

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE
KATEDRA PARAZITOLOGIE A HYDROBIOLOGIE



Dizertační práce

**METABOLISMUS ŽELEZA U BUNĚK
TRICHOMONÁD**

Mgr. Pavel Suchan

Vedoucí dizertační práce:
Doc. RNDr. Jan Tachezy, Ph.D.

Praha 2003

Na tomto místě bych chtěl poděkovat všem, kteří přispěli ke vzniku této práce. V první řadě je to Doc. Jan Tachezy, který byl určitě víc než jen školitel. Díky moc, Honzo, za trpělivost, přátelský přístup a mnoho cenných zkušeností! Dále si dovoluji poděkovat Prof. Jaroslavovi Kuldovi, díky jehož osobitému přístupu vznikalo na katedře parazitologie tvořivé a přátelské prostředí. Děkuji také Doc. Petrovi Horákovi, který v tomto trendu pokračuje. Díky, Petře, za Tvé kamarádké a vždy korektní chování! Děkuji také všem ostatním, kteří k přátelskému prostředí na katedře přispívají.

Děkuji studentskému klubu Mrtvá Ryba, jmenovitě Ondřejovi a Káče.

Děkuji také Dědovi a W3ishovi, a to nejen za jejich profesionální pomoc.

Many thanks to Prof. Graham Coombs and his team at Glasgow University for their generous support and help.

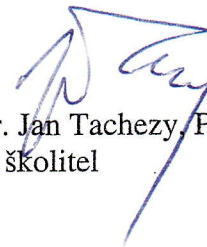
Nejvíce děkuji celé své rodině za podporu a pochopení!

Prohlašuji, že jsem pracoval samostatně a použil pouze literaturu uvedenou v seznamu.



Mgr. Pavel Suchan
autor

Data prezentovaná v této disertační práci jsou výsledkem týmové práce laboratoře Molekulární a Biochemické Parazitologie. Prohlašuji, že se autor na jejich získání zasloužil významným podílem.



Doc. RNDr. Jan Tachezy, Ph.D.,
školitel

OBSAH

1. ÚVOD	1
1.1. Železo v živých systémech	3
1.2. Struktura a funkce proteinů účastnících se metabolismu železa	5
1.2.1. Transferiny.....	5
1.2.2. Feritiny.....	12
1.2.3. Hemoproteiny.....	14
1.2.4. Fe-S proteiny.....	15
1.2.5. Přenašeče importující železo do buněk.....	20
1.2.6. Přenašeče exportující železo z buněk.....	21
1.2.7. Ceruloplasmin a Hephaestin.....	22
1.2.8. Protein HFE.....	23
1.2.9. Frataxin.....	24
1.2.10. Hepcidin.....	26
1.2.11. Ostatní proteiny vázající železo.....	27
1.3. Železo vázané v nízkomolekulárních komplexech	28
1.3.1. Nízkomolekulární železo v gastrointestinálním traktu.....	28
1.3.2. Nízkomolekulární železo v tělních tekutinách.....	30
1.3.3. Buněčný příjem nízkomolekulárního železa.....	30
1.4. Intracelulární transport železa	32
1.5. Regulace vstupu železa do buňky a jeho ukládání	34
1.6. Mechanismy uplatňující se u patogenních mikroorganismů při získávání železa od hostitele	37
1.6.1. Siderofory.....	37
1.6.2. Receptory pro transferin a laktoferin.....	41
1.6.3. Získávání železa z hemoglobinu.....	42
1.6.4. Získávání železa z nízkomolekulárních komplexů.....	43
1.6.5. Význam intracelulárního železa.....	44
1.7. Metabolismus železa u parazitických prvoků	45
1.7.1. Trypanozomy.....	45
1.7.2. Leishmanie.....	49
1.7.3. Plasmodia.....	50
1.7.4. Trichomonády.....	52
1.7.5. Améby.....	57
1.7.6. Giardia.....	57
1.8. Vliv železa na virulenci mikroorganismů	59
1.9. Závěr	61
1.10. Literatura	62
2. CÍLE PRÁCE	85
3. PUBLIKACE A PREZENTACE	86
4. ZÁVĚR	88

5.	PŘÍLOHY	91
5.1.	Příloha 1 (publikace): <i>Tritrichomonas foetus</i>: iron acquisition from lactoferrin and transferrin.....	92
5.2.	Příloha 2 (publikace): The host-protein-independent iron uptake in <i>Tritrichomonas foetus</i>.....	106
5.3.	Příloha 3 (publikace): Iron enhancement of experimental infection of mice by <i>Tritrichomonas foetus</i>.....	116
5.4.	Příloha 4 (publikace): Incorporation of iron into <i>Tritrichomonas foetus</i> cell compartments revealed ferredoxin as a major iron-binding protein in hydrogenosomes.....	125

1. ÚVOD

Železo je prvek, který je naprosto nezbytný pro většinu organismů. Buňky využívají tento kov především pro aktivitu proteinů účastnících se transportu elektronů a oxidoredukčních reakcí, které vyžadují tvorbu volných radikálů. Naproti tomu volné železo, tj. železo, které není specificky vázáno, je pro buňky vysoce toxické. Oxidoredukční reakce železa jsou totiž zdrojem vysoce reaktivních volných radikálů, které mohou ve tkáních katalyzovat autooxidační procesy. Organismy proto udržují velmi nízkou vnitřní hladinu volného železa, a to okolo 10^{-18} M. Toho je docíleno zejména díky souhře tří proteinů: (1) laktoferinu, který železo specificky vyvazuje; (2) transferinu, transportujícího železo mezi tkáněmi; (3) feritinu, který slouží pro intracelulární ukládání tohoto kovu.

Udržování nízké hladiny volného železa v tělních tekutinách pomocí specifické vazby na proteiny zároveň umožňuje obranu vyšších organismů proti mikrobiálním infekcím (tzv. nutriční imunitu). Pro hostitele mohou být totiž patogenní pouze mikroorganismy, které se naučily využívat i takto specificky vázané železo. Bakterie uplatňují při získávání hostitelova železa několik různých mechanismů jako je např. schopnost syntetizovat siderofory, nízkomolekulární ligandy, které díky své vysoké afinitě k železu tento kov hostiteli odebírají. Dalším mechanismem je exprese povrchových receptorů, které vážou železo přímo z transferinu, laktoferinu, hemoglobinu a dalších hostitelských proteinů vázajících železo. U některých mikroorganismů byla také pozorována schopnost snižovat pH a oxidoredukční potenciál ve svém okolí, což vede ke spontánnímu uvolnění železa z různých ligandů a tudíž i ke snadnější asimilaci tohoto kovu.

Mechanismy, které se uplatňují při získávání železa u parazitických prvoků nebyly doposud zcela objasněny. Ačkoliv bylo prokázáno, že anaerobní prvoci, jako např. trichomonády, giardie a *Entamoeba histolytica* mají extrémně vysoké nutriční nároky na železo, specifické receptory pro hostitelské proteiny vázající železo se doposud podařilo detekovat a částečně charakterizovat pouze u šesti druhů prvoků. Geny, kódující tyto receptory, byly identifikovány a analyzovány pouze v případě receptoru pro transferin u *Trypanosoma brucei*. Rovněž neexistují žádné informace o mechanismech uplatňujících se při následném intracelulárním transportu železa a další inkorporaci do buněčných organel a cílových molekul prvoků.

Důvodem vysokých nároků anaerobních prvoků na železo je pravděpodobně klíčová funkce železo-sírných proteinů v energetickém metabolismu, který je u trichomonád koncentrován do hydrogenosomů, organel sloužících k syntéze ATP za anaerobních podmínek.

Nejvýznamnějšími zástupci trichomonád jsou *Tritrichomonas foetus*, původce sexuálně přenosného onemocnění dobytka a *Trichomonas vaginalis*, způsobující pohlavně přenosné onemocnění člověka, kteří parazitují v urogenitální soustavě svých hostitelů. Zdrojem železa v těle hostitele může být pro oba prvoky laktoferin, který je přítomný ve vaginálních sekretech. Buňky *T. vaginalis* jsou schopny využívat také železo uvolněné z erytrocytů, které aktivně lyzují. *T. foetus*, parazitující především v uteru hostitele, může využívat pro příjem železa také transferin. Buňky *T. foetus* byly nalezeny také v zadní části zažívacího traktu, a proto by tento prvok mohl získávat železo i z nízkomolekulárních komplexů přítomných ve střevním obsahu. Vzhledem k vysokým nutričním nárokům trichomonád na železo, mnoha zdrojům, které mohou tyto prvoci pro příjem železa využívat a přítomnosti hydrogenosomů, jejichž funkce plně závisí na aktivitě Fe-S proteinů, jsou trichomonády velmi atraktivním experimentálním modelem pro výzkum příjmu a metabolismu železa.

Následující kapitoly úvodní části této práce budou zaměřeny na strukturu a funkci proteinů a nízkomolekulárních komplexů železa a na celkový metabolismus tohoto kovu u eukaryotických buněk. Navazující kapitoly se pokusí osvětlit mechanismy, pomocí kterých mikroorganismy takto metabolizované železo získávají. Zvláštní důraz bude kladen na parazitické prvoky. Výsledky vlastní experimentální práce, jež je zaměřena na studium mechanismů uplatňujících se při příjmu a intracelulárním zpracování železa buňkami trichomonád a dalších anaerobních prvoků, jsou shrnuty v kapitole 4 a doloženy v připojených publikacích a manuskriptu v kapitole 5.

1.1. Železo v živých systémech

Železo se v biologických systémech vyskytuje převážně ve dvou základních stavech, a to jako železnaté (Fe^{2+}) a železité (Fe^{3+}) kationty. Pro biologické systémy je nejdůležitější vlastností železa, které vytváří v obou oxidačních stavech oktahedrální komplexy se šesti ligandy, schopnost pokrývat velmi široké rozpětí redoxních potenciálů podle charakteru ligandu a geometrie koordinační vazby. Např. redoxní potenciál železa vázaného v železo-sírných proteinech se pohybuje v rozmezí od -600 do $+350$ mV (Williams, 1985), což je ideální rozpětí pro využití v biologických systémech. Železo je součástí aktivních center proteinů přenášejících elektrony, jejichž výsledný redoxní potenciál závisí na složení aminokyselin vazebného místa. Díky tomu mohou organismy změnami ve složení aminokyselin ovlivňovat redoxní potenciál železa tak, aby co nejlépe vyhovoval potřebám specifických biochemických reakcí.

Železo se v přírodních systémech nejčastěji účastní při přenosu kyslíku jako součást proteinů hemoglobinu a myoglobinu, je aktivní součástí bílkovin elektrontransportního řetězce (cytochromy, Fe-S proteiny), účastní se procesů oxidativní fosforylace (mitochondriální cis-akonitáza, sukcinátdehydrogenáza), katalýzy oxidací (oxidázy) a na druhé straně rozkladu toxických derivátů kyslíku (superoxiddismutáza). Železo se rovněž podílí na fixaci dusíku a vodíku (nitrogenázy a hydroxylázy) a na mnoha dalších významných reakcích (Crichton, 1991b). Jednou z nejvýznamnějších reakcí v živých organismem, která je podmíněna účastí železa, je přeměna ribózy na deoxyribózu. Tato reakce, která je nebytná pro replikaci DNA a tedy i pro buněčné dělení, je katalyzovaná enzymem ribonukleotidreduktázou. Aktivita tohoto enzymu je podmiňována přítomností dvou molekul železa vázaného ve formě komplexu Fe-O-Fe. Jedinou výjimkou, která v přírodě nevyžaduje pro aktivitu ribonukleotidreduktázy železo a proto je na tomto kovu nezávislá, jsou některé bakterie, jako např. *Brevibacterium ammoniagenes* využívající mangan (Stubbe, 1990a) nebo *Lactobacillus leichmani* využívající adenosylkobalamin (Stubbe, 1990b).

Vlastnosti železa, které jsou pro organismus velice výhodné, mohou být na druhé straně zdrojem poškození. Interakcí železa s deriváty kyslíku, jako je peroxid nebo superoxid, dochází ke vzniku vysoce reaktivních hydroxylových a ferylových radikálů. Tyto radikály mohou ve tkáních katalyzovat autooxidační procesy vedoucí k porušení buněčných

membrán, degradaci proteinů, mutacím včetně chromozomálních aberací, případně k buněčné smrti. Klasickým případem je Fentonova reakce, která katalyzuje vznik hydroxylových radikálů (Wooldridge and Williams, 1993):



Hydroxylový radikál může způsobovat peroxidaci lipidů s následným poškozením buněčných membrán a rovněž poškození DNA. Obě reakce mohou mít až letální následky (Minnotti and Aust, 1992; Henle *et al.*, 1996).

Dalším významným aspektem metabolismu železa je rozpustnost tohoto kovu. Železo je rozpustné ve vodných roztocích pouze za anaerobních podmínek ve formě železnatých iontů, které vytvářejí komplexy se šesti molekulami vody $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$. Při fyziologickém pH v přítomnosti kyslíku je železo oxidováno na trojmocné kationty, které se ihned přeměňují na nerozpustný hydroxid železitý a dále na nerozpustné oxohydroxidové polymery. Trojmocné železo je rozpustné pouze za velmi nízkých hodnot pH kolem 1, což za fyziologických podmínek způsobuje praktickou nepřítomnost volného Fe^{3+} v biologických systémech (Crichton, 1991a). Organismy žijící v aerobním prostředí musí tedy udržovat železo v solubilní formě vytvářením komplexů se specifickými nízkomolekulárními či vysokomolekulárními ligandy. Naproti tomu právě u anaerobních mikroorganismů je možné zachování evolučně původních mechanismů příjmu železa, tj. získávání volného železa v anaerobní atmosféře (Fenchel and Finlay, 1994).

1.2. Struktura a funkce proteinů účastnících se metabolismu železa

1.2.1. Transferiny

Jako transferiny je označována skupina glykoproteinů s podobnou strukturou, ale rozdílnou lokalizací v těle. Pro všechny transferiny je společné, že buňkám železo buď poskytují, nebo naopak vazbou tohoto prvku brání buňkám v jeho příjmu. Mezi transferiny patří serotransferin (označovaný také jako transferin *s.s.*), který je přítomen zejména v séru, laktoferin (též laktotransferin), který je přítomen v mléce a dalších sekretech, ovotransferin (též conalbumin) z vaječného bílku a melanotransferin, který je lokalizován na plazmatické membráně melanocytů (Harris and Aisen, 1989). Transferin je tvořen jediným polypeptidovým řetězcem o relativní molekulové hmotnosti kolem 80 kDa (Aisen and Leibman, 1978). Polypeptidický řetězec vytváří dvě homologní domény s podobnou strukturní konformací (tzv. N- a C-terminální laloky), z nichž každá nese po jednom vazebném místě pro trojmocné železo. Obě vazebná místa se liší stabilitou vazby a afinitou k železu v závislosti na pH. Vazba železa na N-terminální doménu má nižší afinitu k železu a je více citlivá na snížení pH než vazba na C-konci (Ponka *et al.*, 1990). Předpokládá se, že dnešní molekula transferinu vznikla duplikací ancestrálního genu kódujícího původně jedinou doménu (Williams, J., 1982; Yang *et al.*, 1984), což nepřímo dokazuje i nález proteinu podobného transferinu o molekulové váze 41 kDa u sumek rodu *Pyura*, který obsahuje pouze jedno vazebné místo pro železo (Martin *et al.*, 1984).

Navázání železa ve vazebném místě zprostředkovávají čtyři aminokyselinové zbytky peptidového řetězce (2× tyrosin, 1× histidin, 1× asparagová kyselina) a uhličitanový nebo hydrogenuhličitanový aniont, který spojuje železo s argininem nebo histidinem (Aisen *et al.*, 1967). Stabilita vazby železa při nízkém pH se liší jak mezi N- a C- lalokem jediného proteinu, tak i mezi jednotlivými typy transferinů. Výrazné rozdíly v citlivosti k nízkému pH mezi jednotlivými typy transferinů determinují jejich rozdílné biologické funkce. Serotransferin uvolňuje železo již při snížení pH na hodnotu okolo 5,5. To umožňuje disociaci Fe^{3+} v kyselých endosomech buněk, což je krok nezbytný pro transport železa mezi tkáněmi. Vazba železa na lidský laktoferin je zhruba 300× pevnější (Aisen and Leibman, 1972) a k uvolnění železa dochází teprve při pH 2, eventuelně při pH 3-4 v

přítomnosti chelátorů (Mazurier and Spik, 1980). Laktoferin proto působí spíše při obraně proti mikrobiálním infekcím jako silný chelátor.

Serotrtransferin

Serotrtransferin je univerzálním přenašečem železa mezi tkáněmi v těle obratlovců, který byl v různých množstvích detekován téměř ve všech orgánech (Mason and Taylor, 1978). Ačkoliv železo vázané na tento glykoprotein představuje méně než 0,1 % (3 mg) celkového množství železa v těle, dynamicky je to nejdůležitější složka s nejvyšší hladinou obratu, která denně přenese až 30 mg železa (Bothwell *et al.*, 1979).

Transferin byl nalezen u všech studovaných obratlovců a je přítomen i u některých bezobratlých (Aisen, 1994). Tento protein je obsažen zejména v krevním séru, lymfě, cerebrospinálním moku, mléce a dalších sekretech. Transferin plní dvě hlavní funkce spojené s transportem železa. Přenáší železo absorbované enterocyty z potravy do jater, kde je ukládáno a dopravuje tento kov po těle k buňkám ostatních tkání. Transferin je tedy schopen podle typu buněčné tkáně železo buňkám předávat i odebírat.

Mechanismy, pomocí kterých transferin buňkám odjímá železo, byly doposud nejlépe prostudovány u intestinální linie Caco-2. Bylo prokázáno, že na bazolaterální membráně těchto buněk jsou přítomny receptory, které vážou přednostně apotrtransferin, který nemá navázané železo (Nunez *et al.*, 1996). Apotrtransferin je poté endocytován a transportován v endosomech do apikální části buňky (Nunez *et al.*, 1997), která odpovídá membránám enterocytů obráceným k lumenu střeva, kde probíhá absorpce železa. Zde pravděpodobně dochází k vazbě železa na apotrtransferin. Poté je železo intracelulárně transportováno do bazálních partií buňky, kde je transferin s navázaným železem na bazolaterální membráně exocytován a dostává se tak do krevního oběhu, kde železo předává ostatním buňkám (Nunez and Tapia, 1999).

Doposud bylo popsáno několik mechanismů, pomocí kterých buňky železo z transferinu získávají. Je to především vysoce specifická endocytóza zprostředkovaná receptory, adsorpční endocytóza transferinu, endocytóza kapalné fáze, eventuálně uvolnění železa z transferinu bez účasti endocytózy aktivitou membránové oxidoreduktázy.

Receptory zprostředkovaná endocytóza transferinu umožňuje příjem železa buňkám většiny tkání (Kühn *et al.*, 1984; Kühn *et al.*, 1990). Transferin, který obsahuje dvě molekuly železa (holotrtransferin) je při extracelulárním pH 7,4 vázán s vysokou afinitou

na specifický membránový receptor. Savčí receptor pro transferin je exprimován na povrchu proliferujících buněk, buněk syntetizujících hemoglobin a na povrchu diferencujících se buněk (Kühn *et al.*, 1990). Izolace a analýza tohoto receptoru ukázala, že se jedná o dimer složený ze dvou identicky glykosylovaných a stejně velkých podjednotek o velikosti 90 kDa spojených disulfidickými můstky. Obě podjednotky obsahují cytoplazmatickou doménu, hydrofobní transmembránovou oblast a extracelulární doménu. Extracelulární doména je odštěpitelná trypsinem od cytoplazmatické membrány. Molekula je posttranslačně upravována kovalentním navázáním kyseliny palmitové (Schneider *et al.*, 1984; Jing *et al.*, 1990). Disociační konstanta vazby Fe₂-transferin-receptor je značně variabilní podle typu buňky ($K_d \cong 10^{-9}$ - 10^{-7} M). Také množství receptorů exprimovaných na povrchu buňky se mění v závislosti na druhu buňky, jejím stavu diferenciaci a dostupnosti železa v prostředí (Richardson and Ponka, 1997).

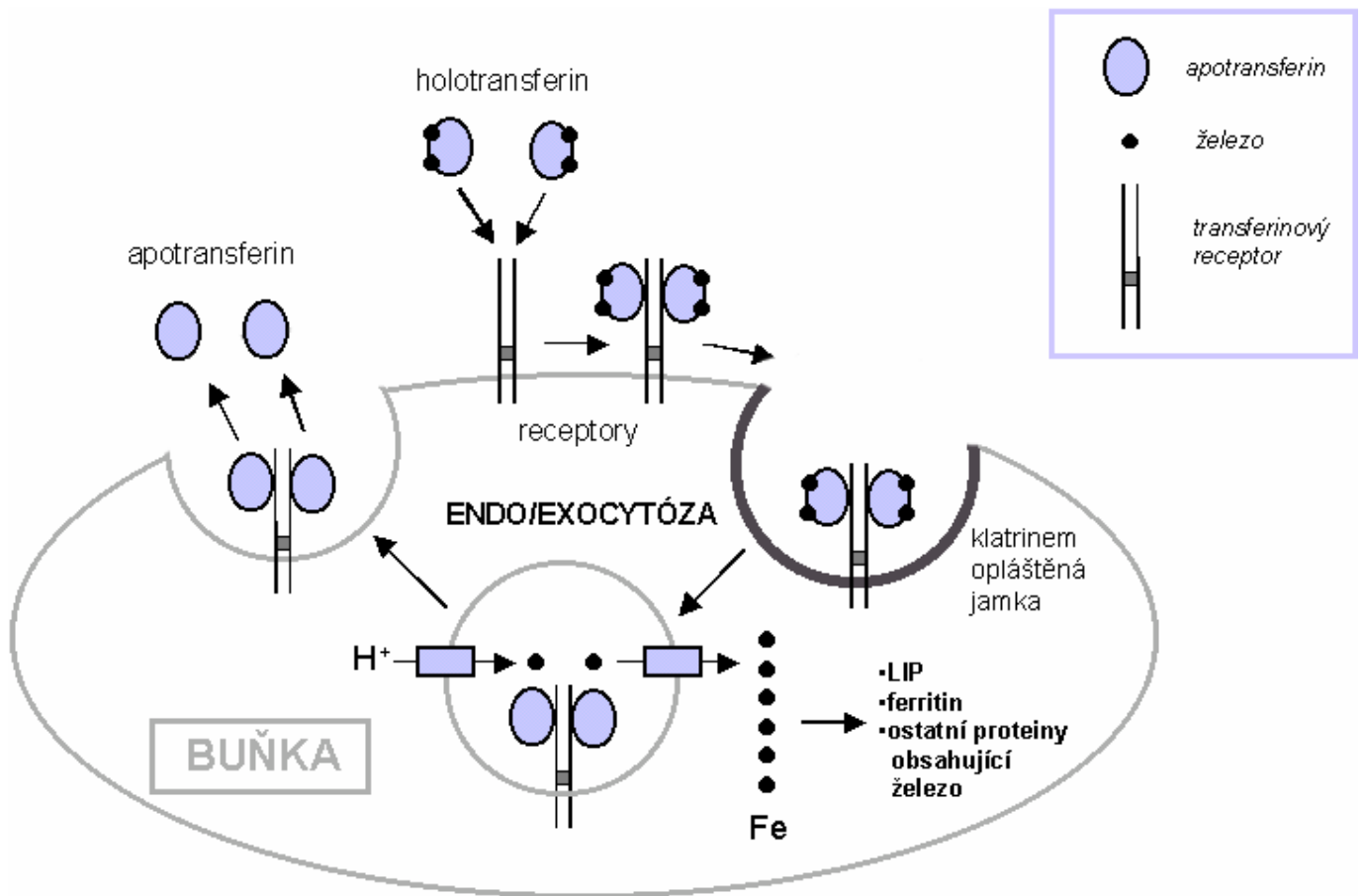
Komplex receptoru s navázaným transferinem je na vnitřní části membrány asociován s klatrinem, následně dochází k akumulaci receptoru s navázaným transferinem v jamkách opláštěných klatrinem a vzniku endosomu. V endosomech dochází působením ATP-závislé H⁺-pumpy ke snížení pH na hodnotu asi 5,5. Za těchto podmínek se železo uvolňuje z transferinu, zatímco apotransferin zůstává připojen k receptoru. Apotransferin je poté recyklován tím, že je uvolněn ve vnějším prostředí při neutrálním pH, kdy je jeho afinita k receptoru v porovnání s holotransferinem výrazně nižší (Obr. 1). V případě hepatocytů je receptor recyklován zhruba 100× (Aisen, 1984).

Kawabata a kol. (1999) později objevili homolog transferinového receptoru označený jako TfR2, který se v lidských buňkách vyskytuje ve dvou typech a to jako membránová forma TfR2-alfa a typ TfR2-beta, který transmembránovou oblast postrádá. Schopnost vázat transferin a stimulovat růst buněk v prostředí s nízkou koncentrací železa však byla prokázána pouze u transmembránové formy (Kawabata *et al.*, 2000). Vazba transferinu na receptor TfR2-alfa má ve srovnání s klasickým transferinovým receptorem (TfR) výrazně nižší afinitu a to zhruba 25× (Kawabata *et al.*, 2000; West *et al.*, 2000) a je sporné, zda vůbec tento receptor slouží k přijímání transferinu *in vivo* (Kawabata *et al.*, 2000). Další rozdíl mezi TfR2 a TfR spočívá v tkáňové specifitě exprese. Zatímco TfR2 je přednostně exprimován v dospělých hepatocytech, exprese TfR je v těchto buňkách relativně nízká. Exprese TfR2 v průběhu vývoje hepatocytů totiž stoupá, zatímco v

případě TfR klesá. Naproti tomu během diferenciaci erytrocytů se exprese TfR2 snižuje, zatímco exprese TfR narůstá (Kawabata *et al.*, 2001).

Méně specifické, na transferinových receptorech nezávislé mechanismy získávání železa založené na adsorptivní endocytóze transferinu nebo prosté endocytóze kapalné fáze byly pozorovány zejména u hepatocytů a některých linií neoplastických buněk. (Page *et al.*, 1984). Bylo prokázáno, že nespecifická vazba transferinu není saturovatelná a má výrazně nižší afinitu v porovnání s vazbou na specifické receptory. Proto se uplatňuje patrně až při vyšších koncentracích transferinu (Trinder *et al.*, 1996).

Alternativním procesem umožňujícím buňkám získávat železo nezávisle na endocytóze je podle některých autorů redukce trojmocného železa vázaného na transferin působením membránové oxidoreduktázy (Sun *et al.*, 1987a; Sun *et al.*, 1987b). Redukované dvojmocné ionty mohou snadněji procházet přes cytoplazmatickou membránu a vstupovat tak do buňky. Redukce Fe^{3+} je patrně spojena s transmembránovým přenosem elektronů z cytoplazmatického NADH na komplex Fe^{3+} -transferin (Fry, 1989). Přítomnost aktivity redukující transferinové železo však byla zpochybňována jinými autory (Thorstensen and Aisen, 1990).



Obr.1. Receptory zprostředkovaná endocytóza transferinu. Endocytóza transferinu je zahájena vazbou tohoto proteinu na specifický receptor. Následně dochází k akumulaci receptoru s navázaným transferinem v jamkách opláštěných klatrinem a vzniku endosomu. V endosomech zajišťuje ATP-závislá protonová pumpa snížení pH na hodnotu okolo 5,5. Za těchto podmínek se železo uvolňuje z transferinu, zatímco apotransferin zůstává k receptoru připojen. Železo je poté transportováno po buňce do kompartmentů, kde je využíváno. Komplex receptor-apotransferin je recyklován zpět na povrch buňky, kde při neutrálním pH disociuje apotransferin od receptoru.

Laktoferin

Laktoferin je glykoprotein přítomný ve většině sekretů endokrinních žláz a v sekundárních granulích neutrofilních granulocytů (Sánchez *et al.*, 1992). Laktoferin je obsažen v lidském a kravském mléku, nebyl však detekován v mléku krysy, králíků a psů (Masson and Heremans, 1971). V krvi a v místech zánětlivých reakcí jsou hlavním zdrojem laktoferinu neutrofilní granulocyty. Ačkoliv se laktoferin z mléka a z neutrofilů liší strukturálním složením glykanů, vazebná schopnost pro železo je u obou typů identická.

Laktoferin plní mnoho různých funkcí jako je:

(1) zajišťování obrany organismu proti mikrobiálním infekcím. Za normálních podmínek je laktoferin v tělních sekretech saturován železem pouze z 10% a je tak schopen odebírat patogenům zbytky volného železa (Finkelstein *et al.*, 1983). Antimikrobiální aktivita laktoferinu je kromě schopnosti odstraňovat železo z prostředí spojena s vazbou na buněčné povrchy patogenů. Bylo pozorováno, že tento protein porušuje vnější membránu gramnegativních bakterií a zvyšuje tak její permeabilitu (Naidu *et al.*, 1990; Visca *et al.*, 1990). Laktoferin vázaný na povrchu buněk také patrně blokuje místa, která jsou nezbytná pro transport železa nebo jiných důležitých látek (Arnold *et al.*, 1982).

Při zánětu je laktoferin uvolňován ze stimulovaných neutrofilních granulocytů. V této formě je schopen odejímat železo z transferinu. Komplex laktoferinu s železem je poté vylučován buňkami retikuloendoteliálního systému prostřednictvím specifických receptorů a železo je ukládáno do feritinu. Soubor těchto procesů vede k hyposiderémii (snížení hladiny železa v séru), která je podstatou antimikrobiálního účinku a vede k inhibici růstu a dělení buněk patogena (Van Snick *et al.*, 1974).

- (2) inhibice tvorby volných radikálů
 - (3) regulace absorpce železa a buněčného růstu
 - (4) inhibice agregace krevních destiček
 - (5) ovlivňování metabolismu lipidů
 - (6) ovlivňování imunitního systému
- (Spik and Montreuil, 1983; Sánchez *et al.*, 1992).

Vzhledem k uvedenému širokému spektru funkcí není překvapivé, že laktoferin interaguje s různými liniemi buněk jako jsou hepatocyty (Sitaram and McAbee, 1997), epiteliální buňky (Hu *et al.*, 1990; Rochard *et al.*, 1992), B- a T- lymfocyty (Zimecki *et al.*, 1991), makrofágy a monocyty (Mogulievski *et al.*, 1987), buňky krevních destiček (Leveugle *et al.*, 1993) a mikroorganismy (Spik and Montreuil, 1983; Naidu *et al.*, 1990; Visca *et al.*, 1990). Tyto vazby jsou tkáňově a pravděpodobně i druhově specifické a jsou založeny na interakci různých povrchových proteinů a proteoglykanů s různými doménami laktoferinu (Rochard *et al.*, 1989; Spik *et al.*, 1994). Na celkové vazbě laktoferinu se u jednoho typu buněk může podílet i více typů interakcí. Např. u buněk jaterního parenchymu přispívá N-koncová sekvence laktoferinu k primárnímu zachycení proteinu na povrch hepatocytů pomocí nízkoafinitní vazby ($K_d = 10 \mu\text{M}$) na chondroitin-sulfátové proteoglykany (Ziere *et al.*, 1996). Teprve poté dochází k vysokoafinitní vazbě ($K_d = 187 \text{ nM}$) zprostředkované C-koncovou doménou laktoferinu, která je nezbytná pro následnou internalizaci ligandu a jeho intracelulární degradaci v lysosomech (Mogulievski *et al.*, 1987; Sitaram and McAbee, 1997), jež vede k uvolnění navázaného železa.

Melanotransferin

Melanotransferin (antigen p97) je membránově vázaný homolog transferinu, lokalizovaný zejména na povrchu melanocytů (Woodbury *et al.*, 1980; Brown *et al.*, 1982). Melanotransferin je jediný doposud známý transferin, který je vázán na cytoplazmatické membráně, a to pomocí glykosylfosfatidylinositolové kotvy (Alemany *et al.*, 1993; Food *et al.*, 1994). Richardson a Baker (1991) ukázali, že melanotransferin váže na své N-doméně, která je velmi podobná doméně serotransferinu, železo z nízkomolekulárních komplexů. Nepodařilo se však prokázat, že by melanotransferin zprostředkoval další transport železa přes cytoplazmatickou membránu do melanocytů. Později bylo zjištěno, že nedochází ani k regulaci exprese tohoto proteinu v závislosti na hladině železa v buňce (Richardson, 2000). Podle současných názorů stejné pracovní skupiny (Richardson and Ponka, 1997; Sekyere and Richardson, 2000; Richardson, 2000) i jiných laboratoří (Kriegerbecková and Kovář, 2000) je význam melanotransferinu pro celkový příjem železa nádorovými buňkami menší než se původně předpokládalo.

