

Erytroferon – nový hormon regulující metabolismus železa

Kautz L, Jung G, Valore EV, et al. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. Nat Genet 2014, doi:10.1038/ng.2996

Tvorba funkčních erytrocytů vyžaduje dostatečnou dodávku železa erytroidním prekursorům. Nároky na dodávku železa

výrazně stoupají po krvácení nebo při hemolýze a jsou zajištěny zvýšenou střevní absorpcí železa a zvýšeným uvolňováním železa ze zásob (Ganz et al., 2012).

Mechanismus, kterým se při zvýšené erytropoeze zvyšuje dostupnost železa, byl ale až dosud neznámý (Nicholas et al., 2002, Pak et al., 2006, Vokurka et al., 2006). Hlavním regulátorem střevní absorpce železa a jeho tkáňové distribuce je hormon hepcidin, který produkují játra. Hepcidin se váže na svůj receptor, ferroportin, který

umožňuje přesun železa z buněk do extracelulární tekutiny a vylučuje jeho endocytózu a degradaci. Tím blokuje střevní absorpci železa, uvolňování zásobního železa z jater a uvolňování železa z makrofágů. Tvorba hepcidinu je regulována sérovými koncentracemi železa, velikostí zásob železa a stoupá u stavů spojených se zánětem. Dlouho předpokládána a hledaná regulační molekula, pravděpodobně produkovaná erytroidními prekursory v kostní dřeni, by měla umožnit při stimulaci erytropoezy zvýšit dostupnost železa a měla by tedy nejspíše inhibovat produkci hepcidinu. U myši bylo prokázáno, že krvácením nebo hemolýzou indukovaná anémie opravdu snižuje sérové hladiny hepcidinu a že tato inhibice závisí na produkci erytropoetinu a funkční kostní dřeni. U zdravých dobrovolníků snížilo podání erytropoetinu sérové hladiny hepcidinu, aniž by současně došlo ke změnám sérové koncentrace železa.

U stavů spojených s neefektivní erytropoezou, např. u talasémie, by zvýšené koncentrace uvedené regulační molekuly mohly supresí hepcidinu a neadekvátně zvýšenou střevní absorpcí železa způsobit přetížení organismu železem. V komentované práci spolupracovníci Tomase Ganze v Los Angeles a v New Yorku identifikovali nový hormon produkovaný erytroidními prekursory, který hraje klíčovou roli v časně supresi hladin hepcidinu po vyvolání stimulace erytropoezy krvácením či hemolýzou.

Autoři nejdříve studovali dynamiku odpovědi hepcidinu na zvýšenou erytropoetickou aktivitu. U flebotomovaných nebo erytropoetinem léčených C57/BL/6 myši začaly transkripce hepcidinu v játrech a sérové hladiny hepcidinu klesat nejpozději do devíti hodin po podnětu, dosáhly minima (10 % původních hodnot) po 15 hodinách a zůstaly alespoň mírně snížené až 48 hodin po podnětu. Časový vývoj sérových koncentrací hepcidinu u myši byl podobný vývoji sérových hodnot hepcidinu po podání erytropoetinu u zdravých dobrovolníků. Pokles hepcidinu nebyl v tomto experimentu provázen žádnou změnou sérových koncentrací železa. Regulace hepcidinu železem je zprostředkována transkripčními faktory BMP-SMAD, jejich transkripce ale v tomto modelu hemoragií stimulované erytropoezy nebyla vůbec ovlivněna (snížena) a k supresi hepcidinu po flebotomii docházelo i u myši s vysokými hladinami hepcidinu v důsledku parenterálního podávání železa, které měly výrazně stimulovaný systém BMP-SMAD. Bylo tedy jasné, že faktor(y) regulující koncentraci hepcidinu v souvislosti se stimulací erytropoezy jsou odlišné od faktorů souvisejících se změnami metabolismu železa.

