Ενδοκυττάρια ομοιοστασία σιδήρου

Δανάη Παλαιολόγου[1], Σταματία-Λυδία Χατζηνικολάου[2]

ΠΕΡΙΛΗΨΗ: Ο σίδηρος είναι ένα ιχνοστοιχείο απαραίτητο για τη φυσιολογική λειτουργία όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων, καθώς συμμετέχει σε βασικές βιολογικές διεργασίες, όπως ή μεταφορά του οξυγόνου, η παραγωγή ενέργειας σε μορφή ATP, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση. Η περίσσεια του σιδήρου όμως είναι επιβλαβής για το κύτταρο λόγω της δημιουργίας ελεύθερων ριζών υδροξυλίου και της επαγωγής οξειδωτικού στρες. Συνεπώς οι διαδικασίες της πρόσληψης, μεταφοράς, χρήσης και αποθήκευσης του σιδήρου ρυθμίζονται με ακρίβεια τόσο σε συστημικό όσο και σε κυτταρικό επίπεδο. Η βασική οδός πρόσληψης του σιδήρου από τα κύτταρα είναι μέσω του συμπλόκου μορίου σιδήρου-τρανσφερρίνης, που προσδένεται στον υποδοχέα της τρανσφερρίνης TfR1. Άλλοι μηχανισμοί πρόσληψης σιδήρου περιλαμβάνουν τη φαγοκύττωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων από μακροφάγα και την πρόσληψη αίμης και ελεύθερου σιδήρου μέσω ειδικών πρωτεϊνών μεταφορέων. Ο νεοπροσληφθής σίδηρος εισέρχεται στην οξειδοαναγωγική «ασταθή δεξαμενή σιδήρου» του κυτταροπλάσματος, όπου δεσμεύεται από κυτταροπλασματικά σιδηροφόρα και μεταφέρεται στο μιτοχόνδριο όπου λαμβάνουν χώρα η σύνθεση της αίμης και των σιδηροθειούχων συμπλόκων. Ο πλεονάζων σίδηρος είτε αποθηκεύεται στη φερριτίνη είτε εξάγεται από το κύτταρο μέσω της φερροπορτίνης. Η ρύθμιση της ενδοκυττάριας ομοιοστασίας του σιδήρου επιτυγχάνεται με μηχανισμούς που περιλαμβάνουν αλλαγές στη μεταγραφή, τη σταθερότητα του mRNA, στη μετάφραση αλλά και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Το καλύτερα μελετημένο σύστημα είναι αυτό των μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων και βασίζεται στην αλληλεπίδραση των σιδηρορυθμιστικών πρωτεϊνών IRP1 (Iron regulatory protein 1) και IRP2 (Iron regulatory protein 2) με τα σιδηροαποκριτικά στοιχεία (IRE – Iron responsive elements) των mRNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μεταφορά (TfR1, DMT1, φερροπορτίνη), την αποθήκευση (φερριτίνη) και τη χρήση του σιδήρου στο κύτταρο (ALAS2). Το ρυθμιστικό σύστημα IRE/IRP επιτρέπει τη γρήγορη ανταπόκριση των κυττάρων στα επίπεδα του κυτταροπλασματικού σιδήρου, επιτυγχάνοντας έτσι τη βέλτιστη λειτουργία των γονιδίων που συμμετέχουν στην ομοιοστασία του σιδήρου σε κυτταρικό επίπεδο.

Haema 2016; 7(3): 267-277 Copyright EAE

1. Πρόσληψη σιδήρου από το κύτταρο

1.1. Πρόσληψη σιδήρου μέσω της τρανσφερρίνης

Ο σίδηρος μεταφέρεται στο πλάσμα προσδεμένος στην τρανφερρίνη, μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία δεσμεύει το σίδηρο στην τρισθενή του μορφή, συμβάλλοντας στη μεταφορά και την πρόσληψή του από τα κύτταρα. Η πρόσληψη του συμπλόκου σιδήρου-τρανσφερρίνης ($[Fe^{3+}]_2$ –Tf) είναι μια από τις βασικότερες πηγές σιδήρου για το κύτταρο, ιδιαίτερα για τα κύτταρα που παρουσιάζουν αυξημένες ανάγκες για σίδηρο (π.χ. ερυθροβλάστες). Η πρόσληψη πραγματοποιείται μέσω της πρόσδεσης του συμπλόκου σιδήρου-τρανσφερρίνης στον υποδοχέα της τρανσφερρίνης TfR1 (Transferrin Receptor 1, *TFR1*). Ο TfR1, ένας από τους καλύτερα μελετημένους υποδοχείς[1-3], είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας που σχηματίζει ομοδιμερή. Κάθε υπομονάδα του TfR1 συνδέεται με ένα μόριο τρανσφερρίνης. Η συγγένεια με την οποία συνδέεται η τρανσφερρίνη αυξάνει ανάλογα με τα άτομα σιδήρου που είναι προσδεμένα σε αυτήν. Η ολοτραν-

[1]Βιολόγος, MSc, PhD, Ερευνητικό Αιματολογικό Εργαστήριο Α΄ Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής και Ειδικής Νοσολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

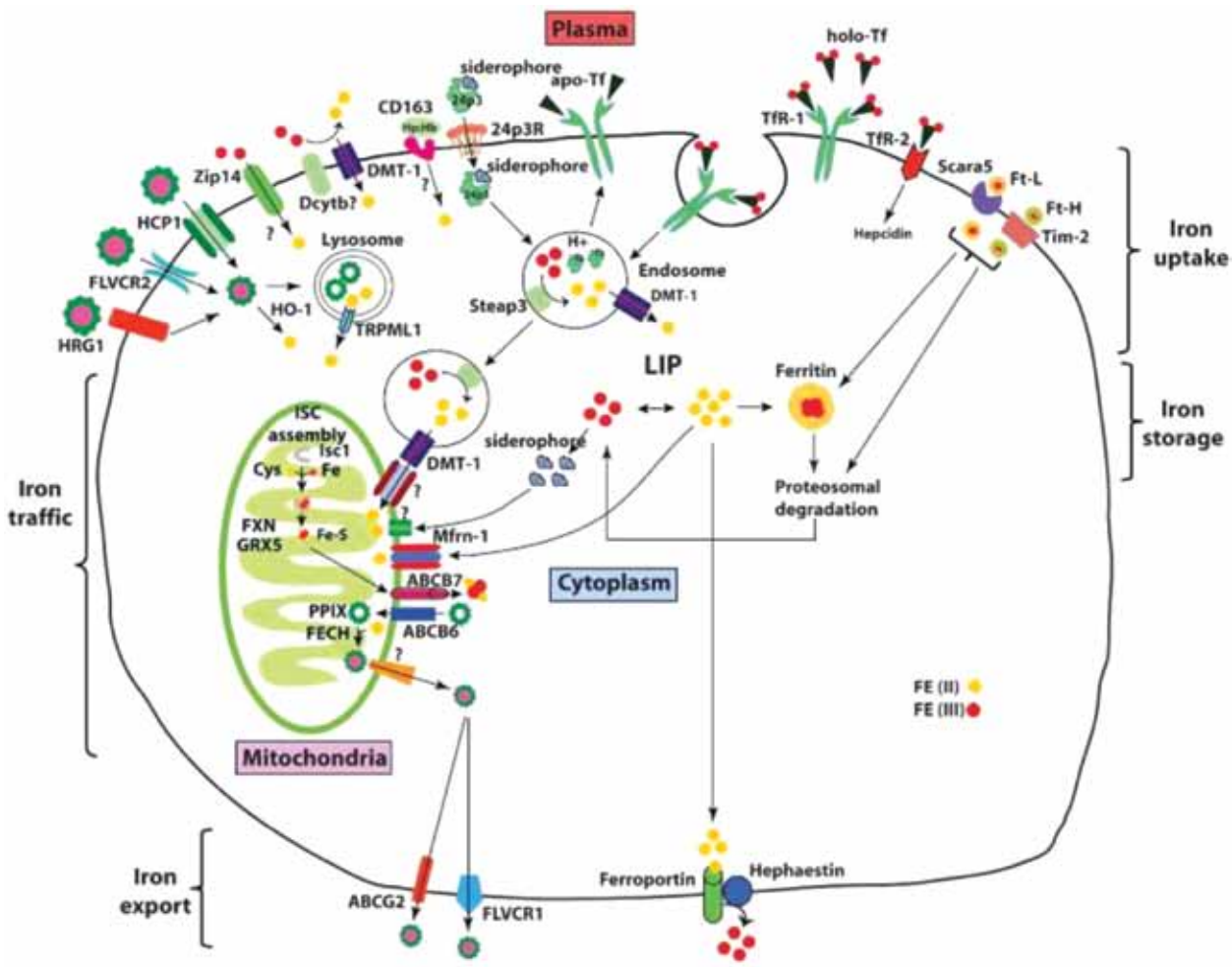
[2]Ιατρος, PhD, Ειδικευόμενη Γαστρεντερολογίας, ΑΟΝΑ «Ο Άγιος Σάββας»

Συγγραφέας υπεύθυνος για επικοινωνία: Δανάη Παλαιολόγου, Μιχαλακοπούλου 176, 16121 Γουδή, Αθήνα,
e-mail: danaipalaiologou@gmail.com

σφερρίνη ($[Fe^{3+}]_2$–Tf) έχει έως και 500 φορές μεγαλύτερη συγγένεια για τον TfR1 σε σχέση με την αποτρανσφερρίνη (μη συνδεδεμένη με σίδηρο τρανσφερρίνη)[4]. Ο TfR1 εκφράζεται στα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα και η έκφρασή του αυξάνεται σε ιστούς με αυξημένες ανάγκες για σίδηρο, όπως στα κύτταρα του πλακούντα, στα εντεροκύτταρα, στα καρκινικά κύτταρα και κυρίως στους ερυθροβλάστες.