Ovotransferin

Ovotransferin se nachází ve vaječném bílku ptáků, kde slouží zejména jako antimikrobiální agens. Vedle toho plní tento protein funkci zásobárny železa, které může být použito pro syntézu DNA, transport kyslíku nebo elektronů (Weinberg, 1984).

1.2.2. Feritiny

Železo musí být intracelulárně skladováno v takové formě, která zabrání účasti tohoto prvku v reakcích produkujících toxické volné radikály. Zároveň musí být tento kov uchováván v rozpustné formě, která umožňuje jeho rychlou mobilizaci v době potřeby. Nejrozšířenější molekulou skladující železo v buňkách obratlovců i bezobratlých, která splňuje předešlé podmínky, je feritin (Crichton, 1990; Massover, 1993).

Z hlediska struktury lze feritiny rozdělit na dva základní typy: (1) nehemový feritin, který je přítomen u bakterií skupiny *Eubacteria* a většiny eukaryotických buněk včetně člověka a (2) bakterioferitin obsahující hem, který je znám u některých bakterií a hub. Feritin ani obdobný protein sloužící k ukládání železa nebyl doposud nalezen u prvoků s výjimkou *Encephalitozoon cuniculi* (Katinka *et al.*, 2001). Příslušnost tohoto organismu k prvokům je však sporná a novější fylogenetické studie řadí mikrosporidie spíše k houbám (Hirt *et al.*, 1997).

Nehemový feritin byl popsán u řady obratlovců i bezobratlých (Baba *et al.*, 1977; Schussler *et al.*, 1996; Capurro *et al.*, 1996). Živočišný feritin je lokalizován v cytoplazmě, případně může být přítomen v lysosomech, kde je degradován (Richter, 1960). Nedávno byl tento protein detekován také v mitochondriích lidských erytroblastů a dalších buněk (Levi *et al.*, 2001). Cytosolický feritin obratlovců je tvořen ze dvou (H a L) nebo vzácněji ze tří (H, L, a M – heavy, light, and medium) polypeptidových podjednotek s vysoce homologní aminokyselinovou sekvencí, jejichž zastoupení v molekule feritinu se liší podle jeho typu (Massover, 1993). Kompletní molekula savčího cytosolického apoferitinu má relativní molekulovou hmotnost 450 kDa a je složena z 24 nekovalentně vázaných podjednotek. Má tvar schránky, která je schopna vázat přibližně 4.500 atomů trojmocného železa ve formě ferihydratových parakrystalů. Této chemicky značně komplikované struktury odpovídá vzorec $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$.

Zabudovávání a uvolňování železa do cytosolického feritinu se účastní šest symetrických kanálů procházejících napříč schránkou. Při zabudovávání je železo transportováno do molekuly feritinu ve formě rozpustných dvojmocných kationtů Fe^{2+} . Uvnitř molekuly Fe^{2+} asociuje s vnitřním povrchem podjednotek, kde je feroxidázovou aktivitou oxidováno na Fe^{3+} a koordinačně vázáno na ligandy přítomné na vnitřním povrchu feritinové schránky. Tím je zahájena inkorporace železa do parakrystalického jádra, která je ukončena tvorbou ferihydrítových krystalů (Crichton, 1990). Mechanismy uvolňování železa z cytosolického feritinu *in vivo* nejsou příliš prostudovány. V pokusech *in vitro* bylo pozorováno uvolňování a mobilizace železa z feritinu pomocí různých chelátorů (Ponka, 1994).

Expresce cytosolického feritinu je u obratlovců regulována intracelulární hladinou železa a je koordinována s expresí receptoru pro transferin (viz. kapitola 1.5).

Mitochondriální feritin je homopolymer složený pouze z podjednotek H (Levi *et al.*, 2001). Tyto podjednotky jsou syntetizovány v cytoplazmě ve formě prekurzorů o relativní molekulové hmotnosti 30 kDa a následně transportovány pomocí signální sekvence do mitochondrií, kde je tato sekvence odštěpena. Podjednotky o relativní molekulové hmotnosti 22 kDa se v mitochondriích skládají do klasických schránek, které mají feroxidázovou aktivitu (Levi *et al.*, 2001). Bylo prokázáno, že mitochondriální feritin exprimovaný v transfekovaných lidských HeLa buňkách je schopen inkorporovat železo. Pro tuto inkorporaci je nezbytná právě feroxidázová aktivita proteinu (Corsi *et al.*, 2002).

Pro strukturu bakterioferitinu je charakteristická vazba hemu typu b (Frolow *et al.*, 1994). Geny pro bakterioferitin byly nalezeny u řady bakterií jako např. *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium avium*, *Helicobacter pylori*, *Bacillus subtilis*, *Treponema pallidum* a mnoha dalších (Andrews *et al.*, 1991; Inglis *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 1995). Bakterioferitin patrně hraje, obdobně jako feritin, důležitou roli při intracelulárním ukládání železa. Jaká je však jeho specifická funkce u některých bakterií, kde je přítomen bakterioferitin i feritin (např. *E. coli*), však není známo (Quail *et al.*, 1996).

Při patologických stavech, které jsou doprovázeny přetížením organismu železem, je přebytečné železo skladováno v degradativním produktu feritinu nazývaném hemosiderin. Množství tohoto zásobního proteinu se může za patologických podmínek zvýšit až 100×, zatímco množství feritinu může stoupnout maximálně 5-10×. Hemosiderin je lokalizován v nepravidelných elektrondenzních shlucích nazvaných siderosomy. Tyto membránové

váčky vznikají enormním zvětšením nebo propojením lysosomů a vykazují křížovou reaktivitu s protilátkami proti feritinu. Molekula hemosiderinu částečně obklopuje elektrondenzní jádro, které pravděpodobně obsahuje agregáty polymerních hydroxidů železa. Ve srovnání s feritinem je molekula hemosiderinu výrazně menší (Wixom *et al.*, 1980).

1.2.3. Hemoproteiny

Jako hemoproteiny je označována skupina proteinů, v nichž je železo vázáno v hemu (feroproporfyriu IX). Železo je v této molekule ukotveno pomocí čtyř koordinačně kovalentních vazeb s atomy dusíku pyrolových heterocyklů a jednou až dvěma vazbami zprostředkovanými proteinovou částí molekuly. Inkorporaci železa do hemu zprostředkovává enzym ferochelatáza (Jones and Jones, 1969), zatímco uvolnění tohoto prvku, pro které je nezbytné rozštěpení tetrapyrolového kruhu, je katalyzováno hemoxygenázou (Maines *et al.*, 1986; Trakshel *et al.*, 1986).

Hemoproteiny plní tři základní funkce. Slouží jako: (1) přenašeče kyslíku (hemoglobin, myoglobin), (2) enzymy (peroxidázy, oxidázy) a (3) přenašeče elektronů (cytochromy) (Williams, 1985).

Nejhojněji se vyskytujícím hemoproteinem vázajícím železo v lidském těle a zároveň univerzálně rozšířeným přenašečem kyslíku je hemoglobin. Tento protein váže stejně jako svalový myoglobin dvojmocné železo, které umožňuje přenos molekulárního kyslíku. U dospělých obratlovců je přítomen jako tetramerní protein složený ze čtyř polypeptidických globinových řetězců, zatímco u bezobratlých jsou známy jeho monomerní formy.

K vytvoření funkční molekuly hemoglobinu je nezbytný dostatečný přísun železa. Během vývoje krvinek proto odpovídá počet receptorů pro transferin, ze kterého je železo pro tvorbu hemoglobinu získáváno, požadavkům pro biosyntézu hemoglobinu. Maximální počet receptorů (800.000) je exprimován na povrchu proliferujících erytroblastů (Iacopetta *et al.*, 1982; Iacopetta and Morgan, 1983). U retikulocytů, které se již po transformaci z erytroblastů nedělí, avšak stále aktivně syntetizují hemoglobin, dochází ke snížení exprese transferinových receptorů na 100.000. Na povrchu zralých erytrocytů, které již hemoglobin neprodukují, receptory pro transferin přítomné nejsou. Exprese transferinových receptorů je zřejmě regulována pomocí dvou odlišných mechanismů. V počáteční fázi vývoje se projevuje regulace na úrovni transkripce, která je nezávislá na

hladině intracelulárního železa (Chan and Gerhardt, 1992). Teprve v pozdějších fázích vývoje po nastartování biosyntetických reakcí je exprese transferinových receptorů řízena hladinou intracelulárního železa. Kromě transferinového železa může být k tvorbě hemu využíváno i netransferinové železo vázané v nízkomolekulárních komplexech (Egyed, 1988; Fuchs *et al.*, 1988; Morgan, 1988).

Speciální roli v metabolismu železa hraje duodenální cytochrom b (Dcytb). Tento membránový protein, příbuzný cytochromu b_{561} , byl poprvé nalezen na apikální membráně buněk duodenální sliznice myši, kde plní funkci ferrireduktázy a usnadňuje tak absorpci železa (McKie *et al.*, 2001). Homologní protein označený jako cytochrom b(588) byl identifikován také na apikální membráně králičích enterocytů (Knopfel and Solioz, 2002). Později bylo prokázáno, že je Dcytb exprimován i v buňkách ostatních tkáních (McKie *et al.*, 2002). Experimenty, v nichž byla myším podávána strava s různým obsahem železa dále ukázaly, že hladina exprese reduktázy je regulována dostupností železa v trávicím traktu (Dupic *et al.*, 2002).

1.2.4. Fe-S proteiny

Železo-sírné proteiny obsahují ve své molekule prostetickou skupinu složenou ze železa a síry – tzv. Fe-S centrum. Fe-S struktury mohou mít v proteinech odlišnou stechiometrii, nejčastější je skupina typu 2Fe-2S nebo 4Fe-4S (Frazzon and Dean, 2001). Fe-S proteiny hrají roli v mnoha metabolických drahách, jako např. v Krebsově cyklu (mitochondriální akonitáza, sukcinát dehydrogenáza), při reparaci DNA (endonukleáza III) nebo se podobně jako cytochromy účastní elektrontransportního řetězce (NADH-CoQ reduktáza) (Crichton, 1991b). Fe-S protein IRP-1 reguluje expresi transferinového receptoru, feritinu a dalších molekul a tím zásadně ovlivňuje metabolismus železa (viz. kapitola 1.5).

Fe-S proteiny hrají klíčovou roli v metabolismu anaerobních mikrorganismů. Energetický metabolismus anaerobních prvoků (trichomonády, giardie, *Entamoeba histolytica*) je závislý na aktivitě minimálně dvou Fe-S proteinů: pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy a ferredoxinu (Müller, 1992).

Tvorba Fe-S center je v buňkách zprostředkována několika různými systémy. Hlavní roli hraje komplexní mechanismus nazývaný ISC (*iron-sulfur cluster assembly*), na němž se podílí minimálně sedm proteinů (IscR, IscS, IscU, IscA, HscB, HscA a ferredoxin). Tyto

proteiny jsou u *E. coli* a *Azotobacter vinelandii* kódovány v operonu *iscRSUA-hscBA-fdx-ORF3* (Zheng *et al.*, 1998; Tokumoto *et al.*, 2002). ISC systém byl prokázán také u řady dalších organismů, jako např. u zástupců rodů *Caenorhabditis*, *Drosophila*, *Homo*, *Mus*, *Saccharomyces* (Tachezy *et al.*, 2001).

Nejlépe prostudovanou složkou účastnící se tvorby Fe-S center je pyridoxal-5'-fosfát – dependentní cysteindesulfuráza, která katalyzuje přeměnu L-cysteinu na L-alanin a síru. Tato cysteindesulfurázová aktivita byla nejprve popsána u proteinu NifS v buňkách *A. vinelandii* (Zheng *et al.*, 1993), kde poskytuje síru pro tvorbu Fe-S center nitrogenázy (Zheng and Dean, 1994). Později byl u *A. vinelandii* objeven homolog IscS, který dodává síru potřebnou pro tvorbu Fe-S center různých železo-sírných proteinů u *A. vinelandii* i u dalších organismů (Zheng *et al.*, 1998). Důležitost proteinu IscS pro metabolismus železa byla prokázána také u kvasinek, kde mutace homologního genu *Nfs1* způsobuje snížení aktivit mitochondriálních železo-sírných proteinů akonitázy a sukcinátdehydrogenázy (Strain *et al.*, 1998), pokles příjmu železa buňkami kvasinek a snížení distribuce železa v mitochondriích (Li *et al.*, 1999).

Dalším krokem při syntéze Fe-S center zprostředkovaným ISC mechanismem je přenos síry z proteinu IscS na IscU. Tento proces je založen na přímé interakci obou proteinů (Urbina *et al.*, 2001), která je zprostředkována disulfidickým můstkem (Kato *et al.*, 2002). Terciární struktura proteinu IscU naznačuje, že tato molekula funguje jako “lešení” pro syntézu Fe-S centra (Agar *et al.*, 2000). Na homodimerické molekule IscU tak v přítomnosti železnatých iontů, L-cysteinu, katalytického množství proteinu IscS a dalších složek ISC systému dochází k syntéze jednoho 2Fe-2S centra (Yuvaniyama *et al.*, 2000). Dále bylo prokázáno, že je protein IscU schopen přenášet vytvořené Fe-S centrum na finální akceptory této skupiny, jako je např. feredoxin (Nishio and Nakai, 2000) a funguje tedy jako mediátor přenášení Fe-S center.

Studium funkce feredoxinu při tvorbě Fe-S center v buňkách kvasinek ukázalo, že tento protein je v procesu tvorby Fe-S center zodpovědný za redukci meziproductů. Tento krok je pro biosyntézu center nezbytný (Lange *et al.*, 2000). Vypnutí genu pro feredoxin vede u kvasinek ke ztrátě aktivity Fe-S proteinů a k akumulaci železa v buňce (Rodriguez-Manzaneque *et al.*, 2002).

Za hlavní funkci proteinu IscA bylo původně považováno předávání železnatých a sulfidových iontů feredoxinu (Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2001). Práce Krebse a kol. (2001) však naznačuje, že IscA plní spíše funkci lešení podobně jako je tomu v případě IscU. Nezbytnost proteinu typu IscA pro metabolismus železa byla ověřena v

kvasinkovém modelu. Mutace v genech *Isa1* a *Isa2*, kódujících proteiny homologní se savcím *IscA*, totiž vede k defektům v maturaci mitochondriálních i cytosolických Fe-S proteinů a k akumulaci železa v mitochondriích (Kaut *et al.*, 2000; Jensen and Culotta, 2000).

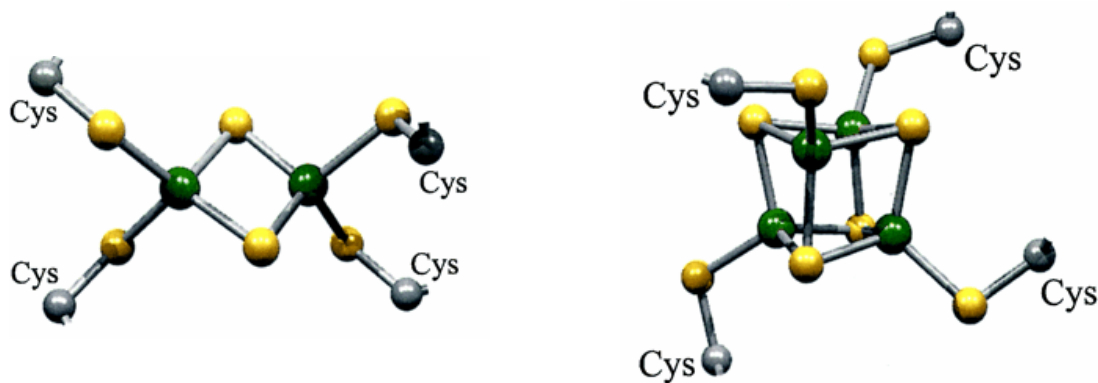
Geny *hscA* a *hscB* kódují chaperony *Hsc66* a *Hsc20* o relativní molekulové hmotnosti 66 kDa a 20 kDa. Protein *Hsc66* je příbuzný eukaryotickým chaperonům typu *hsp70*, zatímco *Hsc20* náleží do skupiny typu *hsp40* (Vickery *et al.*, 1997). Chaperon *Hsc20* je zodpovědný za vazbu substrátu a následný přenos na *Hsc66*, který plní vlastní ochrannou funkci (Cupp-Vickery and Vickery, 2000). Předpokládá se, že oba proteiny při tvorbě Fe-S center nově vytvořená centra stabilizují nebo přenášejí (Hoff *et al.*, 2000; Silberg *et al.*, 2001).

Expres jednotlivých složek ISC systému je regulována proteinem *IscR*. Aminokyselinová sekvence tohoto proteinu je velmi podobná rodině transkripčních faktorů *MarA/SoxS/Rob*. V práci Schwartze a kol. (2001) bylo prokázáno, že *IscR* funguje jako represor operonu *iscRSUA*. Při této regulaci se uplatňuje vlastní 2Fe-2S centrum *IscR* proteinu (Schwartz *et al.*, 2001).

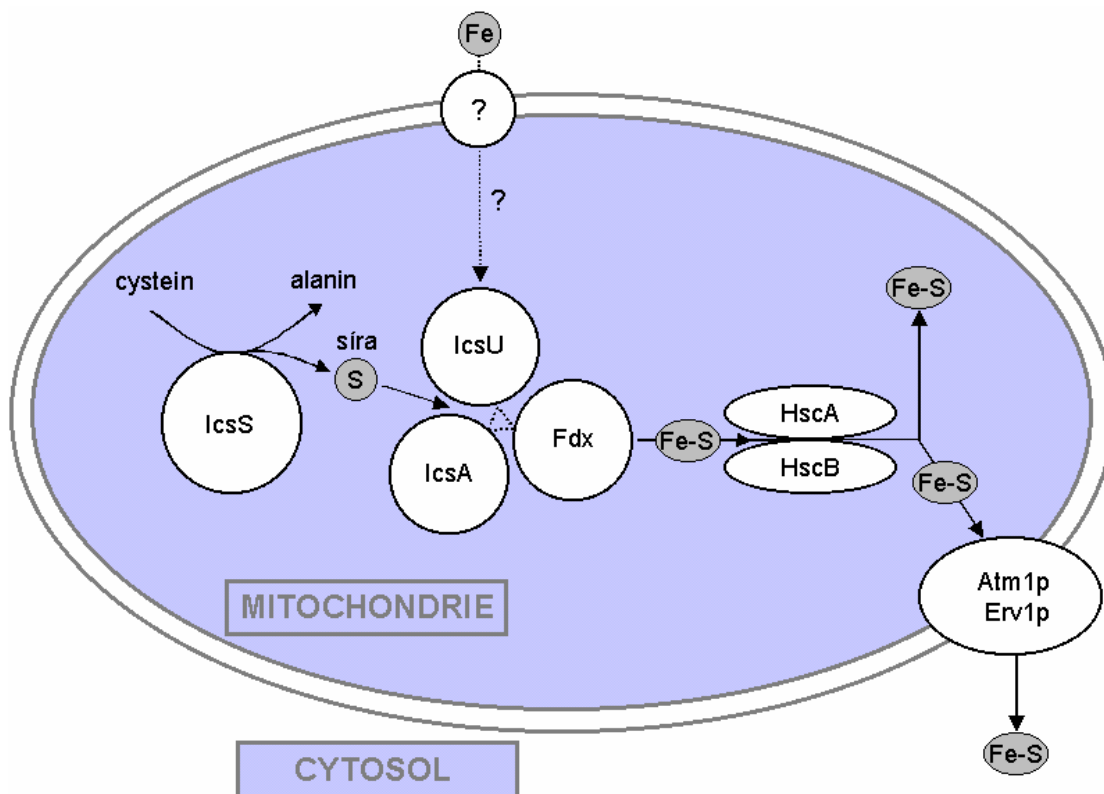
U eukaryotických buněk je biosyntéza Fe-S center kompartmentalizována. Land a Rouault (1998) ukázali, že v lidských buňkách dochází v případě cysteindesulfurázy k translaci za použití jednoho transkriptu a několika alternativních startovacích kodónů. Jednotlivé formy proteinů o různé délce jsou pak lokalizovány v odlišných kompartmentech (mitochondrie, cytosol, jádro). V případě proteinu *IscU* dochází k alternativnímu sestřihu příslušné pre-mRNA (Tong and Rouault, 2000). To vede k tvorbě dvou různých produktů (*IscU1* a *IscU2*), které se liší terminální sekvencí zodpovědnou za nasměrování proteinů do cytosolu (*IscU1*) nebo do mitochondrií a jádra (*IscU2*). Autoři navíc prokázali lokalizaci proteinů *IscU* a *IscS* v cytoplazmě i v mitochondriích. Naproti tomu u myši (Nakai *et al.*, 1998) a kvasinek (Strain *et al.*, 1998) je *IscS* lokalizován pouze v mitochondrii. Export prekurzorů Fe-S center syntetizovaných v mitochondriích do cytoplazmy v tomto případě zprostředkovává ABC transportér (u kvasinek nazvaný *Atm1p*) přítomný na vnitřní membráně mitochondrií (Kispal *et al.*, 1999). Pro maturaci cytosolických Fe-S bílkovin je rovněž nezbytný protein *Erv1p* (Lisowski, 1992). Homology tohoto kvasinkového proteinu jsou přítomné prakticky u všech eukaryotických buněk, zatímco u bakterií nebyly popsány (Polimeno *et al.*, 1999). Lidský homolog *Erv1p*, který nese název ALR (“augmenter of liver regeneration”, hepatopoinetin) funguje také jako extracelulární hepatotrofický růstový faktor (Hagiya *et al.*, 1994). *Erv1p* byl původně

funkčně spojován s biogenezí mitochondrií a regulací buněčného cyklu kvasinek (Lisowsky, 1994). Později bylo prokázáno, že se jedná o FAD-závislou sulfhydrylázu (Lee *et al.*, 2000) přítomnou v mezimembránovém prostoru mitochondrií, která díky schopnosti katalyzovat tvorbu disulfidických můstků podporuje i buněčný metabolismus Fe-S center (Lange *et al.*, 2001). Vzhledem k lokalizaci Erv1p je velmi pravděpodobné, že tento protein zprostředkovává přenos prekurzorů přes membránu mitochondrií na ABC transportér (Lange *et al.*, 2001).

Další mechanismus tvorby Fe-S center, který je nezávislý na ISC systému, je tzv. SUF systém. U *E.coli* jsou jednotlivé složky tohoto systému kódované geny ležícími na operonu *sufABCDSE*. Vzhledem k tomu, že homology genu *sufC* byly nalezeny také u dalších bakterií a v plastidech mnoha rostlin, jedná se patrně o široce rozšířený mechanismus (Takahashi and Tokumoto, 2002).



Obr.2. Příklady Fe-S center. Struktura 2Fe-2S centra (*vlevo*) a 4Fe-4S centra (*vpravo*). Atomy uhlíku cysteinyly jsou vyobrazeny šedě, atomy síry žlutě a atomy železa zeleně (upraveno podle Frazzon and Dean, 2001).



Obr.3. Syntéza Fe-S center v mitochondriích. Tvorba železo-sírných center v mitochondriích je zprostředkována mechanismem ISC (Iron-Sulfur Cluster assembly), na němž se podílí minimálně sedm proteinů (IscR, IcsS, IcsU, IcsA, HscB, HscA a ferredoxin). Pyridoxal-5'-fosfát – dependentní cysteindesulfuráza IcsS katalyzuje přeměnu L-cysteinu na L-alanin a síru, která slouží jako prekurzor pro tvorbu Fe-S center. V dalším kroku dochází k přenosu síry z proteinu IcsS na IcsU, který funguje jako “lešení” pro syntézu Fe-S centra. Na molekule IcsU dochází v přítomnosti železnatých iontů, které jsou do mitochondrií importovány doposud neznámým způsobem, L-cysteinu, katalytického množství proteinu IcsS a dalších složek k syntéze jednoho 2Fe-2S centra. Protein IcsU následně přenáší vytvořené centrum na ferredoxin (Fdx), který je zodpovědný za redukci meziproductů. Funkci “lešení” při syntéze Fe-S center plní pravděpodobně i protein IcsA. Chaperony HscA (66) a HscB (20) zprostředkovávají stabilizaci a přenos nově vytvořených Fe-S center. HscA je zodpovědný za vazbu substrátu a následný přenos na HscB, který plní vlastní ochrannou funkci. Export prekurzorů Fe-S center syntetizovaných v mitochondriích do cytoplazmy zprostředkovává ABC transportér (Atm1p) přítomný na vnitřní membráně mitochondrií. Pro maturaci cytosolických Fe-S bílkovin je rovněž nezbytná FAD-závislá sulphydryláza lokalizovaná v mezimembránovém prostoru mitochondrií (Erv1p). Tento protein pravděpodobně umožňuje přenos prekurzorů přes membránu mitochondrií na ABC transportér.

1.2.5. Přenašeče importující železo do buněk

Molekuly, které zprostředkovávají membránový přenos iontů železa u eukaryotických buněk, byly vyizolovány a charakterizovány v nedávné době. Gen, který je zodpovědný za transport železa do buněk *Arabidopsis thaliana* byl objeven v roce 1996 (Eide *et al.*, 1996). Gunshinová a kol. (1997) klonovala a identifikovala gen DCT1 (*divalent cation transporter 1*) z krysího duodena. Následná funkční charakterizace produktu tohoto genu vedla ke zjištění, že se jedná o přenašeč obsahující dvanáct transmembránových úseků, který transportuje železnaté, zinečnaté a další divalentní kationty. Ionty kovů jsou tímto proteinem translokovány mechanismem protonového symportu. *In situ* hybridizací bylo zjištěno, že je tento gen exprimován ve většině dalších tkání. Homologní gen ve stejnou dobu identifikoval Fleming a kol. u myši (Fleming *et al.*, 1997) a potkanů (Fleming *et al.*, 1998). Sledovaný gen je mutován u modelových linií myši a potkanů s mikrocytární anémií, která vede k nedostatečné střevní absorpci a následnému deficitu v příjmu železa.

Oba vyizolované geny kódují bílkoviny homologní s proteiny skupiny Nramp (*natural resistance-associated macrophage protein*), které zprostředkovávají přenos dvojmocných kationtů kovů přes membránu lysosomů makrofágů (Nramp1) a jiných buněčných linií (Nramp2). Tyto integrální proteiny se významně podílejí na rezistenci makrofágů vůči intracelulárním patogenům právě tím, že odčerpávají ionty dvojmocných kovů z fagolysosomů a přenášejí je do cytoplazmy makrofágů (Malo *et al.*, 1994; Gruenheid *et al.*, 1995).

Další důležitou funkcí proteinu Nramp2 je účast na přechodu železa z endosomu do buňky (Cannone-Hergaux *et al.*, 1999; Gruenheid *et al.*, 1999). Protein Nramp2 se pravděpodobně vyskytuje v membránovém multiproteinovém komplexu společně s transferinem, transferinovým receptorem a dalšími, blíže nepopsanými molekulami (Vyoral and Petrák, 1998; Gruenheid *et al.*, 1999).

U buněk *S. cerevisiae* byly objeveny 3 proteiny patřící do skupiny Nramp2 proteinů, označované jako Smf1p, Smf2p a Smf3p (Cellier *et al.*, 1995). Chen a kol. (1999) prokázal v experimentech s žabími oocyty, že se proteiny Smf1p a Smf2p účastní metabolismu železa tím, že stimulují nebo přímo zprostředkovávají transport tohoto kovu do buněk.

Pro větší přehlednost začaly být proteiny DCT-1, Nramp2 a ostatní přenašeče železa patřící do rodiny Nramp proteinů (Cellier *et al.*, 1995) označovány společným názvem DMT-1 (*divalent metal ion transporter 1*).

V literatuře je popisováno ještě několik dalších systémů zprostředkovávajících transport železa do buňky, jako je např. mechanismus založený na transmembránovém proteinu SFT (*stimulation of Fe transport*), který přenáší transferinové i netransferinové železo (Gutierrez *et al.*, 1997; Gutierrez *et al.*, 1998). Bylo prokázáno, že exprese tohoto proteinu, který stimuluje vstup dvojmocného i trojmocného železa do experimentálně transfekovaných oocytů, je regulována dostupností železa (Yu *et al.*, 1998). Další popsáný mechanismus je založený na součinnosti střevního mucinu, reduktázy železa, transmembránového integrinu a transportního proteinu mobilferinu (Umbreit *et al.*, 1998). Funkčnost v živých zvířecích modelech však doposud nebyla prokázána ani u jednoho z těchto systémů.

1.2.6. Přenašeče exportující železo z buněk

Molekula zprostředkovávající export železa přes cytoplazmatickou membránu ven z buňky byla identifikována ve stejnou dobu nezávisle ve třech laboratořích. Donovan a kol. (2000) popsal ve žloutkovém vaku ryb transmembránový protein nazvaný ferroportin, který je zodpovědný za přenos železa ze žloutkových zásob do krevního oběhu. Ferroportin byl dále detekován na bazální straně syncytiotrofoblastu placenty člověka, kde umožňuje dodávání železa buňkám embrya, na bazolaterální membráně lidských enterocytů, kde zprostředkovává export železa z buňky do krevního oběhu a v řadě dalších lidských a myších tkání, jako jsou např. játra, ledviny a slezina (Donovan *et al.*, 2000). Exprese ferroportinu v žabích oocytech prokázala, že se skutečně jedná o protein exportující železo vně buněk (Donovan *et al.*, 2000). Později bylo zjištěno, že mutace v genu pro ferroportin *fpn1* je zodpovědná za choroby způsobené poruchami v metabolismu železa, jako je např. dědičná hemochromatóza (Njajou *et al.*, 2001; Devalia *et al.*, 2002).

McKie a kol. (2000) identifikovali protein zprostředkovávající export železa z buněk, nazvaný IREG1 (*iron regulated gene 1*). Tento přenašeč je přítomný na bazolaterální membráně enterocytů a ostatních polarizovaných epiteliálních buněk. Úloha proteinu IREG1 při exportu železa z buněk byla prokázána v experimentech s žabími oocyty, v nichž exprese tohoto proteinu vedla ke zvýšení exkrece železa z buněk (McKie *et al.*,

2000). Yamaji a kol. (2001) popsal u Caco-2 buněk, že zvýšení exprese IREG1 má za následek stimulaci transepiteliálního transportu železa. Exprese IREG1 je regulována dostupností železa. U pacientů s anémií vede nedostatek železa ke zvýšení syntézy mRNA pro IREG1 (Rolfes *et al.*, 2002), zatímco přebytek železa u jedinců trpících dědičnou hemochromatózou nebo zvýšení koncentrace železa v médiu *in vitro* kultivovaných Caco-2 buněk způsobuje snížení hladiny příslušné mRNA (Rolfes *et al.*, 2002; Martini *et al.*, 2002).

Abboud a Hail (2000) popsali gen kódující přenašeč MTP1 (*metal transporter protein 1*). MTP1 byl nalezen u buněk tkání udržujících homeostázi železa, jako např. na bazolaterální membráně enterocytů, v cytoplazmě buněk retikuloendoteliálního systému a v buňkách dělohy. Zvýšení exprese MTP1 ve tkáňových kulturách vede ke snížení hladiny intracelulárního železa. Exprese MTP1 je také regulována dostupností železa. U myších enterocytů a hepatocytů vede nedostatek železa ke zvýšení exprese MTP1 v duodenu, zatímco v játrech dochází ke snížení exprese (Abboud and Haile, 2000). Autoři se dále domnívají, že v případě buněk retikuloendoteliálního systému slouží protein MTP1 k exportu železa z cytoplazmy do ostatních buněčných kompartmentů.

Analýza struktury ferroportinu a proteinů IREG1 a MTP1 prokázala, že se jedná o identické molekuly patřící do rodiny DMT-1 proteinů. Proto se v literatuře pro popis proteinu zodpovědného za export železa z buňky používá souhrnné označení IREG1/ferroportin1/MTP1 (Fleming and Sly, 2001).