Autoři poté studovali změny mRNA v kostní dřeni pomocí profilování genové exprese pomocí čipů Affymetrix, aniž by pozorovali jakékoli změny hladin mRNA faktorů Gdf15 a Twsg1, které byly dříve navrženy jako možné regulátory produkce hepcidinu kostní dřeni. Nejlepší časový vztah k supresi hepcidinu ukázala exprese do té doby necharakterizovaného transkriptu, označovaného v databázích jako Fam132b. Tento transkript kódoval secernovaný protein a jeho exprese byla výrazně indukována již čtyři hodiny po krvácení, ještě před supresi hepcidinu, a zůstávala zvýšená po celou dobu suprese jaterní produkce hepcidinu. Tento faktor byl pojmenován erytroferon (ERFE – erytroidní hormon ovlivňující metabolismus železa). Tento secernovaný protein byl také dříve popsán jako myonektin nebo CTRP15, člen rodiny proteinů příbuzných faktorů C1q komplementu a rodiny faktorů nekrotizujících tumorů (TNF). Validační studie ukázala, že exprese erytroferonu stoupá v kostní dřeni nejpozději do čtyř hodin po flebotomii a dosahuje maxima (třicetinasobného vzestupu) do devíti hodin s dalším postupným poklesem během 24–48 hodin. Exprese erytroferonu stoupala paralelně se sérovými koncentracemi erytropoetinu. Podání erytropoetinu vyvolalo podobný, ale rychlejší

vzestup exprese erytroferonu, což ukazovalo na možnost, že gen indukující erytroferon je regulován erytropoetinem. Exprese genu pro erytroferon nebyla regulována systémem BMP-SMAD.

Studium tkáňové exprese genu pro erytroferon po podání erytropoetinu poté ukázalo, že gen pro erytroferon byl za bazálních podmínek slabě exprimován v tlustém střevě, duodenu, svalectech, kostní dřeni a varlatech, po podání erytropoetinu ale stoupla exprese genu pro erytroferon jen v kostní dřeni a slezině (u myši patří i slezina mezi erytropoetické orgány). Pomocí průtokové cytometrie bylo možno ukázat, že gen pro erytroferon je exprimován různými erytroidními prekursory v průběhu jejich diferenciaci, ale nejvyšší byla v bazofilních a polychromatofilních erytroblastech. Poté se autorům podařilo nejprve klonovat cDNA pro erytroferon a poté stanovit sekvenci aminokyselin lidského a myšičího erytroferonu, které jsou ze 71 % identické (lidský erytroferon je tvořen 354 aminokyselinami a myšičí jen 340 aminokyselinami) s větší shodou v C-terminální části, která obsahuje TNFα-podobnou doménu. Aktivace genu pro erytropoetin je spojena s aktivací signální cesty JAK2-STAT5. V regulační oblasti genu pro erytroferon našli autoři několik vazebných míst pro STAT5. Inhibitory STAT5 inhibovaly vzestup exprese erytroferonu po podání erytropoetinu. Exprese erytroferonu indukovaná erytropoetinem je tedy závislá na aktivaci systému JAK2-STAT5. Naproti tomu exprese erytroferonu nezávisela na žádných faktorech indukovaných hypoxií nebo zánětem.

Myši s vyřazeným genem pro erytroferon nemají omezené dožití, jsou plodné a mají jen mírně sníženou koncentraci hemoglobinu v době růstu, ale nikoli v dospělosti, a vyznačovaly se dále jen statisticky nevýznamným trendem k menšímu objemu erytrocytů a nižším sérovým koncentracím železa. Od normálních myši se nelišily ani hladinou hepcidinu, ani množstvím železa ve slezině. Po flebotomii u myši s vyřazeným genem pro erytroferon nedocházelo k supresi hepcidinu a sérové koncentrace železa byly u flebotomovaných myši s vyřazeným genem pro erytroferon významně nižší než u normálních myši. Tyto nálezy potvrzují představu, že erytroferon je opravdu nezbytný k supresi hepcidinu při zvýšené erytropoetické aktivitě. Erytroferon ale na druhé straně nemá žádný vliv na diferenciaci erytroblastů. Absence erytroferonu u myši s vyřazeným genem pro erytroferon měla za následek zhoršenou mobilizaci železa po krvácení s následnou nižší koncentrací hemoglobinu, menším obsahem hemoglobinu v erytrocytech a nižším objemem erytrocytů a normalizace červeného krevního obrazu po flebotomii byla u těchto myši ve srovnání s normálním myšičím kmenem významně (o několik dní) opožděna.