Στους ερυθροβλάστες η πρόσληψη σιδήρου μέσω του συμπλόκου σιδήρου-τρανσφερρίνης είναι και η μόνη οδός πρόσληψης σιδήρου, γεγονός που υπογραμμίζεται και από τη βαριά αναιμία και τις νευρολογικές διαταραχές που οδηγούν σε εμβρυικό θάνατο τα ποντίκια στα οποία έχει εξαλειφθεί ο TfR1[4]. Ποντίκια με ετεροζυγωτία για τον TfR1 εμφανίζουν διαταραχές στην ερυθροποίηση και στην ομοιοστασία του σιδήρου[5].

Όταν η ολοτρανσφερρίνη προσδεθεί στον TfR1, λόγω της δυσκολίας αποσύνδεσης του σιδήρου από το μόριο της τρανσφερρίνης, υποδοχέας και σύμπλοκο ενδοκυττώνονται αυτούσια μέσα σε κυστίδια που καλύπτονται με κλαθρίνη. Στη συνέχεια, το pH των κυστιδίων μειώνεται μέσω αντλίας πρωτονίων που βρίσκεται στην επιφάνειά τους και το όξινο περιβάλλον (pH 5,5) επιφέρει την απελευθέρωση του Fe^{3+} από την τρανσφερρίνη. Η μεταφορά



Εικόνα 1. Κυτταρικός μεταβολισμός του σιδήρου (από Pantopoulos et al, 2012). Οι κύριες οδοί πρόσληψης του σιδήρου είναι η τρανφερρίνη του πλάσματος, η πρόσληψη ανόργανου σιδήρου από τον DMT1 και η πρόσληψη αίμης. Η φορτωμένη με σίδηρο ολοτρανσφερρίνη προσδένεται στον υποδοχέα TfR1 και το σύμπλοκο ενδοκυτταρώνεται σε κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη. Μια αντλία πρωτονίων στην επιφάνεια των κυστιδίων μειώνει το pH με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του Fe3+ σιδήρου, που περαιτέρω οξειδώνεται προς Fe2+ απο την Steap3 και μεταφέρεται από τον DMT1 στο κυτταρόπλασμα. Ο νεοπροσληφθείς σίδηρος εισέρχεται στην οξειδοαναγωγική «ασταθή δεξαμενή σιδήρου» του κυτταροπλάσματος, όπου δεσμεύεται από κυτταροπλασματικά σιδηροφόρα και μεταφέρεται στο μιτοχόνδριο όπου λαμβάνουν χώρα η σύνθεση της αίμης και των σιδηροθειούχων συμπλόκων. Εναλλακτικά στους ερυθροβλάστες ο σίδηρος μεταφέρεται απευθείας στα μιτοχόνδρια μέσω παροδικής σύνδεσης των ενδοσωμάτων με τα μιτοχόνδρια. Ο πλεονάζων σίδηρος είτε αποθηκεύεται στη φερριτίνη είτε εξάγεται από το κύτταρο μέσω της φερροπορτίνης. Τα κύτταρα μπορούν επίσης να εξάγουν αίμη (FLVCR1) ή πορφυρίνες (ABCG2)

του σιδήρου στο κυτταρόπλασμα γίνεται μέσω του διαμεμβρανικού υποδοχέα DMT1 (Divalent Metal Transporter 1) που βρίσκεται στην επιφάνεια των κυστιδίων[6]. Για τη διακίνηση αυτή, ο τρισθενής σίδηρος πρέπει να αναχθεί σε δισθενή, μέσω της σιδηροαναγωγάσης STEAP3 (six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3)[7]. Τέλος, το σύμπλοκο της αποτρανσφερρίνης με τον TfR1 επανέρχεται στην κυτταρική μεμβράνη, όπου η αποτρανσφερρίνη αποδεσμεύεται και επιστρέφει στο πλάσμα για να επαναχρησιμοποιηθεί.

Ο δεύτερος γνωστός υποδοχέας της τρανσφερρίνης, ο TfR2 (Transferrin receptor 2, *TFR2*), εκφράζεται κυρίως στα ηπατοκύτταρα και στους διαφοροποιημένους ερυθροβλάστες[4,8]. Η συγγένεια της ολοτρανσφερρίνης για τον TfR2 είναι τουλάχιστον 25 φορές μικρότερη από αυτή για τον TfR1[9]. Ο ρόλος του TfR2 στην πρόσληψη σιδήρου από τα κύτταρα δε φαίνεται να είναι τόσο σημαντικός, αντίθετα ο ρόλος του είναι κυρίως ρυθμιστικός. Μεταλλάξεις στο γονίδιο του TfR2 δεν επηρεάζουν την πρόσληψη σιδήρου, αντίθετα οδηγούν σε υπερφόρτωση του οργανισμού με σίδηρο[10]. Το γεγονός ότι μεταλλάξεις στον υποδοχέα TfR2 προκαλούν κληρονομική αιμοχρωμάτωση τύπου 3 υποδηλώνει το σημαντικό ρόλο του υποδοχέα αυτού στη ρύθμιση της ομοιοστασίας του σιδήρου.

1.2. Πρόσληψη σιδήρου μέσω οδών ανεξάρτητων της τρανσφερρίνης

Μοριακές και γενετικές μελέτες υποστηρίζουν την ύπαρξη και άλλων οδών πρόσληψης σιδήρου από τα κύτταρα, ανεξάρτητων της τρανσφερρίνης. Τα μακροφάγα προσλαμβάνουν μεγάλες ποσότητες σιδήρου μέσω φαγοκύτωσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, ενώ στην ενδαγγειακή αιμόλυση η αιμοσφαιρίνη συνδέεται με τις απτοσφαιρίνες και η ελεύθερη αίμη δεσμεύεται από την αιμοπεξίνη, για να ενδοκυττωθούν στη συνέχεια στα μακροφάγα[4,8]. Φαίνεται ότι εξειδικευμένα κύτταρα έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν σίδηρο από την αίμη με άμεση απορρόφηση της αίμης από την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Οι ακριβείς μηχανισμοί δεν έχουν ακόμα πλήρως διευκρινιστεί[4].

Σε καταστάσεις υπερφόρτωσης σιδήρου, ο ελεύθερος σίδηρος (Nontransferrinboundiron, NTBI) μεταφέρεται στα παρεγχυματικά κύτταρα μέσω οδών ανεξάρτητων της τρανσφερρίνης. Παρόλο που οι ακριβείς μηχανισμοί δεν έχουν ακόμα περιγραφεί και ενώ αρχικά ο DMT1 είχε θεωρηθεί ως βασικός μεταφορέας ελεύθερου σιδήρου, φαίνεται ότι σημαντικό ρόλο στη μεταφορά του NTBI παίζουν ο μεταφορέας ψευδαργύρου Zip 14 στο ήπαρ[11], οι δίαυλοι ασβεστίου LVD (LVDCC - L-type voltage-dependent calcium channels) στα κύτταρα του μυοκαρδίου[12], η λιποκαλίνη 2 (Lipocalin 2- *LCN2*) και ο υποδοχέας 24p3R στο νεφρό[13]. Η άμεση πρόσληψη σιδήρου μέσω της φερριτίνης έχει περιγραφεί κυρίως σε παθολογικές καταστάσεις ιστικής καταστροφής, όπου η απελευθέρωση μορίων φερριτίνης από τα κατεστραμμένα κύτταρα διεγείρει την ενδοκύτωσή τους από τα μακροφάγα[14,15,16].

2. Ο σίδηρος στο κυτταρόπλασμα

2.1. Η ασταθής δεξαμενή σιδήρου

Ο σίδηρος που προσλαμβάνεται από το κύτταρο, είτε μέσω της τρανσφερρίνης είτε μέσω των άλλων οδών που προαναφέρθηκαν, ελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα σχηματίζοντας τη λεγόμενη «ασταθή δεξαμενή σιδήρου» (Labile Iron Pool - LIP), η φύση της οποίας 40 χρόνια μετά την αρχική της περιγραφή δεν έχει ακόμη διαλευκανθεί[17]. Στην ασταθή δεξαμενή σιδήρου προστίθεται και ο σίδηρος που προέρχεται από την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών που περιέχουν αίμη ή σίδηρο. Ο ελεύθερος σίδηρος του κυτταροπλάσματος, Fe^{2+} και Fe^{3+}, δεσμεύεται με μικρή συγγένεια από χηλικούς παράγοντες χαμηλού μοριακού βάρους, όπως κιτρικά ανιόντα, ATP, AMP, πυροφωσφορικό, πολυπεπτίδια ή μόρια που προσομοιάζουν στα βακτηριακά σιδεροφόρα[4,18]. Εκτός από το κυτταρόπλασμα μικρές ποσότητες ασταθούς σιδήρου (της τάξης των 6-16μM) έχουν εντοπιστεί και σε κυτταρικά οργανίδια.