1.2.7. Ceruloplasmin a Hephaestin

Ceruloplasmin je monomerní sérová oxidáza o relativní molekulové hmotnosti 132 kDa produkovaná hepatocyty. Tento protein byl objeven v souvislosti s metabolismem mědi, kde funguje jako oxidáza tohoto prvku (Frieden, 1968; Camakaris *et al.*, 1999; Musci *et al.*, 1999). Savčí ceruloplasmin má však také feroxidázovou aktivitu a stimuluje příjem nízkomolekulárního železa u buněčných linií HepG2 a K562 (Mukopadhyay *et al.*, 1998) a u linií gliomových buněk BT325 (Qian *et al.*, 2001). Exprese ceruloplasminu je regulována železem a je zvýšena u buněk udržovaných při nedostatku železa (Mukopadhyay *et al.*, 1998; Mukopadhyay *et al.*, 2000). Je velmi pravděpodobné, že savčí ceruloplasmin interaguje s membránovým přenašečem, který zprostředkovává vstup

železa do buňky stejně jako je tomu v případě kvasinkového homologu ceruloplasminu Fet3 a membránové permeázy Ftr1 u *S. cerevisiae* (viz. kap. 1.3.3).

Ačkoliv bylo prokázáno, že ceruloplasmin stimuluje vstup železa do hepatocytů a některých dalších typů buněk, jeho skutečná úloha v metabolismu železa nebyla zatím zcela objasněna. U některých buněk jako je např. linie střevních buněk Caco-2 nebyla totiž stimulace vstupu železa ceruloplasminem pozorována (Zerounian and Linder, 2002) a autozomálně recesivní aceruloplasminémie se projevuje ukládáním železa v parenchymatických tkáních a anémií (Harris *et al.*, 1999). Studie na myších s vyřazeným genem pro ceruloplasmin ukazují také spíše na úlohu tohoto proteinu v mobilizaci železa z buněk retikuloendoteliálního systému a hepatocytů (Harris *et al.*, 1999).

Později objevený transmembránový homolog ceruloplasminu ze střevních buněk dostal název hephaestin. Gen *heph*, který kóduje tento protein, je mutován u sla-myší (*sex-linked anemia*). Tato mutace se projevuje defektem ve vstřebávání železa do těla. Bylo prokázáno, že se hephaestin neúčastní absorpce železa enterocyty v lumen střeva, ale podílí se na výstupu železa na bazolaterální straně enterocytů a na následném přenosu do krevního oběhu (Vulpe *et al.*, 1999). Gen pro hephaestin byl později izolován také z enterocytů krysy (Frazer *et al.*, 2001) a detekován v lidských enterocytech (Syed *et al.*, 2002). Struktura molekuly hephaestinu naznačuje, že se nejedná přímo o přenašeč železa, ale o faktor, který spolupracuje s přenašečem ferroportin/IREG1/MTP1, s nímž vytváří na bazolaterální membráně enterocytů transportní komplex (Rolfs and Hediger, 2001).

Membránová forma ceruloplasminu byla objevena také v buňkách savčího mozku. V tomto případě se však jedná o produkt alternativního sestřihu, který je k cytoplazmatické membráně ukotven pomocí glykosylfosfatidylinositolové kotvy (Patel *et al.*, 2000).

1.2.8. Protein HFE

V roce 1996 byl identifikován gen, jehož mutace u člověka způsobuje onemocnění nazývané dědičná hemochromatóza (Feder *et al.*, 1996). Hemochromatóza vzniká nadměrným vstřebáváním železa v tenkém střevě, jeho akumulací v různých orgánech (játra, žlázy s vnitřní sekrecí, srdce) a následným poškozením těchto orgánů. Identifikovaný gen, označovaný jako HFE (Feder, *et al.*, 1996), patří do rodiny hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy (MHC I). Transmembránový protein kódovaný tímto genem je, podobně jako bílkoviny komplexu MHC I, asociován s β -2-

mikroglobulinem. U pacientů s hemochromatózou byla objevena mutace C282Y, která brání vzniku disulfidické vazby nezbytné pro asociaci proteinu HFE s β -2-mikroglobulinem (Feder *et al.*, 1997). Ztráta schopnosti asociovat s mikroglobulinem vede k poruchám transportu železa a povrchové exprese proteinu HFE (Waheed *et al.*, 1997). Později byly objeveny ještě další mutace v genu pro HFE, které jsou spojeny s hemochromatózou, jako např. mutace S65C (Mura *et al.*, 1999).

Exprese mRNA pro HFE byla prokázána ve všech lidských tkáních s výjimkou mozku. Protein HFE sám o sobě železo neváže a mechanismus, kterým ovlivňuje metabolismus tohoto kovu, není plně znám. Bylo však zjištěno, že komplex HFE/ β -2-mikroglobulin vytváří na povrchu buněk heterodimer, který váže transferinový receptor TfR1. Zdá se, že tato vazba snižuje afinitu receptoru k transferinu, čímž dochází ke snížení buněčného příjmu železa (Feder, *et al.*, 1998). Další hypotézy předpokládají, že protein HFE přímo blokuje vazbu transferinu k jeho receptoru (Lebron *et al.*, 1998) nebo dochází k inhibici uvolňování železa z komplexu HFE-TfR1-transferin-Fe (Roy *et al.*, 1999). Narozdíl od TfR1 nebyla vazba proteinu HFE na receptor TfR2 prokázána (West *et al.*, 2000).

Kromě membránově vázané formy HFE byla také identifikována jeho solubilní podoba (Jeffrey *et al.*, 1999).

Později bylo prokázáno, že kromě klasické hemochromatózy typu 1, která je způsobená mutací v genu HFE, existují ještě další typy této choroby, za které nesou odpovědnost jiné proteiny: hemochromatóza typu 2 (juvenilní hemochromatóza) způsobená mutací v neznámém genu na chromozómu 1q (Roetto *et al.*, 1999), typ 3 v důsledku mutace TfR2 (Camaschella *et al.*, 2000) a typ 4 způsobený mutací v IREG1/ferroportin1/MTP1 (Njajou *et al.*, 2001; Devalia *et al.*, 2002)

1.2.9. Frataxin

Frataxin je mitochondriální protein, který byl původně objeven v souvislosti s Friedrichovou ataxií, chorobou projevující se progresivní nepohyblivostí všech čtyř končetin (Harding, 1981). Jedná se o dědičnou neurodegenerativní a kardiodegenerativní chorobu způsobenou sníženou hladinou frataxinu. Tento defekt je zaviněn mutací genu pro frataxin ve formě vkládání repetice tripletu GAA (Campuzano *et al.*, 1996). Postižený jedinec sice produkuje protein o správné délce, v důsledku repetice však dochází ke snížení úrovně transkripce (Sakamoto *et al.*, 1999) a následnému snížení exprese frataxinu

(Campuzano *et al.*, 1997). Lidský frataxin je protein o relativní molekulové hmotnosti 18 kDa, přítomný v mitochondriální matrix (Campuzano *et al.*, 1997). Většina poznatků týkajících se buněčné funkce frataxinu však byla získána v experimentech s kvasinkovým homologem frataxinu Yfh1p. Bylo prokázáno, že Yfh1p udržuje buněčnou homeostázi železa zejména tím, že zprostředkovává export železa z mitochondrií a tak předchází oxidativnímu poškození těchto organel (Radisky *et al.*, 1999). Mutace v genu kódujícím tento protein vede k akumulaci železa v mitochondriích (Radisky *et al.*, 1999) a k následné zvýšené citlivosti k oxidativnímu stresu, která způsobuje patologické projevy choroby (Wong *et al.*, 1999), ale také k poruchám respirace, které vedou ke snížení hladiny ATP v buňce (Wilson and Roof, 1997) a k inaktivaci Fe-S proteinů (Rotig *et al.*, 1997) v důsledku poruchy tvorby Fe-S center (Mühlenhoff *et al.*, 2002). Ke zvýšení oxidativního stresu přispívá kromě akumulace železa v mitochondriích také stimulace buněčného příjmu železa vlivem snížené hladiny tohoto kovu v cytosolu (Babcock *et al.*, 1997; Radisky *et al.*, 1999). Naopak vložení zdravého genu do postižených buněk má za následek přesun akumulovaného mitochondriálního železa zpět do cytoplazmy (Radisky *et al.*, 1999).

Další z funkcí, kterou frataxin plní, je vazba, ukládání a udržování železa v dostupné formě v mitochondriích. Adamec a kol. (2000) prokázali schopnost frataxinu vytvářet multimer, který váže železo. Rekombinantní protein vytváří komplex o relativní molekulové hmotnosti přibližně 1.1 Mda, který váže více než 3.000 atomů železa. Vysokomolekulární komplexy frataxinu o relativní molekulové hmotnosti větší než 600 kDa byly detekovány také přímo v mitochondriích (Adamec *et al.*, 2000). Gakh a kol. (2002) pomocí různých metod (nedenaturující PAGE, interferenční a absorbační měření při sedimentační rovnováze) potvrdili, že v přítomnosti železnatých iontů skutečně dochází k agregaci molekul rekombinantního frataxinu do multimerů o relativní molekulové hmotnosti 840 Kda, které jsou složeny ze 48 frataxinových podjednotek. Autoři dále prokázali, že v každém komplexu je uloženo přibližně 2.400 atomů železa. Železo je ve frataxinové schránce pravděpodobně udržováno v oxidované formě, jak naznačuje feroxidázová aktivita frataxinového multimeru (Park *et al.*, 2002).

Úloha frataxinu při skladování mitochondriálního železa byla potvrzena i při krystalografických studiích. Negativně nabitý povrch proteinu má totiž vlastnosti velmi podobné povrchu feritinu, který zprostředkovává ukládání železa v cytoplazmě. Povrch frataxinu tak poskytuje možnost interakce typu podjednotka-podjednotka a protein-železo (Dhe-Paganon *et al.*, 2000). Údaje o vazebných vlastnostech lidského frataxinu však

nebyly potvrzeny Adinolfim a kol. (2002), který prokázal schopnost vázat železo pouze u proteinů Yfh1p z kvasinek a CyaY z *E. coli*. Úplné potvrzení schopnosti frataxinu ukládat železo bude tedy ještě vyžadovat další experimenty.

1.2.10. Heparin

Heparin je peptid, který byl poprvé popsán a izolován z ultrafiltrátu lidské krve (Krause *et al.*, 2000) a lidské moči (Park *et al.*, 2001). Jedná se o molekulu bohatou na cystein, která patří do skupiny antimikrobiálních peptidů přítomných u mnoha živočichů a rostlin. U člověka je tato látka syntetizována zejména v játrech, a to v několika formách, z nichž nejčastější jsou Heparin20 a Heparin25 (Park *et al.*, 2001). Bylo prokázáno, že příslušná mRNA má zvýšenou expresi v játrech myši s experimentálně vyvolaným i spontánním přetížením železem (Pigeon *et al.*, 2001). Zablokování exprese heparinu u myši má navíc za následek akumulaci železa v játrech a dalších parenchymatických tkáních (Nicolas *et al.*, 2001), zatímco zvýšení exprese tohoto peptidu vede k mikrocytární anémii a dalším projevům nedostatku železa (Nicolas *et al.*, 2002). Dále bylo prokázáno, že heparin působí jako negativní regulátor střevní absorpce železa (Anderson *et al.*, 2002). Naproti tomu u myši s indukovaným zvýšením absorpce železa ve střevě dochází ke snížení hladiny exprese heparinu v játrech (Frazer *et al.*, 2002).

Heparin je lokalizován v buněčném jádře, kam je transportován pomocí signální sekvence (Pigeon *et al.*, 2001), hlavní roli pro celkový metabolismus železa však hraje cirkulace tohoto peptidu v krevním oběhu. Zdá se, že cirkulující heparin je klíčovou molekulou, která zprostředkovává komunikaci mezi střevem, kde dochází k absorpci železa a játry, kde je tento kov ukládán a udržuje tak homeostázi železa (Fleming and Sly, 2002). Snížení poptávky po železe v játrech vede ke zvýšení sekrece heparinu v tomto orgánu. Heparin následně putuje krevním oběhem k enterocytům, kde interaguje s povrchovým komplexem HFE-TfR1 a tím redukuje buněčný příjem železa (Fleming and Sly, 2002).

Gen pro heparin je také mutován u pacientů, kteří trpí dědičnou hemochromatózou, jež není způsobena mutací v HFE genu (Majore *et al.*, 2002). Heparin je tedy další molekulou, která je pravděpodobně za hemochromatózu zodpovědná.

1.2.11. Ostatní proteiny vázající železo

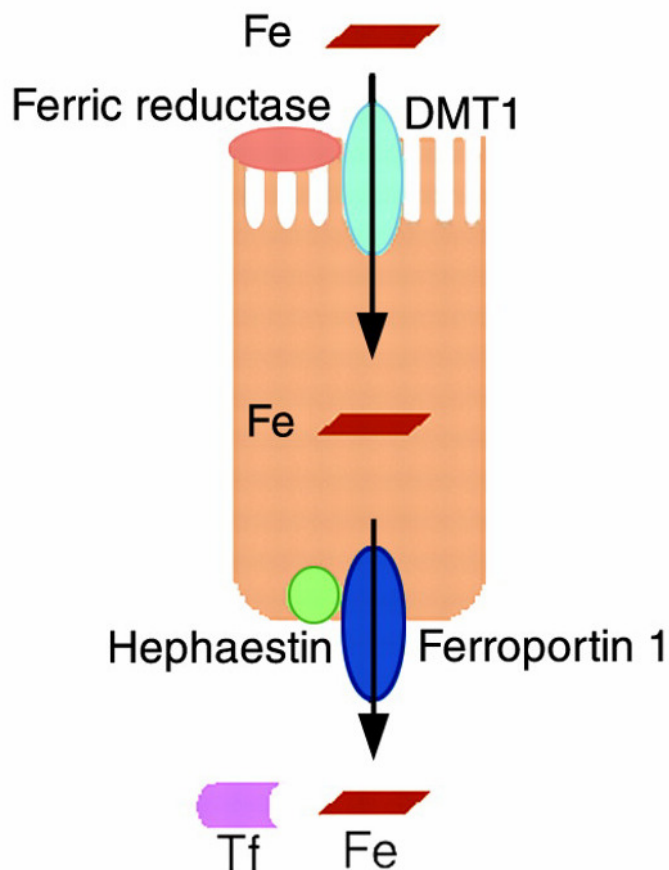
Výše zmíněné skupiny proteinů (kap.1.2.1 – 1.2.10) jsou v současné době považovány za klíčové pro metabolismus železa. V živých systémech se však metabolismu tohoto kovu účastní mnoho dalších molekul (odhaduje se, že zhruba jedna třetina z 100.000 genů člověka kóduje metaloproteiny). Části z těchto proteinů (např. ferrireduktázy) bude v této práci pro lepší přehlednost věnována pozornost v pozdějších kapitolách, které se jejich funkce bezprostředně týkají. Podrobné zahrnutí některých dalších molekul jako např. proteinů vázajících železo ve skupině Fe-O-Fe by však bylo nad rámec této práce.

1.3. Železo vázané v nízkomolekulárních komplexech

1.3.1. Nízkomolekulární železo v gastrointestinálním traktu

Za normálních fyziologických podmínek se v těle obratlovců vyskytuje železo v nízkomolekulárním stavu pouze v trávicím traktu. Nízkomolekulární železo je ve formě různých sloučenin součástí jak živočišné, tak i rostlinné potravy. Jedná se o solubilní formu ve vakuolách rostlinných buněk nebo o nerozpustnou formu v podobě kontaminace oxidy a hydroxidy železa (Skikne and Baynes, 1994; Hazell, 1985). Nízkomolekulární železo je solubilizováno v prostředí žaludku, kde dojde k narušení stability vazeb mezi železem a jeho ligandy působením žaludečních šťáv o nízkém pH a následně ke změně distribuce železa vůči jeho ligandům. K další změně v rozpustnosti a distribuci železa dochází patrně i po neutralizaci tráveniny sekretem pankreatu v duodenu. Co je tedy ve skutečnosti ligandy železa v okamžiku před jeho vstupem do enterocyty není známo. Dle Conrada a Umbreita (1993) se solubilizované železo váže v žaludku na mucin, který udržuje železo v rozpustné formě i po vstupu do duodena.

K rozpustnosti železa rovněž přispívá jeho redukce na dvojmocné ionty. Na tomto procesu se podílí např. kys. askorbová. Vstřebávání nehemového železa je stimulováno také dalšími organickými kyselinami a žlučí (Sanyal *et al.*, 1991). Pro příjem železa u střevních buněk je nezbytná redukce působením povrchových reduktáz jako je např. protein Dcytb. Redukované železo je následně transportováno přes apikální membránu enterocytů pomocí přenašeče DMT-1 a reexportováno přes bazolaterální membránu pomocí proteinu IREG1/ferroportin1/MTP1. Následná oxidace aktivitou hephaestinu umožňuje navázání železa na transferin, který zprostředkovává další přenos po těle (Obr.4). Podrobnější popis vlastností proteinů Dcytb, DMT-1, IREG1/ferroportin1/MTP1 a hephaestinu je podán v kapitolách 1.2.3, 1.2.5 – 1.2.7.



Obr. 4. Model vstřebávání železa v trávicím traktu. Nehemové nízkomolekulární železo (*Fe*) z potravy je nejprve na apikální straně enterocytů redukováno povrchovými reduktázami (*Ferric reductase*) a transportováno do buňky pomocí přenašeče DMT1. Přijaté železo může být v buňce skladováno nebo transportováno přes bazolaterální membránu přenašečem IREG1/ferroportin1/MTP1 (*Ferroportin 1*). Následná oxidace aktivitou hephaestinu umožňuje navázání železa na transferin (*Tf*) a další přenos po těle (upraveno podle Fleming and Sly, 2001).

1.3.2. Nízkomolekulární železo v tělních tekutinách

Hladina nízkomolekulárního železa v tělních tekutinách je při fyziologickém stavu velmi nízká. Většina sérového železa je vázána na transferin, který je saturován zhruba ze 30 procent. V lidském séru je celková hladina železa asi 15-30 μM , z toho však pouze kolem 3 procent není vázáno na transferin (Batey *et al.*, 1980). Hladina nízkomolekulárního železa v tělních tekutinách je tedy obvykle nižší než 10^{-18} M (Bullen, 1981). Význam nízkomolekulárního železa se však může zvýšit při patofyziologických stavech souvisejících s poruchami metabolismu tohoto kovu. Při přetížení organismu železem může transferin dosáhnout plné saturace, což vede ke zvýšení hladiny nízkomolekulárního, tzv. netransferinového železa (non-transferrin-bound iron, NTBI) až na koncentraci 5-15 μM (Batey *et al.*, 1980; Hershko and Peto, 1987; Gutteridge *et al.*, 1985). Tento jev byl poprvé sledován u pacientů s přetížením železem vzniklých v důsledku četných transfúzí (Hershko *et al.*, 1978). Metabolismus nízkomolekulárního železa hraje důležitou roli také u pacientů s dědičnou hemochromatózou, u nichž hladina železa v séru vzrůstá až na hodnotu 13 μM (Batey *et al.*, 1980) a u jedinců trpících hypotransferinemií nebo atransferinemií (Saito, 1975; Hayashi *et al.*, 1993). K lokálnímu zvýšení hladiny nízkomolekulárního železa dochází patrně i v místech poranění, kde probíhá destrukce buněk a uvolňuje se intracelulární železo (Olanmi *et al.*, 1994).

Složení nízkomolekulárních komplexů železa v tělních tekutinách nebylo dosud uspokojivě objasněno. Původně byl za potenciální nízkomolekulární ligand železa označen citrát (Grootveld *et al.*, 1989). Koncentrace citrátu v séru je však relativně nízká v porovnání s jinými molekulami schopnými vytvářet *in vitro* komplexy se železem, jako jsou např. aminokyseliny, cukry, organické kyseliny askorbát, pyruvát a laktát (Sarkar, 1970). Proto bude vyžadovat objasnění chemické podstaty ligandů železa ještě další experimentální důkazy.

1.3.3. Buněčný příjem nízkomolekulárního železa

Mechanismus, pomocí kterého přijímají buňky nízkomolekulární železo, lze obecně charakterizovat v následujících bodech: (1) transport železa přes cytoplazmatickou membránu obvykle vyžaduje redukci na dvojmocný kationt, který má větší schopnost

prostupovat membránou (2) přenos Fe^{2+} je zprostředkován membránovými přenašeči nebo kanály, (3) příjem nízkomolekulárního železa je nezávislý na endocytóze, (4) transportní mechanismus obvykle vyžaduje přítomnost vápenatých iontů, (5) transport Fe^{2+} je inhibován ionty některých přechodných kovů jako např. Cd^{2+} , (6) kapacita transportu roste při zvýšené extracelulární koncentraci nízkomolekulárního železa (da Silva *et al.*, 1996).

U savčích buněk byla ferrireduktázová aktivita redukující železo na dvojmocný kationt poprvé detekována na modelech střevní absorpce (Han *et al.*, 1995; Riedel *et al.*, 1995). Později bylo prokázáno, že je za tuto reduktázovou aktivitu zodpovědný duodenální cytochrom b – Dcytb (viz. kap. 1.2.3). Následný transmembránový přenos iontů železa do eukaryotických buněk je zprostředkován zejména přenašeči typu DMT-1 (viz. kap. 1.2.5).

Mechanismus získávání železa z nízkomolekulárních komplexů byl podrobně prostudován také u kvasinek *S. cerevisiae* a *S. pombe*. Prvním krokem při získávání železa z nízkomolekulárních komplexů u těchto organismů je redukce povrchovými ferrireduktázami, kódovanými geny *Fre1* (Dancis *et al.*, 1990) a *Fre2* (Georgatsou and Alexandraki, 1994). Dvojmocné ionty železa jsou poté transportovány pomocí dvou odlišných systémů, které se liší svou afinitou a specifitou k tomuto kovu. Jsou to: (1) méně specifický nízkoafinitní systém zprostředkovaný proteinovým přenašečem *Fet4*, který transportuje kromě železnatých iontů rovněž ionty dalších kovů (kobalt, kadmium apod.) (Dix *et al.*, 1997) a (2) vysokoafinitní systém specifický pouze pro železo, který je tvořen feroxidázou *Fet3* u *S. cerevisiae* (Askwith *et al.*, 1994) a *Fio1* u *S. pombe* (Askwith and Kaplan, 1997) a transmembránovou permeázou *Ftr1* (Askwith and Kaplan, 1997). Navázané dvojmocné železo je nejprve reoxidováno aktivitou feroxidázy na trojmocný kationt a poté permeázou transportováno do cytoplazmy (Askwith and Kaplan, 1997).

1.4. Intracelulární transport železa

Velmi málo prostudovanou oblastí metabolismu železa je intracelulární transport tohoto kovu. Železo, které je přenášeno z vnějšího okolí přes cytoplazmatickou membránu nebo membránu endosomů, musí být dopraveno do cytoplazmy, mitochondrií a ostatních cílových organel, kde je zabudováno do feritinu, hemu a dalších funkčních center (Morgan *et al.*, 1986; Sibille, *et al.*, 1986). Většina hypotéz a modelů popisujících mechanismus intracelulárního transportu železa předpokládá přítomnost slabě vázané „mobilní“ složky železa v buňkách, která je v literatuře také označována jako „free-“, „chelatable-“, „transit-“, „intermediate-“ nebo „labile-“ iron pool. Dále se předpokládá, že hladina této formy železa reguluje expresi proteinů, které se účastní metabolismu železa (viz. kap. 1.5.) a má vliv na řadu enzymatických aktivit (Jacobs, 1977; Haile *et al.*, 1992; Vaňáčková *et al.*, 2001). Poprvé byla tato složka železa v buňce popsána jako část buněčného železa, které zůstávalo zachyceno na kolonách při gelových filtracích buněčných lyzátů a frakcí (Jacobs, 1977). Labilní složka železa může být také definována jako frakce buněčného železa přístupná pro chelataci běžnými chelátory. Ty nejsou schopny efektivně kompetovat o železo obsažené v pevných komplexech např. feritinu, transferinů nebo hemoproteinů, ale pouze o kov vázaný slabší vazbou. Přes dlouholeté snahy však chemická podstata intracelulárního mobilního železa nebyla objasněna. Mnoho autorů předpokládalo vazbu železa na nízkomolekulární ligandy jako jsou aminokyseliny, kyselina askorbová, kyselina citronová, cukry a fosforylované cukerné deriváty, ATP a jiné nukleotidy a polyfosfáty (Saltman, 1965; Jacobs, 1977; Pollack *et al.*, 1985; Weaver and Pollack, 1989; Weaver *et al.*, 1989; Böhnke *et al.*, 1995). Přímý důkaz o fyziologické funkci těchto ligandů v buňkách však dosud nebyl předložen. Základním metodickým problémem je slabá vazba železa na hledané ligandy, která je často předstížena silnou chelatační aktivitou pufrů používaných v experimentech jako je např. Tris nebo fosfátové pufrы (Richardson and Ponka, 1997). Další potenciální molekuly, které by se mohly podílet na transportu intracelulárního železa, jsou nízkomolekulární proteiny a polypeptidy. Protein o relativní molekulové hmotnosti 5 kDa, který by se mohl podílet na transportu železa u retikulocytů, objevili Workman a Bates (1974). Garrick a kol. (1993) a Adams a kol. (1989) identifikovali další nízkomolekulární proteiny o relativní molekulové hmotnosti 8-13 kDa vázající železo v cytoplazmě králičích erytrocytů a transportující tento kov k

mitochondriím. Ostatní autoři (Blackburn and Morgan, 1977) však tyto výsledky nepotvrdili. Protein o relativní molekulové hmotnosti větší než 20 kDa, který váže železo v cytoplazmě buněčné linie K562, identifikoval Vyoral a kol.(1992). Inkubace buněk s transferinem prokázala přechodnou asociaci železa s tímto proteinem před inkorporací do feritinu. Výzkum ve stejné laboratoři také prokázal, že v buňkách linie K562 nelze nalézt nízkomolekulární komplex železo-ligand o relativní molekulové hmotnosti nižší než 5 kDa (Vyoral and Petrák, 1998).

Richardson a kol. (1996) navrhli zcela nový model intracelulárního transportu železa, který obchází obecně zažitou představu o přítomnosti intracelulárního mobilního železa. Železo, které je uvolněno v endosomech, je podle jejich hypotézy přenášeno do mitochondrií přímým kontaktem mezi buněčnými organelami. Tento model, nazvaný „the kiss and run hypothesis“, byl podpořen experimenty s inhibitorem motility endosomů wortmanninem, které prokázaly snížení inkorporace železa do mitochondrií v přítomnosti inhibitoru (Zhang and Ponka, 1997). Interakce mezi endosomy obsahujícími transferin a mitochondriemi byla navíc pozorována již dříve pomocí elektronové mikroskopie (Isobe *et al.*, 1981).

1.5. Regulace vstupu železa do buňky a jeho ukládání

Nedostatek stejně jako nadbytek železa může mít pro buňku letální následky. Tyto okolnosti vedly organismy ke tvorbě účinného mechanismu regulace vstupu železa do buňky a jeho bezpečného ukládání. Mechanismy, které se účastní této regulace, fungují na základě monitorování intracelulární koncentrace železa. Celý proces se odehrává na posttranskripční úrovni a je v literatuře velmi dobře popsán (Richardson and Ponka, 1997; Theil, 1998).

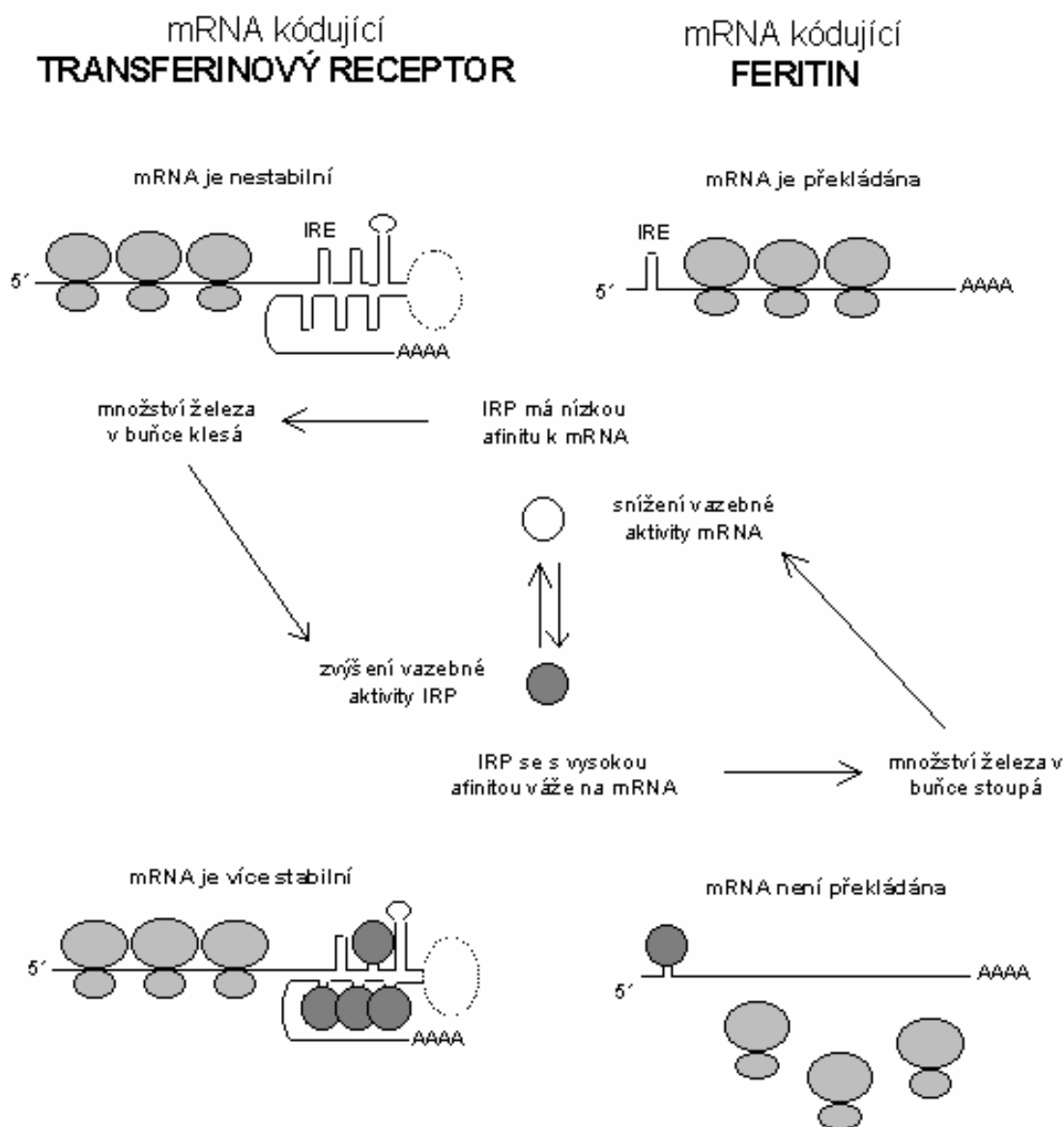
Princip hlavního regulačního mechanismu je založen na sestavování a rozkladu Fe-S centra regulačního proteinu označovaného jako IRP-1 (*iron regulatory protein 1*) a na degradaci homologního proteinu IRP-2 (Rouault *et al.*, 1988; Sameniengo *et al.*, 1994). Proteiny IRP-1 a IRP-2 interagují se sekvenčně specifickými vlásenkovými oblastmi mRNA, označovanými jako IRE (*iron responsive element*). Tyto sekvence jsou přítomny v jedné kopii v 5' nepřekládané oblasti mRNA pro feritin a v pěti kopiích v 3' nepřekládané oblasti mRNA kódující transferinový receptor TfR (Hentze *et al.*, 1987; Haile *et al.*, 1992; Obr. 5). Při nedostatku železa dochází k vazbě IRP na IRE, přičemž vazba na 5'IRE zabraňuje připojení malé ribosomální podjednotky k mRNA feritinu. To vede ke snížení syntézy tohoto proteinu a následnému snížení ukládání železa v buňce. Naproti tomu vazba na 3'IRE stabilizuje mRNA pro transferinový receptor a tím způsobuje zvýšení jeho exprese a následně i zvýšení příjmu železa buňkou. Při nárůstu hladiny železa v buňce dochází naopak k inhibici vazby IRP na mRNA, zvýšení syntézy feritinu a snížení exprese transferinového receptoru (Haile *et al.*, 1992; Obr. 5). Studium struktury regulačních proteinů ukázalo, že IRP-1 je protein identický s akonitázou, enzymem Krebsova cyklu, jehož funkce je také regulována hladinou železa v cytoplazmě. Při zvýšené hladině železa má tento protein sestavenou krychlovou skupinu 4Fe-4S, která zprostředkovává jeho akonitázovou aktivitu. Při nedostatku železa naopak 4Fe-4S centrum nevznikne nebo je rozloženo a protein není enzymaticky aktivní. Získává však vysokou vazebnou schopnost vůči IRE (Rouault *et al.*, 1991).

