

## Savremena saznanja o molekulskim mehanizmima regulacije homeostaze gvožđa

Petar Popović\*, Gordana Žunić\*, Evica Dinčić†

Vojnomedicinska akademija, \*Institut za medicinska istraživanja, †Klinika za neurologiju, Beograd

**K l j u č n e r e č i :** gvožđe; hemostaza; biološki transport; transferin; feritin.

**K e y w o r d s :** iron; homeostasis; biological transport; transferrin; ferritin.

Gvožđe je najzastupljeniji oligoelement u organizmu i sastavni je deo brojnih fiziološki važnih molekula počev od hemoglobina i mioglobina do mnoštva enzima uključenih u različite vitalne procese u ćeliji (oksidaze, katalaze, peroksidaze, citohromi, akonitaze, ribonukleotid reduktaze i sintetaze azotnog oksida) (1, 2). S obzirom na funkciju navedenih molekula, gvožđe ima važnu ulogu u brojnim ćelijskim procesima, kao što su sinteza DNK, RNK i proteina; proliferacija i diferencijacija ćelija; transport elektrona; ćelijsko disanje; regulacija ekspresije gena (1, 2). Oko 75% endogenog gvožđa je prisutno u formi nabrojanih aktivnih molekula proteina, dok 25% čine transportne i deponovane forme. Veliki biološki značaj gvožđa zasniva se na njegovim hemijskim karakteristikama. Naime, pošto postoji u dvovalentnom (fero) i trovalentnom (feri) obliku, gvožđe ima sposobnost da prima i odaje elektrone, što mu omogućava učestvovanje u oksidoredukcionim procesima u ćeliji (3). Međutim, olakšavajući stvaranje citotoksičnih slobodnih radikala, gvožđe može imati i izrazito toksične efekte (2, 3).

Da bi se obezbedile ćelijske potrebe za gvožđem, a istovremeno izbegli njegovi potencijalni toksični efekti, razvijeni su prefinjeni i visokospecijalizovani molekulski mehanizmi odgovorni za njegovu apsorpciju, transport i odlaganje u solubilnom, netoksičnom obliku (4, 5). U ovom radu biće izneta savremena saznanja o regulaciji apsorpcije gvožđa, najpre na nivou enterocita, a zatim i na nivou somatskih ćelija.

### Regulacija prometa gvožđa na nivou enterocita

Tokom rasta i razvoja neophodno je da apsorpcija gvožđa iz lumena tankog creva premaši gubitak za 0,5 mg

dnevno. Nakon toga, pošto se u organizmu odrasle osobe uspostavi ravnoteža, svakodnevne potrebe za gvožđem, koje iznose do 25 mg, u najvećem delu se obezbeđuju iz unutrašnjih rezervi, dok se gubitak i apsorpcija kreću u opsegu 1–2 mg (4). Međutim, i pored relativno malog udela u svakodnevnom prometu gvožđa u organizmu, regulisanje apsorpcije u tankom crevu, tj. na nivou enterocita glavni je mehanizam održavanja njegove količine, s obzirom na to da se dodatne potrebe organizma za gvožđem potpuno obezbeđuju ishranom, dok povećanje ekskrecije prirodnim mehanizmima nije moguće (4, 5). Istraživanja, sprovedena u nekoliko poslednjih godina, ukazuju na postojanje više puteva apsorpcije koji su, zavisno od oblika u kome se gvožđe nalazi, regulisani različitim molekulskim mehanizmima (4, 5) (sl. 1).

Ishranom uneto gvožđe se u najvećem delu nalazi u okviru metaloporfirina hema ili u obliku trovalentnog feri jona za čiju je apsorpciju neophodno heliranje u kiseloj sredini želudačnog soka ( $\text{pH} < 3$ ), pošto je nerastvorljiv u slabo kiseloj i alkalnoj sredini. Aktivnošću redukcionih faktora (askorbinska kiselina) deo trovalentnih feri jona može biti redukovan u dvovalentni fero oblik, koji je dobro rastvorljiv i u neutralnoj sredini tankog creva. Zbog navedene dobre rastvorljivosti u farmakološkim preparatima uglavnom se nalaze soli dvovalentnog fero gvožđa (4, 5).

Apsorpcija gvožđa odvija se u proksimalnom delu tankog creva. Uprkos dvostruko većem prisustvu neorganskog feri oblika gvožđa u ishrani dve trećine potreba za gvožđem obezbeđuje se apsorpcijom metaloporfirina hema, najviše zbog njegove dobre rastvorljivosti. Mehanizmi apsorpcije hema nisu do kraja proučeni, ali je poznato da on ulazi u enterocite kao intaktni metaloporfirin, endocitozom, nakon