Λόγω της ασταθούς δέσμευσης με τους προαναφερθέντες παράγοντες ο σίδηρος παραμένει σε οξειδοαναγωγικά ενεργή μορφή και μπορεί να συμμετέχει σε αντιδράσεις τύπου Fenton, οδηγώντας σε παραγωγή ελεύθερων ριζών υδροξυλίου που μπορούν να επιφέρουν βλάβες σε μεμβράνες, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα του κυττάρου. Αν και η ασταθής δεξαμενή σιδήρου του κυτταροπλάσματος αποτελεί μόνο το 3-5% του ενδοκυττάριου σιδήρου πιστεύεται ότι τα επίπεδά της σχετίζονται με τον ολικό σίδηρο του κυττάρου[19]. Ο οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος αποτελεί μια πρώτη πηγή σιδήρου για την κάλυψη των αναγκών του κυττάρου για παραγωγή αίμης και σιδηροθειούχων συμπλόκων, συνεπώς αυξομειώσεις στα επίπεδα της «ασταθούς δεξαμενής σιδήρου» ενεργοποιούν ομοιοστατικούς μηχανισμούς τόσο σε κυτταρικό (IREs-IRPs) όσο και σε συστημικό (εψιδίνη) επίπεδο.

2.2. Η φερριτίνη

Ο σίδηρος της ασταθούς δεξαμενής σιδήρου,που δε χρησιμοποιείται για τις ανάγκες του κυττάρου και δεν εξάγεται από το κύτταρο, αποθηκεύεται στη φερριτίνη. Η φερριτίνη απαντά σε όλους σχεδόν τους οργανισμούς, είναι συντηρημένη μεταξύ των ειδών και αποτελεί ένα από τα πιο αρχαία μόρια της ομοιοστασίας του σιδήρου. Το κάθε μόριο φερριτίνης αποτελείται από 24 υπομονάδες ελαφρών (L-light) και βαριών (H-heavy) αλύσων και

μπορεί να δεσμεύσει περίπου 4500 άτομα σιδήρου στην κοιλότητα που δημιουργείται από τη σφαιρική διάταξη των 24 υπομονάδων[20]. Η Η και η L φερριτίνη είναι γενετικά και λειτουργικά διαφορετικές. Η Η φερριτίνη κωδικοποιείται από το γονίδιο *FTH1* (Ferritin heavy chain 1), έχει δράση σιδηροξιδάσης και είναι απαραίτητη για τη γρήγορη οξείδωση του σιδήρου από Fe^{2+} σε Fe^{3+}. Η L φερριτίνη κωδικοποιείται από το γονίδιο *FTL* (Ferritin light chain) και συμβάλει στην ενσωμάτωση του οξειδωμένου σιδήρου στον πυρήνα του μορίου, αυξάνοντας συγχρόνως το ρυθμό ανανέωσης της θέσης της σιδηροξίδασης προκειμένου να οξειδωθούν και άλλα άτομα σιδήρου[21].

Και στα δύο γονίδια των αλύσων της φερριτίνης, πολύ καλά συντηρημένες αλληλουχίες κωδικοποιούν για το μοναδικό σιδηροαποκριτικό στοιχείο (IRE) που βρίσκεται στο 5΄ άκρο της μη μεταφραζόμενης περιοχής του mRNA τους. Το IRE παίζει σημαντικό ρόλο στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της φερριτίνης. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων συντελείται η ρύθμιση αυτή θα αναφερθούν παρακάτω.

Ο βασικός ρόλος της φερριτίνης είναι η αποθήκευση του πλεονάζοντος σιδήρου προκειμένου να μη γίνει τοξικός για το κύτταρο, αλλά και για να είναι άμεσα διαθέσιμος για τις ανάγκες του οργανισμού για ερυθροποίηση. Η φερριτίνη προλαμβάνει τη δημιουργία ελεύθερων ριζών, μειώνοντας τη διαθεσιμότητα του δισθενή σιδήρου στην αντίδραση Fenton[22]. Η δράση της φερριτίνης ως αντιοξειδωτικό μόριο είναι καίριας σημασίας για το κύτταρο. Ποντίκια στα οποία έχει εξαλειφθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί για την Η φερριτίνη πεθαίνουν σε εμβρυϊκή ηλικία[23], ενώ η υπό όρους εξάλειψή του προκαλεί μεγάλη ηπατική βλάβη λόγω του οξειδωτικού στρες[24]. Μελέτες στη δροσόφυλλα έδειξαν ότι τόσο η Η όσο και η L φερριτίνη εκφράζονται κατά την εμβρυογένεση και είναι και οι δύο απαραίτητες για την εμβρυϊκή ανάπτυξη[25].

Η κινητοποίηση του αποθηκευμένου σιδήρου για να καλυφθούν οι ανάγκες ερυθροποίησης σε καταστάσεις σιδηροπενίας έχει ως αποτέλεσμα την αποδόμηση της φερριτίνης μέσω του λυσοσώματος και του πρωτεοσώματος. Φαίνεται ότι για την ενεργοποίηση αυτών των οδών απαραίτητη προϋπόθεση είναι η μείωση του ενδοκυττάριου σιδήρου[26]. Ο τρόπος με τον οποίο ο τρισθενής σίδηρος της φερριτίνης ανάγεται σε δισθενή και αποδεσμεύεται για να χρησιμοποιηθεί στα μιτοχόνδρια δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρος[22].

Κύριος ρυθμιστής της έκφρασης της φερριτίνης είναι ο σίδηρος. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η ρύθμιση της φερριτίνης είναι κυρίως μετα-μεταγραφική και συντελείται με την κινητοποίηση αποθηκευμένων μορίων mRNAH και L φερριτίνης από τα μονοσώματα στα πολυσώματα υπό την παρουσία σιδήρου[27]. Η μετα-μεταγραφική ρύθμιση γίνεται μέσω του συστήματος IRE (Iron responsive element)/IRP (Iron regulatory proteins) και ανάλογα με τα επίπεδα του ενδοκυττάριου σιδήρου, και συγκεκριμένα της ασταθούς δεξαμενής σιδήρου.

Η έκφραση της φερριτίνης επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες εκτός του σιδήρου, όπως η φλεγμονή, η υποξία, η ισχαιμία, το οξειδωτικό στρες, οι νεοπλασματικές καταστάσεις αλλά και ορισμένες ορμόνες. Η ρύθμιση γίνεται τόσο σε μεταγραφικό, όσο και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, ανάλογα με τον εκάστοτε παράγοντα[28].

3. Μετακίνηση του σιδήρου από το κυτταρόπλασμα στο μιτοχόνδριο

Το μεγαλύτερο μέρος του σιδήρου που προσλαμβάνει το κύτταρο καταλήγει στη μήτρα του μιτοχονδρίου όπου και χρησιμοποιείται για τη σύνθεση της αίμης και των σιδηροθειούχων συμπλόκων. Ο ακριβής τρόπος που γίνεται αυτή η μεταφορά δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως και συνεχίζει να αποτελεί ένα από τα λιγότερο κατανοητά κομμάτια του ενδοκυττάριου μεταβολισμού του σιδήρου. Σίγουρο είναι όμως ότι κατά την πορεία αυτή ο σίδηρος πρέπει να δεσμευτεί από κατάλληλα μόρια που θα τον καταστήσουν ακίνδυνο για το κύτταρο και θα τον οδηγήσουν στον προορισμό του.