Sekvence IRE ani další složky výše popisovaného regulačního mechanismu nebyly pozorovány u transferinového receptoru TfR2, jehož exprese není regulována dostupností železa (Fleming *et al.*, 2000).

Pomocí mechanismu založeného na interakci IRP-IRE je regulována úroveň exprese řady dalších proteinů účastnících se metabolismu železa, jako je např. δ -aminolevulinát syntáza, klíčový enzym pro syntézu hemu. Jeho IRE jsou lokalizovány podobně jako u feritinu v 5' nepřekládané oblasti mRNA a exprese tohoto proteinu je tedy nedostatkem železa suprimována (Cox *et al.*, 1991). U mRNA pro protein DMT-1 byla v 3' nepřekládané oblasti objevena IRE sekvence (Gunshin *et al.*, 1997). Alternativní sestřih a zpracování 3' nepřekládaného konce však vede ke tvorbě dvou forem mRNA kódujících DMT-1: (1) formu nesoucí IRE oblast a (2) formu, která tuto regulační oblast postrádá (Lee *et al.*, 1998). Zdá se, že regulace exprese DMT-1 v závislosti na dostupnosti železa hraje důležitou roli zejména ve střevě. Regulace syntézy formy mRNA nesoucí IRE byla pozorována u duodenálních buněk (Cannone-Hergaux *et al.*, 1999), zatímco u ostatních buněk sledována nebyla (Wardrop and Richardson, 1999; Gunshin *et al.*, 2001). Přítomnost regulační oblasti IRE byla prokázána také v 5' nepřekládané oblasti mRNA kódující transporter IREG1/ferroportin1/MTP1 (McKie *et al.*, 2000; Abboud and Haile, 2000). Použití obdobného regulačního mechanismu podporuje i zjištění, že nedostatek železa vede ke zvýšení exprese mRNA kódující IREG1/ferroportin1/MTP1, zatímco přebytek železa způsobuje snížení hladiny této mRNA (Rolfs *et al.*, 2002).

Později objevený regulační protein IRP-2 (Samaniengo *et al.*, 1994) má stejnou vazebnou aktivitu pro mRNA jako IRP-1. Tato aktivita však není regulována na úrovni sestavování a rozkládání Fe-S centra, ale železem indukovanou proteolýzou proteinu. IRP-2 obsahuje vloženou sekvenci 73 aminokyselin, která je označována jako „iron degradation dependent domain“. Tato sekvence zprostředkovává při zvýšené hladině železa nasměrování IRP-2 do proteasomu, kde dochází k následné degradaci proteinu (Iwai *et al.*, 1995).

Z předešlých údajů je zřejmé, že regulační protein IRP funguje v celkovém metabolismu buňky jako faktor, který vytváří spojení mezi železem, erytropoézou a mitochondriálním energetickým metabolismem (Menotti *et al.*, 1998).



Obr.5. Regulace exprese transferinového receptoru a feritinu v závislosti na množství železa v buňce. Při nedostatku železa v buňce se protein IRP váže na regulační oblast mRNA nazývanou IRE. Tato vazba zabraňuje připojení ribosomu k mRNA feritinu a vede ke snížení syntézy tohoto proteinu a následnému snížení ukládání železa v buňce. Naproti tomu vazba IRP stabilizuje mRNA pro transferinový receptor a způsobuje tak zvýšení exprese tohoto receptoru a následné zvýšení buněčného příjmu železa. Při zvýšení hladiny železa v buňce dochází naopak ke snížení vazby IRP na IRE a následnému zvýšení syntézy feritinu a snížení exprese transferinového receptoru (upraveno podle Kühn *et al.*, 1990).

1.6. Mechanismy uplatňující se u patogenních mikroorganismů při získávání železa od hostitele

Patogenní mikroorganismy získávají železo od hostitele nejčastěji pomocí dvou strategií: (1) produkují nízkomolekulární látky s vysokou afinitou a specifitou k trojmocnému železu nazývané siderofory, které umožňují odnímat tento kov z hostitelských molekul obsahujících nehemové železo a (2) exprimují specifické povrchové receptory pro molekuly vázající železo v těle hostitele. Povrchové receptory umožňují získávat železo přímo z proteinů a dalších molekul produkovaných hostitelem, jako je hem a proteiny obsahující hemové železo (hemoglobin, hemopexin, haptoglobin) nebo proteiny vázající nehemové železo (transferin, laktoferin). Siderofory jsou produkovány aerobními bakteriemi, fakultativně anaerobními bakteriemi a houbami, nejsou však syntetizovány striktně anaerobními bakteriemi, bakteriemi žijícími intracelulárně a prvoky (Weinberg, 1995a). Specifické receptory naproti tomu hrají důležitou roli při získávání železa především u organismů neschopných syntetizovat siderofory.

Kromě výše zmíněných nejrozšířenějších strategií vyvinuly mikroorganismy řadu dalších mechanismů, které se uplatňují při získávání hostitelova železa. Je to např. získávání nízkomolekulárního železa (viz. kap. 1.6.4 a 1.7) nebo využití buněčného železa v případě intracelulárních parazitů (viz. kap. 1.6.5 a 1.7). Buňky *Tritrichomonas foetus* extracelulárně uvolňují železo z vazebných míst transferinu tím, že snižují pH okolního prostředí. Trojmocné železo je poté redukováno, transportováno do buňky a metabolicky zpracováno (Tachezy *et al.*, 1998). *Legionella pneumophila* proteolyticky degraduje transferin metaloproteázou, kterou produkuje do svého prostředí. To vede k uvolnění železa z transferinu a následnému transportu kovu do buňky (Brian *et al.*, 1997). Buňky *E. coli* jsou schopny získávat železo vázané na citrát pomocí specifického mechanismu, který je obdobný jako systémy umožňující příjem železa pomocí sideroforů (Crosa, 1997).

1.6.1. Siderofory

Řada bakterií a hub vylučuje do svého prostředí nízkomolekulární chelátory (relativní molekulová hmotnost 500-1000 Da), které jsou specifické pro trojmocné železo

(Lankford, 1973; Neilands, 1981; Neilands, 1995). Tyto látky, označované jako siderofory, mají extrémně vysokou afinitu k Fe^{3+} (stabilizační konstanty komplexů Fe^{3+} -siderofor leží v rozmezí 10^{25} - 10^{52}) a mohou tak odebírat železo z transportních proteinů obratlovců (Weinberg, 1974).

Podle chemické struktury jsou siderofory děleny do dvou hlavních skupin: (1) katecholáty a (2) hydroxamáty (Neilands, 1995; Obr. 6).

Bakterie syntetizují desítky hydroxamátových sideroforů, jako je např. aerobaktin (*Aerobacter aerogenes*, *Escherichia coli*), pseudobaktin (r. *Pseudomonas*), mykobaktin (r. *Mycobacterium*) a schizokinein (r. *Bacillus*), a podobný počet katecholátových sideroforů, z nichž nejrozšířenější je enterobaktin (*Escherichia coli* a další enterobakterie), agrobaktin (*Agrobacterium tumefaciens*), vibriobaktin (*Vibrio cholerae*), parabaktin (*Paracoccus denitrificans*), anguibaktin (*Vibrio anguillarum*) a pyochelin produkovaný bakteriemi rodu *Pseudomonas* (Crosa, 1989; Weinberg, 1995a).

Houby syntetizují pouze hydroxamátové siderofory, jako např. desferioxamin (aktinomycéty), rhodotorulová kyselina (kvasinky rodu *Rhodotorula* a *Rhodosporidium*), koprogen (r. *Neurospora*) nebo ferichrom popsáný u rodu *Penicillium* a *Ustilago* (Crosa, 1989; Weinberg, 1995a).

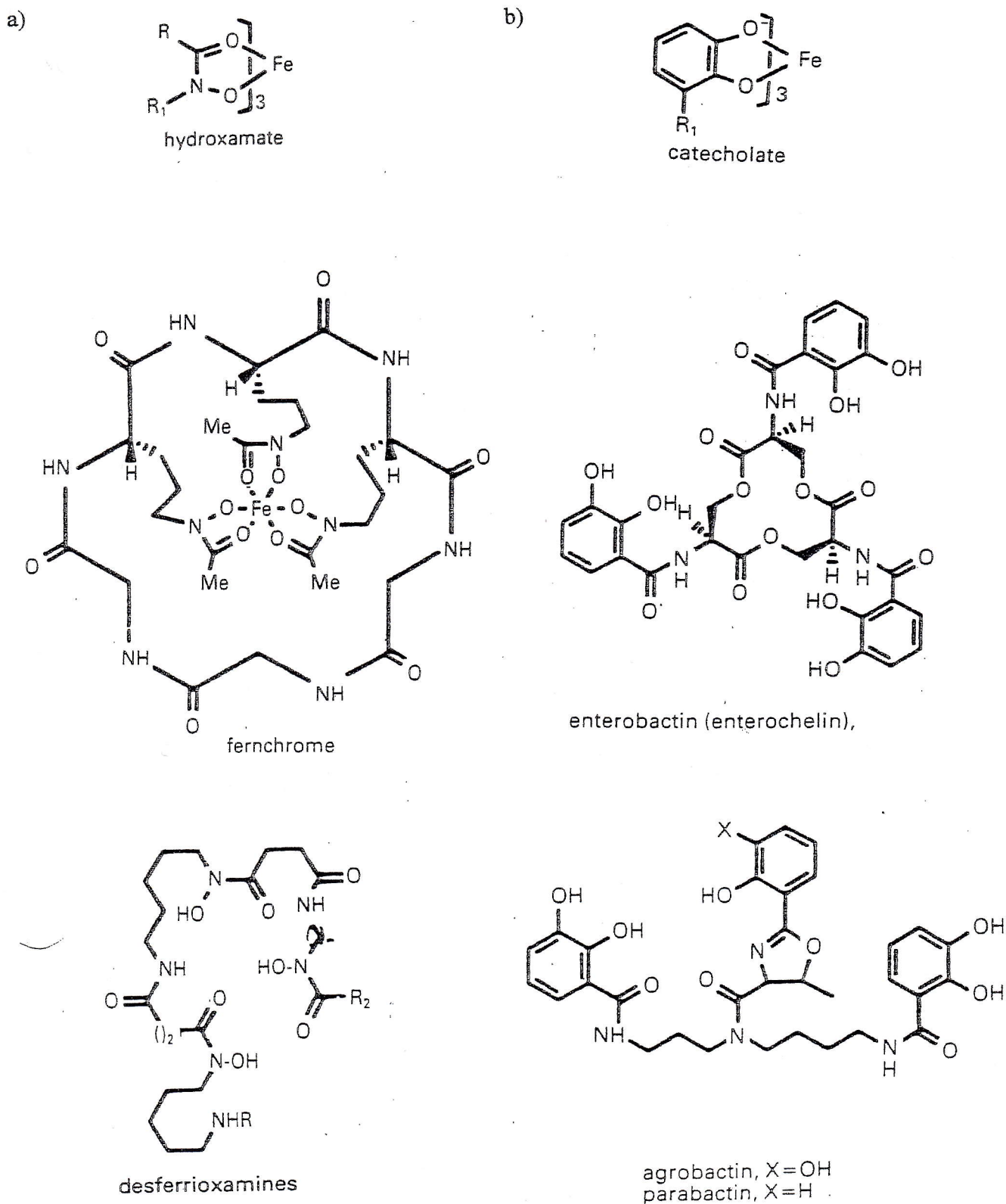
Některé mikroorganismy jsou schopny syntetizovat několik typů vlastních (endogenních) sideroforů a zároveň využívat i siderofory produkované jinými mikroorganismy (exogenní siderofory). Tento fenomén je znám zejména u enterobakterií. U *E. coli* byly zjištěny 4 různé mechanismy využívající siderofory pro příjem železa: (1) syntéza endogenního sideroforu enterobaktinu kódovaného chromozomálně, (2) syntéza endogenního sideroforu aerobaktinu kódovaného na plazmidu, (3) získávání železa z exogenních hydroxamátových sideroforů ferichromu, koprogenu a rhodotorulové kyseliny a (4) získávání železa vázaného na citrát (Crosa, 1997).

Mechanismy umožňující získávat železo pomocí sideroforů jsou aktivovány nedostatkem tohoto kovu v prostředí. Již dříve bylo pozorováno, že mikroorganismy rostoucí v prostředí s limitovanou dostupností železa exprimují silněji některé membránové proteiny (Finkelstein *et al.*, 1983). Mezi tyto proteiny patří zejména specifické receptory sloužící k příjmu sideroforů s navázaným železem. U gramnegativních bakterií jsou tyto receptory lokalizovány na vnější membráně. Komplex železo-siderofor je po vazbě na receptor transportován do periplazmatického prostoru a poté translokován přes cytoplazmatickou membránu do cytoplazmy, kde dochází k

uvolnění železa (Crosa, 1997). Přenos je pravděpodobně zprostředkován membránovou permeázou. Uvolnění trojmocného železa ze sideroforu je spojeno s jeho redukcí na dvojmocné kationty, k nimž mají siderofory výrazně nižší afinitu. U buněk mnoha bakterií a hub (např. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*) byla objevena membránově vázaná nebo cytoplazmatická ferrisideroforreduktáza. Volný siderofor je poté buňkou buď recyklován nebo degradován. Např. u buněk *Escherichia coli* je aerobaktin recyklován, zatímco enterobaktin je intracelulárně rozštěpen. V případě katecholátových sideroforů přispívá k uvolnění železa z komplexu také intracelulární degradace sideroforu (Crichton, 1991c).

Syntéza sideroforů, příslušných receptorů a dalších asociovaných molekul je indukována nedostatkem železa. Buněčná regulace tohoto procesu je řízena proteinem označovaným Fur - *ferric uptake regulation* (Crosa, 1997). Tento protein o relativní molekulové hmotnosti 16,8 kDa se v přítomnosti železa váže na specifické sekvence v promotorové oblasti tzv. fur-kontrolovaných genů a působí jako represor transkripce (Hantke, 1984). Při snížení hladiny železa v buňce ztrácí protein vazebnou aktivitu a represe kontrolovaných genů je zrušena. Specifické vazebné místo u fur-kontrolovaných genů bylo nazváno "FUR box" nebo "iron box" a jeho univerzální sekvence je: GATAATGATAATCATTATC. Všechny doposud identifikované geny zodpovědné za syntézu sideroforů a příjem a transport ferrisideroforů obsahují FUR box a jsou regulovány proteinem Fur. Ten se váže i na promotor vlastního genu a autoreguluje tak i svou vlastní expresi (Stojiljkovic *et al.*, 1994).

Vedle negativní regulace transportu železa je známa i regulace pozitivní, kdy jako stimulační signál působí příjem ferrisideroforu. Tento mechanismus byl nejlépe prostudován v případě komplexu železo-enterobaktin u *Pseudomonas aeruginosa*. U této bakterie dochází ke kombinaci obou mechanismů, tj. siderofor vyvolává pozitivní signál pro expresi vlastního receptoru, zatímco nadbytek železa syntézu receptoru utlumuje působením proteinu Fur (Crosa, 1997).



Obr. 6. Chemická struktura a příklady sideroforů. Chemická struktura a příklady některých hydroxamátových (a) a catecholátových (b) sideroforů (upraveno podle Crichton, 1991c).

1.6.2. Receptory pro transferin a laktoferin

Některé patogenní mikroorganismy exprimují na svém povrchu receptory, které umožňují získávat železo z transferinu a laktoferinu produkovaného hostitelem. Specifické receptory pro tyto proteiny byly popsány u řady bakterií (Weinberg, 1995a) a některých prvoků (Peterson and Alderete, 1984a; Coppens *et al.*, 1987; Chaudhri *et al.*, 1994; Lima and Villalta, 1990; Voyatzaki and Soteriadou, 1990; Wilson *et al.*, 1994; Tachezy *et al.*, 1996). Mechanismy uplatňující se při získávání železa pomocí receptorů se u jednotlivých skupin organismů liší. Zatímco bakterie uvolňují železo z ligandu hostitele na svém povrchu, prvoci jsou schopni komplex ligand-receptor endocytovat a železo uvolňovat až poté uvnitř buňky.

Na vnější membráně bakterií žijících v prostředí bohatém na transferin (*Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*) byly zjištěny dva typy receptorů pro tento protein označené jako Tbp1 a Tbp2 (Cornelissen *et al.*, 1992; Gerlach *et al.*, 1992; Legrain *et al.*, 1993; Gray-Owen, *et al.*, 1995). Receptor pro transferin byl identifikován také u *Pasteurella haemolytica* (Ogunnarivo and Schryvers, 1990). Transferinové receptory vykazují vysokou podobnost s receptory pro laktoferin, hem (resp. hemoglobin) a dalšími receptory vnější membrány bakterií, jejichž funkce závisí na interakci s periplazmatickým proteinovým komplexem TonB, ExbB, ExbD.

Vazba transferinu na receptor je značně hostitelsky specifická (Weinberg, 1995a). Po navázání transferinu na receptor dochází k uvolnění železa a následnému transportu v komplexu s proteinem FbpA přes periplazmatický prostor k plasmatické membráně. (Chen *et al.*, 1993).

Mechanismy získávání železa z laktoferinu jsou u bakterií velmi podobné mechanismům uplatňujícím se při příjmu železa z transferinu. Receptory pro laktoferin byly popsány např. u bakterií rodu *Neisseria* (Peterson *et al.*, 1994), u *Bordetella pertussis* (Redhead *et al.*, 1987), *Haemophilus influenzae* (Schryvers, 1988) a *Staphylococcus aureus* (Naidu *et al.*, 1992). Gen kódující laktoferinový receptor byl nejpodrobněji prostudován u *Neisseria meningitidis* (Peterson *et al.*, 1994).

U parazitických prvoků byly doposud receptory pro transferin identifikovány u trypanosom *Trypanosoma brucei* (Coppens *et al.*, 1987; Chaudhri *et al.*, 1994),

amastigotů *Trypanosoma cruzi* (Lima and Villalta, 1990) a promastigotů *Leishmania mexicana*, *L. infantum* a *L. major* (Voyatzaki and Soteriadou, 1990; Voyatzaki and Soteriadou, 1992). Specifický příjem železa z laktoferinu byl popsán u buněk *L. chagasi* (Wilson *et al.*, 1994), *Trichomonas vaginalis* (Peterson and Alderete, 1984) a *Tritrichomonas foetus* (Tachezy *et al.*, 1996). Prvoci přijímají, podobně jako savčí buňky, železo z transferinu a laktoferinu pomocí endocytózy. Hlubší studium však ukazuje, že mechanismy příjmu železa založené na receptory zprostředkované endocytóze nejsou u buněk savců a prvoků identické. Podrobnější popis mechanismů uplatňujících se při příjmu železa u buněk parazitických prvoků je podán v kapitole 1.7.

1.6.3. Získávání železa z hemoglobinu

Řada patogenů využívá hemoglobin a produkty jeho degradace jako hlavní zdroj železa (Weinberg, 1995a). Hemoglobin, který se uvolňuje při rozrušení erytrocytů buď působením patogenních mikroorganismů (uvolňování hemolyzinů, hemolýza závislá na kontaktu) nebo v důsledku patofyziologických procesů, je mikroby vázán pomocí specifických receptorů. Specifická vazba hemoglobinu na buněčný povrch byla zjištěna u mnoha bakterií (Lee and Hill, 1992; Henderson and Payne, 1993; Hasan *et al.*, 1997) a také u parazitického prvoka *Trichomonas vaginalis* (Lehker *et al.*, 1990). Vazba hemoglobinu je narozdíl od transferinu nebo laktoferinu značně hostitelsky nespecifická a jeden druh bakterie může vázat hemoglobin z různých savců (Weinberg, 1995a).

Mechanismus získávání hemového železa byl nejpodrobněji prostudován u buněk *Neisseria meningitidis* (Stojiljkovic *et al.*, 1995). Tato bakterie exprimuje na svém povrchu dva druhy receptorů umožňujících příjem hemového železa: (1) receptory vázající hemoglobin i volný hem a (2) receptory specifické pouze pro volný hem. Receptor prvního typu je kromě vazby hemoglobinu na povrchu buňky schopen zajišťovat také rozštěpení hemu. Volný hem je poté transportován přes periplasmatický prostor pomocí systému membránových proteinů TonB, ExbB, ExbD. Jedná se o mechanismus podobný přenosu transferinového a laktoferinového železa nebo komplexu železo-siderofor. Hem je během transportu přes periplasmatický prostor vázán na protein FbpA (Desai *et al.*, 1995). Po transportu hemu do cytoplazmy dochází k rozrušení porfyrinového kruhu aktivitou hemoxygenázy a k uvolnění železa (Stojiljkovic and Hantke, 1994). Funkce druhého typu

receptoru, který váže pouze volný hem, je na systému proteinů TonB, ExbB, ExbD nezávislá (Stojiljkovic and Hantke, 1992; Stojiljkovic *et al.*, 1995).

Některé mikroorganismy jako *Staphylococcus aureus* (Francis *et al.*, 1984), *Neisseria meningitidis* (Dyer *et al.*, 1987), *Haemophilus ducreyi* (Lee, 1991) a *Haemophilus influenzae* (Wong *et al.*, 1994) jsou schopny vázat a využívat železo z komplexu hemoglobin-haptoglobin, eventuelně komplexu hem-hemopexin. Haptoglobin je protein, který váže pouze hemoglobin, zatímco hemopexin je specifický pouze pro volný hem. Oba bakteriostatické proteiny vznikají při hemolýze v rámci reakce hostitele na uvolnění hemového železa a mají za úkol tuto formu železa z krevního řečiště vyvázat a transportovat do jaterní tkáně, kde je intracelulárně ukládáno.

Také parazitičtí prvoci jako např. *Entamoeba histolytica*, plasmodia nebo leishmanie jsou schopni využívat železo vázané v hemu. Mechanismy, které využívají buňky parazitických prvoků při získávání hemového železa jsou podrobněji popsány v kapitole 1.7.

1.6.4. Získávání železa z nízkomolekulárních komplexů

Nízkomolekulární železo je pro parazitické mikroorganismy nejlépe dostupné v zažívacím traktu, kam se dostává s potravou. V této formě je patrně využíváno střevními bakteriemi i prvoky. Zatímco bakterie mohou pro příjem nízkomolekulárního železa využívat siderofory i specifické receptory pro nízkomolekulární ligandy (Waggeg and Braun, 1981), prvoci získávají železo z nízkomolekulárních komplexů pravděpodobně pomocí membránových přenašečů (Tachezy *et al.*, 1998).

Mikroorganismy využívají pro příjem nízkomolekulárního železa často mechanismy spojené s tvorbou redukčního prostředí, které kombinují se snižováním pH okolí. Tyto změny prostředí vedou ke zvýšené solubilitě železa a jeho snažšímu transportu přes cytoplazmatickou membránu. Schopnost vytvářet redukční prostředí společně se snižováním pH okolí byla popsána např. u *Bifidobacterium thermophilum* (Kot and Bezkorovainy, 1993), *Bifidobacterium breve* (Bezkorovainy and Solberg, 1993), *Streptococcus mutans* (Evans *et al.*, 1986), *S. cerevisiae* (Lesuisse *et al.*, 1987), *Trichomonas foetus* (Tachezy *et al.*, 1998) a intracelulárního parazita *Listeria*

monocytogenes, který je schopen redukovat železo prostřednictvím nízkomolekulárních redukčních agens (Adams *et al.*, 1990).

Za fyziologických podmínek je hladina nízkomolekulárních komplexů železa v tělních tekutinách zanedbatelná (Bullen, 1981). Význam nízkomolekulárního železa pro patogeny však vzrůstá při stavech, kdy dochází k zvýšení hladiny železa v hostitelském organismu v důsledku vrozených poruch metabolismu železa jako je např. hemochromatóza (Batey *et al.*, 1980) nebo hypotransferinémie a atransferinémie (Saito, 1975; Hayashi *et al.*, 1993), následkem nadměrného příjmu železa v potravě (Weinberg, 1990) nebo jako důsledek poranění (Olahanmi *et al.*, 1994). Problematika vztahu železa a virulence mikroorganismů je podrobněji zpracována v kapitole 1.8.

1.6.5. Význam intracelulárního železa

Intracelulární železo hraje důležitou roli zejména v případě parazitických mikroorganismů lokalizovaných uvnitř buňky. Intracelulární feritin i intracelulární labilně vázané železo mohou vnitrobuněčným patogenům teoreticky poskytovat dostatečné množství tohoto prvku. Oba zdroje železa by mohly být využívány i extracelulárně žijícími mikroorganismy, a to především v případech, kdy dochází k destrukci buněk hostitele. Příjem železa z feritinu však nebyl doposud u mikroorganismů přímo prokázán. Některé práce (Diamond *et al.*, 1978) naznačují, že by trofozoiti *Entamoeba histolytica* invadující jaterní tkáň, která je bohatá na feritin, mohli využívat právě tento zdroj železa. Také u buněk *T. foetus* byla popsána stimulace růstu feritinem *in vitro* (doc. Tachezy, nepublikovaná data). V průběhu bovinní trichomoníazy, která je vyvolávána tímto parazitem, dochází k rozrušení hostitelské tkáně a lze tedy předpokládat, že by trichomonády mohly využívat i feritin, který se uvolňuje z rozpadlých buněk *in situ*.

Ačkoliv intracelulární labilně vázané železo (LIP) může zaujímat nezanedbatelný podíl železa v buňce (Vyoral *et al.*, 1998; Suchan *et al.*, 2003), nebyla tato forma železa doposud z hlediska poskytování železa mikroorganismům studována. To je způsobeno zejména nedostatečně objasněnou podstatou ligandů na nichž je železo v buňce labilně vázáno. Vzhledem ke slabé vazbě železa k ligandům může být LIP snadno dostupný zejména pro mikroorganismy parazitující přímo v cytoplazmě hostitelských buněk.

1.7. Metabolismus železa u parazitických prvoků

1.7.1. Trypanozomy

Trypanozomy, které patří mezi bičíkovce skupiny *Kinetoplastida*, střídají ve svém vývojovém cyklu dvě velmi odlišná prostředí: trávicí trakt hmyzího přenašeče a krevní řečiště (v případě afrických trypanozom), popř. intracelulární prostředí (v případě *T. cruzi*) obratlovčího hostitele (Vickerman, 1985). Přechod mezi jednotlivými prostředími je spojen se zásadními metabolickými změnami, které se dotýkají i metabolismu železa. Procyklické (hmyzí) formy, které obsahují plně funkční mitochondrii, vyžadují relativně velké množství železa zejména pro funkci cytochromů. Naproti tomu krevní formy mají relativně malé nutriční nároky na železo, neboť potřebují tento prvek pouze pro aktivitu několika zbývajících enzymů, jako je ribonukleotidreduktáza (Hofer *et al.*, 1997; Dormeyer *et al.*, 1997), glycerol-3-fosfát oxidáza (Fairlamb and Bowman, 1977), mitochondriální terminální alternativní oxidáza TAO (Chaudhuri *et al.*, 1998) a Fe-superoxiddismutáza (Le Trant *et al.*, 1983; Ismail *et al.*, 1997). Jedna trypomastigotní buňka *T. brucei* tak potřebuje při svém dělení přijmout pouze okolo 4.000 atomů železa za hodinu (Steverding, 1998). Přesto je však citlivost krevních forem *T. brucei* ke snížení hladiny železa v okolí (např. při chelataci desferioxaminem) zhruba 10 × vyšší než v případě savčích buněk (Breidbach *et al.*, 2002).

Hlavním zdrojem železa pro krevní formy trypanozom je transferin, který je vychytáván pomocí specifických receptorů a následně endocyticky internalizován. Jedna buňka má na svém povrchu pouze okolo 2.300 molekul receptoru, zatímco savčí buňka může na svém povrchu exprimovat až 800.000 těchto molekul (Steverding *et al.*, 1995). Struktura transferinových receptorů *T. brucei* je tvořena, obdobně jako u savčích receptorů, proteinovým dimerem. V ostatních vlastnostech se však receptory trypanozom a savců liší. Podjednotky transferinového receptoru *T. brucei* mají relativní molekulovou hmotnost 52 a 42 kDa (Chaudhuri *et al.*, 1994) a nenesou žádné oblasti homologní s receptory savců. Asociace s membránou je zprostředkována pouze přes těžší subjednotku, a to pomocí glykosylfosfatidylinositolové (GPI) kotvy (Schell *et al.*, 1991). Savčí transferinový receptor je naproti tomu tvořen dvěma identickými subjednotkami o relativní molekulové hmotnosti 90 kDa. Obě podjednotky jsou tvořeny integrálními

membránovými proteiny, jejichž struktura je zpevněna vzájemným propojením disulfidickými můstky. Další odlišností receptorů trapanozom a savců je různá afinita k holo- a apotransferinu v závislosti na pH. Při neutrálním pH vážou receptory trypanozom s vysokou afinitou holotransferin ($K_d=3,6$ nM) i volný apotransferin ($K_d=20$ nM). Savčí receptory mají za těchto podmínek vysokou afinitu pouze k holotransferinu (Steverding, 1998). Při nízkém pH (okolo 5.5) mají savčí receptory stále vysokou afinitu k transferinu i po disociaci železa od tohoto proteinu, zatímco u trypanozom dochází po disociaci železa od transferinu následně i k rozpadu komplexu receptor-transferin (Maier and Steverding, 1996). U trypanozom tedy probíhá disociace komplexu receptor-transferin v kyselém endosomálním prostředí a receptor je poté recyklován, zatímco uvolněný transferin je dále transportován do lysosomů a zde proteolyticky degradován (Grab *et al.*, 1992; Steverding *et al.*, 1995). Železo zůstává vázáno v buňkách, kde je metabolicky využíváno, zatímco produkty degradace transferinu jsou exkretovány vně buňky. Naproti tomu u savčích buněk k disociaci komplexu receptor-transferin v endosomech nedochází, ale uvolňuje se pouze transferinové železo. Komplex receptor-transferin je recyklován a k oddělení transferinu od receptoru dochází až na povrchu buněk při neutrálním pH (Steverding *et al.*, 1995).

Transferinové receptory jsou na povrchu trypanozom lokalizovány pouze v periflagelární kapse. Umístění v tomto úzkém prostoru patrně chrání receptory před rozpoznáním makrofágy a s tím spojenou následnou imunitní odpovědí hostitele (Borst, 1991).

Obě podjednotky transferinového receptoru trypanozom jsou kódovány geny, které patří do skupiny ESAG - *expression site-associated genes* (Pays *et al.*, 1989; Schell *et al.*, 1991). Tyto kódující oblasti jsou lokalizovány v blízkosti genu pro variabilní povrchový glykoprotein (VSG) a mají patrně i stejný evoluční původ jako tento glykoprotein (Pays *et al.*, 2001). U trypanozom se vyskytuje zhruba 1.000 genů, které kódují různé antigenní varianty VSG. Přepisována je vždy pouze jediná kopie tohoto genu, která leží v jednom z expresních míst v blízkosti telomery. V genomu trypanozom je obsaženo zhruba 20 expresních míst pro VSG, v daný okamžik je však aktivní pouze jedno místo. Toto přepínání zprostředkovává antigenní variabilitu povrchu trypanozom, která umožňuje bránit se před zásahem specifickými protilátkami hostitele (Borst *et al.*, 1996). Transkripce ESAG genů je pod kontrolou stejného promotoru jako VSG. Díky tomu jsou geny ESAG-6 a ESAG-7, které kódují obě podjednotky transferinového receptoru (Schell *et al.*, 1991; Salmon *et al.*, 1994; Steverding *et al.*, 1994), schopny zaručovat obdobnou

antigenní variabilitu tohoto receptoru. Geny pro transferinový receptor totiž kromě homologních oblastí obsahují rovněž hypervariabilní oblast 32 nukleotidů, která kóduje odlišné složení příslušných polypeptidových řetězců (Zomerdijk *et al.*, 1991). Tato část receptoru vytváří snadno dostupnou povrchovou smyčku, proti níž jsou namířeny protilátky hostitele. Protože se však smyčka neúčastní interakce transferin-receptor (Borst, 1991), umožňuje tak útěk před imunitní odpovědí hostitele. Sekvenční variabilita přepisovaných kopií transferinového receptoru navíc trypanozomám umožňuje reagovat na diverzitu transferinů z různých hostitelů (a to i v přítomnosti protilátek proti tomuto proteinu) a tak z evolučního hlediska rozšiřovat spektrum hostitelů (Bitter *et al.*, 1998; Gerrits *et al.*, 2002).