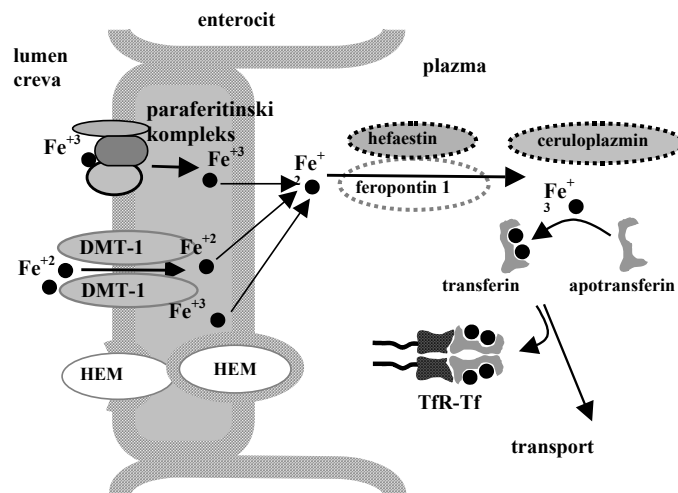
čega dolazi do enzimskog otvaranja porfirinskog prstena i oslobađanja jona gvožđa. U stanjima nedostatka gvožđa dolazi do povećanja apsorpcije hema, iako ne u onoj meri u kojoj se povećava apsorpcija neorganskog gvožđa. Najzad, pokazano je da nema kompeticije između apsorpcije hema i slobodnog gvožđa (4, 5).

Mnogo više detalja poznato je o molekulima koji učestvuju u preuzimanju neorganskog gvožđa iz lumena tankog creva. Navedeni molekuli identifikovani su korišćenjem radioaktivnog izotopa gvožđa, dok je njihov funkcionalni značaj potvrđen činjenicom da nedostatak gvožđa u organizmu dovodi do njihovog pojačanog prisustva na enterocitima. Takođe je potvrđeno da se preuzimanje dvovalentnog i trovalentnog gvožđa odvija preko dva odvojena puta. Transport dvovalentnog gvožđa posredovan je tzv. *Nramp2* molekulom, transporterom dvovalentnih metala ili, kako se još naziva, transporterom dvovalentnih katjona (*DMT-1*, *divalent metal transporter*; *DCT-1*, *divalent cation transporter*) (6, 7). Nazvan je *Nramp2* (*DMT-1* ili *DCT-1*) usled velike sličnosti sa *Nramp1* (*natural resistance-associated macrophage protein*) molekulom koji ima važnu ulogu u odbrani organizma od patogenih mikroorganizama (5). *Nramp2* ima funkciju transporta gvožđa iz lumena tankog creva u enterocit, mada može učestvovati u transmembranskom transportu i drugih katjona (cink, mangan, kobalt, kadmijum, bakar, nikal i olovo) (8). Za transport trovalentnog feri jona odgovoran je membranski kompleks molekula, koji se naziva paraferitin (*paraferitin*). Navedeni kompleks čine mobilferin (*mobilferrin*),  $\beta$ -integrin i flavin monooksigenaza.

zvan stimulator transporta gvožđa (*SFT*, *stimulator of iron transport*), za koga je pokazano da olakšava apsorpciju i feri i fero jona (10).

Istovremeno sa apsorpcijom iz lumena creva enterociti preuzimaju gvožđe i iz organizma endocitozom kompleksa transferin – transferinski receptor. Ovo je važno s obzirom na to da se na osnovu zasićenosti unutrašnjih rezervi, na nivou enterocita, reguliše apsorpcija gvožđa unetog ishranom. Naime, povećanje koncentracije gvožđa u enterocitima dovodi do zasićenja unutarćelijskog mobilferina, čime se ometa transport trovalentnog gvožđa preko membranskog kompleksa mobilferin –  $\beta$ -integrin, dok istovremeno dolazi do značajnog pada u ispoljavanju molekula neophodnog za unos dvovalentnog gvožđa, što sve zajedno ima za posledicu smanjenje ili čak prekid apsorpcije neorganskog gvožđa iz lumena creva (9).

Za transport gvožđa iz enterocita u cirkulaciju odgovoran je nedavno otkriveni molekul tzv. ferroportin1 (*ferroportin1*), čije ispoljavanje je regulisano samim nivoom gvožđa u ćeliji (11, 12). Pored enterocita ferroportin1 je u značajnoj gustini ispoljen na makrofagama, ćelijama placente, jetre, bubrega i slezine (11). Za potpunu funkcionalnost ferroportin1 neophodna je aktivnost ferooksidaze. U tom smislu funkcija ferroportin1 pomognuta je membranskom ferooksidazom nazvanom hefaestin (*hephaestin*) i serumskim ceruloplazminom. Navedeni molekuli, hefaestin i ceruloplazmin, ne učestvuju direktno u transportu gvožđa, već ga samo olakšavaju menjajući njegovo oksidativno stanje (12) (sl. 1).



Sl. 1 – Regulacija prometa gvožđa na nivou enterocita

Značaj navedenog kompleksa potvrđen je i eksperimentima u kojima tretman ćelija antitelima prema  $\beta$ -integrinima smanjuje apsorpciju feri jona gvožđa za 90% (4). U eksperimentnim modelima je utvrđeno da nedostatak nekog od navedenih molekula, bilo da on učestvuje u transportu dvovalentnog ili trovalentnog jona, ima za posledicu značajan nedostatak gvožđa u organizmu, kao i da obrnuto nedostatak gvožđa dovodi do povećanog prisustva svih navedenih molekula (4, 9). Nedavno je otkriven još jedan molekul na-