Ένα τέτοιο μόριο φορέας είναι η λιποκαλίνη 24p3 (ή Lipocalin 2- *LCN2*), η οποία ανήκει στην οικογένεια των λιποκαλινών. Στην οικογένεια αυτή περιλαμβάνονται πάνω από 20 μικρές εκκρινόμενες πρωτεΐνες που σχηματίζουν μια κοιλότητα στην οποία μπορούν να δεσμεύουν και να μεταφέρουν μικρά μόρια. Η ιδιαιτερότητα της λιποκαλίνης 24p3 είναι ότι μπορεί να να δεσμεύσει τον σίδηρο μόνο παρουσία ενός άλλου σιδηροδεσμευτικού μορίου. Σε πρόσφατη μελέτη αναγνωρίστηκε το γονίδιο *BDH2*, που κωδικοποιεί για το 2,5 Διυδροξυβενζοϊκό οξύ (2,5-Dihydroxy Benzoic Acid - DHBA), ένα μόριο που μοιάζει με τα βακτηριακά σιδηροφόρα και αποτελεί τον απαραίτητο συμπαράγοντα που καθιστά δυνατή τη δέσμευση του σιδήρου από τη λιποκαλίνη 24p3. Αντίστοιχα η βακτηριακή λιποκαλίνη δεσμεύει το σιδηροφόρο εντεροβακτίνη που αποτελείται εν μέρει και από 2,3-DHBA, μόριο που μοιάζει εξαιρετικά με το 2,5-DBHA των θηλαστικών[29]. Πειραματικά μοντέλα ποντικών στα οποία έχει απαλειφθεί το γονίδιο της λιποκαλίνης παρουσιάζουν σημαντικές διαταραχές στην απόπτωση των αιμοποιητικών κυττάρων τους[30] και είναι ευαίσθητα στις βακτηριακές λοιμώξεις[31]. Σε αντίθεση με τη λιποκαλίνη 24p3, ο 2,5-DHBA εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς, γεγονός που υποδηλώνει τη συμμετοχή του και σε άλλες διαδικασίες πλην της φόρτωσης σιδήρου στη λιποκαλίνη[32]. *In vitro* αποσιώπηση του γονιδίου *BDH2* σε κύτταρα ποντικών οδηγεί σε υψηλά επίπεδα κυτταροπλασματικού σιδήρου και ελευθέρων ριζών, ενώ τα μιτοχόνδρια εμφανίζουν έλλειψη σιδήρου και δε συνθέτουν αίμη, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο 2,5-DHBA συμμετέχει στην πρόσληψη σιδήρου από τα μιτοχόνδρια[32].

4. Σίδηρος και μιτοχόνδριο: Είσοδος, έξοδος και χρήση του σιδήρου

4.1. Είσοδος του σιδήρου στο μιτοχόνδριο

Για να φτάσει στη μήτρα του μιτοχονδρίου, θέση της σύνθεσης της αίμης και των σιδηροθειούχων συμπλόκων ο σίδηρος πρέπει να διαπεράσει την εξωτερική και την εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο γίνεται η μεταφορά διαμήκους της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός καθώς ορισμένες πιθανές πρωτεΐνες μεταφορείς αναγνωρίστηκαν πρόσφατα. Χρησιμοποιώντας υπολογιστικές μελέτες μεγάλης κλίμακας αναζητήθηκαν μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που εκφράζονται ταυτόχρονα με τις βασικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη σύνθεση της αίμης. Η μελέτη αναγνώρισε δύο μέλη της οικογένειας των solute carrier, τα *SLC25A39* και *SLC22A4*, και τον μεταφορέα *TMEM14C* που εδράζονται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη[33]. Η αποσιώπηση των γονιδίων αυτών σε έμβρυα zebrafish αναστέλλει την παραγωγή της αίμης, παρατήρηση που ενισχύει το ρόλο τους στην είσοδο του σιδήρου στο μιτοχόνδριο[33]. Επίσης η καταστολή της έκφρασης του γονιδίου SLC25A39 σε κυτταρική σειρά ερυθρολευχαιμίας ποντικού έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή της σύνθεσης της αίμης, λόγω αναστολής της ενσωμάτωσης του σιδήρου στην πρωτοπορφυρίνη IX[33]. Το πως οι μεταφορείς αυτοί προσλαμβάνουν τον σίδηρο από τα μόρια φορείς και τα σιδηροφόρα αποτελεί ακόμη αντικείμενο έρευνας. Σε μια πρόσφατη μελέτη προτάθηκε επίσης ότι ρόλο στην εισαγωγή σιδήρου στο μιτοχόνδριο κατέχει και ο μεταφορέας DMT1[34]. Για πρώτη φορά πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, συνεντοπισμού και εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου έδειξαν ότι και τα 4 ισόμορφα του DMT1 εντοπίζονται στο μιτοχόνδριο και κατά κύριο λόγο στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η ακριβής βέβαια ρύθμιση και λειτουργία του DMT1 στο μιτοχόνδριο μένει να επιβεβαιωθεί και από περαιτέρω μελέτες.

Ο μεταφορέας του σιδήρου που μεταφέρει το σίδηρο διαμέσου της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης είναι η μιτοφερρίνη (Mitoferrin, *MFRN*),που ανήκει και αυτή στην οικογένεια των SLC μεταφορέων και εκφράζεται σε δύο ισομορφές. Η μιτοφερρίνη-1 είναι ειδική για το αναπτυσσόμενο ερυθρό ενώ η μιτοφερρίνη-2 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς. Η στοχευμένη απενεργοποίηση της μιτοφερρίνης-1 προκαλεί εμβρυονικό θάνατο λόγω αναιμίας[35].

Ένας εναλλακτικός τρόπος μεταφοράς σιδήρου έχει προταθεί για τα ερυθροκύτταρα, σύμφωνα με τον οποίο η εξαιρετικά αποτελεσματική μεταφορά σιδήρου από τα ενδοσώματα στα μιτοχόνδρια συντελείται με επαφή και "πρόσδεση" των ενδοσωμάτων πάνω στα μιτοχόνδρια και την απευθείας μεταφορά του σιδήρου («kiss and run hypothesis»[36]. Λήψεις από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με ζωντανή απεικόνιση δείχνουν ενδοσώματα που μετακινούνται στο κυτταρόπλασμα, έρχονται σε επαφή με τα μιτοχόνδρια και σχηματίζουν έναν παροδικό δεσμό μέσω του οποίου μεταφέρεται ο σίδηρος στα μιτοχόνδρια.

4.2. Η μιτοχονδριακή φερριτίνη

Τα μιτοχόνδρια εκφράζουν τη μιτοχονδριακή φερριτίνη (Mitochondrial ferritin, *FTMT*). Κωδικοποιείται από ένα πυρηνικό γονίδιο, διαφορετικό από αυτό που κωδικοποιεί τις H και L αλυσίδες της φερρίτίνης. Συντίθεται στο κυτταρόπλασμα ως ένα πρόδρομο πολυπεπτίδιο και στη συνέχεια εισάγεται στο μιτοχόνδριο όπου δημιουργείται η ώριμη πρωτεΐνη, η οποία έχει δράση σιδηροξείδασης. Η μιτοχονδριακή φερριτίνη εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα και δε φαίνεται να έχει κάποιο βασικό ρόλο στη φυσιολογική χρήση του μιτοχονδριακού σιδήρου. Ο ρόλος της έγκειται στην προστασία του οργανιδίου από την υπερσυσσώρευση σιδήρου και τις τοξικές της συνέπειες[37], γεγονός που υπογραμμίζεται στους σιδηροβλάστες (ερυθροβλάστες υπερφορτωμένοι με σίδηρο στη σιδηροβλαστική αναιμία). Στους σιδηροβλάστες παρατηρείται αυξημένη έκφραση μιτοχονδρικής φερριτίνης, πιθανότατα για να προστατευτεί το μιτοχόνδριο από τον πλεονάζοντα τοξικό σίδηρο[38].

4.3. Η έξοδος της αίμης και των σιδηροθειούχων συμπλόκων από το μιτοχόνδριο

Ο σίδηρος που εισέρχεται στο μιτοχόνδριο χρησιμοποιείται για τη σύνθεση της αίμης και των σιδηροθειούχων συμπλόκων, διαδικασίες που τόσο η ρύθμιση όσο και τα επιμέρους στάδιά τους είναι πλέον καλά μελετημένα. Ο τρόπος όμως που εξέρχονται η αίμη και τα σιδηροθειούχα σύμπλοκα από το μιτοχόνδριο παραμένει εν πολλοίς άγνωστος μέχρι και σήμερα , με εξαίρεση την πρόσφατη αναγνώριση ενός μιτοχονδριακού μεταφορέα που συμμετέχει στην εξαγωγή της αίμης από το μιτοχόνδριο. Σύμφωνα με τους Chiabrando και συνεργάτες ένα ισόφορμο του εξαγωγέα της αίμης από την πλασματική μεμβράνη, ο υποδοχέας 1β της υποομάδας C του ιού της λευχαιμίας των αιλουροειδών(Feline leukemia virus subgroup C receptor 1b - *FLVCR1b*) εδράζεται στο μιτοχόνδριο και εξάγει τα μόρια της αίμης από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα. Υπερέκφραση και αποσιώπηση του γονιδίου *FLVCR1b* οδηγεί σε αυξημένη συγκέντρωση αίμης στο κυτταρόπλασμα και το μιτοχόνδριο αντίστοιχα. Πειραματικά μοντέλα ποντικών στα οποία έχουν απαλειφθεί και τα δύο *FLVCR1* ισόμορφα παρουσιάζουν αναστολή της διαφοροποίησης των ερυθροκυττάρων και εμβρυονικό θάνατο. Αντίθετα έμβρυα ποντικών στα οποία έχει

απαλειφθεί μόνο το ισόμορφο της κυτταρικής μεμβράνης *FLVCR1a,* παρουσιάζουν φυσιολογική ωρίμανση των ερυθροβλαστών, αλλά ατελή αγγειογένεση που οδηγεί σε αιμορραγίες, οιδήματα και σκελετικές δυσμορφίες[39].