Hladina exprese transferinového receptoru je u trypanozom regulována dostupností železa (Fast *et al.*, 1999). Při nedostatku železa v prostředí dochází ke zvýšení hladiny samotného receptoru i mRNA kódující jednu z podjednotek (ESAG 6). Na rozdíl od savčích buněk však tato regulace není zprostředkována systémem IRE/IRP. Cytoplazmatická cis-akonitáza je sice v buňkách trypanozom přítomná a její sekvence vykazuje vysokou podobnost se savčím regulačním proteinem IRP-1 (Fast *et al.*, 1999; Saas *et al.*, 2000), vyřazení tohoto proteinu v buňkách trypanozom však na expresi transferinového receptoru nemá žádný vliv (Fast *et al.*, 1999). Podrobnější znalost regulace exprese transferinového receptoru u trypanozom bude tedy vyžadovat ještě další zkoumání.

U procyklických forem *T. brucei* nebyla endocytóza transferinu prokázána (Webster, 1989), ačkoliv by tyto formy mohly využívat transferin obsažený v nasáté krvi uvnitř zažívacího traktu přenašečů. Jaké jsou další možné zdroje železa pro toto stádium trypanozom není také známo. Je pravděpodobné, že buňky využívají zásoby železa vytvořené ještě v krevním řečišti hostitele. Přítomnost proteinů skladujících železo, jako je např. feritin, však dosud nebyla potvrzena.

Funkční transferinový receptor ve formě dimeru produktů genů ESAG 6 a ESAG 7 byl identifikován také u krevních forem *Trypanosoma evansi* (Kabiri and Steverding, 2001). Příbuznost transferinových receptorů obou druhů trypanozom byla podpořena zjištěním, že specifické protilátky proti receptoru *T. brucei* zcela inhibují schopnost *T. evansi* přijímat transferin.

Pro životní cyklus *T. cruzi* je charakteristické výhradně intracelulární množení. Tento parazit napadá zejména makrofágy a svalové buňky člověka, kde se usazuje přímo v

cytoplazmě. Pro přenos mezi hostitelem a hmyzím přenašečem slouží nedělicí se krevní trypomastigotní stadia, které se po nasátí přenašečem transformují v trávicím ústrojí na proliferující neinfekční epimastigoty. Ty se dále v zadní části střeva přeměňují na infekční metacyklické trypomastigoty, kteří jsou přenášeni zpět do definitivního hostitele. Zde tyto stádia napadají makrofágy, kde se v cytoplazmě přeměňují na proliferující amastigotní formy.

Zdrojem železa pro intracelulární amastigoty je podle některých autorů transferin. U buněk těchto stádií se podařilo identifikovat specifické transferinové receptory (Lima and Villalta, 1990). Na povrchu jedné buňky je exprimováno zhruba 80.000 molekul tohoto receptoru o relativní molekulové hmotnosti 200 kDa a s disociační konstantou $K_d=2,82 \cdot 10^{-6}$ M (Lima and Villalta, 1990). Transferin také stimuluje růst amastigotů *in vitro*, zatímco chelátor desferioxamin proliferaci inhibuje (Loo and Lalonde, 1984). Je však sporné, zda k využívání transferinu amastigotními stadii *T. cruzi* dochází i za podmínek *in vivo*. Není totiž zcela jasné, jakou cestou by se tento protein dostával přímo do cytoplazmy hostitelských buněk, v nichž trypanozomy parazitují. Přítomnost receptorů pro transferin ani jeho endocytóza nebyly potvrzeny ani v elektronmikroskopických studiích (Soares and deSouza, 1991).

Experimentální infekce *T. cruzi*, jsou obvykle doprovázeny snižováním hladiny extracelulárního železa v hostiteli (Lalonde and Holbein, 1984). Tento mechanismus slouží k obraně hostitele proti extracelulárním patogenům a je zprostředkován makrofágy, které absorbují železo z krevního oběhu. Zvýšení hladiny železa v buňkách makrofágů by tedy v případě infekce *T. cruzi* mohlo mít pozitivní dopad na intracelulární vývoj těchto parazitů. Tato hypotéza je podpořena i experimenty, které ukázaly, že vyvážení intracelulárního železa desferioxaminem inhibuje růst amastigotů uvnitř makrofágů (Loo and Lalonde, 1984).

U epimastigotních stádií *T. cruzi* byla pozorována vazba transferinu na povrch buňky a jeho následná internalizace v okolí periflagelární kapsy, případně cytostomu (Soares and de Souza, 1991). Tato stádia trypanozom by tedy mohla využívat transferin, který je uvnitř trávicího traktu přenašečů snadno dostupný z nasáté krve.

1.7.2. Leishmanie

Leishmanie jsou dalším významným zástupcem skupiny *Kinetoplastida*. Pro vývojový cyklus tohoto prvoka je charakteristické střídání savčího hostitele, v němž se uvnitř fagosomů makrofágů množí amastigotní formy, a hmyzího přenašeče. V trávicím traktu přenašeče proliferují promastigotní procyklická stádia, která se následně přeměňují na infekční metacyklické formy.

Experimenty *in vitro* prokázaly schopnost promastigotních stádií leishmanií využívat různé zdroje železa jako je transferin, laktoferin, hemin nebo nízkomolekulární komplexy železa (Chang and Hendricks, 1985).

Získávání železa z transferinu je u leishmanií zprostředkováváno specifickými receptory. Receptorové molekuly byly identifikovány na povrchu promastigotních stádií *L. major*, *L. infantum* a *L. mexicana* (Voyatzaki and Soteriadou, 1990; Voyatzaki and Soteriadou, 1992; Wilson *et al.*, 1994). Tyto integrální glykoproteiny o relativní molekulové hmotnosti 70-78 kDa jsou rozloženy rovnoměrně po celém povrchu promastigotů (Voyatzaki and Soteriadou, 1990; Voyatzaki and Soteriadou, 1992). Zkřížená reaktivita specifické monoklonální protilátky proti myšímu transferinovému receptoru s transferinovým receptorem leishmanií navíc naznačuje, že některé funkční části mohou být u obou molekul podobné (Voyatzaki and Soteriadou, 1992). Pro přesnější studium podobnosti obou receptorů však budou nezbytné informace o aminokyselinové sekvenci receptoru leishmanií.

Wilson a kol. (2002) nedávno popsali v celkovém lyzátu i v jednotlivých buněčných frakcích promastigotů *L. donovani chagasi* NADPH-závislou aktivitu redukující trojmocné železo. Zdá se tedy, že u leishmanií dochází působením membránově vázaných nebo sekretovaných reduktáz k uvolnění železa z transferinu už na povrchu buňky. Tato situace je odlišná od trypanozom, které pomocí specifických receptorů internalizují komplex železo-transferin.

U promastigotních stádií *L. donovani chagasi* byla také pozorována vazba laktoferinu na povrch buněk, příjem železa z tohoto proteinu a stimulace růstu *in vitro* (Wilson *et al.*, 1994). Vazba laktoferinu však byla inhibována transferinem a laktoferin naopak inhiboval vazbu transferinu. Potvrzení, zda je receptor na povrchu leishmanií společný pro oba proteiny však ještě bude vyžadovat další experimentální podklady.

Naproti tomu u buněk *L. donovani donovani*, u nichž byla vazba transferinu a laktoferinu pozorována také (Britigan *et al.*, 1998), není vazba laktoferinu na povrch

buněk transferinem inhibována. Dále je zajímavé, že vazba apolaktoferinu a ferrilaktoferinu na povrch buněk tohoto parazita je srovnatelná, zatímco v případě transferinu je silně preferována forma proteinu s navázaným železem (Britigan *et al.*, 1998).

Na povrchu promastigotů *L. donovani donovani* byl identifikován také specifický receptor pro hemoglobin (Sengupta *et al.*, 1999). Tento protein o relativní molekulové hmotnosti 46 kDa zprostředkovává specifickou vysokoafinitní vazbu hemoglobinu v oblasti periflagelární kapsy a následnou internalizaci do buňky pomocí endocytózy (Sengupta *et al.*, 1999). Specifická vazba hemu a dalších metaloporfyrinů byla pozorována také na povrchu promastigotních stádií *L. mexicana amasonensis* (Galbraith and McElrath, 1988).

Získávání železa intracelulárními amastigoty, jež jsou hlavním patogenním agens leishmaniázy, bohužel nebylo doposud pro jejich komplikovanou kultivaci *in vitro* studováno. Experimenty se značeným transferinem však prokázaly, že v makrofázích infikovaných leishmaniemi dochází k transportu endocytovaného transferinu do parazitoforní vakuoly, soustředování tohoto proteinu na povrchu amastigotů a následné endocytóze v prostoru periflagelární kapsy. Uvnitř parazitů pak dále dochází k transportu endocytovaného transferinu do lysosomálního kompartmentu aniž by byl protein dále recyklován (Borges *et al.*, 1998). Předchozí údaje tedy prokazují, že leishmanie jsou schopny modulovat endocytární systém hostitelských buněk takovým způsobem, aby si zajistily dostatečný přísun nutričních faktorů. Do jaké míry však toto tvrzení platí i pro navázané železo však zatím není známo.

1.7.3. Plasmodia

Také ve vývojovém cyklu plasmodií dochází ke střídání savčího definitivního hostitele a hmyzího přenašeče. Definitivní hostitel je infikován sporozoity, kteří posléze opouštějí krevní řečiště a napadají hepatocyty. V jaterních buňkách dochází k asexuálnímu množení a následnému uvolňování merozoitů, kteří infikují erythrocyty. V červených krvinkách dochází k dalšímu cyklu asexuálního pomnožení a uvolnění merozoitů spojenému s destrukcí erythrocytů. Merozoiti poté napadají i další erythrocyty. Přenos na hmyzího přenašeče během sání zprostředkovávají sexuální stadia, která se po určité době v erythrocytech vytvářejí.

Význam železa pro vývoj plasmodií *in vitro* (Shanzer *et al.*, 1991) i *in vivo* (Fritsch *et al.*, 1985) byl prokázán poprvé ve studiích, v nichž přidání chelátoru desferioxaminu inhibovalo růst tohoto parazita uvnitř erytrocytů. Přirozený zdroj železa pro intraerytrocytární stádia i mechanismy uplatňující se při příjmu tohoto kovu jsou však u plasmodií dosud stále nejasné.

Hemoglobin, který je hlavní komponentou obsahující železo v erytrocytech, by mohl být pro plasmodia základním zdrojem tohoto prvku. Plasmodia však nedisponují hemoxygenázovou aktivitou, která katalyzuje uvolňování železa z hemu (Sanchez-Lopez and Haldar, 1992), a proto nebyla využitelnost této formy železa pro plasmodia dlouho akceptována. V podmínkách, které nastávají během proteolytické degradace hemoglobinu v potravní vakuole, však může rovněž docházet i ke spontánnímu štěpení porfyrinového kruhu hemu a následnému uvolnění železa bez uplatnění hemoxygenázové aktivity (Gabay a Gingsburg, 1993). Tento proces je katalyzován ferylovými kationty (Fe^{4+}) a vyžaduje nízké pH a stimulaci proteázami. Ačkoliv je tímto způsobem v potravních vakuolách uvolněno pouze okolo 3% z celkového endocytovaného hemového železa, jedná se o množství dostačující pro pokrytí nutričních požadavků parazita (Gabay *et al.*, 1993). Rovněž bylo prokázáno, že chinoliny, které jsou používány jako antimalarika, inhibují uvolňování železa z hemu. Blokování příjmu železa z hemu je tedy pravděpodobně jedním z faktorů determinujících antimalarické působení těchto léčiv (Gabay *et al.*, 1993). Lze proto předpokládat, že hem je pro intraerytrocytární stádia plasmodií důležitým zdrojem železa.

Haldar a kol. (1986) a Rodriguez and Jungery (1986) popsali plasmodiální receptor pro transferin přítomný na cytoplazmatické membráně erytrocytů infikovaných *P. falciparum*. Receptor o předpokládané relativní molekulové hmotnosti 100 kDa však nebyl přítomen na povrchu zdravých erytrocytů. Toto pozorování je v souladu s obecným poznatkem, že plasmodia mohou inkorporovat do membrány erytrocytů vlastní receptory. Tyto molekuly umožňují příjem látek, které nejsou poskytovány neinfikovanými, metabolicky úzce specializovanými erytrocyty. Ani jedna z prací popisujících transferinový receptor plasmodií však neprokázala skutečné využití železa z transferinu. Přítomnost specifického receptoru na povrchu infikovaných erytrocytů nebyla potvrzena ani v pozdějších studiích (Pollack and Schnelle, 1988). Práce popisující neschopnost infikovaných erytrocytů akumulovat železo z ^{59}Fe -transferinu a zjištění, že hladina tohoto proteinu v médiu neovlivňuje *in vitro* růst merozoitů uvnitř erytrocytů definitivně vyvrátily atraktivní

hypotézu o přítomnosti funkčních plasmodiových receptorů v membráně infikovaných erytrocytů (Sanchez-Lopez and Haldar, 1992).

Erytrocytární stádia plasmodií jsou schopny *in vitro* získávat také železo z nízkomolekulárních komplexů, jako je např. Fe-NTA nebo Fe-citrát (Sanchez-Lopez and Haldar, 1992). Význam těchto zdrojů je však patrně u jedinců s normálním metabolismem železa zanedbatelný (Gabay *et al.*, 1993).

Teprve v nedávné době bylo prokázáno, že regulace přísunu železa je u plasmodií založena na podobném mechanismu jako u savčích buněk (Loyevsky *et al.*, 2001). V buňkách *P. falciparum* se podařilo identifikovat homolog savčího regulačního proteinu IRP-1 nazvaný PfIRPa, který se je schopen vázat *in vitro* na savčí IRE sekvence. Hladina tohoto proteinu stoupá u buněk s nedostatkem železa. Pomocí imunofluorescence se podařilo detekovat tento protein také v infikovaných erytrocytech (Loyevsky *et al.*, 2001).

Také mechanismy zprostředkovávající tvorbu Fe-S center v buňkách plasmodií jsou velmi pravděpodobně podobné procesům známým u ostatních eukaryotických buněk. U *P. falciparum* i u dalších zástupců skupiny *Apicomplexa* (Seeber, 2002) byly identifikovány sekvence příbuzné genům kódujícím jednotlivé složky ISC a SUF systémů (Ellis *et al.*, 2001; Seeber, 2002), které jsou zodpovědné za maturaci Fe-S center v buňkách bakterií a v mitochondriích eukaryotických buněk.

1.7.4. Trichomonády

Trichomonády patří mezi jednohostitelské prvoky. Ačkoliv většina trichomonád parazituje v trávicím traktu hostitele, dva nejvýznamnější a nejprostudovanější druhy (*Trichomonas vaginalis* a *Tritrichomonas foetus*) parazitují v urogenitálním traktu a způsobující sexuálně přenosné onemocnění člověka, resp. dobytka. Základním společným prvkem buňky trichomonád i buněk dalších anaerobních prvoků je nepřítomnost mitochondrií. Přestože anaerobní prvoci nepotřebují železo pro tvorbu cytochromů, jsou jejich nutriční nároky na železo ve srovnání s aerobními buňkami výrazně vyšší (Diamond *et al.*, 1978). *T. foetus* vyžaduje pro optimální růst *in vitro* 50-100 μM koncentraci železa v prostředí (Tachezy *et al.*, 1996) a podobné rozmezí koncentrací železa je nezbytné i pro růst *T. vaginalis* (Lehker and Alderete, 1992). Většina anaerobních buněk naproti tomu dosahuje optimálního růstu už okolo 0.3-0.4 μM železa v prostředí (Diamond *et al.*, 1978). Vysoké nutriční nároky anaerobních prvoků na železo patrně odrážejí nezbytnost tohoto

kovu pro funkci Fe-S proteinů, jako jsou feredoxiny nebo pyruvát:feredoxin oxidoreduktázy, které hrají klíčovou roli v energetickém metabolismu této skupiny prvoků (Müller, 1992). Fe-S centra těchto proteinů jsou v buňkách trichomonád pravděpodobně vytvářena podobným mechanismem jako u ostatních organismů. U *T. vaginalis* byly identifikovány dva geny (TviscS-1 a TviscS-2) homologní s cysteindesulfurázou IscS, enzymem účastnícím se biosyntézy Fe-S center u bakterií a v mitochondriích eukaryotických buněk. Oba geny obsahují N-terminální vedoucí sekvenci zodpovědnou za nasměrování nascentního proteinu do hydrogenosomu (Tachezy *et al.*, 2001).

Buňky *T. vaginalis* i *T. foetus* jsou schopny využívat jako zdroj železa laktoferin přítomný ve vaginálních sekretech (Peterson and Alderete, 1984; Tachezy *et al.*, 1996). Oba druhy trichomonád mohou také přijímat a využívat nízkomolekulární komplexy, jako např. Fe-NTA, Fe-citrát nebo síran železno-amonný (Lehker and Alderete, 1992; Tachezy *et al.*, 1996). Růst *T. vaginalis* je stimulován také hemoglobinem, zatímco transferin množení tohoto prvoka nepodporuje (Lehker *et al.*, 1990). Naproti tomu buňky *T. foetus* jsou schopny transferinové železo využívat (Tachezy *et al.*, 1996). Rozdílná schopnost obou parazitů využívat železo z transferinu je patrně dána odlišnou lokalizací v urogenitálním traktu hostitele. Zatímco *T. foetus* napadá mimo jiné i dělohu, kde je prostředí bohaté na transferin, buňky *T. vaginalis* parazitují především v poševním prostředí, v němž se transferin nevyskytuje.

Trichomonády přijímají železo z laktoferinu pomocí specifických receptorů (Tachezy *et al.*, 1996; Grab *et al.*, 2001). Struktura laktoferinových receptorů nebyla doposud uspokojivě stanovena, pokusy o izolaci této molekuly pomocí afinitní chromatografie však naznačují, že se jedná o protein o relativní molekulové hmotnosti 155 kDa (Grab *et al.*, 2001). Experimenty s radioaktivně značeným laktoferinem provedené v naší laboratoři vedly k závěru, že je laktoferin buňkami *T. foetus* endocytován a železo se uvolňuje intracelulárně v endosomálním kompartmentu, kde nízké pH oslabuje vazbu mezi tímto kovem a laktoferinem (Tachezy *et al.*, 1996; Tachezy *et al.*, 1998). Inhibitory okyselení endosomů (NH₄Cl, chlorochin), které zvyšují pH těchto organel na hodnotu 6.0-6.4, způsobují inhibici akumulace železa z laktoferinu (Gregor *et al.*, 1996). Nízká hodnota této inhibice (20-30%) však ukazuje, že ke kompletnímu uvolnění železa z laktoferinu uvnitř buněk trichomonád jsou potřebné ještě další faktory. Experimenty *in vitro* prokázaly, že kromě nízkého pH je k odštěpení železa z laktoferinu nezbytná i přítomnost chelátorů (Mazurier and Spik, 1980). Proto nelze vyloučit, že látky s vysokou chelatační aktivitou zprostředkovávají uvolňování železa z tohoto proteinu také uvnitř lysosomů

trichomonád. Po uvolnění železa z laktoferinu je tento protein buňkami *T. foetus* recyklován (Tachezy *et al.*, 1996). Proteolytické štěpení laktoferinu, které vede k uvolnění železa z laktoferinu u savčích buněk (Mikogami *et al.*, 1994), nebylo u *T. foetus* pozorováno. Endocytózu laktoferinu a následné intracelulární uvolnění železa pozorovali u buněk *T. foetus* pomocí elektronové mikroskopie i další autoři (Affonso *et al.*, 1994; Affonso *et al.*, 1997). Odlišné výsledky publikovali Peterson a Alderete (1984) u *T. vaginalis*, kteří sledovali uvolňování železa už na povrchu buňky.

Železo z transferinu získávají buňky *T. foetus* pomocí mechanismu, který je nezávislý na specifických receptorech. Prvním krokem tohoto mechanismu je extracelulární uvolnění železa z transferinu v důsledku nízkého pH prostředí, které je trichomonádami vytvářeno (Pindak *et al.*, 1993; Tachezy *et al.*, 1996) a vlivem extracelulární redukce zprostředkované NADH-závislou ferrireduktázovou aktivitou nebo nízkomolekulárními redukčními agens (Tachezy *et al.*, 1998). Redukované železo je poté transportováno do cytoplazmy pomocí aktivního mechanismu založeného pravděpodobně na specifických membránových přenašečích (Tachezy *et al.*, 1998). Pomocí membránových přenašečů je patrně akumulováno i železo z nízkomolekulárních zdrojů (Tachezy *et al.*, 1998).

Mechanismus příjmu hemového železa z hemoglobinu, který jsou trichomonády schopny vázat na svůj povrch, není doposud zcela objasněn. Schopnost buněk *T. vaginalis* využívat hemové železo je pravděpodobně závislá na jejich hemolytické aktivitě, která vede k uvolňování hemoglobinu z okolních erytrocytů (Dailey *et al.*, 1990). Většina autorů se domnívá, že se jedná o lyzi závislou na přímém kontaktu erytrocytů s trichomonádami (Dailey *et al.*, 1990; Fiori *et al.*, 1997). Některé studie však naznačují, že k lyzi erytrocytů může docházet i bez přímého kontaktu buněk, např. vlivem nízkého pH vytvářeného v bezprostředním okolí trichomonád (Pindak *et al.*, 1993). Vedle vazby hemového železa byla u buněk *T. vaginalis* pozorována také specifická vazba a následná internalizace celých erytrocytů (Lehker *et al.*, 1990). Intracelulární lyze je tedy pravděpodobně další možností, jak mohou trichomonády rozrušovat krvinky a uvolňovat hem vázaný v těchto buňkách.

Důležitým krokem v metabolismu železa je jeho intracelulární transport. Protože dosud není u trichomonád ani u jiných eukaryotických buněk známo, jakým způsobem je železo transportováno v cytosolu a jaké mechanismy se uplatňují při vstupu tohoto kovu do buněčných organel, zvolili jsme pro studium intracelulárního transportu železa u *T. foetus* v naší laboratoři metodiku sledování inkorporace železa ^{59}Fe do molekul jednotlivých subcelulárních frakcí pomocí nativní elektroforézy (Vyoral and Petrák, 1996; Suchan *et*

al., 2003). Pomocí této techniky jsme v cytoplazmě buněk *T. foetus* inkubovaných s ^{59}Fe -NTA identifikovali několik molekul obsahujících železo, z nichž nejvýraznější byla označena jako „Band C“ (Suchan *et al.*, 2003). Další významnou složkou, která byla v cytoplazmě detekována, je labilně vázané intracelulární železo- LIP (Vyoral *et al.*, 1998; Suchan *et al.*, 2003) představované silným difúzním proužkem v čele elektroforézy. Následná charakterizace této složky prokázala, že se jedná o formu železa chelatovatelnou silnými chelátory, která je v buňce z větší části vázána na směs molekul o relativní molekulové hmotnosti 5-30 kDa. U trichomonád i dalších anaerobních prvoků zaujímá LIP výrazně větší část z celkového množství železa než u savčích buněk (Suchan *et al.*, 2003). Silné zastoupení labilně vázaného železa u prvoků může souviset s nepřítomností feritinu a používáním LIPu jako alternativní intracelulární zásobárny železa u této skupiny organismů.

Jednou z hlavních cílových organel, do nichž je železo směřováno, jsou hydrogenosomy (Suchan *et al.*, 2003). Hlavní funkcí těchto organel, které se nacházejí pouze u trichomonád a několika dalších anaerobních mikroorganismů, je tvorba ATP za anaerobních podmínek (Müller, 1993). Metabolismu hydrogenosomů se účastní tři známé Fe-S proteiny: feredoxin přenášející elektrony, pyruvát:feredoxin oxidoreduktáza zodpovědná za oxidativní dekarboxylaci pyruvátu a hydrogenáza, která katalyzuje syntézu molekulárního vodíku. Důležitost hydrogenosomů pro metabolismus železa u trichomonád naznačuje i extrémně vysoká koncentrace železa v těchto organelách (4× vyšší než v cytosolu) měřená pomocí atomové absorpční spektrofotometrie (Suchan *et al.*, 2003). Analýza inkorporace železa do hydrogenosomů prokázala, že železo je v této organelě vázáno nejméně devíti molekulami, z nichž nejvýraznější byla označena jako „band H-I“. Sekvence aminokyselin N-terminálního konce tohoto proteinu prokázala, že se jedná o feredoxin (Suchan *et al.*, 2003). Vysoká zastoupenost tohoto proteinu v hydrogenosomu naznačuje, že funkcí feredoxinu nemusí být pouze přenos elektronů, ale že by se tento protein mohl v hydrogenosomu uplatňovat i při dalších procesech, které souvisí s metabolismem železa, jako je např. syntéza nebo uchovávání Fe-S center.

Řada autorů pozorovala vliv železa v prostředí na aktivitu hydrogenosomálních enzymů a regulaci jejich exprese u *T. vaginalis* (Peterson and Alderete, 1984; Gorell, 1985) i u *T. foetus* (Tachezy *et al.*, 1996; Vaňáčková *et al.*, 2001). Při nedostatku železa v prostředí dochází u obou druhů trichomonád ke snížení aktivity Fe-S proteinů pyruvát:feredoxin oxidoreduktázy a hydrogenázy a snížení hladiny Fe-S skupin odpovídajících feredoxinu, ale také ke snížení aktivity enzymu malátdehydrogenázy

(dekarboxylující), který železo pro svou aktivitu nepotřebuje (Vaňáčová *et al.*, 2001). Snížení aktivit uvedených proteinů není způsobeno pouze nedostatkem železa pro tvorbu Fe-S center, jak se původně předpokládalo, ale spíše celkovým snížením koncentrace proteinů vlivem omezené transkripce mRNA kódujících příslušné bílkoviny (Vaňáčová *et al.*, 2001).

Drмота *et al.* (1996) ukázali, že železo ovlivňuje funkci hydrogenosomálních bílkovin i na posttranslační úrovni. Dvojmocné železo se může alternativně vázat na specifickou sekvenci polypeptidového řetězce malátdehydrogenázy (dekarboxylující) a vést tím k rozštěpení proteinu a ztrátě enzymatické aktivity. Ta je za normálních podmínek stabilizována vazbou kationtů Mn^{2+} a Mg^{2+} na stejné regulační místo.

Podle některých autorů (Arroyo *et al.*, 1992; Tsai *et al.*, 2002) železo reguluje expresi adhezinů na povrchu trichomonád. Tyto proteiny, označené jako AP65, AP51, AP33 a AP23 jsou podle autorů důležitým faktorem virulence *T. vaginalis*. Sekvence genů kódujících tyto proteiny překvapivě ukázala, že gen pro AP65 je homologní s genem kódujícím hydrogenosomální malátdehydrogenázu (dekarboxylující) (Alderete *et al.*, 1995), zatímco AP33 je identický s α - a AP51 s β - subjednotkou hydrogenosomální sukcinát-CoA ligázy (Alderete *et al.*, 1998). Rapelli a kol. (1995) nezávisle identifikovali sekretovaný adhezin označený jako P65, jehož sekvence byla také identická s hydrogenosomální malátdehydrogenázou (dekarboxylující). Jiné studie založené na elektronmikroskopickém pozorování buněk trichomonád však prokázaly přítomnost enzymů odpovídajících adhezinům pouze uvnitř hydrogenosomů (Drmotа *et al.*, 1996; Brugerolle *et al.*, 2000). Porovnání enzymatické aktivity malátdehydrogenázy (dekarboxylující) přisuzované sekretovanému P65 s aktivitou enzymu izolovaného z hydrogenosomů ukázalo další nejasnosti týkající se využívání kofaktorů (Addis *et al.*, 1997; Doležal - diplomová práce, 2000). Zdá se tedy, že geny kódující skutečné adheziny bude třeba ještě identifikovat.

Podobně byla prokázána i úloha železa v regulaci exprese proteinů zodpovědných za adhezi na fibronektin (Crouch *et al.*, 2001) a mucin (Lehker and Sweeney, 1999) a v modulaci povrchové exprese a fosforylace antigenu P270 u kmenů *T. vaginalis* nesoucích dsRNA virus (Alderete, 1999).

1.7.5. Améby

Entamoeba histolytica je jediným zástupcem améb, u něž byl metabolismus železa studován. Tento anaerobní prvek nemá hydrogenosomy ani mitochondrie, v jeho energetickém metabolismu však přesto hrají důležitou roli Fe-S proteiny (Weinbach *et al.*, 1976; Weinbach *et al.*, 1980). Nutriční nároky *E. histolytica* na železo by tedy mohly být dost vysoké, jak původně naznačovaly experimenty Latoura a Reeve (1965). Trofozoiti tohoto prvoka vyžadovaly pro dosažení maximálního růstu *in vitro* 44 μM koncentraci železa v prostředí. Tyto výsledky však mohou být zpochybnitelné, neboť v experimentech nebyla použita axenická kultura tohoto prvoka, ale kultura monoxenická (*E. histolytica* společně s *Bacterioides symbiosus*). Zajímavé výsledky přinesly pozdější pokusy Smithe a Meerovitche (1982) s axenickou kulturou améb, které vedly k závěru, že *E. histolytica* je schopná využít z prostředí během 48 hodin kultivace méně než 2 μM železa.

Améby jsou schopny využívat jako zdroj železa nízkomolekulární komplexy (Latour and Reeves, 1965; Smith and Meerovitch, 1982; Suchan *et al.*, 2003) a pravděpodobně také feritin (Diamond *et al.*, 1978) a hemoglobin (Serrano-Luna *et al.*, 1998). Reyes-Lopez a kol. (2001) identifikovali na povrchu améb dva proteiny o relativní molekulové hmotnosti 70 a 140 kDa, které mohou vázat lidský transferin. Dále ukázali, že po navázání transferinu na vazebné proteiny je komplex endocytován do buňky. Vazba transferinu na povrch *E. histolytica* ani následná internalizace však nebyla potvrzena pomocí konfokální ani elektronové mikroskopie (Batista *et al.*, 2000). Pokusy se stimulací růstu améb pomocí železa vázaného na transferin rovněž ukázaly, že železo v této formě pravděpodobně není pro améby využitelné (Suchan *et al.*, 2003). Pro objasnění, zda je transferin vhodným zdrojem železa pro améby, bude tedy nezbytné získat více experimentálních podkladů.

1.7.6. Giardie

Giardie patří také mezi anaerobní prvoky postrádající hydrogenosomy i mitochondrie, v jejichž energetickém metabolismu přesto hrají důležitou roli Fe-S proteiny (Müller, 1992). Fe-S centra jsou u giardií pravděpodobně skládána podobným způsobem jako u ostatních eukaryotických buněk. U *G. intestinalis* byl identifikován gen GiiscS, který je homologní

s cysteindesulfurázou IscS. Tento gen však neobsahuje N-terminální vedoucí sekvenci a k biosyntéze Fe-S center tedy pravděpodobně dochází v cytoplazmě (Tachezy *et al.*, 2001).

Pro příjem železa používají giardie nízkomolekulární komplexy, které jsou v trávicím traktu snadno dostupné. Naproti tomu transferin ani laktoferin nestimuluje růst tohoto prvoka (Suchan *et al.*, 2003). Laktoferin se navíc silně váže na povrch giardií a působí tak toxicky (Turchany *et al.*, 1997). Vlastní mechanismy uplatňující se při příjmu železa u giardií však doposud nebyly objasněny. Sledování inkorporace železa do buněk giardií prováděná v naší laboratoři prokázala, že využitelnost železa z různých zdrojů je v přímé souvislosti se schopností giardií inkorporovat tento prvek do složky labilního železa (Suchan *et al.*, 2003). Více informací o metabolismu železa u giardií však zatím není k dispozici.

1.8. Vliv železa na virulenci mikroorganismů

Schopnost získávat železo od hostitelů patří mezi nejdůležitější virulenční faktory mikroorganismů. V řadě studií bylo prokázáno, že experimentální podávání železa laboratorním zvířatům vede ke stimulaci virulence patogenních bakterií v nich parazitujících (např. *Clostridium perfringens*, *Pasteurella septica*, *Yersinia pestis*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus*) (Finkelstein *et al.*, 1983; Weinberg, 1984). Srovnatelné výsledky byly získány i v experimentech s parazitickými prvky. Intraperitoneální a intramuskulární aplikace nízkomolekulárních komplexů železa zvyšovala infektivitu a mortalitu myši infikovaných intraperitoneálně *T. foetus* (Kulda *et al.*, 1999). Parenterální i alimentární podávání železa ve formě Fe^{2+} -glukonátu nebo citrátu železito-amonného stimuluje invazivitu trofozoitů *E. histolytica* a tvorbu jaterních abscesů u experimentálně infikovaných křečků (Diamond *et al.*, 1978). Intraperitoneální podávání železa ve formě Fe^{3+} -dextran zvyšuje parazitémii *T. cruzi* u myši (Pedrosa *et al.*, 1993). Intramuskulární aplikace tohoto komplexu stimuluje také infekci *P. berghei* u experimentálně nakažených kryš (Murray *et al.*, 1975).