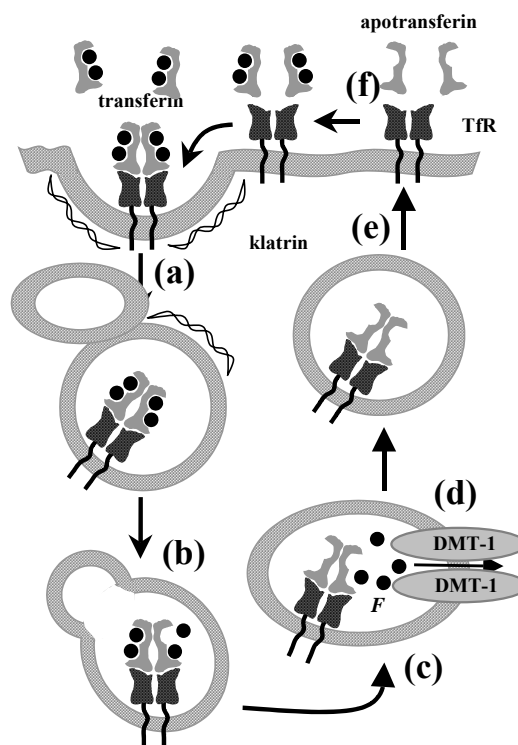
Osim u enterocitima, pojedini od navedenih molekula odgovornih za transport neorganskog gvožđa identifikovani su i u drugim ćelijama i tkivima. Međutim, s obzirom na to da se transport gvožđa u te ćelije skoro potpuno odvija putem endocitoze kompleksa transferin – transferinski receptor, njihov značaj nije jasan. Skorašnja istraživanja, međutim, ukazuju da su navedeni molekuli, transporter dvovalentnih jona, *Nramp2* (6, 7) i stimulator transporta gvožđa (13) važni za unutarćelijski transport iz endozoma u cito-

plazmu, dok paraferitinski kompleks, odgovoran za transport trovalentnih jona, može učestvovati u transportu gvožđa iz cirkulacije u ćeliju (4, 5). Saznanja o važnosti *Nramp2* molekula najvećim delom su dobijena istraživanjima na eksperimentalnom modelu anemičnog beogradskog laboratorijskog pacova kod koga je zračenjem izazvana mutacija gena odgovornog za sintezu navedenog molekula (6). Međutim, više godina pre nego što je razjašnjena molekulska osnova izražene anemije koja je prisutna kod navedenih životinja, na istom modelu beogradskog pacova pokazan je veliki značaj gvožđa, odnosno njegovog transporta u mnoštvu metaboličkih procesa (14).

Kao što je poznato, za transport gvožđa do tkiva odgovoran je transferin, serumski glikoprotein molekulske mase 80kDa. Njegov afinitet za vezivanje gvožđa zavisi od koncentracije vodonikovih jona (*pH*), tako da je u neutralnoj sredini visok, dok sa porastom kiselosti opada, pa se gvožđe odvaja od transferina kada je *pH* niži od 6,5. Slično molekulima uključenim u apsorpciju gvožđa i transferin može učestvovati u transportu drugih metala (aluminijum, mangan, bakar i kadmijum) mada za njih ima značajno manji afinitet vezivanja (5). U cirkulaciji transferin se nalazi u obliku bez gvožđa, tzv. apotransferin ili može imati vezane jedan ili dva jona trovalentnog gvožđa. U fiziološkim okolnostima 1/3 transferina zasićena je vezanim gvoždem, dok se preostalih 2/3 molekula u cirkulaciji nalazi u obliku apotransferina (4, 5). Treba reći i da sam afinitet vezivanja transferina za receptor zavisi od njegove zasićenosti jonima gvožđa. Naime, najveći afinitet ima transferin sa dva vezana jona, zatim sa jednim, dok je najmanji afinitet apofertina, pošto za sebe nema vezano gvožđe (4, 5). Sama zasićenost transferina merena preko ukupnog (*TIBC*, *total iron binding capacity*) ili nezasićenog kapaciteta za vezivanje gvožđa (*UIBC*, *unsaturated iron binding capacity*) danas je u širokoj kliničkoj primeni kao pokazatelj stanja homeostaze gvožđa na nivou organizma. Međutim, savremena istraživanja ukazuju na značajne nedostatke korišćenja navedenog parametra i predlažu direktnu detekciju nekih molekula značajnih za metabolizam gvožđa, kao što su receptor za transferin i feritin (5).

### Regulacija prometa gvožđa na nivou ćelije

Glavni put ulaska gvožđa u ćeliju odvija se endocitozom odnosno internalizacijom transferina (Tf) vezanog receptorom za transferin (TfR, *CD71*) (sl. 2). Receptor za transferin je glikoprotein molekulske mase od 95kDa, ispoljen na membrani ćelije kao transmembranski disulfidno vezan homodimer, čiji je poluzivot oko 30 časova. Svaki monomer može da veže jedan molekul transferina, a sam proces endocitoze detaljno je proučen. Danas su poznata dva tipa receptora za transferin koji imaju specifičnu distribuciju i verovatno različitu funkciju. Dok je TfR1 ispoljen na svim ćelijama izuzev eritrocita i prevashodno učestvuje u preuzimanju gvožđa, njegov homolog TfR2 specifično se nalazi na pojedinim ćelijama i verovatno ima i druge funkcije (5).