4.4. Έξοδος του σιδήρου από το κύτταρο

Η φερροπορτίνη (Ferroportin, *FPN* ή *IREG1 ή SLC40A1*) είναι ο μοναδικός εξαγωγέας σιδήρου που έχει αναγνωριστεί στα σπονδυλωτά. Είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη της οικογένειας των SLC μεταφορέων, που κατά κύριο λόγο εκφράζεται στα κύτταρα που συμμετέχουν στην απορρόφηση σιδήρου και στην ανακύκλωση των γερασμένων ερυθροκυττάρων. Έχει εντοπιστεί στα ηπατοκύτταρα, στο εντερικό επιθήλιο, στα μακροφάγα, στον σπλήνα και στα κύτταρα του εξω-εμβρυικού σπλαχνικού ενδοδέρματος[40].

Ο σίδηρος που απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα από τα ενδοσώματα είναι δισθενής. Επομένως η φερροπορτίνη μεταφέρει το Fe^{2+}, ο οποίος οξειδώνεται σε Fe^{3+} πρίν από την απελευθέρωσή του στο πλάσμα, έτσι ώστε να μπορεί να δεσμευθεί στην αποτρανσφερρίνη. Υπεύθυνη για την οξείδωση αυτή είναι η ηφαιστίνη, μια οξειδοαναγωγάση που βρίσκεται στη βασεοτελική μεμβράνη των ηπατοκυττάρων[41]. Η αντίστοιχη οξειδοαναγωγάση του πλάσματος είναι η σερουλοπλασμίνη (Ceruloplasmin, *CP*) που οξειδώνει τον σίδηρο που εξέρχεται από τα μακροφάγα[42]. Επαρκή επίπεδα χαλκού είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της λειτουργικότητας της σερουλοπλασμίνης.

Το γεγονός ότι η φερροπορτίνη είναι ο μοναδικός εξαγωγέας σιδήρου από τα κύτταρα υποστηρίζεται και από το ότι εξάλειψη σε ποντίκια και των δύο αλληλίων της φερροπορτίνης οδηγεί σε εμβρυϊκό θάνατο, ενώ στοχευμένη εξάλειψη σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων οδηγεί σε υπερσυσσώρευση σιδήρου στους αντίστοιχους ιστούς[40].

Εναλλακτικά τα κύτταρα μπορούν να εξάγουν σίδηρο με τη μορφή της αίμης. Ο μεταφορέας FLVCR1 που εδράζεται στην κυτταρική μεμβράνη συμμετέχει στην έξοδο της αίμης από τα ερυθροποιητικά κύτταρα, τα μακροφάγα και στη μεταφορά μορίων αίμης διαμέσου της βασικοτελικής μεμβράνης των ηπατοκυττάρων[4]. Η υπερέκφραση ή η καταστολή της έκφρασης του *FLVCR1* προκαλεί μείωση ή αύξηση της αίμης στο κυτταρόπλασμα[43]. *FLVCR1*$^{-/-}$ποντίκια παρουσιάζουν εμβρυϊκή θνητότητα λόγω ατελούς ερυθροποίησης. Το γεγονός ότι μεταλλάξεις του *FLVCR1* στον άνθρωπο δεν προκαλούν ανωμαλίες της ερυθροποίησης αλλά ανωμαλίες στο νευρομυϊκό σύστημα και στην όραση, πιθανώς λόγω οξειδωτικού στρές, εξηγείται από την ύπαρξη του μιτοχονδριακού ισόφορμου *FLVCR1b* που εξάγει την αίμη από το μιτοχόνδριο και προάγει την ερυθροποίηση[39].

Τέλος, η πρωτεΐνη ανθεκτικότητας του καρκίνου του μαστού (*ABCG2)* μέλος των ABC μεταφορέων έχει προταθεί ότι μπορεί να εξάγει αίμη ή πορφυρίνες από την κυτταρική μεμβράνη. Ποντίκια στα οποία έχει απαλειφθεί το γονίδιο *ABCG2* παρουσιάζουν πρωτοπορφυρία λόγω συσσώρευσης της πρωτοπορφυρίνης IX[44]. Έχει επίσης προταθεί ότι ο ABCG2 δρα και ως μεταφορέας του ουρικού οξέος και κατ' επέκταση πολυμορφισμοί στο γονίδιο *ABCG2* δεν σχετίζονται με ανωμαλίες της ερυθροποίησης αλλά με αυξημένα επίπεδα ουρικού οξέος του ορού και ανάπτυξη ουρικής αρθρίτιδας[45].

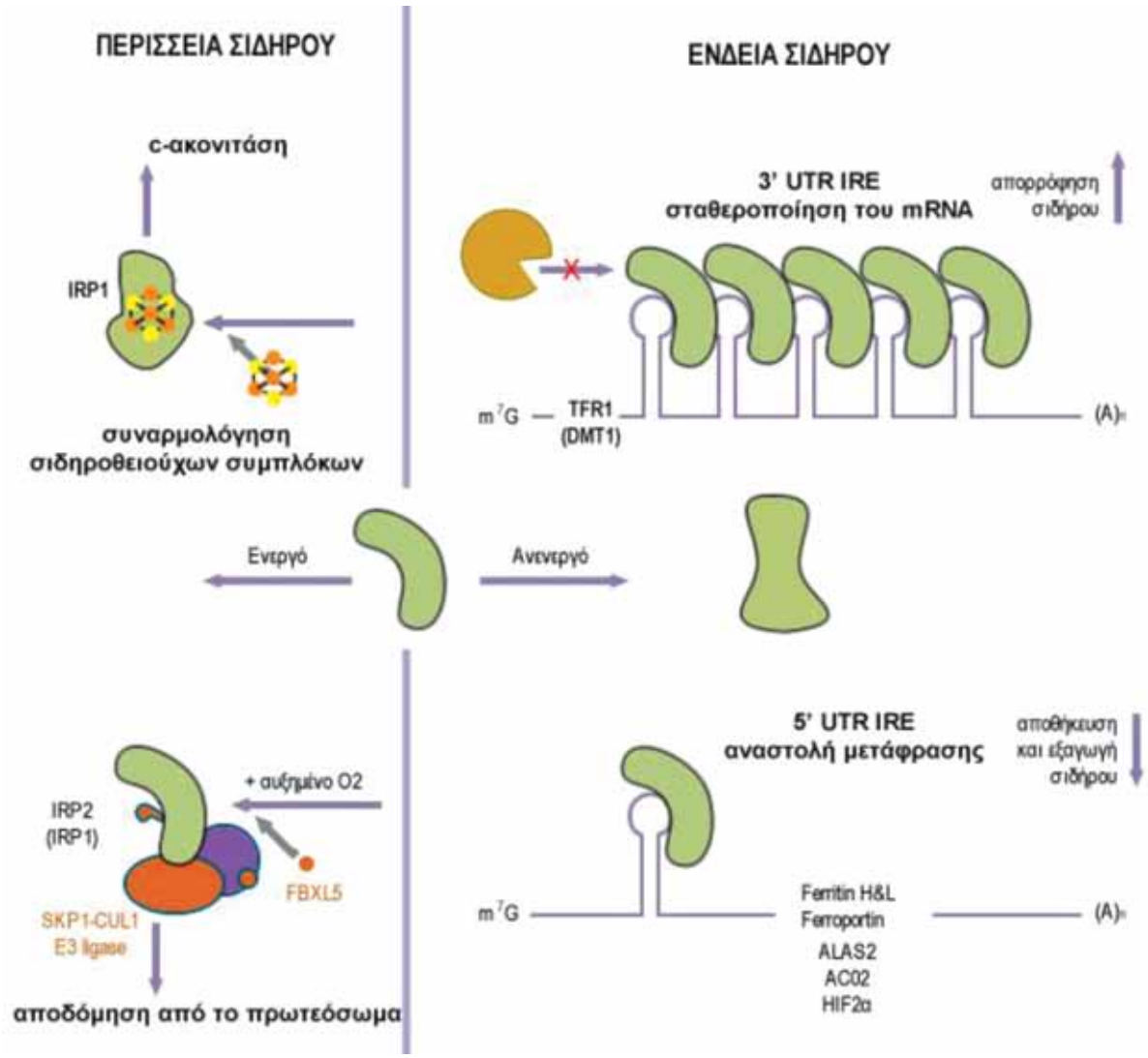
5. Κυτταρική ομοιοστασία του σιδήρου (cellular iron balance IREs-IRPs)

5.1. Το σύστημα IRE/IRP

Η ενδοκυττάρια ομοιοστασία του σιδήρου επιτυγχάνεται κυρίως μέσω μετα-μεταγραφικών ρυθμιστικών μηχανισμών. Βασίζεται στην αλληλεπίδραση των σιδηρορυθμιστικών πρωτεϊνών IRP1 (Iron regulatory protein 1) και IRP2 (Iron regulatory protein 2) με τα σιδηροαποκριτικά στοιχεία (IRE – Iron responsive elements) των mRNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μεταφορά, την αποθήκευση και τη χρήση του σιδήρου στο κύτταρο. Τα IRE είναι καλά συντηρημένες περιοχές στα μη μεταφραζόμενα τμήματα του mRNA των γονιδίων στόχων και παρουσιάζουν εξαιρετικά μεγάλη δομική ομοιότητα μεταξύ τους[46]. Ένα IRE ορίζεται τόσο από τη δομή του όσο και από την αλληλουχία των βάσεων του RNA, και μπορεί να βρίσκεται είτε στην 5΄ είτε στην 3΄μη μεταφραζόμενη περιοχή (untranslated region, UTR) του mRNA. Έχει δομή φουρκέτας και αποτελείται από τον εξανουκλεοτιδικό βρόγχο και το στέλεχος. Η μεγάλη ειδικότητα και συγγένεια της αλληλεπίδρασης μεταξύ του IRE και της IRP1 είναι αποτέλεσμα των δεσμών που αναπτύσσονται μεταξύ RNA και πρωτεΐνης στα σημεία του εξανουκλεοτιδικού βρόγχου του IRE[47].