Řada autorů popisuje vztah mezi hladinou železa v těle a zvýšeným rizikem infekce pro lidského hostitele (Brock, 1994; Weinberg, 1995b). Např. u mužů z afrického kmene Zulu byla pozorována zvýšená incidence amébiázy, která pravděpodobně souvisí s faktem, že muži z této skupiny trpí často siderózou. Tato porucha je zřejmě způsobena místním zvykem pití piva, které obsahuje velké množství železa uvolněného z kovových nádob používaných při domácí výrobě tohoto nápoje (Diamond *et al.*, 1978). Pro nomády v Somálsku je naproti tomu typická snížená hladina železa v těle, která zaručuje vyšší odolnost tohoto etnika vůči infekcím způsobeným patogenními mikroorganismy. Naproti tomu orální podávání železa ve formě Fe_2SO_4 vede k mnohonásobnému zvýšení počtu infekcí jako je brucelóza, malárie nebo tuberkulóza (Stockman, 1981). Rovněž pacienti trpící hemochromatózou jsou senzitivnější k řadě infekcí, jako jsou např. nákazy *Vibrio vulnificus*, *Yersinia enterocolitica* a *Pasteurella pseudotuberculosis* (Brock, 1994). U pacientů s AIDS, kterým byly při profylaxi proti *Pneumocystis carinii* podávány léky v kombinaci se železem, byla také pozorována vyšší mortalita než u pacientů, kterým železo podáváno nebylo (Salmon-Céron *et al.*, 1995; Weinberg, 1996).

Jak je patrné z předešlých údajů, virulence mikroorganismů je ovlivňována dostupností železa v hostiteli. V případě, kdy je železo v hostiteli snadno dostupné, se může projevit patogenita organismů, které nejsou za normálních podmínek vůbec nebo jen slabě virulentní. Důležitou roli ve virulenci mikroorganismů hrají také mechanismy, které se uplatňují při odebírání hostitelova železa. Nejznámějším příkladem je vztah virulence bakterií produkujících siderofory (*E. coli*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio cholerae*, rody *Enterobacter*, *Shigella*) a přítomnosti některých plasmidů, které obsahují geny zodpovědné za syntézu a transport sideroforů zvyhodňujících patogeny v kompetici o hostitelovo železo (Williams, 1979; Goldberg *et al.*, 1991). U mikroorganismů nesyntetizujících siderofory byl vztah mezi virulencí a mechanismy, které se uplatňují při získávání železa, detailněji studován u buněk parazitického prvoka *T. foetus* inokulovaných do břišní dutiny myši (Kulda *et al.*, 1999). U myši, které byly infikovány silně virulentním kmenem Lub-1, se trichomonády začaly množit bezprostředně po inokulaci do břišní dutiny a infekce měla smrtelný průběh. Stejný průběh infekce byl však pozorován i u slabě virulentního kmene KV1-V, pokud bylo myším současně intraperitoneálně nebo intramuskulárně podáváno železo. Studium schopnosti obou kmenů získávat železo z různých zdrojů ukázalo, že virulentní kmen Lub-1 je v porovnání s kmenem KV1-V schopen účinněji akumulovat železo z transferinu a nízkomolekulárních zdrojů, zatímco akumulace železa z laktoferinu je u obou kmenů srovnatelná. To odpovídá jak přirozené situaci v uteru dobytka, kde je transferin hlavním zdrojem železa, tak experimentálně navozenému přebytku železa v myším modelu.

1.9. Závěr

Metabolismus železa, který zahrnuje příjem tohoto kovu, jeho další buněčné zpracování a s tím související regulační mechanismy, je v současné době považován za jednu z klíčových problematik v rámci studia metabolismu buňky. Je tomu zejména díky zjištěním, která prokázaly zásadní úlohu železa v regulaci exprese proteinů souvisejících přímo s metabolismem tohoto kovu, ale také úlohu v regulaci Krebsova cyklu a následně i celého energetického metabolismu buňky, a v neposlední řadě v regulaci syntézy nukleových kyselin. Studium metabolismu železa prošlo v poslední době velmi rychlým vývojem. Teprve nedávno se podařilo objasnit mechanismy účastnící se transportu tohoto kovu přes cytoplazmatickou membránu, které dále osvětlily procesy uplatňující se při importu a exportu železa z buňky. Přesto však stále ještě existuje řada nezodpovězených otázek, jako je např. molekulární podstata intracelulárního mobilního železa a způsob, jakým probíhá transport železa v buňce. Také studium metabolismu železa u parazitických prvoků je teprve na svém počátku. Právě proto však může přinést nové a zajímavé informace. Jelikož se jedná o evolučně staré organismy (trichomonády, giardie), mohli bychom poznat původní mechanismy uplatňující se při příjmu železa a jeho zpracování. Anaerobní prvoci jsou vhodným modelem také díky extrémně vysokým nutričním nárokům na železo a velkému množství labilně vázaného železa v buňce. Zájem si určitě zaslouží i studium vlivu železa na biogenezi a funkci hydrogenosomů, organel, které obsahují řadu Fe-S proteinů. Díky unikátním vlastnostem metabolismu anaerobních prvoků lze předpokládat, že by nalezení rozdílů v metabolismu železa těchto organismů a jejich hostitelů (zejména člověka) mohlo přispět k vývoji nových léčiv proti chorobám, způsobeným těmito patogeny.

1.10. Literatura

- Aboud, S. and Haile, D.J. 2000. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J.Biol.Chem.* **275**, 19906-19912
- Abraham, N.G., Levere, R.D., and Lutton, J.D. 1991. Eclectic mechanism of heme regulation of hematopoiesis. *Int.J.Cell Cloning* **9**, 185-210
- Adamec, J., Rusnak, F., Owen, W.G., Naylor, S., Benson, L.M., Gacy, A.M., and Isaya, G. 2000. Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: implications for Friedreich ataxia. *Am.J.Hum.Genet.* **67**, 549-562
- Adams, M.L., Ostapiuk, I., and Grasso, J.A. 1989 The effect of inhibition of heme synthesis on the intracellular localization of iron in rat reticulocytes. *Biochim.Biophys.Acta* **1012**, 243-253
- Adams, T.J., Vartivarian, S., and Cowart, R.E. 1990. Iron acquisition systems of *Listeria monocytogenes*. *Infect.Immun.* **58**, 2715-2718
- Addis, M.F., Rappelli, P., Cappuccinelli, P., and Fiori, P.L. 1997. Extracellular release by *Trichomonas vaginalis* of a NADP⁺ dependent malic enzyme involved in pathogenicity. *Microb.Pathog.* **23**, 55-61
- Adinolfi, S., Trifuoggi, M., Politou, A.S., Martin, S., and Pastore, A. 2002. A structural approach to understanding the iron-binding properties of phylogenetically different frataxins. *Hum.Mol.Genet.* **11**, 1865-1877
- Affonso, A.L., Benchimol, M., Ribeiro, K.C., Lins, U., and de Souza, W. 1994. Further studies on the endocytic activity of *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol.Res.* **80**, 403-413
- Affonso, A.L., de Almeida, J.C., and Benchimol, M. 1997. Partial characterization of cytoplasmic compartments involved in the endocytic process of *Tritrichomonas foetus*. *Eur.J.Cell.Biol.* **72**, 247-256
- Agar, J.N., Krebs, C., Frazzon, J., Huynh, B.H., Dean, D.R., and Johnson, M.K. 2000. IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU. *Biochemistry* **39**, 7856-7862
- Aisen, P., Aasa, R., Malmström, B.G., and Vänngård, T. 1967. Bicarbonate and the binding of iron to transferrin. *J.Biol.Chem.* **242**, 2484-2490
- Aisen, P. and Leibman, A. 1972. Lactoferrin and transferrin: a comparative study. *Biochim.Biophys.Acta* **257**, 314-323
- Aisen, P. 1984. Transferrin metabolism and the liver. *Seminars in liver disease* **4**, 193-206
- Alderete, J.F., O'Brien, J.L., Arroyo, R., Enbring, J.A., Musatovova, O., Lopez, O., Lauriano, C., and Nguyen, J. 1995. Cloning and molecular characterization of two genes encoding adhesion proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Mol.Microbiol.* **17**, 69-83
- Alderete, J.F., Enbring, J.A., Lauriano, C.M., and O'Brien, J.L. 1998. Only two of the *Trichomonas vaginalis* triplet AP51 adhesins are regulated by iron. *Microb.Pathog.* **24**, 1-16
- Alderete, J.F. 1999. Iron modulates phenotypic variation and phosphorylation of P270 in double-stranded RNA virus-infected *Trichomonas vaginalis*. *Infect.Immun.* **67**, 4298-4302

- Alemaný, R., Vila, M.R., Franci, C., Egea, G., Real, F.X., and Thomson, T.M. 1993. Glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring of melanotransferrin (p97): apical compartmentalization in intestinal epithelial cells. *J.Cell.Sci.* **104**, 1155-1162
- Anderson, G.J., Frazer, D.M., Wilkins, S.J., Becker, E.M., Millard, K.N., Murphy, T.L., McKie, A.T., and Vulpe, C.D. 2002. Relationship between intestinal iron-transporter expression, hepatic hepcidin levels and the control of iron absorption. *Biochem.Soc.Trans.* **30**, 724-726
- Andrews, S.C., Findlay, J.B., Guest, J.R., Harrison, P.M., Keen, J.N., and Smith, J.M. 1991. Physical, chemical and immunological properties of the bacterioferritins of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Azotobacter vinelandii*. *Biochim.Biophys.Acta* **1078**, 111-116
- Arroyo, R., Enbring, J., and Alderete, J.F. 1992. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Mol.Microbiol.* **6**, 853-862
- Askwith, C., Eide, D., Van Ho, A., Bernard, P.S., Li, L., Davis-Kaplan, S., Sipe, D.M., and Kaplan, J. 1994. The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell* **76**, 403-410
- Askwith, C., and Kaplan, J. 1997. An oxidase-permease-based iron transport in *Schizosaccharomyces pombe* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **272**, 401-405
- Baba, A., May, M.E., and Fish, W.W. (1977). The properties of *Corbicula sandai* apoferritin. *Biochim.Biophys.Acta* **491**, 491-496
- Babcock, M., de Silva, D., Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S., Montermini, L., Pandolfo, M., and Kaplan, J. 1997. Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1, a putative homolog of frataxin. *Science* **276**, 1709-1712
- Batey, R.G., Fong, P.L.C., Shamir, S., and Sherlock, S. 1980. A non-transferrin-bound serum iron in idiopathic hemochromatosis. *Digestive Diseases and Sciences* **25**, 340-346
- Batista, E.J., de Menezes Feitosa, L.F., and de Souza, W. 2000. The endocytic pathway in *Entamoeba histolytica*. *Parasitol.Res.* **86**, 881-890
- Bezkorovainy, A. and Solberg, L. 1993. Ferrous iron uptake by *Bifidobacterium breve*. *Biol.Trace Elem.Res.* **20**, 251-267
- Bitter, W., Gerritis, H., Kieft, R., and Borst, P. 1998. The role of transferrin-receptor variation in the host range *Trypanosoma brucei*. *Nature* **391**, 499-502
- Blackburn, G.W. and Morgan, E.H. 1977. Factors affecting iron and transferrin release from rabbit reticulocyte ghosts to cytosol. *Biochim.Biophys.Acta* **497**, 728-744
- Böhnke, R. and Mazantke, B.F. 1995. The mobile ferrous pool in *Escherichia coli* is bound to a phosphorylated sugar derivative. *Biometals* **8**, 223-230
- Borges, V.M., Vannier-Santos, M.A., and de Souza, W. 1998. Subverted transferrin trafficking in Leishmania-infected macrophages. *Parasitol.Res.* **84**, 811-822
- Borst, P. 1991. Transferrin receptors, antigenic variation and the prospect of trypanosome vaccine. *Trends in Genetics* **7**, 307-309
- Borst, P., Rudenko, G., Taylor, M.C., Blundell, P.A., Van Leeuwen, F., Bitter, W., Cross, M., and McCulloch, R. 1996. Antigenic variation in trypanosomes. *Arch.Med.Res.* **27**, 379-388
- Bothwell, T.H., Charlton, R.W., Cook, J.D., and Finch, C.A. 1979. Metabolism of Iron in Human Body. In: Bothwell, T.H. editor, Iron Metabolism in man, pp. 1-576. Oxford, Blackwell

- Breidbach, T., Scory, S., Krauth-Siegel, R.L., and Steverding, D. 2002. Growth inhibition of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* by the iron chelator deferoxamine. *Int.J.Parasitol.* **32**, 473-479
- Brian, W.J., Mauchline, W.S., Dennis, P.J., and Keevil, C.W. 1997. A study of iron acquisition mechanism of *Legionella pneumophila* grown in chemostat culture. *Curr.Microbiol.* **34**, 238-243
- Britigan, B.E., Lewis, T.S., McCormick, M.L., and Wilson, M.E. 1998. Evidence for the existence of a surface receptor for ferriclactoferrin and ferritransferrin associated with the plasma membrane of the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Adv.Exp.Med.Biol.* **443**, 135-140
- Brock, J.H. 1994. Iron in infection, immunity, inflammation and neoplasia. In: Brock, J. H., Halliday, J. V., Pippard, M. J., and Powel, L. editors, *Iron Metabolism in Health and Disease*, pp. 353-389. London, W. B. Saunders Company
- Brown, J.P., Hewick, R.M., Hellstrom, I., Hellstrom, K.E., Doolittle, R.F., and Dreyer, W.J. 1982. Human melanoma-associated antigen p97 is structurally and functionally related to transferrin. *Nature* **296**, 171-173
- Brugerolle, G., Bricheux, G., and Coffe, G. 2000. Immunolocalization of two hydrogenosomal enzymes of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol.Res.* **86**, 30-35
- Bullen, J.J. 1981. The significance of iron in infection. *Reviews of Infectious Diseases* **3**, 1127-1138
- Camakaris, J., Voskoboinik, I., and Mercer, J.F. 1999. Molecular mechanism of copper homeostasis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **261**, 225-232
- Camaschella, C., Roetto, A., Cali, A., De Gobbi, M., Garozzo, G., Carella, M., Majorano, N., Totaro, A., and Gasparini, P. 2000. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat.Genet.* **25**, 14 -15
- Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M.D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., and Monticelli, A. 1996. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* **271**, 1423-1427
- Campuzano, V., Montermini, L., Lutz, Y., Cova, L., Hindelang, C., Jiralerspong, S., Trottier, Y., Kish, S.J., Fauchoux, B., and Trouillas, P. 1997. Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum.Mol.Genet.* **6**, 1771-1780
- Cannone-Hergaux, F., Gruenheid, S., Ponka, P., and Gros, P. 1999. Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood* **12**, 4406-4417
- Cellier, M., Prive, G., Belouchi, A., Kwan, T., Rodrigues, V., Chia, W., and Gros, P. 1995. Nramp defines a family of membrane proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**, 10089-10093
- Coppens, I., Opperdoes, F.R., Courtoy, P.J., and Baudhin, P. 1987. Receptor-mediated endocytosis in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *J.Protozool.* **34**, 465-473
- Cornelissen, C.N., Biswas, G.D., Tsai, J., Paruchuri, D.K., Thompson, S.A., and Sparling, P.F. 1992. Gonococcal transferrin-binding protein 1 is required for transferrin utilization and is homologous to TonB-dependent outer membrane receptors. *J.Bacteriol.* **174**, 5788-5797
- Corsi, B., Cozzi, A., Arosio, P., Drysdale, J., Santambrogio, P., Campanella, A., Biasiotto, G., Albertini, A., and Levi, S. 2002. Human mitochondrial ferritin expressed in HeLa cells incorporates iron and affects cellular iron metabolism. *J.Biol.Chem.* **277**, 22430-22437

- Cox, T.C., Bawden, M.J., Martin, A., and May, B.K. 1991. Human erythroid 5-aminolevulinate synthase: promoter analysis and identification of an iron-responsive element in the mRNA. *EMBO J.* **10**, 1891-1902
- Crichton, R. 1990. Proteins of iron transport and storage. *Adv.Prot.Chem.* **40**, 281-363
- Crichton, R.R. 1991a. Solution chemistry of iron in biological media. *In: Burgess, J. editor, Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism*, pp. 13-28. Ellis Horwood series in inorganic chemistry, New York, Ellis Horwood
- Crichton, R.R. 1991b. The importance of iron for biological systems. *In: Burgess, J. editor, Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism*, pp. 29-58. Ellis Horwood series in inorganic chemistry, New York, Ellis Horwood
- Crichton, R.R. 1991c. Microbial iron uptake and intracellular release. *In: Burgess, J. editor, Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism*, pp. 59-76. Ellis Horwood series in inorganic chemistry, New York, Ellis Horwood
- Crosa, J.H. 1989. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbial.Rev.* **53**, 517-530
- Crosa, J.H. 1997. Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**, 319-336
- Crouch, M.L., Benchimol, M., and Alderete, J.F. 2001. Binding of fibronectin by *Trichomonas vaginalis* is influenced by iron and calcium. *Microb.Pathog.* **31**, 131-144
- Cupp-Vickery, J.R and Vickery, L.E. 2000. Crystal structure of Hsc20, a J-type co-chaperone from *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.* **304**, 835-845
- Dailey, D.C, Chang, T.H., and Alderete, J.F. 1990. Characterization of *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Parasitology* **101 Pt 2**, 171-175
- Dancis, A., Klausner, R.D., Hinnebusch, A.G., and Barriocanal, J.G. 1990. Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell.Biol.* **10**, 2294-2301
- da Silva, D.M., Askwith, C.C., and Kaplan, J. 1996. Molecular mechanisms of iron uptake in eukaryotes. *Physiol.Rev.* **76**, 31-47
- de Capurro, M., Iughetti, P., Ribolla, P.E., and de Bianchi, A.G. 1996. *Musca domestica* hemolymph ferritin. *Arch.Insect.Biochem.Physiol.* **32**, 197-207
- Desai, P. J., Nzeribe, N., and Genco, C. A. 1995. Binding and accumulation of hemin in *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect.Immun.* **63**, 4634-4641
- Devalia, V., Carter, K., Walker, A.P., Perkins, S.J., Worwood, M., May, A., and Dooley, J.S. 2002. Autosomal dominant reticuloendothelial iron overload associated with a 3-base pair deletion in the ferroportin 1 gene (SLC11A3). *Blood* **100**, 695-697
- Dhe-Paganon, S., Shigeta, R., Chi, Y.I., Ristow, M., and Shoelson, S.E. 2000. Crystal structure of human frataxin. *J.Biol.Chem.* **275**, 30753-30756
- Diamond, L.S., Harlow, D.R., Phillips, B.P., and Keister, D.B. 1978. *Entamoeba histolytica*: iron and nutritional immunity. *Arch.Invest.Med. (Mex.)* **9**, 329-338
- Dix, D., Bridgham, J., Broderius, M., and Eide, D. 1997. Characterization of the FET4 protein of yeast-evidence for a direct role in the transport of iron. *J.Biol.Chem.* **272**, 11770-11777

- Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S.J., Moynihan, J., Paw, B.H., Drejer, A., Barut, B., Zapata, A., Law, T.C., Brugnara, C., Lux, S.E., Pinkus, G.S., Pinkus, J.L., Kingsley, P.D., Palis, J., Fleming, M.D., Andrews, N.C., and Zon, L.I. 2000. Positional cloning of zebrafish ferroportin 1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* **403**, 776-781
- Dormeyer, M., Schoneck, R., Dittmar, G.A., and Krauth-Siegel, R.L. 1997. Cloning, sequencing and expression of ribonucleotide reductase R2 from *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett.* **414**, 449-453
- Drmota, T., Proost, P., Van Ranst, M., Weyda, F., Kulda, J., and Tachezy, J. 1996. Iron-ascorbate cleaveable malic enzyme from hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*: purification and characterization. *Mol.Biochem.Parasitol.* **83**, 221-234
- Dupic, F., Fruchon, S., Bensaid, M., Loreal, O., Brissot, P., Borot, N., Roth, M.P., and Coppin, H. 2002. Duodenal mRNA expression of iron related genes in response to iron loading and iron deficiency in four strains of mice. *Gut* **51**, 648-653
- Dyer, D.W., West, E.P., and Sparling, P.F. 1987. Effects of serum carrier proteins on the growth of pathogenic *Neisseria* with haem-bound iron. *Infect.Immun.* **55**, 2171-2175
- Egyed, A. 1988. Carrier mediated iron transport through erythroid cell membrane. *Br.J.Haematol.* **68**, 483-486
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J., and Guerinot, M.L. 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**, 5624-5628
- Ellis, K.E.S., Clough, B., Saldanha, J.W., and Wilson, R.J.M. 2001. NifS and SufS in malaria. *Mol.Microbiol.* **41**, 973-981
- Evans, S.L., Arceneaux, J.E.L., Martin, M.E., and Aranha, H. 1986. Ferrous iron transport in *Streptococcus mutans*. *J.Bacteriol.* **168**, 1096-1099
- Evans, D.J., Evans, D.J. Jr., Lampert, H.C., and Nakano, H. 1995. Identification of four new prokaryotic bacterioferritins, from *Helicobacter pylori*, *Anabaena variabilis*, *Bacillus subtilis* and *Treponema pallidum* by analysis of gene sequences. *Gene* **153**, 123-127
- Fairlamb, A.H. and Bowman, I.B.R. 1977. The isolation and characterization of particulate sn-glycerol-3-phosphate oxidase from *Trypanosoma brucei*. *Int.J.Biochem.* **8**, 659-668
- Fast, B., Kremp, K., Boshart, M., and Steverding, D. 1999. Iron-dependent regulation of transferrin receptor expression in *Trypanosoma brucei*. *Biochem.J.* **342**, 691-696
- Feder, J. N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D.A., Basava, A., Dormishian, F., Domingo, R. Jr., Ellis, M.C., Fullan, A., Hinton, L.M., Jones, N.L., Kimmel, B.E., Kronmal, G.S., Lauer, P., Lee, V.K., Loeb, D.B., Mapa, F.A., McClelland, E., Meyer, N.C., Mintier, G.A., Moeller, N., Moore, T., Morikang, E., and Wolff, R.K. 1996. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat.Genet.* **13**, 399-408
- Feder, J. N., Tsuchihashi, Z., Irrinki, A., Lee, V.K., Mapa, F.A., Morikang, E., Prass, C.E., Starnes, S.M., Wolff, R.K., Parkkila, S., Sly, W.S., and Schatzman, R.C. 1997. The hemochromatosis founder mutation in HLA-I disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. *J.Biol.Chem.* **272**, 14025-14028
- Feder, J. N., Penny, D.M., Irrinki, A., Lee, V.K., Lebron, J.A., Watson, N., Tsuchihashi, Z., Sigal, E., Bjorkman, P.J., and Schatzman, R.C. 1998. The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**, 1472-1477
- Fenchel, T. and Finlay, B.J. 1994. The evolution of live without oxygen. *American Scientist* **82**, 22-29

- Finkelstein, R.A., Sciortino, C.V., and McIntosh, M.A. 1983. Role of iron in microbe-host interactions. *Reviews of Infectious Diseases* **5**, 759-777
- Fiori, P.L., Rappelli, P., Addis, M.P., Mannu, F., and Cappuccinelli, P. 1997. Contact- dependent disruption of the host cell membrane skeleton induced by *Trichomonas vaginalis*. *Infect.Immun.* **65**, 5142-5148
- Fleming, M.D., Trenor, C.C., Su, M.A., Foernzler, D., Beier, D.R., Dietrich, W.F., and Andrews, N.C. 1997. Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat.Genet.* **16**, 383-386
- Fleming, M.D., Romano, M.A., Su, M.A., Garrick, L.M., Garrick, M.D., and Andrews, M.C. 1998. 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.* **95**, 1148-1153
- Fleming, R.E., Migas, M.C., Holden, C.C., Waheed, A., Britton, R.S., Tomat, S., Bacon, B.R., and Sly, W.S. 2000. Transferrin receptor 2: continued expression in mouse liver, the face of iron overload and in hereditary hemochromatosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**, 2214-2219
- Fleming, R.E. and Sly, W.S. 2002. Mechanisms of iron accumulation in hereditary hemochromatosis. *Annu.Rev.Physiol.* **64**, 663-680
- Food, M.R., Rothensberger, S., Gabathuler, R., Haidl, I.D., Reid, G., and Jefferies, W.A. 1994. Transport and expression in human melanomas of a transferrin-like glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. *J.Biol.Chem.* **269**, 3034-3040
- Francis Jr., R.T., Booth, J.W., and Becker, R.R. 1984. Uptake of iron from hemoglobin and the haptoglobin-hemoglobin complex by hemolytic bacteria. *Int.J.Biochem.* **17**, 767-773
- Frazer, D.M., Vulpe, C. D., McKie, A.T., Wilkins, S.J., Trinder, D., Cleghorn, G.J., and Anderson, G.J. 2001. Cloning and gastrointestinal expression of rat hephaestin: relationship to other iron proteins. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver.Physiol.* **281**, G931-939
- Frazer, D.M., Wilkins, S.J., Becker, E.M., Vulpe, C. D., McKie, A.T., Trinder, D., and Anderson, G.J. 2002. Hepcidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology* **123**, 835-844
- Frazzon, J. and Dean, D.R. 2001. Feedback regulation of iron-sulfur cluster biosynthesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **98**, 14751-14753
- Frieden, E. 1968. The biochemistry of copper. *Sci.Am.* **218**, 103-114
- Fritsch, G., Treumer, J., Spira, D.T., and Jung, A. 1985. *Plasmodium vinckei*: suppression of mouse infection with desferrioxamine B. *Exp.Parasitol.* **60**, 171-174
- Frolow, F., Kalb, A. J., and Yariv, J. 1994. Structure of a unique twofold symmetric haem-binding site. *Nat.Struct.Biol.* **1**, 453-460
- Fry, M. 1989. Diferric transferrin reductase in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **158**, 469-473
- Fuchs, O., Borová, J., Hradílek, A., and Neuwirt, J. 1988. Non-transferrin donors of iron for heme synthesis in immature erythroid cells. *Biochim.Biophys.Acta* **969**, 158-166
- Gabay, T. and Ginsburg, H. 1993. Hemoglobin denaturation and iron release in acidified red blood cell lysate- a possible source of iron for inrearythrocytic malaria parasites. *Exp.Parasitol.* **77**, 261-272

- Gabay, T., Krugliak, M., Shalmiev, G., and Ginsburg, H. 1993. Inhibition by anti-malarial drugs of haemoglobin denaturation and iron release in acidified red blood cell lysates- a possible mechanism of their anti-malarial effect? *Parasitology* **108**, 371-381
- Gakh, O., Adamec, J., Gacy, A.M., Twesten, R.D., Owen, W.G., and Isaya, G. 2002. Physical evidence that yeast frataxin is an iron storage protein. *Biochemistry* **41**, 6798-6804
- Galbraith, R.A. and McElrath, M.J. 1988. Heme binding to *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **29**, 54
- Garrick, L.M., Gniecko, K., Liu, Y., Cohan, D.S., Grasso, J.A., and Garrick, M.D. 1993. Iron distribution in Belgrade rat reticulocytes after inhibition of heme synthesis with succinylacetone. *Blood* **81**, 3414-3421
- Georgatsou, E. and Alexandraki, D. 1994. Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell.Biol.* **14**, 3065-3073
- Gerlach, G.F., Klashinsky, S., Anderson, C., Potter, A.A., and Willson, P.J. 1992. Characterization of two genes encoding distinct transferrin-binding proteins in different *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *Infect.Immun.* **60**, 3253-3261
- Gerrits, H., Mussmann, R., Bitter, W., Kieft, R., and Borst, P. 2002. The physiological significance of transferrin receptor variations in *Trypanosoma brucei*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **119**, 237-247
- Goldberg, M.B., Boyko, S.A., and Calderwood, S.B. 1991. Positive transcriptional regulation of an iron-regulated virulence gene in *Vibrio cholerae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**, 1125-1129
- Gorrell, T.E. 1985. Effect of culture medium iron content on the biochemical composition and metabolism of *Trichomonas vaginalis*. *J.Bacteriol.* **161**, 1228-1230
- Grab, D.J., Wells, C.W., Shaw, M.K., Webster, P., and Russo, D.C. 1992. Endocytosed transferrin in African trypanosomes is delivered to lysosomes and may not be recycled. *Eur.J.Cell.Biol.* **59**, 398-404
- Grab, D.J., Lonsdale-Eccles, J.D., Oli, M.W., and Corbeil, L.B. 2001. Lactoferrin-binding proteins of *Tritrichomonas foetus*. *J.Parasitol.* **87**, 1064-1070
- Gray-Owen, S.D., Loosmore, S., and Schryvers, A.B. 1995. Identification and characterization of genes encoding the human transferrin-binding proteins from *Haemophilus influenzae*. *Infect.Immun.* **63**, 1201-1210
- Gregor, M., Tachezy J., and Slavík, J. 1996. The effect of lysosomal pH on lactoferrin-dependent iron uptake in *Tritrichomonas foetus*. In: Slavík, J. editor. *Fluorescent Probes and Fluorescent Microscopy*, pp. 95-99. New York, Plenum
- Grootveld, M., Bell, J.D., Halliwell, B., Aruoma, O.I., Bomford, A., and Sadler, P.J. 1989. Non-transferrin-bound iron in plasma or serum from patients with idiopathic hemochromatosis. *J.Biol.Chem.* **264**, 4417-4422
- Gruenheid, S., Cellier, M., Vidal, S., and Gros, P. 1995. Identification and characterization of a second mouse Nramp gene. *Genomics* **25**, 514-525
- Gruenheid, S. Canonne-Hergaux, F., Gauthier, S., Hackam, D.J., Grinstein, S., and Gros, P. 1999. The iron transport protein NRAMP2 is an integral membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes. *J.Exp.Med.* **189**, 831-841
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y, Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L., and Hediger, M.A. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **388**, 482-488

- Gunshin, H., Allerson, C.R., Polycarpou-Schwarz, M., Rolfs, A., Rogers, J.T., Kishi, F., Hentze, M.W., Rouault, T.A., Andrews, N.C., and Hediger, M.A. 2001. Iron-dependent regulation of the divalent metal ion transporter. *FEBS Lett.* **509**, 309-316
- Gutierrez, J.A., Yu, J., Rivera, S., and Wessling-Resnick, M. 1997. Functional expression, cloning and characterization of SFT, a stimulator of Fe transport. *J.Cell.Biol.* **139**, 895-905
- Gutierrez, J.A., Yu, J., and Wessling-Resnick, M. 1998. Characterization and chromosomal mapping of the human gene for SFT, a stimulator of Fe transport. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **253**, 739-42
- Gutteridge, J. M., Rowley, D.A., Griffiths, E., and Halliwell, B. 1985. Low-molecular-weight iron complexes and oxygen radical reactions in idiopathic haemochromatosis. *Clin.Sci.(Lond).* **68**, 463-467
- Hagiya, M., Francavilla, A., Polimeno, L., Ihara, I., Sakai, H., Seki, T., Shimonishi, M., Porter, K.A., and Starzl, T.E. 1994. Cloning and sequence analysis of the rat augments of liver regeneration (ALR) gene: expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**, 8142-8146
- Haile, D.J., Rouault, T.A., Tang, C.K., Chin, J., Harford, J.B., and Klausner, R.D. 1992. Reciprocal control of RNA-binding and aconitase activity in the regulation of the iron-responsive element binding protein: role of the iron-sulfur cluster. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**, 7536-7540
- Haldar, K., Henderson, C.L., and Cross, G.A.M. 1986. Identification of the parasite transferrin receptor of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and its acylation via 1,2-diacyl-*sn*-glycerol. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **83**, 8565-8569
- Han, O., Failla, M.J., Hill, A.D., Morris, E.R., and Smith, J.C. 1995. Reduction of Fe(III) is required for uptake of nonheme iron by Caco-2 cells. *J.Nutr.* **125**, 1291-1299
- Hantke, K. 1984. Cloning of the repressor protein gene of iron regulated system in *E. coli* K-12. *Mol.Gen.Genet.* **197**, 337-341
- Harding, A.E. 1981. Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain* **104**, 589-620
- Harris, D.C. and Aisen, P. 1989. Physical biochemistry of the transferrins. In: Loehr, T. M. editor, *Iron Carriers and Iron Proteins*, pp. 239-351. Physical Bionorganic Chemistry Series, New York, VCH Publishers
- Harris, Z.L., Durley, A.P., Man, T.K., and Gitlin, J.D. 1999. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**, 10812-10817
- Hasan, A.A., Holland, J., Smith, A., and Williams, P. 1997. Elemental iron does repress transferrin, haemopexin and haemoglobin receptor expression in *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microbiol.Lett.* **150**, 19-26
- Hayashi, A., Wada, Y., Suzuki, T., and Shimizu, A. 1993. Studies on familial hypotransferrinemia: unique clinical course and molecular pathology. *Am.J.Hum.Genet.* **53**, 201-213
- Hazell, T. 1985. Minerals in foods: dietary sources, chemical forms, interactions, bioavailability. *World Rev.Nutr.Diet.* **46**, 1-123
- Henderson, D.P. and Payne, S.M. 1993. Cloning and characterization of the *Vibrio cholerae* genes encoding the utilization of iron from haemin and haemoglobin. *Mol.Microbiol.* **7**, 461-469
- Henle, E.S., Luo, Y., Gassmann, W., and Linn, S. 1996. Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated fenton reactions. The deoxyguanosine family. *J.Biol.Chem.* **271**, 21177-21186