Sl. 2 – Faze reciklacije kompleksa transferin-transferinski receptor

Na samoj ćelijskoj membrani molekuli TfR1 akumuliraju se u poljima koja su obložena klatriinom (engl. – *clathrin coated pit*), što i omogućava endocitozu kompleksa Tf-TfR1 formiranjem tzv. klatriinom obložene vezikule (engl. – *clathrin coated vesicle*) (sl. 2a). Navedene vezikule spajaju se u citoplazmi sa endozomom u kome u uslovima kisele sredine (*pH*~5,5) (sl. 2b) dolazi do odvajanja gvožđa od transferina, dok sam transferin bez gvožđa, tzv. apotransferin ostaje vezan za TfR1 (sl. 2c). Nakon odvajanja od transferina gvožđe se iz endocitotskih vezikula prebacuje u citoplazmu pomoću aktivnosti transportera dvovalentnih metala, *DMT-1/Nramp2* (sl. 2d) (6, 7). Preko transportnih vezikula kompleks TfR1–apofertin ponovo dospeva do plazmatske membrane (sl. 2e), gde se u uslovima neutralne sredine (*pH*=7,4) apotransferin odvaja od TfR1, a njegovo mesto zauzima drugi molekul Tf (sl. 2f). Nakon ponovnog vezivanja gvožđa za oslobođeni apotransferin ceo ciklus se ponavlja (15). Važno je istaći da se opisani proces reciklacije TfR1 molekula odvija ciklično, u pravilnim vremenskim razmacima (15–20 minuta), i nezavisno od stvaranja kompleksa sa transferinom (16).

S obzirom na navedeni značaj gvožđa u homeostazi ćelije, ali i na njegove potencijalno toksične efekte, mehanizmi regulacije njegovog preuzimanja iz vanćelijskog prostora su veoma precizni i strogo kontrolisani. Kao osnovni put preuzimanja gvožđa kontrola ispoljavanja TfR1 molekula na membrani ćelije zauzima centralno mesto u regulisanju homeostaze unutarćelijskog gvožđa i biće detaljno opisan. Nažalost, uprkos intenzivnim istraživanjima tokom

prethodne dve decenije navedeni mehanizmi ni danas nisu potpuno razjašnjeni (4, 5, 17).

### Mehanizmi regulacije ispoljavanja TfR1

U skladu sa funkcijom transporta gvožđa iz vanćelijskog u unutarćelijski prostor logično je da sam nivo slobodnog gvožđa u citoplazmi ima presudnu ulogu u regulisanju nivoa ispoljavanja receptora za transferin. Mehanizmima autoregulacije po principu negativne povratne sprege nedostatak slobodnog gvožđa u citoplazmi stimuliše ispoljavanje, dok zasićenje unutarćelijskih depoa dovodi do sprečavanja ispoljavanja TfR1 molekula (2). Navedeni mehanizam regulacije ispoljavanja TfR1 odvija se na nivou informacione RNK (iRNK) za TfR1 i detaljno je proučen. Pored navedenog, verovatno glavnog mehanizma regulacije, nivo ispoljavanja TfR1 molekula može biti regulisan brzinom njegove endocitoze odnosno cikliranja (16, 18), ali i regulacijom na nivou transkripcije DNK (17).

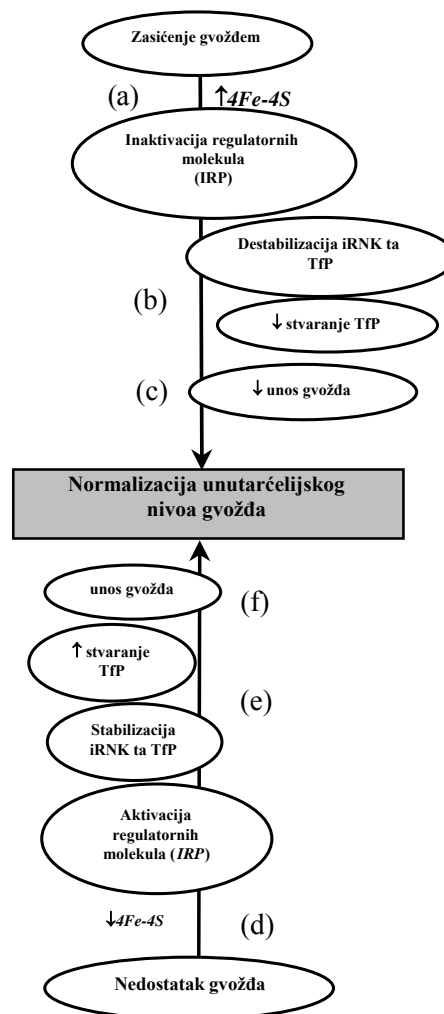
#### Regulacija ispoljavanja *TfR1* na nivou transkripcije gena

Identifikovano je više molekula velike mase koji se mogu vezati za promotor gena za TfR1. Njihova prolazno povećana aktivnost u citozolu prethodi porastu sadržaja iRNK za TfR1, što prethodi ulasku ćelije u S fazu ćelijskog ciklusa (19). Pored spomenutih molekula koji verovatno regulišu transkripciju gena za TfR1 molekul, u skladu sa potrebama ćelija tokom faza ćelijske deobe, potvrđena je i regulacija transkripcije hipoksijom (17). Regulacija na nivou DNK glavni je mehanizam u ćelijama različite zrelosti tokom diferencijacije eritroidne loze, ali nije dominantan i u drugim ćelijama (5).

