A., Bierła J., Pietrzak P., Dziaman T., Lipiński P.: Ferroportin expression in haem oxygenase 1-deficient mice. *Biochem. J.*, 2013; 449: 69-78
- [90] Starzyński R.R., Lipiński P.: IRP1, białko kontrolujące homeostazę żelaza komórkach ssaków: regulacja jego aktywności przez jony żelaza i tlenek azotu. *Postępy Biol. Kom.*, 2003; 30: 497-514
- [91] Styś A., Galy B., Starzyński R.R., Smuda E., Drapier J.C., Lipiński P., Bouton C.: Iron regulatory protein 1 outcompetes iron regulatory protein 2 in regulating cellular iron homeostasis in response to nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 2011; 286: 22846-22854
- [92] Sun C.C., Vaja V., Babbitt J.L., Lin H.Y.: Targeting the hepcidin-ferroportin axis to develop new treatment strategies for anemia of chronic disease and anemia of inflammation. *Am. J. Hematol.*, 2012; 87: 392-400
- [93] Suzuki H., Tashiro S., Hira S., Sun J., Yamazaki C., Zenke Y., Ikeda-Saito M., Yoshida M., Igarashi K.: Heme regulates gene expression by triggering Crm1-dependent nuclear export of Bach1. *EMBO J.*, 2004; 23: 2544-2553
- [94] Tanno T., Bhanu N.V., Oneal P.A., Goh S.H., Staker P., Lee Y.T., Moroney J.W., Reed C.H., Luban N.L., Wang R.H., Eling T.E., Childs R., Ganz T., Leitman S.F., Fucharoen S., Miller J.L.: High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat. Med.*, 2007; 13: 1096-1101
- [95] Tanno T., Porayette P., Sripichai O., Noh S.J., Byrnes C., Bhupatiraju A., Lee Y.T., Goodnough J.B., Harandi O., Ganz T., Paulson R.F., Miller J.L.: Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood*, 2009; 114: 181-186
- [96] Tolosano E., Fagoonee S., Morello N., Vinchi F., Fiorito V.: Heme scavenging and the other facets of hemopexin. *Antioxid. Redox Signal.*, 2010; 12: 305-320
- [97] Tolosano E., Hirsch E., Patrucco E., Camaschella C., Navone R., Silengo L., Altruda F.: Defective recovery and severe renal damage after acute hemolysis in hemopexin-deficient mice. *Blood*, 1999; 94: 3906-3914
- [98] Vashisht A.A., Zumbrennen K.B., Huang X., Powers D.N., Durazo A., Sun D., Bhaskaran N., Persson A., Uhlen M., Sangfelt O., Spruck C., Leibold E.A., Wohlschlegel J.A.: Control of iron homeostasis by an iron-regulated ubiquitin ligase. *Science*, 2009; 326: 718-721
- [99] Viatte L., Vaulont S.: Hepcidin, the iron watcher. *Biochimie*, 2009; 91: 1223-1228
- [100] Vinchi F., Gastaldi S., Silengo L., Altruda F., Tolosano E.: Hemopexin prevents endothelial damage and liver congestion in a mouse model of heme overload. *Am. J. Pathol.*, 2008; 173: 289-299
- [101] Volz K.: The functional duality of iron regulatory protein 1. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2008; 18: 106-111
- [102] 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
- [103] Walker F.A.: Models of the bis-histidine-ligated electron-transferring cytochromes. Comparative geometric and electronic structure of low-spin ferro- and ferrihemes. *Chem. Rev.*, 2004; 104: 589-615
- [104] Wang X.M., Kim H.P., Nakahira K., Ryter S.W., Choi A.M.: The heme oxygenase-1/carbon monoxide pathway suppresses TLR4 si-

gnaling by regulating the interaction of TLR4 with caveolin-1. *J. Immunol.*, 2009; 182: 3809-3818

[105] West A.R., Oates P.S.: Subcellular location of heme oxygenase 1 and 2 and divalent metal transporter 1 in relation to endocytotic markers during heme iron absorption. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2008; 23: 150-158

[106] White K.N., Conesa C., Sánchez L., Amini M., Farnaud S., Lorzalac C., Evans R.W.: The transfer of iron between ceruloplasmin and transferrins. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1820: 411-416

[107] Yang Z., Philips J.D., Doty R.T., Giraudi P., Ostrow J.D., Tiribelli C., Smith A., Abkowitz J.L.: Kinetics and specificity of feline leukemia virus subgroup C receptor (FLVCR) export function and its dependence on hemopexin. *J. Biol. Chem.*, 2010, 285: 28874-28882

[108] Ye H., Jeong S.Y., Ghosh M.C., Kovtunovych G., Silvestri L., Ortillo D., Uchida N., Tisdale J., Camaschella C., Rouault T.A.: Glutaredoxin 5 deficiency causes sideroblastic anemia by specifically impairing heme biosynthesis and depleting cytosolic iron in human erythroblasts. *J. Clin. Invest.*, 2010; 120: 1749-1761

[109] Ye H., Rouault T.A.: Erythropoiesis and iron-sulfur cluster biogenesis. *Adv. Hematol.*, 2010; 2010: 1-8

[110] Young M.F., Griffin I., Pressman E., McIntyre A.W., Cooper E., McNanley T., Harris Z.L., Westerman M., O'Brien K.O.: Utilization of iron from an animal-based iron source is greater than that of ferrous sulfate in pregnant and nonpregnant women. *J. Nutr.*, 2010; 140: 2162-2166

[111] Zhang D.L., Hughes R.M., Ollivierre-Wilson H., Ghosh M.C., Rouault T.A.: A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and erythroid precursor cells to evade translational repression. *Cell Metab.*, 2009; 9: 461-473

[112] Zhang D.L., Senecal T., Ghosh M.C., Ollivierre-Wilson H., Tu T., Rouault T.A.: Hpcidin regulates ferroportin expression and intracellular iron homeostasis of erythroblasts. *Blood*, 2011; 118: 2868-2877

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.