- Hentze, M.W., Caughman, S.W., Roualt, T.A., Barriocanal, J.G., Dancis, A., Harford, J.B., and Klausner, R.D. 1987. Identification of the iron-responsive element for the translational regulation of human ferritin mRNA. *Science* **238**, 1570-1572
- Hershko, C., Graham, G., Bates, G.W., and Rachmilewitz, E.A. 1978. Non-specific serum iron in thalassemia: an abnormal serum iron fraction of potential toxicity. *Br.J.Haematol.* **40**, 255-263
- Hershko, C. and Peto, T.E. 1987. Non-transferrin plasma iron. *Br.J.Haematol.* **66**, 149-151
- Hirt, R.P., Healy, B., Vossbrink, C.R., Canning, E.U., and Embley, T.M. 1997. A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria. *Curr.Biol.* **7**, 995-998
- Hofer, A., Schmidt, P.P., Gralsund, A., and Thelander, L. 1997. Cloning and characterization of the R1 and R2 subunits of ribonucleotide reductase from *Trypanosoma brucei*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 6959-6964
- Hoff, K.G., Silberg, J.J., and Vickery, J.E. 2000. Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**, 7790-7795
- Hu, W. L., Mazurier, J., Montreuil, J., and Spik, G. 1990. Isolation and partial characterization of a lactotransferrin receptor of mouse small-intestinal brush border. Binding characteristic of membrane-bound and triton X-100-solubilized forms. *Biochem.J.* **249**, 435-441
- Chan, L.N. and Gerhardt, E.M. 1992. Transferrin receptor gene is hyperexpressed and transcriptionally regulated in differentiating erythroid cells. *J.Biol.Chem.* **267**, 8254-8259
- Chang, K.P. and Hendricks, L.D. 1985. Laboratory cultivation and maintenance of *Leishmania*. In: Chang, K.P. and Bray, R.S. editors, *Leishmaniasis*, pp. 214-244. New York, Elsevier
- Chaudhuri, M., Steverding, D., Kittelberger, D., Tjia, S., and Overath, P. 1994. Expression of a glycosylphosphatidylinositol-anchored *Trypanosoma brucei* transferrin-binding complex in insect cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**, 6443-6447
- Chaudhuri, M., Ajayi, W., and Hill, G.C. 1998. Biochemical and molecular properties of the *Trypanosoma brucei* alternative oxidase. *Mol.Biochem.Parasitol.* **95**, 53-68
- Chen, C.Y., Berish, S.A., Morse, S.A., and Mietzner, T.A. 1993. The ferric iron-binding protein of pathogenic *Neisseria* spp. functions as a periplasmic transport protein in iron-acquisition from human transferrin. *Mol.Microbiol.* **10**, 311-318
- Chen, X.Z., Peng, J.B., Cohen, A., Nelson H., Nelson N., and Hediger, M.A. 1999. Yeast SMF1 mediates H(+)-coupled iron uptake with concomitant uncoupled cation currents. *J.Biol.Chem.* **274**, 35089-35094
- Iacopetta, B.J., Morgan, E.H., and Yeoh, G.C.T. 1982. Transferrin receptors and iron uptake during erythroid cell development. *Biochim.Biophys.Acta* **687**, 204-210
- Iacopetta, B.J. and Morgan, E.H. 1983. Transferrin endocytosis and iron uptake during erythroid cell development. *Biomed.Biochim.Acta* **42**, S182-S186
- Inglis, N.F., Stevenson, K., Hosie, A.H.F., and Sharp, J.M. 1994. Complete sequence of the gene encoding the bacterioferritin subunit of *Mycobacterium avium* subspecies *silvaticum*. *Gene* **150**, 205-206
- Ismail, S.O., Paramchuk, W., Skeiky, Y.A., Reed, S.G., Bhatia, A., and Gedamu, L. 1997. Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **86**, 187-197

- Isobe, K., Isobe, Y., and Sakurami, T. 1981. Cytochemical demonstration of transferrin in the mitochondria of immature human erythroid cells. *Acta Haematol.* **65**, 2-9
- Iwai, K., Klausner, R.D., and Roualt, T.A. 1995. Requirements for iron-regulated degradation of the RNA binding protein, iron regulatory protein 2. *EMBO J.* **14**, 5350-5357
- Jacobs, A. 1977. Low molecular weight intracellular iron transport compounds. *Blood* **50**, 433-439
- Jeffrey, G.P., Basclain, K., Hajek, J., Chakrabarti, S., and Adams, P.C. 1999. Alternate splicing produces a soluble form of the hereditary hemochromatosis protein HFE. *Blood Cells Mol.Dis.* **25**, 61-67
- Jensen, L.T. and Culotta, V.C. 2000. Role of *Saccharomyces cerevisiae* ISA1 and ISA2 in iron homeostasis. *Mol.Cell.Biol.* **20**, 3918-3927
- Jing, S. and Trowbridge, I.S. 1990. Nonacylated human transferrin receptors are rapidly internalized and mediated iron uptake. *J.Biol.Chem.* **265**, 11555-11559
- Jones, M.S. and Jones, O.T. 1969. The structural organization of haem synthesis in rat liver mitochondria. *Biochem.J.* **113**, 507-514
- Kabiri, M. and Steverding, D. 2001. *Trypanosoma evansi*: demonstration of a transferrin receptor derived from expression site-associated genes 6 and 7. *J.Parasitol.* **87**, 1189-1191
- Katinka, M.D., Duprat, S., Cornillot, E., Metenier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretaillade, E., Brottier, P., Wincker, P., Delbac, F., El Alaoui, H., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J., and Vivares, C.P. 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* **414**, 450-453
- Kato, S., Mihara, H., Kurihara, T., Takahashi, Y., Tokumoto, U., Yoshimura, T., and Esaki, N. 2002. Cys-238 of IscS and Cys-63 of IscU are the sites of disulfide bridge formation in a covalently bound IscS/IscU complex: implications for the mechanism of iron-sulfur cluster assembly. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **99**, 5948-5952
- Kaut, A., Lange, H., Diekert, K., Kispal, G., and Lill, R. 2000. Isa1p is a component of the mitochondrial machinery for maturation of cellular iron-sulfur proteins and requires conserved cysteine residues for function. *J.Biol.Chem.* **275**, 15955-15961
- Kawabata, H., Yang, R., Hiramata, T., Vuong, P.T., Kawano, S., Gombart, A., and Koeffler, H.P. 1999. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J.Biol.Chem.* **274**, 20826-20832
- Kawabata, H., Germain, R.S., Vuong, P.T., Nakamaki, T., Said, J.W., and Koeffler, H.P. 1999. Transferrin receptor 2-alpha supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and in vivo. *J.Biol.Chem.* **275**, 16618-16625
- Kawabata, H., Germain, R.S., Ikezoe, T., Tong, X., Dreen, E.M., Gombart, A.F. and Koeffler, H.P. 2001. Regulation of expression of murine transferrin receptor 2. *Blood* **98**, 1949-1954
- Kispal, G., Csere, P., Prohl, C., and Lill, R. 1999. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.* **18**, 3981-3989
- Knopfel, M. and Solioz, M. 2002. Characterization of a cytochrome b(588) ferric/cupric reductase from rabbit duodenal brush border membranes. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **291**, 220-225
- Kot, E. and Bezkorovainy, A. 1993. Distribution of accumulated iron in *Bifidobacterium thermophilum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**, 177-181

- Krause, A., Neitz, S., Magert, H.J., Schulz, A., Forssmann, W.G., Schulz-Knappe, P., and Adermann, K. 2000. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* **480**, 147-150
- Krebs, C., Agar, J.N., Smith, A.D., Frazzon, J., Dean, D.R., Huynh, B.H., and Johnson, M.K. 2001. IscA, an alternate scaffold for Fe-S cluster biosynthesis. *Biochemistry* **40**, 14069-14080
- Kriegerbeckova, K. and Kovář, J. 2000. Role of melanotransferrin (p97) in non-transferrin iron uptake by HeLa and K562 cells. *Folia Biol. (Praha)* **46**, 77-81
- Kulda, J., Poislová, M., Suchan, P., and Tachezy, J. 1999. Iron enhancement of experimental infection of mice by *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol.Res.* **85**, 692-699
- Kühn, L.C., McClelland, A., and Ruddle, F.H. 1984. Gene transfer, expression, and molecular cloning of the human transferrin receptor gene. *Cell* **37**, 95-103
- Kühn, L.C., Schulman, H.M., and Ponka, P. 1990. Iron-transferin requirements and transferrin receptor expression in proliferating cells. *In: Ponka, P., Schulman, H. M., and Woodworth, R. C. editors, Iron transport and storage*, pp. 149-191, CRC Press
- Land, T. and Rouault, T.A. 1998. Targeting of a human iron-sulfur cluster assembly enzyme, nifS, to different subcellular compartments is regulated through alternative AUG utilization. *Mol.Cell.* **2**, 807-815
- Lange, H., Kaut, A., Kispal, G., and Lill, R. 2000. A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**, 1050-1055
- Lange, H., Lisowsky, T., Gerber, J., Mühlenhoff, U., Kispal, G., and Lill, R. 2001. An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep.* **2**, 715-720
- Lalonde, R.G. and Holbein, B.E. 1984. Role of iron in *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Clin.Invest.* **73**, 470-476
- Lankford, C.E. 1973. Bacterial assimilation of iron. *CRC Crit.Rev.Microbiol.* **2**, 273-331
- Latour, N.G. and Reeves, E.R. 1965. An iron requirement for growth *Entamoeba histolytica* in culture, and the antiamebial activity of 7-iodo-8-hydroxy-quinoline-5-sulfonic acid. *Exp.Parasitol.* **17**, 203-209
- Lebron, J. A., Bennett, M.J., Vaughn, D.E., Chirino, A.J., Snow, P.M., Mintier, G.A., Feder, J.N., and Bjorkman, P.J. 1998. Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell* **93**, 111-123
- Le Trant, N., Meshnick, S.R., Kitchener, K., Eaton, J. W., and Cerami, A. 1983. Iron-containing superoxide dismutase from *Crithidia fasciculata*. Purification, characterization, and similarity to leishmanial and trypanosomal enzymes. *J.Biol.Chem.* **258**, 125-130
- Lee, B.C. and Bryan, L.E. 1989. Identification and comparative analysis of the lactoferrin and transferrin receptors among clinical isolates of gonococci. *J.Med.Microbiol.* **28**, 199-204
- Lee, B.C. 1991. Iron sources for *Haemophilus ducreyi*. *J.Med.Microbiol.* **34**, 317-322
- Lee, B.C. and Hill, P. 1992. Identification of an outer membrane haemoglobin-binding protein in *Neisseria meningitidis*. *J.Gen.Microbiol.* **138**, 2647-2657
- Lee, P.L., Gelbart, T., West, C., Halloran, C., and Beutler, E. 1998. The human Nramp2 gene: characterization of the gene structure, alternative splicing, promoter region and polymorphism. *Blood Cells Mol.Dis.* **24**, 199-215

- Lee, J.E., Hofhaus, G., and Lisowsky, T. 2000. Erv1p from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulfhydryl oxidase. *FEBS Lett.* **477**, 62-66
- Legrain, M., Jacobs, E., Irwin, S.W., Schryvers, A.B., and Quentin-Millet, M.J. 1993. Molecular cloning and characterization of *Neisseria meningitidis* genes encoding the transferrin binding proteins Tbp1 and Tbp2. *Gene* **130**, 73-80
- Lehker, M.W., Chang, T.H., Dailey, D.C., and Alderete, J.F. 1990. Specific erythrocyte binding is an additional nutrient acquisition system for *Trichomonas vaginalis*. *J.Exp.Med.* **171**, 2165-2170
- Lehker, M.W. and Alderete, J.F. 1992. Iron regulates growth of *Trichomonas vaginalis* and the expression of immunogenic trichomonad proteins. *Mol.Microbiol.* **6(1)**, 123-132
- Lehker, M.W. and Sweeney, D. 1999. Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. *Sex.Transm.Infect.* **75**, 231-238
- Lesuisse, E., Raguzzi, F., and Crichton, R.R. 1987. Iron uptake by yeast *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of a reduction step. *J.Gen.Microbiol.* **133**, 3229-3236
- Leveugle, B., Mazurier, J., Legrand D., Mazurier C., Montreuil, J., and Spik, G. 1993. Lactotransferrin binding to its platelet receptor inhibits platelet aggregation. *Eur.J.Biochem.* **213**, 1205-1211
- Levi, S., Corsi, B., Bosisio, M., Inverzzini, R., Volz, A., Sanford, D., Arosio, P., and Drysdale, J. 2001. A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene. *J.Biol.Chem.* **276**, 24437-24440
- Li, J., Kogan, M., Knight, S.A., Pain, D., and Dancis, A. 1999. Yeast mitochondrial protein, Nfs1p, coordinately regulates iron-sulfur cluster proteins, cellular iron uptake and iron distribution. *J.Biol.Chem.* **274**, 33025-33034
- Lima, M.F. and Villalta, F. 1990. *Trypanosoma cruzi* receptors for human transferrin and their role. *Mol.Biochem.Parasitol.* **38**, 245-252
- Lisowsky, T. 1992. Dual function of a new nuclear gene for oxidative phosphorylation and vegetative growth in yeast. *Mol.Gen.Genet.* **232**, 58-64
- Lisowsky, T. 1994. ERV1 is involved in the cell-division cycle and the maintenance of mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr.Genet.* **26**, 15-20
- Loo, V.G. and Lalonde, R.G. 1984. Role of iron in intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*. *Infect.Immun.* **45**, 726-730
- Loyevsky, M., La Vaute, T., Allerson, C.R., Stearman, R., Kassim, O.O., Cooperman, S., Gordeuk, V.R., and Roualt, T.A. 2001. An IRP-like protein from *Plasmodium falciparum* binds to mammalian iron-responsive element. *Blood* **98**, 2555-2562
- Maier, A. and Steverding, D. 1996. Low affinity of *Trypanosoma brucei* transferrin receptor to apotransferrin at pH 5 explains the fate of the ligand during endocytosis. *FEBS Lett.* **396**, 87-89
- Maines, M.D., Trakshel, G.M., and Kutty, R.K. 1986. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J.Biol.Chem.* **261**, 411-419
- Majore, S., Binni, F., Ricerca, B.M., Brioli, G., and Grammatico, P. 2002. Absence of hepcidin gene mutations in 10 Italian patients with primary iron overload. *Haematologica* **87**, 221-222
- Malo, D., Vodan, K., Vidal, S., Hu, J., Cellier, M., Shurr, E., Fuks, A., Bumstead, N., Morgan, K., and Gros, P. 1994. Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse Nramp gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. *Genomics* **23**, 51-61

- Martin, A.W., Huebers, E., Huebers, H., Webb, J., and Finch, C.A. 1984. A mono-sited transferrin from a representative deuterostome: the ascidian *Pyura stolonifera* (Subphylum Urochordata). *Blood* **64**, 1047-1052
- Martini, L.A., Tchack, L., and Wood, R.J. 2002. Iron treatment downregulates DMT1 and IREG1 mRNA expression in Caco-2 cells. *J.Nutr.* **132**, 693-696
- Mason, D.Y. and Taylor, C.R. 1978. Distribution of transferrin, ferritin, and lactoferrin in human tissues. *J. Clin.Pathol.* **31**, 316-327
- Masson, P.L. and Heremans, J.F. 1971. Lactoferrin in milk from different species. *Comp.Biochem.Physiol.* **39B**, 119-129
- Massover, W.H. 1993. Ultrastructure of ferritin and apoferritin: A review. *Micron* **24**, 389-437
- Mazurier, J. and Spik, G. 1980. Comparative study of the iron-binding properties of human transferrin. *Biochim.Biophys.Acta* **629**, 399-408
- McKie, A.T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T.J., Farzaneh, F., Hediger, M.A., Hentze, M.W., and Simpson, R.J. 2000. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol.Cell.* **5**, 299-309
- McKie, A.T., Barrow, D., Latunde-Dada, G.O., Rolfs, A., Sager, G., Mudaly, E., Mudaly, M., Richardson, C., Barlow, D., Bomford, A., Peters, T.J., Raja, K.B., Shirali, S., Hediger, M.A., Farzaneh, F., and Simpson, R.J. 2001. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* **291**, 1755-1759
- McKie, A.T., Latunde-Dada, G.O., Miret, S., McGregor, J.A., Anderson, G.J., Vulpe, C.D., Wrigglesworth, J.M., and Simpson, R.J. 2002. Molecular evidence for the role of a ferric reductase in iron transport. *Biochem.Soc.Trans.* **30**, 722-724
- Menotti, E., Henderson, B.R., and Kühn, L.C. 1998. Translational regulation of mRNAs with distinct IRE sequences by iron regulatory proteins 1 and 2. *J.Biol.Chem.* **273**, 1821-1824
- Mikogami, T., Heyman, M., Spik, G., and Desjeux, J.F. 1994. Apical-to-basolateral transepithelial transport of human lactoferrin in the intestinal cell line HT-29c1.19A. *Am.J.Physiol.* **267**, G308-G315
- Minnotti, G. and Aust, S.D. 1992. Redox cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids* **27**, 219-226
- Mogulievsky, N., Masson, P.L., and Courtoy, P.-J. 1987. Lactoferrin uptake and iron processing into macrophages: a study in familial haemochromatosis. *Br.J.Haematol.* **66**, 129-136
- Morgan, E.H., Smith, G.D., and Peters, T.J. 1986. Uptake and subcellular processing of ⁵⁹Fe-¹²⁵I-labeled transferrin by rat liver. *Biochem.J.* **237**, 163-173
- Morgan, E.H. 1988. Membrane transport of non-transferrin-bound iron by reticulocytes. *Biochim.Biophys. Acta* **943**, 428-439
- Mühlenhoff, U., Richhard, N., Ristow, M., Kispal, G., and Lill, R. 2002. The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Hum.Mol.Genet.* **11**, 2025-2036
- Mukhopadhyay, C.K., Attieh, Z.K., and Fox, P.L. 1998. Role of ceruloplasmin in cellular iron uptake. *Science* **279**, 714-717
- Mukhopadhyay, C.K., Mazumder, B., and Fox, P.L. 2000. Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J.Biol.Chem.* **275**, 21048-21054

- Müller, M. 1992. Energy metabolism of ancestral eukaryotes: a hypothesis based on the biochemistry of amitochondriate parasitic protists. *Biosystems* **28**, 33-40
- Müller, M. 1993. The hydrogenosome. *J.Gen.Microbiol.* **139**, 2879-2889
- Mura, C., Raguene, O., and Ferec, C. 1999. HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood* **3**, 2502-2505
- Murray, M.J., Murray, A.B., Murray, N.J., and Murray, M.B. 1975. Refeeding-malaria and hyperferraemia. *Lancet* 653-654
- Musci, G., Politicelli, F., and Calabrese, L. 1999. Structure/function relationship in ceruloplasmin. *Adv.Exp.Med.Biol.* **279**, 175-182
- Naidu, A.S., Andersson, M., and Forsgren, A. 1992. Identification of a human lactoferrin-binding protein in *Staphylococcus aureus*. *J.Med.Microbiol.* **36**, 177-183
- Nakai, Y., Yoshihara, Y., and Kagamiyama, H. 1998. cDNA cloning and characterization of mouse *nifS*-like protein, m-Nfs1: mitochondrial localization of eukaryotic NifS-like proteins. *FEBS Lett.* **433**, 143-148
- Neilands, J.B. 1981. Microbial iron compounds. *Annu.Rev.Biochem.* **50**, 715-731
- Neilands, J.B. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J.Biol.Chem.* **270**, 26723-26726
- Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, I., Beaumont, C., Grandchamp, B., Kahn, A., and Vaulont, S. 2001. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **98**, 8780-8785
- Nicolas, G., Bennoun, M., Porteu, A., Mativet, S., Beaumont, C., Grandchamp, B., Sirito, M., Sawadogo, M., Kahn, A., and Vaulont, S. 2002. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **99**, 4596-4601
- Nishio, K. and Nakai, M. 2000. Transfer of iron-sulfur cluster from NifU to apoferritin. *J.Biol.Chem.* **275**, 22615-22618
- Njajou, O.T., Vaessen, N., Joosse, M., Berghuis, B., van Dongen, J.W., Breuning, M.H., Snijders, P.J., Rutten, W.P., Sandkuijl, L.A., Oostra, B.A., van Duijn, C.M., and Heutink, P. 2001. A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat.Genet.* **28**, 213-214
- Nunez, M.T., Tapia, V., and Arredondo, M. 1996. Intestinal epithelia (Caco-2) cells acquire iron through the basolateral endocytosis of transferrin. *J. Nutr.* **126**, 2151-2158
- Nunez, M.T., Nunez-Millacura, C., Beltran, M., Tapia, V., and Alvarez-Hernandez, X. 1997. Apotransferrin and holotransferrin undergo different endocytoc cycles in intestinal epithelia (Caco-2) cells. *J.Biol.Chem.* **272**, 19425-19428
- Nunez, M.T and Tapia, V. 1999. Transferrin stimulates iron absorption, exocytosis, and secretion in cultured intestinal cells. *Am.J.Physiol.* **276**, 1085-1090
- Ogunnariwo, J.A. and Schryvers, A.B. 1990. Iron acquisition in *Pasteurella haemolytica*: Expression and identification of a bovine-specific transferrin receptor. *Infect.Immun.* **58**, 2091-2097
- Ollagnier-de-Choudens, S., Mattioli, T., Takahashi, Y., and Fontecave, M. 2001. Iron-sulfur cluster assembly: characterization of IscA and evidence for a specific and functional complex with ferredoxin. *J.Biol.Chem.* **276**, 22604-22607

- Olakanmi, O., Stokes, J.B., and Britigan, B.E. 1994. Acquisition of iron bound to low molecular weight chelates by human monocyte-derived macrophages. *J.Immunol.* **153**, 2691-2703
- Page, M.A., Baker, E., and Morgan, E.H. 1984. Transferrin and iron uptake by rat hepatocytes in culture. *Am.J.Physiol.* **246**, G26-G33
- Park, C.H., Valore, E.V., Waring, A.J., and Ganz, T. 2001. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J.Biol.Chem.* **276**, 7806-7810
- Park, S., Gakh, O., Mooney, S.M., and Isaya, G. 2002. The ferroxidase activity of yeast frataxin. *J.Biol.Chem.* **277**, 38589-38595
- Patel, B.N., Dunn, R.J., and David, S. 2000. Alternative RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin in a mammalian brain. *J.Biol.Chem.* **275**, 4305-4310
- Pays, E., Tebabi, P., Pays, A., Coquelet, H., Revelard, P., Salmon, D., and Steinert, M. 1989. The genes and transcripts of an antigen gene expression site from *T. brucei*. *Cell* **57**, 835-845
- Pays, E., Lips, S., Nolan, D., Vanhamme, L., Perez-Morga, D. 2001. The VSG expression sites of *Trypanosoma brucei*: multipurpose tools for the adaptation of the parasite to mammalian hosts. *Mol.Biochem.Parasitol.* **114**, 1-16
- Pedrosa, M.L., Nicoli, J.R., Silva, M.E., Silva, M.E.C., Vieira, L.Q., Bambirra, E.A., and Vieira, E.C. 1993. The effect of iron nutritional status on *Trypanosoma cruzi* infection in germfree and conventional mice. *Comp.Biochem.Physiol.* **106A**, 813-821
- Peterson, K.M. and Alderete, J.F. 1984. Iron uptake and increased intracellular enzyme activity follow host lactoferrin binding by *Trichomonas vaginalis* receptors. *J.Exp.Med.* **160**, 398-410
- Pettersson, A., Maas, A., and Tommassen, J. 1994. Identification of the *iroA* gene product of *Neisseria meningitidis* as a lactoferrin receptor. *J.Bacteriol.* **176**, 1764-1766
- Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P., and Loreal O. 2001. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J.Biol.Chem.* **276**, 7811-7819
- Pindak, F.F, Mora de Pindak, M., and Gardner, W.A. 1993. Contact independent cytotoxicity of *Trichomonas vaginalis*. *Genitourin.Med.* **69**, 35-40
- Polimeno, L., Lisowsky, T., and Francavilla, A. 1999. From yeast to man – from mitochondria to liver regeneration: a new essential gene family. *Ital.J.Gastroenterol.Hepatol.* **31**, 494-500
- Pollack, S., Campana, T., and Weaver, J. 1985. Low molecular weight iron in guinea pig reticulocytes. *Am.J.Haematol.* **19**, 75-84
- Pollack, S. and Schnelle, V. 1988. Inability to detect transferrin receptors on *P. falciparum* parasitized red cells. *Br.J.Haematol.* **68**, 125-129
- Ponka, P. 1994. Physiology and pathophysiology of iron metabolism: Implications for iron chelation therapy in iron overload. In: Bergeron R.J. and Brittenham, G.M. editors, The development of iron chelators for clinical use, pp. 1-32. CRC Press
- Qian, Z.M., Tsoi, Y.K., Ke, Y., and Wong, M.S. 2001. Ceruloplasmin promotes iron uptake rather than release in BT325 cells. *Exp.Brain.Res.* **140**, 369-374
- Quail, M.A., Jordan, P., Grogan, J.M., Butt, J.N., Lutz, M., Thomson, A.J., Andrews, S.C., and Guest, J.R. 1996. Spectroscopic and voltammetric characterisation of the bacterioferritin-associated ferredoxin of *Escherichia coli*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **229**, 635-642

- Radisky, D.C., Babcock, M.C., and Kaplan, J. 1999. The yeast frataxin homologue mediates mitochondrial iron efflux: evidence for a mitochondrial iron cycle. *J.Biol.Chem.* **274**, 4497-4499
- Rappelli, P., Rocchigiani, A.M., Erre, G., Colombo, M.M., Cappuccinelli, P., and Fiori, P.L. 1995. Sequence of cDNA coding for a 65 kDa adhesive protein for the specific detection of *Trichomonas vaginalis* by PCR. *FEMS Microbiol.Lett.* **129**, 21-26
- Redhead, K. and Hill, T. 1991. Acquisition of iron from transferrin by *Bordetella pertussis*. *FEMS Microbiol.Lett.* **77**, 303-308
- Reyes-Lopez, M., Serrano-Luna, J.J., Negrete-Abascal, E., Leon-Sicairos, N., Guerrero-Barrera, A.L., and de la Garza, M. 2001. *Entamoeba histolytica*: transferrin binding proteins. *Exp.Parasitol.* **99**, 132-140
- Riedel, H.D., Remus, A.J., Fitscher, B.A., and Stremmel, W. 1995. Characterization and partial purification of a ferrioreductase from human duodenal microvillus membranes. *Biochem.J.* **309**, 745-748
- Richardson, D.R and Baker, E. 1991. The uptake of inorganic iron complexes by human melanoma cells. *Biochim.Biophys.Acta* **1093**, 20-28
- Richardson, D.R., Ponka, P., and Vyoral, D. 1996. Distribution of iron in reticulocytes after inhibition of heme synthesis with succinylacetone: examination of the intermediates involved in iron metabolism. *Blood* **87**, 3477-3488
- Richardson, D.R. and Ponka, P. 1997. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Bba-Rev. Biomembranes.* **1331**, 1-40
- Richardson, D.R. 2000. The role of the membrane-bound tumour antigen, melanotransferrin (p97), in iron uptake by the human malignant melanoma cell. *Eur.J.Biochem.* **267**, 1290-1298
- Richter, G.W. 1960. The nature of storage iron in hemosiderosis. Electron optical, chemical, and serologic studies on isolated hemosiderin granules. *J.Exp.Med.* **112**, 551-557
- Rodriguez, M.H. and Jungery, M. 1986. A protein on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes functions as transferrin receptor. *Nature* **324**, 388-391
- Rodriguez-Manzanque, M.T., Tamarit, J., Belli, G., Ros, J., and Herrero, E. 2002. Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol.Biol.Cell.* **13**, 1109-1121
- Roetto, A., Totaro, A., Cazzola, M., Cicilano, M., Bosio, S., D'Ascola, G., Carella, M., Zelante, L., Kelly, A.L., Cox, T.M., Gasparini, P., and Camaschella, C. 1999. Juvenile hemochromatosis locus maps to chromosome 1q. *Am.J.Hum.Genet.* **64**, 1388-1393.
- Rochard, E., Legrand, D., Mazurier, J., Montreuil, J., and Spik, G. 1989. The N-terminal domain I of human lactotransferrin binds specifically to phytohemagglutinin-stimulated peripheral blood human lymphocyte receptors. *FEBS Lett.* **255**, 201-204
- Rochard, E., Legrand, D., Lecocq, M., Hamelin, R., Crepin, M., Montreuil, J., and Spik, G. 1992. Characterization of lactotransferrin receptor in epithelial cell lines from non-malignant human breast, benign mastopathies and breast carcinomas. *Anticancer Res.* **12**, 2047-2051
- Rolfs, A. and Hediger, M.A. 2001. Intestinal metal ion absorption: an update. *Curr.Opin.Gastroenterol.* **17**, 177-183
- Rolfs, A., Bonkovsky, H.L., Kohloser, J.G., McNeal, K., Sharma, A., Berger, U.V, and Hediger, M.A. 2002. Intestinal expression of genes involved in iron absorption in humans. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* **282**, G598-607