#### Regulacija ispoljavanja *TfR1* na nivou informacione RNK

Uprkos činjenici da je kontrola fenotipskog ispoljavanja humanih gena u najvećem broju slučajeva vezana isključivo za regulisanje procesa transkripcije, stvaranje nekih molekula kontrolisano je i na nivou translacije, tj. sinteze peptida. Upravo na taj način se u najvećoj meri kontroliše apsorpcija gvožđa na nivou ćelije (20). Kao što je već navedeno, regulacija ispoljavanja TfR1 na nivou iRNK verovatno je najpotentniji mehanizam kontrole s obzirom na to da je direktno podložan regulaciji slobodnim jonima gvožđa u citoplazmi. Pored toga, modulacijom funkcionalne dostupnosti i stabilnosti iRNK slobodno gvožđe istovremeno utiče na preuzimanje vanćelijskog, kao i na deponovanje unutarćelijskog gvožđa regulacijom sinteze, za te procese ključnih molekula, TfR1 za preuzimanje i feritina za deponovanje. Mehanizam navedene kontrole bazira se na aktivnosti dva regulatorna proteina u citoplazmi ćelije, tzv. *IRP-1* i *IRP-2* (*iron regulatori proteini*). Navedeni molekuli, zavisno od statusa sopstvene aktivacije koja je regulisana unutarćelijskim nivoom gvožđa, modulišu proces translacije utičući na dostupnost ili stabilnost iRNK (sl. 3). Svoju re-

gulatorsku funkciju navedeni molekuli ostvaruju vezivanjem za odgovarajuće specifične sekvence na iRNK, tzv. *IREs* (*iron responsible elements*).



Sl. 3 – Mehanizam regulacije ispoljavanja receptora za transferin unutarćelijskim nivoom gvožđa

Na iRNK za receptor za transferin nalazi se pet, dok je na iRNK za feritin detektovana jedna *IRE* sekvenca. Kao što je spomenuto, aktivnost samih regulatorskih proteina u najvećoj meri zavisi od nivoa unutarćelijskog gvožđa, ali može biti kontrolisana i drugim faktorima kao što su azotni oksid (NO), oksidativni stres, hipoksija, nivo fosforilacije, odnosno procesi proliferacije i diferencijacije same ćelije (21). U navedenoj regulatornoj kaskadi najpre nivo unutarćelijskog gvožđa reguliše aktivnost navedenih *IRP* molekula. Naime, u uslovima zasićenosti gvoždem nastaju kompleksi gvožđa i sumpora (*4Fe-4S*; *3Fe-4S*) koji se vezuju za regulatorne proteine i dovode do njihove inaktivacije (sl. 3a), odnosno gubitka sposobnosti da se vežu za *IRE* sekvence na iRNK. U takvim okolnostima *IRP-1* molekul prima enzimsku funkciju citozolne akonitaze koja slično mitohondrijskoj formi utiče na metabolizam citrata, dok se *IRP-2* molekul degradira. Neaktivnost *IRP* molekula dalje

ima za posledicu destabilizaciju iRNK za TfR1 usled dostupnosti mesta podložnih enzimskoj degradaciji, što ima za posledicu prestanak njegove sinteze (sl. 3b) i sledstveno smanjenje preuzimanja gvožđa (sl. 3c). Istovremeno, usled neaktivnosti IRP i RNK za feritin je aktivna, što dovodi do stvaranja feritina i povećanja odlaganja gvožđa. Obratno, u uslovima smanjenja nivoa unutarćelijskog gvožđa ili povećanih potreba usled npr. stimulacije proliferacije ćelije, dolazi do odvajanja kompleksa gvožđa i sumpora od regulatornih, IRP molekula, što dovodi do njihove aktivacije (sl. 3d), a čime se omogućava njihovo vezivanje za IRE sekvence na iRNK. Vezivanjem za navedene sekvence na iRNK za TfR1 onemogućava se enzimska degradacija i sledstveno povećava sinteza samog TfR molekula (sl. 3e), dok se vezivanjem za sekvencu na iRNK za feritin onemogućava dalja sinteza navedenog proteina. Povećanjem nivoa TfR1 povećava se preuzimanje gvožđa (sl. 3f), dok se smanjenjem nivoa feritina istovremeno onemogućava njegovo odlaganje. Rezultat navedenih promena je povećanje nivoa gvožđa u ćeliji (2, 21, 22).

Kao što je već rečeno, a u skladu sa njihovom centralnom ulogom u regulisanju homeostaze gvožđa, IRP molekuli su mesto na kome se ukrštaju, odnosno susreću različiti vanćelijski i unutarćelijski faktori koji utiču na preuzimanje i metabolizam gvožđa. Neki od njih, kao što su NO ili fosforilacija, mogu direktno uticati na aktivnost navedenih regulatorskih molekula nezavisno od nivoa unutarćelijskog gvožđa. Na taj način promena stepena fosforilacije IRP molekula, pod uticajem protein kinaza, predstavlja molekulsku osnovu za regulisanje aktivnosti navedenih molekula i, naravno, uticaj na metabolizam gvožđa u specifičnim stanjima kao što su proliferacija ćelije, proces diferenciranja ili inflamacije (21). Dosadašnja istraživanja ukazuju da je stepen fosforilacije u korelaciji sa aktivnošću, odnosno mogućnošću IRP molekula da se vežu za IRE sekvence i tako deluju na promet gvožđa (23). Treba reći da IRP molekuli na sličan način kontrolišu translaciju i drugih molekula uključenih u održavanje homeostaze gvožđa kao što su *DMT-1/Nramp2*, mitohondrijska akonitaza, kao i neki enzimi odgovorni za sintezu hema (21).