Οι IRP προσδένονται στα IRE και ρυθμίζουν τον ενδοκυττάριο μεταβολισμό του σιδήρου αναστέλλοντας ή επάγοντας τη μετάφραση του mRNA γονιδίων στόχων. Όταν το IRE εδράζεται στην 5΄ UTR του mRNA, η πρόσδεση τωνIRP στο IRE αναστέλλει την έναρξη της μετάφρασης. Αυτό συμβαίνει στις περιπτώσεις της φερριτίνης (ελαφρά-L- και βαριά-H- άλυσο), της φερροπορτίνης, της συνθετάσης του αμιλολεβουλινικού οξέος (ALAS2), της μιτοχονδριακής ακονιτάσης και του HIF2α[8] (Εικόνα 2).

Αντίθετα, στις περιπτώσεις του TfR1 (transferrin receptor 1) και του DMT1, η παρουσία IRE στην 3΄ UTR του mRNA δρα σταθεροποιητικά για το mRNA όταν προσδένονται οι IRP[48] (Εικόνα 2). Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί λειτουργικά IRE σε mRNA που κωδικοποιούν πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες που σχετίζονται όχι μόνο με την ομοιοστασία του σιδήρου, αλλά και με τον κυτταρικό μεταβολισμό, τη ρύθμιση της υποξίας,



Εικόνα 2. Ρύθμιση του ενδοκυττάριου μεταβολισμού του σιδήρου: Το σύστημα IRE/IRP (Hentzeetal., 2010). Σε ένδεια σιδήρου, η IRP1 ή η IRP2 προσδένονται στα IRE στις μη μεταφραζόμενες περιοχές (UTR) των mRNA που κωδικοποιούν για πρωτεϊνες που εμπλέκονται στη διακίνηση και την αποθήκευση του σιδήρου. Η προσδεση των IRP σε μοναδικά IRE που βρίσκονται στην 5΄- UTR σε mRNA στόχους αναστέλλει τη μετάφραση, ενώ η αλληλεπίδραση των IRP με πολλαπλά IRE στην 3΄- UTR του mRNA του υποδοχέα TfR1 επάγει τη μετάφραση της πρωτεϊνης. Ως συνέπεια, η πρόσληψη του σιδήρου μέσω του TfR1 αυξάνει, ενώ η αποθήκευση του σιδήρου στη φερριτίνη και η έξοδος του σιδήρου μέσω της φερροπορτίνης μειώνεται, με αποτέλεσμα να αυξάνει ο σίδηρος της ασταθούς δεξαμενής σιδήρου (LIP). Σε περίσσεια σιδήρου, η IRP1 μετατρέπεται σε κυτταροπλασματική ακονιτάση με την πρόσδεση σιδηροθειούχων συμπλόκων, ενώ η IRP2 αποσταθεροποιείται, ουβικιτινυλιώνεται και αποδομείται από το πρωτεόσωμα. Εκτός από τη φερριτίνη, τη φερροπορτίνη και τον TfR1, οι IRPs ρυθμίζουν τη μετάφραση των mRNA που κωδικοποιούν για τη συνθετάση του αμιλολεβουλινικού οξέος (ALAS2) στη σύνθεση της αίμης, τη μιτοχονδριακή ακονιτάση (ACO2) και τονHIF2α (hypoxiainduciblefactor 2α). Μοναδικά IRE απαντώνται στην 3΄- UTR του mRNA του DMT1 και του CDC14A, ο ρόλος και ο μηχανισμός των οποίων δεν έχει πλήρως περιγραφεί.

τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την οργάνωση του κυτταρικού σκελετού και τη λειτουργία των νευρόνων[49].

Η πρόσδεση της IRP1 και της IRP2 στο IRE εξαρτάται από τα επίπεδα του ενδοκυττάριου σιδήρου, και συγκεκριμένα από τα επίπεδα της ασταθούς δεξαμενής σιδήρου (LIP). Όταν ο ενδοκυττάριος σίδηρος είναι χαμηλός, οι IRP προσδένονται με μεγάλη συγγένεια στα IRE. Το σύμπλεγμα IRE/IRP σταθεροποιεί το mRNA του TfR1 και του DMT1, ενώ αναστέλλει τη σύνθεση της φερριτίνης, της φερροπορτίνης, της ALAS2, του HIF2α και της μιτοχονδριακής ακονιτάσης[49]. Με τον τρόπο αυτό, τα αυξημένα επίπεδα του TfR1 διεγείρουν την πρόσληψη του

σιδήρου μέσω της τρανσφερρίνης και τη μεταφορά του μέσω του DMT1, ενώ με την αναστολή της σύνθεσης της φερριτίνης και της φερροπορτίνης ο σίδηρος δεν αποθηκεύεται, και συγχρόνως περιορίζεται η έξοδος του από το κύτταρο.

Αντίθετα, σε περίσσεια σιδήρου, η διαθεσιμότητα τόσο της IRP1, όσο και της IRP2 μειώνεται δραστικά. Ως αποτέλεσμα, η πρόσληψη σιδήρου μειώνεται μέσω αποδόμησης του mRNA του TfR1, ενώ με την αύξηση της φερριτίνης και της φερροπορτίνης ο πλεονάζων σίδηρος αποθηκεύεται ή εξέρχεται του κυττάρου, προκειμένου να αποφευχθούν οι τοξικές συνέπειες της υπερσυσσώρευσης του.

Σε κάποιες περιπτώσεις, το σύστημα IRE/IRP παρακάμπτεται προκειμένου να εξυπηρετηθούν αποτελεσματικότερα οι ανάγκες του οργανισμού για σίδηρο. Μελέτες σε κύτταρα του βλεννογόνου του δωδεκαδακτύλου και σε ερυθροβλάστες έχουν δείξει την παραγωγή ισομερών mRNA της φερροπορτίνης και του DMT1 τα οποία δεν περιέχουν IRE και επομένως δεν υπόκεινται σε μετα-μεταγραφική ρύθμιση μέσω των IRP[50,51]. Σε καταστάσεις ένδειας σιδήρου, η παράκαμψη του συστήματος IRE/IRP συμβάλλει πιθανότατα στην ομοιοστατική προσαρμογή των κυττάρων αυτών προκειμένου να απορροφηθεί σίδηρος από το έντερο, και συγχρόνως να περιοριστεί η ερυθροποίηση με την εξαγωγή σιδήρου από τους ερυθροβλάστες και τη χρήση του από άλλα κύτταρα.

Το ρυθμιστικό σύστημα IRE/IRP επιτρέπει τη γρήγορη ανταπόκριση των κυττάρων στα επίπεδα του κυτταροπλασματικού σιδήρου, επιτυγχάνοντας έτσι τη βέλτιστη λειτουργία των γονιδίων που συμμετέχουν στην ομοιοστασία του σιδήρου σε κυτταρικό επίπεδο[52].

Η παθοφυσιολογική σημασία του συστήματος IRE/IRP τονίζεται ιδιαίτερα στο κληρονομικό σύνδρομο υπερφερριτιναιμίας καταρράκτη (HHCS – hereditary hyperferritinemia cataract syndrome). Πρόκειται για ένα σπάνιο σύνδρομο που κληρονομείται με τον επικρατούντα αυτοσωμικό τρόπο και χαρακτηρίζεται από υψηλές τιμές φερριτίνης, απουσία υπερφόρτωσης σιδήρου και αμφοτερόπλευρους νεανικούς καταρράκτες. Η υπερφερριτιναιμία οφείλεται στην ανεξέλεγκτη παραγωγή L φερριτίνης, ανεξαρτήτως των επιπέδων σιδήρου, λόγω μεταλλάξεων στο IRE του mRNA της. Οι μεταλλάξεις τροποποιούν την τριτοταγή δομή του IRE και εμποδίζουν την πρόσδεση των IRP, με αποτέλεσμα να καταργείται η ρύθμιση της L φερριτίνης μέσω του συστήματος IRE/IRP[53,54].

5.2. Οι σιδηρορυθμιστικές πρωτεϊνες IRP1 και IRP2

Η IRP1 και η IRP2 είναι ορθόλογες πρωτεΐνες, εμφανίζουν 56% ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων τουςκαι ανήκουν στην οικογένεια των ισομερασών που σχετίζονται με σιδηροθειούχα σύμπλοκα[52].