Podání rekombinovaného erytroferonu snížilo expresi mRNA pro hepcidin v játrech a sérové hladiny hepcidinu. Rekombinovaný erytroferon měl tendenci k agregaci (podobně jako jiné proteiny ze superrodiny TNFα) a kromě suprese hepcidinu měl (snad v důsledku své agregace) i prozánětlivé účinky. Aby se vyloučil potenciální vliv agregace a prozánětlivý účinek agregovaného proteinu, byl lentivirový vektor kódující erytroferon přenesen do hepatocytů. Přestože byla takto navozená jaterní exprese mRNA pro erytroferon jen mírně zvýšena oproti bazálním hodnotám, došlo k významné supresi jaterní exprese mRNA pro hepcidin a poklesu sérových koncentrací hepcidinu, ale bez aktivace prozánětlivých mechanismů a také bez aktivace BMP/STAT (k té nedošlo ani po podání rekombinovaného erytroferonu). Erytroferon rovněž inhiboval produkci hepcidinu v kultivovaných hepatocytech *in vitro*.

Myši s talasémií měly anémii, inefektivní erytropoezu, splenomegalii a nízké koncentrace hepcidinu s následnou nepřiměřeně vysokou absorpcí železa a kumulací železa v játrech. Talasemické myši měli také vysoké sérové koncentrace erytropoetinu a zvýšenou

expresi genu pro erytroferon v kostní dřeni. Erytroferon tedy zřejmě přispívá k supresi hepcidinu i v tomto myším modelu talasémie.

■ KOMENTÁŘ

Prof. MUDr. Vladimír Tesař, DrSc.

Erytroidními buňkami produkováný faktor regulující homeostázu železa, který zajistí dostatečnou dodávku železa při stimulované erythropoeze, byl hledán mnoho let. Původní představa, že pokles hepcidinu při stimulaci erythropoezy je vyvolán přímým působením erythropoetinu na játra, event. hepatocelulární hypoxií, se nepotvrdila. Autoři komentované práce identifikovali pomocí studia exprese mRNA v kostní dřeni po flebotomii nový hormon erytroferon, jehož exprese v erytroidních prekursorech a sekrece do séra nastává krátce po flebotomii nebo po podání erythropoetinu. Erytroferon přímým účinkem na hepatocyty inhibuje produkci a sekreci hepcidinu, a tím umožňuje zvýšenou střevní absorpci železa a zvýšenou mobilizaci železa z jaterních zásob a makrofágů.

V roce 2012 popsali Seldin a spol. stejný protein, který nazvali myonektin (nebo CTRP15), a ukázali, že je produkován v kosterním svalu, jeho produkce je inhibována hladověním a stimulována příjmem potravy a přispívá k regulaci metabolismu lipidů. Nestudovali však expresi tohoto hormonu v kostní dřeni. Teprve další studie ukáží, jaký je biologický význam těchto velmi různých účinků jedné molekuly.

Autoři komentované studie jasně ukázali na klinický význam chybění erytroferonu. Myši s vyřazeným genem pro erytroferon měli ve srovnání s normálními myši opožděnou úpravu hemoglobinu po krvácení. Pozdní, ale přítomná odpověď však ukazuje, že mohou existovat ještě jiné další mechanismy mobilizace železa při stimulaci erythropoezy. Vzhledem k významnému evolučnímu významu schopnosti přežít krvácení to není příliš překvapivé. Je třeba si uvědomit, že aktivovaná erythropoeza vyvolá při chybějící supresi hepcidinu deficit železa, který pak může suprimovat koncentraci hepcidinu mechanismem nezávislým na erytroferonu. Normální hodnoty hemoglobinu u dospělých myši s vyřazeným genem pro erytroferon také ukazují, že erytroferon není nutný pro normální erythropoezu za klidových podmínek a má význam pouze v podmínkách hemoragického stresu.