#### *Regulacija ispoljavanja TfR1 na nivou regulacije procesa cikliranja*

Sam proces cikliranja opisan je ranije, ali treba ponoviti da se on odvija u pravilnim vremenskim razmacima (15–20 minuta) i nezavisno od stvaranja kompleksa sa transferinom (16). Molekulski mehanizmi kontrole opisanog procesa recirkulacije TfR1 nisu dovoljno proučeni, mada je pokazano da fosforilacija unutarćelijskog dela membranskog TfR1 molekula, posredovana aktivnošću enzima protein kinaza, može imati uticaja (18). Naime, unutarćelijski deo TfR1 podložan je fosforilaciji koja se detektuje nakon tretmana farmakološkim stimulatorom protein kinaza, koji istovremeno kod eritroidnih i leukemiskih ćelija dovodi do smanjenja njegovog ispoljavanja (24). Međutim, nije potvrđeno da fosforilacija posredovana aktivnošću protein kinaza direktno utiče na regulisanje cikliranja TfR1 (25).

Pored opisanog puta ulaska gvožđa u ćeliju preko TfR1-zavisnog mehanizma visokog afiniteta i malog kapaciteta, postoji i TfR1-nezavisan put čiji značaj nije potpuno proučen. Značaj TfR1-zavisnog puta je u sporom i kontrolisanom preuzimanju gvožđa, čime se sprečavaju njegovi eventualni toksični efekti. Nasuprot tome TfR1-nezavisni put, posredovan paraferitinskim membranskim kompleksom, karakteriše vrlo brz promet gvožđa, što može dovesti do oštećenja parenhimskih ćelija usled stvaranja slobodnih radikala. Sa druge strane, na nivou intestinalne apsorpcije, gde paraferitinski put značajno učestvuje u preuzimanju gvožđa iz lumena creva, navedeni problem nije od veće važnosti s obzirom na vrlo kratak život enterocita (2–3 dana) (4).

Istraživanja mehanizama kontrole recirkulacije TfR1 otvorila su, međutim, i neke nove nedoumice. Tako je pokazano da tretman K562 ćelijske linije farmakološkim stimulatorom protein kinaza, koji dovodi do smanjenja ispoljavanja TfR1, inhibiše proliferaciju i indukciju diferencijacije (26), čime je otvorena mogućnost da sam TfR1 molekul može imati i regulatorsku ulogu u smislu modulacije procesa proliferacije ćelije. U skladu sa tim je i studija sa *HL-60* leukemiskom ćelijskom linijom, koja je navela autore da zaključuje da smanjenje ispoljavanja TfR1 nije posledica diferencijacije ćelije, već da, nasuprot, prethodi i signalizuje programiranu inhibiciju ćelijske proliferacije, što je istovremeno i neophodno za terminalnu diferencijaciju (27). U skladu sa navedenim podacima koji ukazuju da ispoljavanje TfR1 nije samo pasivno kontrolisano unutarćelijskim potrebama za gvožđem su i nedavno publikovani rezultati *Kawabata* i saradnika (28). Naime, autori su otkrili gen koji kodira drugi molekul receptor za transferin tzv. TfR2. Funkcionalna ispitivanja navedenog molekula pokazala su veliku sličnost sa TfR1, ali i značajne razlike. Za razliku od TfR1, TfR2 ima znatno manji afinitet prema transferinu, dok sadržaj unutarćelijskog gvožđa nije glavni regulator njegovog ispoljavanja. Naime, informaciona RNK za TfR2 ne poseduje IRE sekvence, pa tako i ne može biti pod direktnom kontrolom aktivnosti regulatorskih proteina zavisnih od unutarćelijskog nivoa gvožđa (28). To je dodatno potvrđeno u eksperimentima sa donorima i akceptorima gvožđa. Pokazano je da niti povećanje a ni smanjenje nivoa gvožđa, izazvano navedenim materijama, ne utiče na ispoljavanje TfR2 molekula. TfR2 ispoljen je u velikoj gustini na hepatocitima, hepatoblastoskoj ćelijskoj liniji *HepG2* i hematopoeznoj liniji K562 (28, 29). Slično TfR1, ispoljavanje TfR2 zavisi od stadijuma ćelijskog ciklusa (17). Najzad, prisustvo TfR2 molekula kod životinja sa nedostatkom TfR1 ne može da nadoknadi njegovu funkciju u smislu održavanja metabolizma gvožđa (30). Međutim, utvrđeno je da je ispoljavanje TfR2 regulisano fazama ćelijskog ciklusa sa maksimalnim ispoljavanjem u kasnoj  $G_1$  i odsustvom u  $G_0/G_1$ . Tokom navedenog istraživanja pokazano je i da heliranje unutarćelijskog gvožđa redukuje proliferaciju i smanjuje sintezu DNK u ćelijama koje ne ispoljavaju TfR2, dok ne utiče na iste procese u ćelijama koje ispoljavaju navedeni