Η IRP1 απαντά σε δύο μορφές ανάλογα με τα επίπεδα του ενδοκυττάριου σιδήρου. Σε περίσσεια σιδήρου, η IRP1 συνδέεται με ένα κυβοειδές σιδηροθειούχο σύμπλοκο [4Fe-4S] (holo-IRP1), το οποίο εμποδίζει την πρόσδεση της στο IRE, ενώ συγχρόνως τη μετατρέπει σε κυτταροπλασματική ακονιτάση, η οποία έχει παρόμοια δράση με την αντίστοιχη μιτοχονδριακή[37]. Όταν ο ενδοκυττάριος σίδηρος είναι χαμηλός, το σιδηροθειούχο σύμπλοκο αποδεσμεύεται, και ηIRP1 (apo-IRP1) μπορεί να προσδεθεί στο IRE.

Αντίθετα, η IRP2 δεν έχει διπλό ρόλο και η δράση της περιορίζεται σε αυτή της πρόσδεσης στο IRE. Σε ένδεια ενδοκυττάριου σιδήρου, η IRP2 συνδέεται με το IRE. Με την αύξηση των επιπέδων του σιδήρου, ενεργοποιούνται μηχανισμοί μέσω των οποίων η IRP2 αποσταθεροποιείται, ουβικιτινυλιώνεται, για να αποδομηθεί στη συνέχεια από το πρωτεόσωμα[55,56].

Φαίνεται λοιπόν ότι η IRP2 ρυθμίζεται κυρίως από τα επίπεδα του κυτταροπλασματικού σιδήρου, ενώ η IRP1 εξαρτάται από τα επίπεδα σιδήρου στο μιτοχόνδριο και τη σύνθεση των σιδηροθειούχων συμπλόκων, που λειτουργεί ως «διακόπτης» μεταξύ της IRP1 και της κυτταροπλασματικής ακονιτάσης[57]. Η ρύθμιση της IRP2 είναι μη αναστρέψιμη, ενώ η τελική έκφραση της IRP1 εξαρτάται από το λόγο της holo- προς την apo-IRP1.

Η ρύθμιση των IRP επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες εκτός του σιδήρου. Σύμφωνα με μελέτες σε κυτταρικές σειρές και ποντίκια η υποξία σταθεροποιεί την IRP2 και προάγει την έκφραση της holo-IRP1[58], ενώ οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ενεργοποιούν την IRP1 μέσω της αποδιάταξης των σιδηροθειούχων συμπλόκων[59]. Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) σταθεροποιεί την IRP2 και επάγει την πρόσδεση της IRP1 στο IRE[37], ενώ η αίμη δρα αποσταθεροποιητικά και επάγει την αποδόμηση του IRP2[60].

Μελέτες σε ποντίκια υπογραμμίζουν τη σημασία των IRP.Η ταυτόχρονη εξάλειψη και των δύο γονιδίων που κωδικοποιούν για τις IRP1 και IRP2 οδηγεί σε εμβρυϊκό θάνατο[61], υπογραμμίζοντας τη σημασία των πρωτεϊνών αυτών στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης. Ποντίκια στα οποία έγινε στοχευμένη εξάλειψη και των δύο IRP σε συγκεκριμένους ιστούς παρουσίασαν διαφορετικούς φαινοτύπους ανάλογα με τον ιστό στόχο. Στα εντεροκύτταρα, η απουσία IRP οδήγησε σε αναπτυξιακές ανωμαλίες, δυσαπορρόφηση, αφυδάτωση, απώλεια βάρους και θάνατο στις 4 εβδομάδες[62]. Η απώλεια των IRP στα ηπατοκύτταρα προκάλεσε πρόωρο θάνατο λόγω ηπατικής ανεπάρκειας, μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας και μεταβολών στη σύνθεση της αίμης και των σιδηροθειούχων συμπλόκων[63].

Ποντίκια στα οποία έχει εξαλειφθεί είτε η IRP1 ή η IRP2 είναι βιώσιμα και γόνιμα, γεγονός που υποδεικνύει τον επικαλυπτόμενο ρόλο των δύο πρωτεϊνών. Φαίνεται ότι η IRP2 παίζει καθοριστικότερο ρόλο στη ρύθμιση

της πρόσληψης του σιδήρου και στη σύνθεση της αίμης στους προερυθροβλάστες, ενώ η IRP1 είναι βασικός ρυθμιστής της ερυθροποίησης και της απορρόφησης του σιδήρου[57,64]. Ποντίκια με γονότυπο *IRP1*$^{-/-}$ παρουσιάζουν πολυκυτταραιμία και πνευμονική υπέρταση, ενώ εκείνα με γονότυπο *IRP2*$^{-/-}$ αναπτύσσουν υπόχρωμη μικροκυτταρική αναιμία, έχουν αυξημένη εναπόθεση σιδήρου στα εντεροκύτταρα του δωδεκαδακτύλου και στο ήπαρ και εμφανίζουν νευροεκφυλιστικές διαταραχές, πιθανότατα λόγω εναπόθεσης σιδήρου σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου[57,65,66].

6. Συμπεράσματα

Αν και ο τομέας του ενδοκυττάριου μεταβολισμού του σιδήρου έχει αποτελέσει αντικείμενο εντατικής έρευνας τα τελευταία 10 τουλάχιστον χρόνια, υπάρχει ακόμη σημαντικός αριθμός βασικών μηχανισμών που δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Οι γνώσεις μας για τον τρόπο που επιτελείται η ενδοκυττάρια μεταφορά του σιδήρου και η είσοδος στο μιτοχόνδριο είναι περιορισμένες αν και η διαδικασία αυτή έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς ο ελεύθερος σίδηρος είναι τοξικός και πρέπει να δεσμευτεί και να μεταφερθεί στον προορισμό του. Οι μεταφορείς που συμμετέχουν τόσο στην είσοδο, όσο και στην έξοδο του σιδήρου (στη μορφή της αίμης και των σιδηροθειούχων συμπλόκων) από το μιτοχόνδριο παραμένουν εν πολλοίς άγνωστοι μέχρι σήμερα, με εξαίρεση την πρόσφατη αναγνώριση ενός μιτοχονδριακού εξαγωγέα της αίμης. Επιπρόσθετα και οι μηχανισμοί που αφορούν στην πρόσληψη σιδήρου με μορφή αίμης και ανόργανου σιδήρου από τα κύτταρα παραμένουν μερικώς χαρακτηρισμένοι. Η ανακάλυψη και ο λεπτομερής χαρακτηρισμός του συστήματος IRE/IRP βοήθησαν στην κατανόηση ορισμένων νοσημάτων και οδήγησαν στην αναγνώριση περισσότερων IREs σε mRNAs γονιδίων. Ο περαιτέρω χαρακτηρισμός του ρόλου αυτών των IREs και η συμμετοχή τους τόσο στην ομοιοστασία του σιδήρου, όσο και σε άλλες κυτταρικές διαδικασίες, όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ορισμένες παθήσεις του αναπνευστικού, αλλά και στην ερυθροποίηση θα βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση των βασικών μηχανισμών αυτών των νοσημάτων, αλλά και πιθανόν στην ανακάλυψη νέων θεραπευτικών μεθόδων.

Intracellular iron homeostasis

by Danai Palaiologou[1], Stamatia-Lydia Hatzinicolaou[2]

[1]Biologist, MSc, PhD, Hematological Research Laboratory, First Department of Propaedeutic Internal Medicine, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, [2]MD, PhD, Gastroenterology intern, Gastroenerology Department, St' Savvas Oncology Hospital, Athens, Greece

ABSTRACT: Iron is vital for life as it is utilized by several proteins as cofactor for major biological processes like oxygen transport, energy production and cellular proliferation. At the same time excess iron may also be deleterious for cells because of free radical formation leading to oxidative stress. Acquisition, transport, utilization and storage of iron are tightly controlled to meet physiological needs and prevent excessive accumulation of the metal within cells. The main destinations of iron within mammalian cells are the cytosolic iron-storage protein, ferritin, and the mitochondria. Iron enters the cell predominately in the form of transferrin bound iron via the transferrin receptor1 (TfR1), located at the cell membrane. (Upon cell surface binding, the TBI–TfR1 complex undergoes a clathrin-dependent endocytosis.) Specific cell types may uptake iron via alternative routes, for example macrophages acquire high amounts of iron through phagocytosis of erythrocytes and other cell types are able to internalize heme and non trasnferrin bound iron through specific protein importers. The internalized iron enters the "labile iron pool" of the cytoplasm and is either directed to the mitochondria, where heme and ferrous sulfur cluster synthesis take place, or is stored in ferritin. Cellular iron metabolism is tightly controlled by various mechanisms acting on transcriptional, translational and post-translational level. One of the best studied systems, the iron regulatory protein (IRP)/iron responsive element (IRE) system, controls both mRNA stability and translation of transcripts coding for proteins involved in iron uptake, export, transport and storage. The system depends on the close interactions of the IRPs with the IREs on the mRNA of the genes controlling iron uptake, transfer, storage and transport, according to cellular iron status. In this way the system permits quick cellular responses to intracellular iron shifts, achieving optimum gene function and intracellular iron balance.