Studie na izolovaných hepatocytech s přenosem erytroferonu do hepatocytů virovým vektorem a podáním rekombinovaného erytroferonu ukázaly, že erytroferon inhibuje produkci a sekreci hepcidinu přímým účinkem na hepatocyty. Zbývá však ještě identifikovat receptor pro erytroferon a intracelulární postreceptorové mechanismy, které vedou k supresi produkce hepcidinu. Tyto mechanismy jsou odlišné od regulace hepcidinu sérovými koncentracemi železa, kde je rozhodující aktivace signální cesty BMP-SMAD, která se ale na zprostředkování účinku erytroferonu na produkci hepcidinu nepodílí, a tyto dva mechanismy (regulace hepcidinu změnami metabolismu železa a zvýšenou erythropoetickou aktivitou) spolu zřejmě vůbec neinteragují.

Suprese hepcidinu erytroferonem u inefektivní erythropoezy (např. u talasémie) vysvětluje, proč se u těchto stavů vyvíjí orgánová hemosideróza. Inhibice erytroferonu (a prevence hemosiderózy) by pak mohla být jednou ze součástí léčby těchto stavů. Podávání rekombinovaného (neagregujícího) erytroferonu nebo jinak navozená stimulace receptoru pro erytroferon by pak naopak mohly být součástí léčby anémie chronických chorob, které jsou pravidelně spojeny se zvýšenými koncentracemi hepcidinu a zhoršenou mobilizací a dostupností železa pro erythropoezu (Goodnough et al., 2010).

Literatura

- Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochem Biophys Acta* 2012;1823:1434–1443.
- Goodnough LT, Nemeth E, Ganz T. Detection, evaluation, and management of iron-restricted erythropoiesis. *Blood* 2010;116:4754–4761.
- Nicolas G, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 2002;110:1037–1044.
- Pak M, Lopez MA, Gabayan V, et al. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood* 2006;108:3730–3735.
- Seldin MM, Peterson JM, Byerly MS, et al. Myonectin (CTRP15), a novel myokine that links skeletal muscle to systemic lipid homeostasis. *J Biol Chem* 2012;287:11968–11980.
- Vokurka M, Krijt J, Sulc K, et al. Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol Res* 2006;55:667–674.

mm Hg a < 140 mm Hg. U nemocných po transplantaci ledviny KDIGO doporučuje jako cílovou hodnotu krevního tlaku < 130/80 mm Hg. Cílem této studie bylo analyzovat data od více než 3 400 nemocných po transplantaci ledviny ve stabilním stavu, kteří se účastnili studie FAVORIT (Folic Acid for Vascular Outcome Reduction in Transplantation), s cílem ověřit vztah mezi krevním tlakem a riziky KVK, zvláště s otázkou nalézt rizikovou hodnotu krevního tlaku pro výskyt KVK.

Do této analýzy bylo zařazeno 3 474 účastníků studie FAVORIT, kteří měli kompletní data, z nichž 63 % bylo mužů a průměrný věk byl 53 let. Celkem 20 % nemocných mělo anamnézu KVK, 40 % bylo diabetiků a medián doby sledování po transplantaci ledviny byl průměrně 4 roky. Celkem 88 % nemocných na začátku sledování bylo léčeno alespoň jedním antihypertenzivem. Systolickou hypertenzi měli častěji starší pacienti, muži, ne běloši, diabetici a pacienti s vyšším BMI, vyšší koncentrací celkového cholesterolu a vyšším poměrem albuminu ke kreatininu v moči (ACR). Diastolickou hypertenzi měli častěji muži, ne běloši, kuřáci, pacienti s vyšší koncentrací celkového cholesterolu a ACR. Nižší diastolický krevní tlak měli starší jedinci, diabetici a pacienti s KVK.

Během čtyřletého sledování se vyskytlo 497 KVK, včetně 125 nefatálních IM, 49 iktů, 7 úspěšných resuscitací, 89 úmrtí z kardiovaskulárních příčin a 227 revaskularizací. Vzestup systolického krevního tlaku (TK) o 20 mm Hg byl spojen se vzestupem rizika o 35 %, největší riziko KVK příhod ale bylo zaznamenáno u nejnižších hodnot diastolického TK. Každé snížení diastolického TK pod hodnotu 70 mm Hg bylo spojeno s 51 % rizikem KVK,