molekul (17). Na osnovu navedenih rezultata autori pretpostavljaju da je ispoljavanje TfR2 regulisano progresijom kroz ćelijski ciklus, a ne jednostavno sadržajem gvožđa, kao i da navedeni molekul može direktno uticati na stepen proliferacije ćelija. Slične zaključke o aktivnoj ulozi receptora za transferin u regulaciji ćelijske proliferacije izvela je još jedna grupa istraživača nakon ispitivanja uzročno-posledične korelacije ispoljavanja pojedinih molekula na membrani ćelija i stepena njihove proliferacije (31).

Još jedan molekul značajan za metabolizam gvožđa je tzv. protein hemohromatoze (*HFE*), nazvan tako prema oboljenju do kojeg dolazi usled mutacije gena odgovornog za njegovu sintezu. Po svojoj strukturi navedeni molekul pripada porodici molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti prve klase, mada nema mogućnost da prezentuje antigene limfocitima. Slično drugim molekulima iz navedene porodice i *HFE* u svojoj strukturi sadrži  $\beta$ 2-mikroglobulin, koji je neophodan za njegovu funkciju (32). Funkcionalna ispitivanja su pokazala da *HFE* može da reguliše sintezu molekula odgovornih za transport gvožđa (koji sadrže *IRE* sekvence) i na taj način i aktivno utiče na njegov metabolizam. Molekulski mehanizam navedene funkcije povezan je i sa TfR1 pošto je pokazana njihova fizička povezanost (32). Pokazano je da asocijacija *HFE* sa TfR1 zavisi od koncentracije vodonikovih jona, tako da snažna asocijacija postoji u neutralnoj sredini, a veoma slaba u kiseloj (pH<6,0). Uloga *HFE* u transportu gvožđa nije precizno rastumačena, mada je poznato da on može uticati na stanje fosforilacije TfR1, a zatim i na internalizaciju i recikliranje kompleksa Tf-TfR1 (33).

Na kraju, treba reći da detaljno poznavanje molekularnih mehanizama regulacije homeostaze gvožđa ima i praktičnu primenu u savremenoj medicinskoj praksi. Naime, nivo TfR1 u serumu, odnosno njegovog vanćelijskog dela koji se može enzimski odvojiti sa ćelijske membrane pokazao se kao veoma pouzdan pokazatelj smanjenja rezervi, odnosno funkcionalnog nedostatka gvožđa u organizmu. Nasuprot tome, u uslovima povećanog sadržaja gvožđa dolazi do povećanja nivoa feritina u serumu, dok je koncentracija solubilnog TfR1 minimalna. Zahvaljujući tome, u kliničkim studijama je potvrđeno da je odnos koncentracija navedenih molekula u serumu, izražen kao indeks TfR1/feritin, najosetljiviji i najpouzdaniji pokazatelj stepena poremećaja prometa gvožđa u organizmu (34).

Pored toga što savremena saznanja izneta u ovom radu potvrđuju veliki značaj napretka molekularnih istraživanja u sticanju novih znanja u domenu bazičnih nauka, detaljno poznavanje mehanizama odgovornih za homeostazu gvožđa sigurno će u bliskoj budućnosti, pored doprinosa u dijagnostici i praćenju, umnogome olakšati i lečenje kod bolesti koji su izazvani poremećajem metabolizma navedenog metala. Od posebnog značaja je precizno poznavanje mehanizama regulacije na nivou ćelije, a posebno molekula koji mogu uticati na proces deobe kao što je receptor za transferin. Takva saznanja mogla bi biti osnov za nove pristupe i različitim oblastima medicine, s obzirom na to da mnogobrojne ćelijske funkcije zavise od gvožđa, a prema nekim istraživačima i nezavisno od toga mogu biti regulisane ili kontrolisane molekulima uključenim u njegov metabolizam.

## L I T E R A T U R A

1. *Furukawa T, Naitoh Y, Kohno H, Tokunaga R, Taketani S.* Iron deprivation decreases ribonucleotide reductase activity and DNA synthesis. *Life Sci* 1992; 50(26): : 2059–65.
2. *Hentze MW, Kuhn LC.* Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(16): 8175–82.
3. *Wessling-Resnick M.* Biochemistry of iron uptake. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1999; 34(5): 285–314.
4. *Conrad ME, Umbreit JN.* Iron absorption and transport—an update. *Am J Hematol* 2000; 64(4): 287–98.
5. *Lieu PT, Heiskala M, Peterson PA, Yang Y.* The roles of iron in health and disease. *Mol Aspects Med* 2001; 22(1–2): 1–87.
6. *Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Garrick MD, Andrews NC.* Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(3): 1148–53.
7. *Su MA, Trenor CC, Fleming JC, Fleming MD, Andrews NC.* The G185R mutation disrupts function of the iron transporter Nramp2. *Blood* 1998; 92(6): : 2157–63.
8. *Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, et al.* Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 1997; 388(6641): 482–8.
9. *Conrad ME, Umbreit JN, Moore EG, Hainsworth LN, Porubcin M, Simovich MJ, et al.* Separate pathways for cellular uptake of ferric and ferrous iron. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279(4): G767–74.
10. *Yu J, Wessling-Resnick M.* Structural and functional analysis of SFT, a stimulator of Fe transport. *J Biol Chem* 1998; 273(33): 21380–5.
11. *Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, et al.* Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 2000; 403(6771): 776–81.
12. *McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, et al.* A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* 2000; 5(2): 299–309.