Βιβλιογραφία

1. Ponka P, Lok CN. The transferrin receptor: role in health and disease. Int J Biochem Cell Biol. 1999;31:1111–1137.
2. Cheng Y, Zak O, Aisen P, et al. Structure of the Human Transferrin Receptor-Transferrin Complex Albert Einstein College of Medicine. Cell. 2004;116:565–576.
3. Aisen P. Transferrin receptor 1. Int J Biochem Cell Biol. 2004;36:2137–2143.
4. Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. Biochim Biophys Acta - Gen Subj 2012;1820:188–202.
5. 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;21:396–399.
6. Fleming MD, Romano M, Su M, et al. 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.
7. Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL, et al. Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. Nat Genet. 2005;37:1264–1269.
8. Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: Molecular control of mammalian iron metabolism. Cell. 2004;117:285–297.
9. Kawabata H, Yang R, Hirama T, et al. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. J Biol Chem. 1999;274:20826–20832.
10. Camaschella C, Roetto A, Calì A, et al. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. Nat Genet. 2000;25:14–15.
11. Zhao N, Gao J, Enns C, Knutson MD. ZRT/IRT-like protein 14 (ZIP14) promotes the cellular assimilation of iron from transferrin. J Biol Chem 2010;285:32141–32150.
12. Oudit GY, Sun H, Trivieri MG, et al. L-type Ca2+ channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy. Nat Med. 2003;9:1187–1194.
13. Devireddy LR, Gazin C, Zhu X, Green MR. A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. Cell. 2005;123:1293–1305.
14. Chen TT, Li L, Chung D-H, et al. TIM-2 is expressed on B cells and in liver and kidney and is a receptor for H-ferritin endocytosis. J Exp Med. 2005;202:955–965.
15. Kautz L, Nemeth E. Molecular liaisons between erythropoiesis and iron metabolism. Blood. 2014;124:479–482.
16. Li JY, Paragas N, Ned RM, et al. Scara is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery. Dev Cell 2009;16:35–46.
17. Greenberg GR, Wintrobe MM. A labile iron pool. J Biol Chem. 1946;165:397.
18. Pantopoulos K, Kumar S, Porwal A, Tartakoff LD. Mechanisms of mammalian iron homeostasis Kostas. Biochemistry. 2012;29:5705–5724.
19. Kruszewski M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. Mutat Res. 2003;531:81–92.
20. Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. Biochim Biophys Acta. 1996;1275:161–203.
21. Bou-Abdallah F. The iron redox and hydrolysis chemistry of the ferritins. Biochim Biophys Acta. 2010;1800:719–731.
22. Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. Biochim Biophys Acta. 2009;1790:589–599.
23. Ferreira C, Bucchini D, Martin ME, et al. Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice. J Biol Chem. 2000;275:3021–3024.
24. Darshan D, Vanoaica L, Richman L, Beermann F, Kühn LC. Conditional deletion of ferritin H in mice induces loss of iron storage and liver damage. Hepatology. 2009;50:852–860.
25. Missirlis F, Kosmidis S, Brody T, et al. Homeostatic mechanisms for iron storage revealed by genetic manipulations and live imaging of Drosophila ferritin. Genetics. 2007;177:89–100.
26. De Domenico I, Vaughn MB, Li L, et al. Ferroportin-mediated mobilization of ferritin iron precedes ferritin degradation by the proteasome. EMBO J. 2006;25:5396–5404.
27. Rogers J, Munro H. Translation of ferritin light and heavy subunit mRNAs is regulated by intracellular chelatable iron levels in rat hepatoma cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1987;84:2277–2281.
28. Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein. Blood. 2002;99:3505–3516.
29. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, et al. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. Mol Cell. 2002;10:1033–1043.
30. Liu Z, Yang A, Wang Z, et al. Multiple apoptotic defects in hematopoietic cells from mice lacking lipocalin 24p3. J Biol Chem. 2011;286:20606–20614.
31. Flo TH, Smith KD, Sato S, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestrating iron. Nature. 2004;432:917–921.
32. Devireddy LR, Hart DO, Goetz DH, Green MR. A mammalian siderophore synthesized by an enzyme with a bacterial homolog involved in enterobactin production. Cell. 2010;141:1006–1017.
33. Nilsson R, Schultz IJ, Pierce EL, et al. Discovery of genes essential for heme biosynthesis through large-scale gene expression analysis. Cell Metab. 2009;10:119–130.
34. Wolff N, Ghio AJ, Garrick LM, et al. Evidence for mitochondrial localization of divalent metal transporter 1 (DMT1). FASEB J. 2014;28:2134–2145.
35. Shaw GC, Cope JJ, Li L, et al. Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. Nature. 2006;440:96–100.
36. Sheftel AD, Zhang A-S, Brown C, Shirihai OS, Ponka P. Direct interorganellar transfer of iron from endosome to mitochondrion. Blood. 2007;110:125–132.
37. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism. Cell. 2010;142:24–38.
38. Cazzola M, Invernizzi R, Bergamaschi G, et al. Mitochondrial ferritin expression in erythroid cells from patients with sideroblastic anemia. Blood. 2012;101:1996–2000.
39. Chiabrando D, Marro S, Mercurio S, et al. The mitochondrial

heme exporter FLVCR1b mediates erythroid differentiation. J Clin Invest. 2012;122:4569–4579.
40. Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, et al. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. Cell Metab. 2005;1:191–200.
41. Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, et al. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. Nat Genet. 1999;21:195–199.
42. Harris ZL, Durley AP, Man TK, Gitlin JD. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:10812–10817.
43. Quigley JG, Yang Z, Worthington MT, et al. Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. Cell. 2004;118:757–766.
44. Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, et al. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:15649–15654.
45. Woodward OM, Köttgen A, Coresh J, et al. Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:10338–10342.
46. Piccinelli P, Samuelsson T. Evolution of the iron-responsive element. RNA. 2007;952–966.
47. Walden WE, Selezneva AI, Dupuy J, et al. Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA. Science. 2006;314:1903–1908.
48. Muckenthaler MU, Galy B, Hentze MW. Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. Annu Rev Nutr. 2008;28:197–213.
49. Wang J, Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. Biochem J. 2011;434:365–381.
50. Zhang A-S, Enns C. Molecular mechanisms of normal iron homeostasis. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009;207–214.
51. Hubert N, Hentze MW. Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:12345–12350.
52. Rouault TA. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. Nat Chem Biol. 2006;2:406–414.
53. Beaumont C, Leneuve P, Devaux I, et al. Mutation in the iron responsive element of the L ferritin mRNA in a family with dominant hyperferritinaemia and cataract. Nat Genet. 1995;11:444–446.
54. Girelli D, Corrocher R, Bisceglia L, et al. Molecular basis for the recently described hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome: a mutation in the iron-responsive element of ferritin L-subunit gene (the "Verona mutation"). Blood. 1995;86:4050–4053.
55. Salahudeen AA, Thompson JW, Ruiz JC, et al. An E3 ligase possessing an iron-responsive hemerythrin domain is a regulator of iron homeostasis. Science. 2009;326:722–726.
56. Vashisht AA, Zumbrennen KB, Huang X, et al. Control of Iron Homeostasis by an Iron-Regulated Ubiquitin Ligase. Science. 2009;326:718–721.
57. Wilkinson N, Pantopoulos K. The IRP/IRE system in vivo: Insights from mouse models. Front Pharmacol 2014;5:1–15.
58. Meyron-Holtz EG, Ghosh MC, Iwai K, et al. Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. EMBO J. 2004;23:386–395.
59. Pantopoulos K, Hentze MW. Activation of iron regulatory protein-1 by oxidative stress in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:10559–10563.
60. Ishikawa H, Kato M, Hori H, et al. Involvement of heme regulatory motif in heme-mediated ubiquitination and degradation of IRP2. Mol Cell. 2005;19:171–181.
61. Smith SR, Ghosh MC, Ollivierre-Wilson H, Hang Tong W, Rouault TA. Complete loss of iron regulatory proteins 1 and 2 prevents viability of murine zygotes beyond the blastocyst stage of embryonic development. Blood Cells Mol Dis. 36:283–287.
62. Galy B, Ferring-Appel D, Kaden S, Gröne H-J, Hentze MW. Iron regulatory proteins are essential for intestinal function and control key iron absorption molecules in the duodenum. Cell Metab. 2008;7:79–85.
63. Galy B, Ferring-Appel D, Sauer SW, et al. Iron regulatory proteins secure mitochondrial iron sufficiency and function. Cell Metab. 2010;12:194–201.
64. Zhang D-L, Ghosh MC, Rouault T. The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis - an update. Front Pharmacol. 2014;5:124.
65. Cooperman SS, Meyron-Holtz EG, Olivierre-Wilson H, et al. Microcytic anemia, erythropoietic protoporphyria, and neurodegeneration in mice with targeted deletion of iron-regulatory protein 2. Blood. 2005;106:1084–1091.
66. Galy B, Ferring D, Minana B, et al. Altered body iron distribution and microcytosis in mice deficient in iron regulatory protein 2 (IRP2). Blood. 2005;106:2580–2589.