13. *Gutierrez JA, Yu J, Rivera S, Wessling-Resnick M.* Functional expression cloning and characterization of SFT, a stimulator of Fe transport. *J Cell Biol* 1997; 139(4): 895–905.
14. *Zunic G, Rolovic Z, Basara N, Simovic M, Vasiljevski M.* Decreased plasma proteins, increased total plasma-free amino acids, and disturbed amino acid metabolism in the hereditary severe anemia of the Belgrade laboratory (b/b) rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993; 203(3): 366–71.
15. *Hansen SH, Sandvig K, van Deurs B.* Molecules internalized by clathrin-independent endocytosis are delivered to endosomes containing transferrin receptors. *J Cell Biol* 1993; 123(1): 89–97.
16. *Watts C.* Rapid endocytosis of the transferrin receptor in the absence of bound transferrin. *J Cell Biol* 1985; 100(2): 633–7.
17. *Kawabata H, Germain RS, Vuong PT, Nakamati T, Said JW, Koeffler HP.* Transferrin receptor 2-alpha supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and *in vivo*. *J Biol Chem*. 2000; 275(22): 16618–25.
18. *Schonhorn JE, Akompong T, Wessling-Resnick M.* Mechanism of transferrin receptor down-regulation in K562 cells in response to protein kinase C activation. *J Biol Chem* 1995; 270(8): 3698–705.
19. *Miskimins WK, McClelland A, Roberts MP, Ruddle FH.* Cell proliferation and expression of the transferrin receptor gene: promoter sequence homologies and protein interactions. *J Cell Biol*. 1986; 103(5): 1781–8.
20. *Strachan T, Read PA.* Organisation of the human genome. In: *Strachan T, Read PA*, editors. *Human molecular genetics*. Oxford: BIOS Scientific Publishers 1997. p. 147–82.
21. *Eisentein RS, Blemings KP.* Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron homeostasis. *J Nutr*. 1998; 128(12): 2295–8.
22. *Weiss G, Wachter H, Fuchs D.* Linkage of cell-mediated immunity to iron metabolism. *Immunol Today* 1995; 16(10): 495–500.
23. *Schalinske KL, Eisenstein RS.* Phosphorylation and activation of both iron regulatory proteins 1 and 2 in HL-60 cells. *J Biol Chem* 1996; 271(12): 7168–76.
24. *May WS, Jacobs S, Cuatrecasas P.* Association of phorbol ester-induced hyperphosphorylation and reversible regulation of transferrin membrane receptors in HL60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81(7): 2016–20.
25. *McGraw TE, Dunn KW, Maxfield FR.* Phorbol ester treatment increases the exocytic rate of the transferrin receptor recycling pathway independent of serine-24 phosphorylation. *J Cell Biol* 1988; 106(4): 1061–6.
26. *Alitalo R, Partanen J, Pertovaara L, Holta E, Sistonen L, Andersson L, et al.* Increased erythroid potentiating activity/tissue inhibitor of metalloproteinases and jun/fos transcription factor complex characterize tumor promoter-induced megakaryoblastic differentiation of K562 leukemia cells. *Blood* 1990; 75(10): 1974–82.
27. *Ho PT, Ishiguro K, Sartorelli AC.* Regulation of transferrin receptor in myeloid and monocytic differentiation of HL-60 leukemia cells. *Cancer Res* 1989; 49(8): 1989–95.
28. *Kawabata H, Yang R, Hirama T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF, et al.* Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem*. 1999; 274(30): 20826–32.
29. *Kawabata H, Germain RS, Ikezoe T, Tong X, Green EM, Gombart AF, et al.* Regulation of expression of murine transferrin receptor 2. *Blood*. 2001; 98(6): 1949–54.
30. *Levy JE, Jin O, Fujiwara Y, Kuo F, Andrews NC.* Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nat Genet* 1999; 21(4): 396–9.
31. *Babusikova O, Ondrackova V, Prachar J, Kusenda J, Hraska V.* Flow cytometric analysis of some activation/proliferation markers on human thymocytes and their correlation with cell proliferation. *Neoplasma* 1999; 46(6): 349–55.
32. *Salter-Cid L, Peterson PA, Yang Y.* The major histocompatibility complex-encoded HFE in iron homeostasis and immune function. *Immunol Res* 2000; 22(1): 43–59.
33. *Salter-Cid L, Brunmark A, Peterson PA, Yang Y.* The major histocompatibility complex-encoded class I-like HFE abrogates endocytosis of transferrin receptor by inducing receptor phosphorylation. *Genes Immunol* 2000; 1(7): 409–17.
34. *Baynes RD.* Assessment of iron status. *Clin Biochem* 1996; 29(3): 209–15.

Rad je primljen 15. XI 2001. god.