- Rotig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., Munnich, A., and Rustin, P. 1997. Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat.Genet.* **17**, 215-217
- Rouault, T.A., Hentze, M.W., Caughman, S.W., Harford, J.B., and Klausner, R.D. 1988. Binding of a cytosolic protein to the iron-responsive element of human ferritin messenger RNA. *Science* **241**, 1207-1210
- Rouault, T.A., Stout, C.D., Kaptain, S., Harford, J.B., and Klausner, R.D. 1991. Structural relationship between an iron-regulated RNA-binding protein (IRE-BP) and aconitase: functional implications. *Cell* **64**, 881-883
- Roy, C.N., Penny, D.M., Feder, J.N., and Enns, C.A. 1999. The hereditary hemochromatosis protein, HFE, specifically regulates transferrin-mediated iron uptake in HeLa cells. *J.Biol.Chem.* **274**, 9022-9028
- Saas, J., Ziegelbauer, K., von Haeseler, A., Fast, B., and Boshart, M. 2000. A developmentally regulated aconitase related to iron-regulatory protein-1 is localized in the cytoplasm and in the mitochondrion of *Trypanosoma brucei*. *J.Biol.Chem.* **275**, 2745-2755
- Saito, H. 1975. [A case of atransferrinemia and 35 cases of hypotransferrinemia as determined by radioassay of total iron-binding capacity of the serum (authors transl.)]. *Rinsho.Ketsueki.* **16**, 1036-1043
- Sakamoto, N., Chastain, P.D., Parniewski, P., Ohshima, K., Pandolfo, M., Griffith, J.D., and Wells, R.D. 1999. Sticky DNA: self-association properties of long GAA.TTC repeats in R.R.Y triplex structures from Friedreich's ataxia. *Mol.Cell* **3**, 465-475
- Salmon, D., Geuskens, M., Hanocq, F., Hanocq-Quertier, J., Nolan, D., Ruben, L., and Pays, E. 1994. A novel heterodimeric transferrin receptor encoded by a pair of VSG-site-associated genes in *T. brucei*. *Cell* **78**, 75-86
- Salmon-Céron, D., Fontbonne, A., and Saba, J. 1995. Lower survival in AIDS patients receiving dapsone compared with aerosolized pentamidine for secondary prophylaxis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J.Infect.Dis.* **172**, 656-664
- Saltman, P. 1965. The role of chelation in iron metabolism. *J.Chem.Educ.* **42**, 682-687
- Sameniengo, F., Chin, J., Iwai, K., Rouault, T.A., and Klausner, R.D. 1994. Molecular characterization of a second iron-responsive element binding protein, iron regulatory protein 2. *J.Biol.Chem.* **269**, 30904-30910
- Sánchez, L., Calvo, M., and Brock, J.H. 1992. Biological role of lactoferrin. *Arch.Dis.Child.* **67**, 657-661
- Sanchez-Lopez, R. and Haldar, K. 1992. A transferrin-independent iron uptake activity in *Plasmodium falciparum*-infected and uninfected erythrocytes. *Mol.Biochem.Parasitol.* **55**, 9-20
- Sanyal, A.J., Shiffmann, M.L., Hirsch, J.I., and Moore, E.W. 1991. Premicellar taurocholate enhances ferrous iron uptake from all regions of rat small intestine. *Gastroenterology* **101**, 382-389
- Sarkar, B. 1970. State of iron(III) in normal human serum: low molecular weight and protein ligands besides transferrin. *Canadian Journal of Biochemistry* **48**, 1339-1350
- Seeber, F. 2002. Biogenesis of iron-sulphur clusters in amitochondriate and apicomplexan protists. *Int.J.Parasitol.* **32**, 1207-1217
- Sekyere, E. and Richardson, D.R. 2000. The membrane-bound transferrin homologue melanotransferrin: roles other than iron transport? *FEBS Lett.* **483**, 11-16

- Sengupta, S., Tripathi, J., Tandon, R., Raje, M., Roy, R.P., Basu, S.K., and Mukhopadhyay, A. 1999. Hemoglobin endocytosis in *Leishmania* is mediated through 46-kDa protein located in the flagellar pocket. *J.Biol.Chem.* **274**, 2758-2765
- Serrano-Luna, J.J., Negrete, E., Reyes, M., and de la Garza, M. 1998. *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS: hemoglobing-degrading neutral cysteine proteases. *Exp.Parasitol.* **89**, 71-77
- Shanzer, A., Libman, J., Lytton, S.D., Glickstein, H., and Cabantchik, Z.I. 1991. Reversed siderofores act as antimalarial agents. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**, 6585-6589
- Schell, D., Evers, R., Preis, D., Ziegalbauer, K., Kiefer, H., Lottspeich, F., Cornelissen, A.W.C.A., and Overath, P. 1991. A transferrin-binding protein of *Trypanosoma brucei* is encoded by one of the genes in variant surfaces glycoprotein gene expression site. *EMBO J.* **10**, 1061-1066
- Schneider, C., Owen, M.J., Banville, D., and Williams, J.G. 1984. Primary structure of human transferrin receptor deduced from the mRNA sequence. *Nature* **311**, 675-678
- Schryvers, A.B. 1988. Characterization of the human transferrin and lactoferrin receptors in *Haemophilus influenzae*. *Mol.Microbiol.* **2**, 467-472
- Schussler, P., Potters, E., Winnen, R., Michel, A., Bottke, W., and Kunz, W. 1996. Ferritin mRNAs in *Schistosoma mansoni* do not have iron-responsive elements for post-transcriptional regulation. *Eur.J.Biochem.* **241**, 64-69
- Schwartz, C.J., Giel, J.L., Patschkowski, T., Luther, C., Ruzicka, F.J., Beinert, H., and Kiley, P.J. 2001. IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **98**, 14895-14900
- Sibille, J.C., Octave, J.N., Schneider, Y.J., Trouet, A., and Crichton, R. 1986. Subcellular localization of transferrin protein and iron in the perfused rat liver. Effect of Triton WR 1339, digitonin, and temperature. *Eur.J.Biochem.* **155**, 47-55
- Silberg, J.J., Hoff, K.G., Tapley, T.L., and Vickery, J.E. 2001. The Fe/S assembly protein IscU behaves as a substrate for the molecular chaperone Hsc66 from *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* **276**, 1696-1700
- Sitaram, M.P. and McAbee, D.D. 1997. Isolated rat hepatocytes differentially bind and internalize bovine lactoferrin N- and C- lobes. *Biochem.J.* **323**, 815-822
- Skikne B. and Baynes, R. 1994. Iron absorption. In: Brock, J. H., Halliday, J. V., Pippard, M. J., and Powel, L. editors, *Iron Metabolism in Health and Disease*, pp. 151-187. London, W. B. Saunders Company
- Smith, J.M. and Meerovitch, E. 1982. Specificity of iron requirements of *Entamoeba histolytica* in vitro. *Arch.Invest. Méd. (Méx.)* **13**, 63-69
- Soares, M.J. and deSouza, W. 1991. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol.Res.* **77**, 461-468
- Spik, G. and Montreuil, J. 1983. The role of lactotransferrin in the molecular mechanisms of antibacterial defense. *Bull.Eur.Physiopatol.Respir.* **19**, 123-130
- Spik, G., Legrand, G., Leveugle, B., Mazurier, J., Mikogami, T., Montreuil, J., Pierce, A., and Rochard, E. 1994. Characterization of two kinds of lactotransferrin (lactoferrin) receptors on different target cells. *Adv.Exp.Med.Biol.* **357**, 13-19
- Steverding, D., Stierhof, Y.D., Chaudhri, M., Ligtenberg, M., Schell, D., Beck-Sickinger, A.G., and Overath, P. 1994. ESAG 6 and 7 products of *Trypanosoma brucei* form a transferrin binding protein complex. *Eur.J Cell.Biol.* **64**, 78-87

- Steverding, D., Stierhof, Y.D., Fuchs, H., Tauber, R., and Overath, P. 1995. Transferrin-binding protein complex is the receptor for transferrin uptake in *Trypanosoma brucei*. *J.Cell.Biol.* **131**, 1173-1182
- Steverding, D. 1998. Bloodstream form of *Trypanosoma brucei* require only small amounts of iron for growth. *Parasitol.Res.* **60**, 59-62
- Stockman, J.A. 1981. Infections and iron. *Am.J.Dis.Child.* **135**, 18-20
- Stolijkovic, I. and Hantke, K. 1992. Haemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in Gram-negative bacteria. *EMBO J.* **11**, 4359-4367
- Stolijkovic, I. and Hantke, K. 1994. Transport of haemin across the cytoplasmic membrane through a haemin-specific periplasmic binding protein-dependent transport system in *Yersinia enterocolitica*. *Mol.Microbiol.* **13**, 719-732
- Stolijkovic, I., Hwa, V., Saint Martin, L., O'Gaora, P., Nassif, X., Heffron, F., and So, M. 1995. The *Neisseria meningitidis* haemoglobin receptor: its role in iron utilization and virulence. *Mol.Microbiol.* **15**, 531-541
- Stubbe J. 1990a. Ribonucleotide reductases: amazing and confusing. *J.Biol.Chem.* **265**, 5329-5332
- Stubbe J. 1990b. Ribonucleotide reductases. *Adv.Enzymol.Relat.Areas.Mol.Biol.* **63**, 349-419
- Strain, J., Lorenz, C.R., Bode, J., Garland, S., Smolen, G.A., Ta, T.D., Vickery, L.E., and Cullota, V.C. 1998. Suppressors of superoxide dismutase (SOD1) deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of proteins predicted to mediate iron-sulfur cluster assembly. *J.Biol.Chem.* **273**, 31138-31144
- Suchan P., Vyoral D., Petrák J., Šuťák R., Rasoloson, D., Nohýnková E., Doležal, P., and Tachezy J. 2003. Incorporation of iron to *Tritrichomonas foetus* cell compartments revealed ferredoxin as a major iron binding protein in hydrogenosomes. *Microbiology*, accepted
- Sun, I.L., Navas, P., Crane, F.L., Morré, D.J., and Low, H. 1987a. Differic transferrin reductase in the plasma membrane is inhibited by adryamycin. *Biochem.Int.* **14**, 119-127
- Sun, I.L., Navas, P., Crane, F.L., Morré, D.J., and Low, H. 1987b. NADH differic transferrin reductase in liver plasma membrane. *J.Biol.Chem.* **262**, 15915-15921
- Syed, B.A., Beaumont, N.J., Patel, A., Naylor, C.E., Bayele, H.K., Joannou, C.L., Rowe, P.S., Evans, R.W., and Srai, S.K. 2002. Analysis of the human hephaestin gene and protein: comparative modelling of the N-terminus ecto-domain based upon ceruloplasmin. *Protein.Eng.* **15**, 205-214
- Tachezy, J., Kulda, J., Bahníková, I., Suchan, P., Rázga, J., and Schrével, J. 1996. *Tritrichomonas foetus*: iron acquisition from lactoferrin and transferrin. *Exp.Parasitol.* **83**, 216-228
- Tachezy, J., Suchan, P., Schrével, J., and Kulda, J. 1998. The host-protein-independent iron uptake in *Tritrichomonas foetus*. *Exp.Parasitol.* **90**, 155-163
- Tachezy, J., Sanchez, L.B., and Müller, M. 2001. Mitochondrial type iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by phylogeny of IscS. *Mol.Biol.Evol.* **18**, 1919-1928
- Takahashi, Y. and Tokumoto, U. 2002. A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J.Biol.Chem.* **277**, 28380-28383
- Theil, C.E. 1998. The iron responsive element (IRE) family of mRNA regulators. In: Siegel, A. and Siegel H. editors, *Iron Transport and Storage in Microorganisms, Plants, and Animals*, pp. 403-434. *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 35, New York, Marcel Dekker Inc.

- Thorstensen, K. and Aisen, P. 1990. Release of iron from differic transferrin in the presence of the rat liver plasma membranes: no evidence of a plasma membrane differic transferrin reductase. *Biochim.Biophys.Acta* **1052**, 29-35
- Tokumoto, U., Nomura, S., Minami, Y., Mihara, H., Kato, S., Kurihara, T., Esaki, N., Kanazawa, H., Matsubara, H., and Takahashi, Y. 2002. Network of protein-protein interactions among iron-sulfur cluster assembly proteins in *Escherichia coli*. *J.Biochem.* **131**, 713-719
- Tong, W.H. and Rouault, T. 2000. Distinct iron-sulfur cluster assembly complexes exists in the cytosol and mitochondria of human cells. *EMBO J.* **19**, 5692-5700
- Trakshel, G.M., Kutty, R.K., and Maines, M.D. 1986. Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase. The noninducible isoform. *J.Biol.Chem.* **261**, 11131-11137
- Trinder, D., Zak, O., and Aisen, P. 1996. Transferrin receptor-independent uptake of differic transferrin by human hepatoma cells with antisense inhibition of receptor expression. *Hepatology* **23**, 1512-1520
- Tsai, C.D., Liu, H.W., and Tai, J.H. 2002. Characterization of an iron-responsive promoter in the protozoan pathogen *Trichomonas vaginalis*. *J.Biol.Chem.* **277**, 5153-5162
- Turchany, J.M., McCaffery, J.M., Aley, S.B., and Gillin, F.D. 1997. Ultrastructural effects of lactoferrin binding on *Giardia lamblia* trophozoites. *J.Euk.Microbiol.* **44**, 68-72
- Umbreit, J.N., Conrad, M.E., Moore, E.G., and Latour, L.F. 1998. Iron absorption and cellular transport: the mobilferrin/paraferritin paradigm. *Semin.Hematol.* **35**, 13-26.
- Urbina, H.D., Silberg, J.J., Hoff, K.G., and Vickery, L.E. 2001. Transfer of sulfur from IscS to IscU during Fe/S cluster assembly. *J.Biol.Chem.* **276**, 44521-44526
- Vaňáčová, Š, Rasoloson, D., Rázga, J., Hrdý, I., Kulda, J., and Tachezy, J. 2001. Iron-induced changes in pyruvate metabolism of *Tritrichomonas foetus* and involvement of iron in expression of hydrogenosomal proteins. *Microbiology* **147**, 53-62
- Vickerman, K. 1985. Development cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *Br.Med.Bull.* **41**, 105-114
- Vickery, L.E., Silberg, J.J., and Ta, D.T. 1997. Hsc66 and Hsc20, a new heat shock cognate molecular chaperone system from *Escherichia coli*. *Protein.Sci.* **6**, 1047-1056
- Vidal, S., Gros, P., and Skamene, E. 1995. Natural resistance to infection with intracellular parasites: molecular genetics identifies Nramp1 as the Bcg/Ity/Lsh locus. *J.Leukoc.Biol.* **58**, 382-390
- Visca, P., Dalmastrì, C., Verzili, D., Antonini, G., Chiancone, E., and Valenti, P. 1990. Interaction of lactoferrin with *Escherichia coli* cells and correlation with antibacterial activity. *Med.Microbiol.Immunol.* **179**, 323-333
- Voyatzaki, Ch.S. and Soteriadou, K.P. 1990. Evidence of transferrin binding sites on the surface of *Leishmania* promastigotes. *J.Biol.Chem.* **265**, 22380-22385
- Voyatzaki, Ch.S. and Soteriadou, K.P. 1992. Identification and isolation of the *Leishmania* transferrin receptor. *J.Biol.Chem.* **267**, 9112-9117
- Vulpe, C.D., Kuo, Y.M., Murphy, T.L., Cowley, L., Askwith, C., Libina, N., Gitschier, J., and Anderson, G.J. 1999. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat.Genet.* **21**, 195-199

- Vyoral, D., Hradílek, A., and Neuwirt, J. 1992. Transferrin and iron distribution in subcellular fractions of K562 cells in the early stages of transferrin endocytosis. *Biochim.Biophys.Acta* **1137**, 148-154
- Vyoral, D., Petrák, J., and Hradílek, A. 1998. Separation of cellular iron containing compounds by electrophoresis. *Biol.Trace Elem.Res.* **61**, 263-275
- Vyoral, D. and Petrák, J. 1998. Iron transport in K562 cells: a kinetic study using native gel electrophoresis and ⁵⁹Fe autoradiography. *Biochim.Biophys.Acta* **1403**, 179-188
- Waggeg, W. and Braun, V. 1981. Ferric citrate transport in *Escherichia coli* requires outer membrane receptor protein FecA. *J.Bacteriol.* **145**, 156-163
- Waheed, A., Parkkila, S., Zhou, X.Y., Tomatsu, S., Tsuchihashi, Z., Feder, J.N., Schatzman, R.C., Britton, R.S., Bacon, B.R, and Sly, W.S. 1997. Hereditary hemochromatosis: effects of C282Y and H63D mutations on association with β_2 – microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 12384-12389
- Wardrop, S.L. and Richardson, D.R. 1999. The effect of intracellular iron concentration and nitrogen monoxide on Nramp2 expression and non-transferrin-bound iron uptake. *Eur.J.Biochem.* **263**, 41-49
- Weaver, J. and Pollack, S. 1989. Low-M_r iron isolated from guinea pig reticulocytes as AMP-Fe and ATP-Fe complexes. *Biochem.J.* **261**, 787-792
- Weaver, J., Pollack, S., and Zhan, H. 1989. Low molecular weight iron from guinea pig reticulocytes isolated by Sephadex G-25 chromatography. *Eur.J.Haematol.* **43**, 321-327
- Webster, P. 1989. Endocytosis by African trypanosomes.II. Occurrence in different life-cycle stages and intracellular sorting. *Eur.J.Cell Biol.* **49**, 303-310
- Weinbach, E.C., Diamond, S.D., Claggett, C.E., and Kon, H. 1976. Iron-sulfur proteins of *Entamoeba histolytica*. *J.Parasitol.* **62**, 127-128
- Weinbach, E.C., Takeuchi, T., Claggett, C.E., Inohue, F., Kon, H., and Diamond, S.D. 1980. Role of iron-sulfur proteins in the electron transport system of *Entamoeba histolytica*. *Arch.Invest.Méd.(Méz.)* **11**, 75-81
- Weinberg, E.D. 1974. Iron and susceptibility to infectious disease. *Science* **184**, 952-956
- Weinberg, E.D. 1990. Cellular iron metabolism in health and disease. *Drug Metabolism Reviews* **22**, 531-579
- Weinberg, E.D. 1995a. Acquisition of iron and other nutrients in vivo. In: Roth, J. A. editor, Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, pp. 79-93. Washington, D. C., American Society for Microbiology
- Weinberg, E.D. 1995b. The role of iron in infection. *Current Opinion in Infectious Diseases* **8**, 164-169
- Weinberg, E.D. 1996. Iron overload as a mechanism for the lowered survival in AIDS patients receiving dapsone-iron protoxalate for secondary prophylaxis of *Pneumocystis carinii*. *J.Infect.Dis.* **174**, 241-242
- West, A.P.Jr., Bennet, M.J., Sellers, V.M., Andrews, N.C., Enns, C.A., and Bjorkman, P.J. 2000. Comparison of the interactions of transferrin receptor and transferrin receptor 2 with transferrin and the hereditary hemochromatosis protein HFE. *J.Biol.Chem.* **275**, 38135-38138
- Williams, P.H. 1979. Novel iron uptake system specified by ColV plasmid: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* **26**, 925-932

- Williams, J. 1982. The evolution of transferrin. *Trends in Biochemical Science* **7**, 394-397
- Williams, R.J. 1985. 16th Sir Hans Krebs lecture. The symbiosis of metal and protein functions. *Eur.J.Biochem.* **150**, 231-248
- Wilson, M.E., Vorhies, R. W., Andersen, K.A., and Britigan, B.E. 1994. Acquisition of iron from transferrin and lactoferrin by the protozoan *Leishmania chagasi*. *Infect.Immun.* **62**, 3262-3269
- Wilson R.B. and Roof, D.M. 1997. Respiratory deficiency due to loss of mitochondrial DNA in yeast lacking the frataxin homologue. *Nat.Genet.* **16**, 352-357
- Wilson, M.E., Lewis, T.S., Miller, M.A., McCormick, M.L., and Britigan, B.E. 2002. *Leishmania chagasi*: uptake of iron bound to lactoferrin or transferrin requires an iron reductase. *Exp.Parasitol.* **100**, 196-207
- Wixom, R.L., Prutkin, L., and Munro, H.N. 1980. Hemosiderin: nature, formation, and significance. *Int.Rev.Exp.Pathol.* **22**, 193-225
- Wong, J.C.Y., Holland, J., Parsons, T., Smith, A., and Williams, P. 1994. Identification and characterization of an iron-regulated hemopexin receptor in *Haemophilus influenzae* type b. *Infect.Immun.* **62**, 48-59
- Wong, A., Yang, J., Cavadini, P., Gellera, C., Lonnerdal, B., Taroni, F., and Cortopassi, G. 1999. The Friedreich's ataxia mutation confers cellular sensitivity to oxidant stress which is rescued by chelators of iron and calcium and inhibitors of apoptosis. *Hum.Mol.Genet.* **8**, 425-430
- Woodbury, R.G., Brown, J.P., Yeh, M.-Y., Hellström, I., and Hellström, K.E. 1980. Identification of a cell surface protein, p97, in human melanoma and certain other neoplasms. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **77**, 2183-2187
- Wooldridge, K.G. and Williams, P.H. 1993 Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbial.Rev.* **12**, 325-348
- Workman, E.F.Jr. and Bates, G. W. 1974. Mobilization of iron from reticulocyte ghosts by cytoplasmic agents. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **58**, 787-794
- Yamaji, S., Tennant, J., Tandy, S., Williams, M., Singh Srani, S.K., and Sharp, P. 2001. Zinc regulates the function and expression of the iron transporters DMT1 and IREG1 in human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Lett.* **507**, 137-141
- Yang, F., Lum, J.B., McGill, J.R., Moore, Ch.M., Naylor, S.L., Van Bragt, P.H., Baldwin, W.D., and Bowman, B.H. 1984. Human transferrin: cDNA characterization and chromosomal localization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **81**, 2752-2756
- Yu, J., Zhong Kang, Y., and Wessling-Resnick, M. 1998. Expression of SFT (stimulator of Fe transport) is enhanced by iron chelation in HeLa cells and by hemochromatosis in liver. *J.Biol.Chem.* **273**, 34675-34678
- Yuvaniyama, P., Agar, J.N., Cash, V.L., Johnson, M.K., and Dean, D.R. 2000. NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**, 599-604
- Zerounian, N.R. and Linder, M.C. 2002. Effects of copper and ceruloplasmin on iron transport in the Caco-2 cell intestinal model. *J.Nutr.Biochem.* **13**, 138-148
- Zhang, A.S. and Ponka, P. 1997. Microfilament-dependent trafficking of iron into erythroid cell mitochondria. *In: International Symposium Iron in Biology and Medicine, Saint-Malo, Program and Abstract Book*, p. 106

-
- Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L., Jack, R.F., and Dean, D.R. 1993. Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **90**, 2754-2758
- Zheng, L. and Dean, D.R. 1994. Catalytic formation of a nitrogenase iron-sulfur cluster. *J.Biol.Chem.* **269**, 18723-18726
- Zheng, L., Cash, V.L., Flint, D.H., and Dean, D.R. 1998. Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J.Biol.Chem.* **273**, 13264-13272
- Ziere, G.J., Kruijt, J.K., Bijterbosch, M.K., and van Berkel, T.J.C. 1996. Recognition of lactoferrin and aminopeptidase M-modified lactoferrin by the liver: involvement of proteoglycans and the remnant receptor. *Biochem.J.* **313**, 289-295
- Zimecki, M., Mazurier, J., Machnicki, M., Wiczorek, Z., Montreuil, J., and Spik, G. 1991. Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4- and CD8- murine thymocytes. *Immunol.Lett.* **30**, 119-123
- Zomerdijk, J.C.B.M., Kieft, R., Duyndam, M., Shiels, P.G., and Borst, P. 1991. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: a telomeric expression site for the variant-specific surface glycoprotein genes with novel features. *Nucleic Acids Res.* **19**, 1395-1368

2. CÍLE PRÁCE

1. Zjistit, zda jsou buňky *Tritrichomonas foetus* a buňky dalších anaerobních prvoků schopny využívat železo z různých potenciálních zdrojů tohoto kovu (laktoferin, transferin, nízkomolekulární komplexy)
2. Popsat mechanismy, které se uplatňují při vstupu železa z těchto zdrojů do buněk *Tritrichomonas foetus*
3. Identifikovat hlavní kompartmenty a cílové molekuly v buňkách *Tritrichomonas foetus*, do nichž je železo inkorporováno
4. Zjistit, zda schopnost *Tritrichomonas foetus* získávat železo ovlivňuje virulenci tohoto parazita

3. PUBLIKACE A PREZENTACE

Seznam publikací:

1. Tachezy, J., Kulda, J., Bahníková, I., Suchan, P., Rázga, J., and Schrével, J. 1996. *Tritrichomonas foetus*: iron acquisition from lactoferrin and transferrin. *Experimental Parasitology* 83, 216-228
(viz. příloha 1)
2. Tachezy, J., Suchan, P., Schrével, J., and Kulda, J. 1998. The host-protein-independent iron uptake in *Tritrichomonas foetus*. *Experimental Parasitology* 90, 155-163
(viz. příloha 2)
3. Kulda J., Poislová, M., Suchan, P., and Tachezy., J. 1999. Iron enhancement of experimental infection of mice by *Tritrichomonas foetus*. *Parasitology Research* 85, 692-699
(viz. příloha 3)
4. Suchan P., Vyoral D., Petrák J., Šuťák R., Rasoloson, D., Nohýnková E., Doležal, P., and Tachezy J. 2003. Incorporation of iron into *Tritrichomonas foetus* cell compartments revealed ferredoxin as a major iron-binding protein in hydrogenosomes. *Microbiology*, accepted (in press)
(viz. příloha 4)

Seznam prezentací na mezinárodních setkáních:

1. Tachezy, J., Suchan, P., Kulda, J. and Schrével, J. 1995. Iron acquisition by *Tritrichomonas foetus*. 2nd European Congress of Protistology, Clermont-Ferrand, France, 1995. Book of Abstracts, p.90
2. Tachezy, J., Suchan, P., Rasoloson, D., and Kulda, J. 1997. Iron acquisition by *Tritrichomonas foetus*. 26. Jírovcovy protozoologické dny, Czech Republic, 1996. J. Euk. Microbiol. 44, 25A
3. Suchan, P., Kulda, J., Schrével, J., and Tachezy J. 1997. The host protein independent iron uptake by *Tritrichomonas foetus*. International Symposium Iron in Biology and Medicine, Saint-Malo, France, 1997. Program and Abstract Book, p.58
4. Kulda, J., Suchan, P., Poislová, M., and Tachezy, J. 1997. Iron acquisition and virulence of *Tritrichomonas foetus*. Future chemotherapeutic targets for the anaerobic protozoa, satellite meeting to ICOP, Brisbane, Australia, 1997. Program and Abstract Book, p.6.5
5. Suchan, P. and Tachezy, J. 1997. The host protein independent iron uptake by *Tritrichomonas foetus*. 3rd scientific conference of postgraduate students with international participation, Prague, Czech Republic, 1997. Book of Abstracts, p.19
6. Kulda, J., Suchan, P., Poislová, M., Rasoloson, N., and Tachezy, J. 1998. Význam železa pro infekci anaerobními parazitickými prvky. České a Slovenské parazitologické dny, Tále, Czech Republic, 1998. Kniha abstraktů, p.17
7. Suchan, P., Petrák, J., Vyoral, D., Kulda, J., and Tachezy, J. 1998. Incorporation of iron into cell compartments by anaerobic protist *Tritrichomonas foetus*. Iron in Medicine and Biology - Annual meeting of the European Iron Club and BIOMED Workshop on Iron Chelators, Conference Centre Woudschoten, Zeist, The Netherlands, 1998. Program and Abstract Book, p.65
8. Suchan, P., Petrák, J., Vyoral, D., Kulda, J., and Tachezy, J. 1999. Subcellular localization of iron incorporated into *Tritrichomonas foetus*. 28. Jírovcovy protozoologické dny, Czech Republic, 1999. J. Euk. Microbiol. 76 (Suppl.), 69
9. Suchan, P., Petrák, J., Vyoral, D., Nohýnková, E, Kulda, J., and Tachezy, J. 1999. *Tritrichomonas foetus*: incorporation of iron into cell compartments. World Congress on Iron Metabolism – BIOIRON 99, Sorrento, Italy, 1999. Abstract Book, p.405
10. Coombs, G.H., Goodall, G., Suchan, P., Westrop, G.D., Laphorn, A.J., Hirt, R.P., Müller, S., and Mottram, J.C. 2000. Antioxidant systems of *Trichomonas vaginalis*. Molecular Parasitology Meeting XI, Woods Hole, MA, USA, 2000. Abstract Book, p.44

4. ZÁVĚR

Výsledky mé práce přispěly k následujícím závěrům:

1. Buňky anaerobních prvoků jsou schopny v různé míře využívat železo z laktoferinu, transferinu i z nízkomolekulárních komplexů. Z experimentů sledujících stimulaci růstu a intracelulární inkorporaci tohoto kovu vyplývá, že buňky *T. foetus* využívají pro svůj růst železo ze všech výše zmíněných zdrojů, zatímco *G. intestinalis* a *E. histolytica* mohou pokrývat své nutriční požadavky pouze železem vázaným v nízkomolekulárním komplexu (železo-nitrioltriacetát). Rozdílná schopnost parazitů využívat železo z různých zdrojů je patrně dána odlišnou lokalizací v těle hostitele. Zatímco *T. foetus* napadá především dělohu, děložní hrdlo a vaginu, tedy prostředí bohaté zejména na laktoferin a transferin, ve kterém se za určitých okolností může vyskytovat i železo v nízkomolekulární formě, buňky *G. intestinalis* a *E. histolytica* parazitují v trávicím traktu, v němž se nachází především nízkomolekulární komplexy železa.

2. Buňky *T. foetus* přijímají železo z laktoferinu pomocí endocytózy zprostředkované receptory. Na jedné buňce je exprimováno přibližně 1.7×10^5 specifických vazebných míst pro laktoferin ($K_d \cong 3.6 \mu\text{M}$). Komplex hololaktoferin-receptor je nejprve endocytován a železo je následně uvolněno intracelulárně v endosomálním kompartmentu, kde nízké pH oslabuje vazbu mezi tímto kovem a laktoferinem. Po uvolnění železa z laktoferinu je protein buňkami recyklován. Proteolytické štěpení laktoferinu, které vede k uvolnění železa z tohoto proteinu u savčích buněk, nebylo u trichomonád pozorováno.

3. Transferinové železo přijímají buňky *T. foetus* pomocí mechanismu, který je nezávislý na specifických receptorech. Železo je nejprve extracelulárně uvolněno vlivem nízkého pH, které je trichomonádami vytvářeno v jejich okolí a vlivem extracelulární redukce zprostředkované NADH-závislou ferrireduktázovou aktivitou a sekretovanými nízkomolekulárními redukčními agens. Redukované dvojmocné železo je následně transportováno do cytoplazmy pomocí mechanismu pravděpodobně zprostředkovaného specifickými membránovými přenašeči. Identickým mechanismem, tj. pomocí membránových přenašečů, je patrně absorbováno také železo z nízkomolekulárních zdrojů.

4. Hydrogenosomy představují jeden z hlavních cílových kompartmentů, do nichž je železo intracelulárně transportováno. Tyto organely jsou schopny při inkubaci s komplexem Fe-NTA železo účinně akumulovat (360.4 pmol Fe / hod. / mg prot.). Atomová absorpční spektrofotometrie prokázala, že ustálená hladina železa v těchto organelách při dlouhodobé kultivaci v komplexním médiu je extrémně vysoká (54.4 nmol Fe / mg prot.). Pomocí nativní elektroforézy bylo zjištěno, že je železo v těchto organelách vázáno nejméně devíti komponentami. Sekvence aminokyselin N-terminálního konce nejvýraznější složky vázající železo, proteinu označeného „band H-I“, prokázala, že se jedná o feredoxin adrenoxinového typu. Vysoká zastoupenost tohoto proteinu v hydrogenosomu naznačuje, že feredoxin nemusí plnit pouze funkci přenašeče elektronů, jak se původně předpokládalo, ale že se v hydrogenosomech může uplatňovat i při dalších procesech souvisejících s metabolismem železa.

5. Přestože je ustálená hladina železa v cytoplazmě 4 × nižší než v hydrogenosomech (13.4 nmol Fe / mg prot.), tento kompartment vykazuje srovnatelnou rychlost akumulace železa při krátkodobé inkubaci s Fe-NTA (304.7 pmol Fe / hod. / mg prot.). Analýza pomocí nativní elektroforézy prokázala, že hlavní složkou, která váže železo v cytoplazmě, je LIP („pool“ labilně vázaného intracelulárního železa). Železo vázané v této složce je odstranitelné silnými chelátory a v buňce je z větší části vázáno na směs molekul o relativní molekulové hmotnosti 5-30 kDa. U trichomonád i dalších anaerobních prvoků zaujímá LIP mnohem větší část z celkového množství železa než u savčích buněk. Silné zastoupení labilně vázaného železa může souviset s nepřítomností feritinu u prvoků a možným využitím LIPu jako intracelulární zásobárny železa u této skupiny organismů. V cytoplazmě buněk *T. foetus* bylo dále identifikováno minimálně dalších pět komponent vázajících železo, z nichž nejvýraznější byla označená jako „band-C“. Studie kinetiky inkorporace železa do těchto proteinů ukázaly, že se jedná o konečné příjemce železa.

6. Mechanismy umožňující získávat železo od hostitele hrají klíčovou roli ve virulenci *Trichomonas foetus*. Kmen *T. foetus* KV-1, který má sníženou schopnost přijímat železo z nízkomolekulárních komplexů a transferinu, projevuje při experimentální infekci myšího modelu sníženou virulenci (~5% hladina mortality infikovaných myší) ve srovnání s kmenem LUB-1 MIP (~80% hladina mortality infikovaných myší), jehož schopnost

4. Závěr

získávat železo ze jmenovaných zdrojů je větší. Zvýšení dostupnosti železa v prostředí hostitele formou intraperitoneálního podávání nízkomolekulárního komplexu železa myším má však za následek zvýšení virulenci kmene KV-1 na úroveň srovnatelnou s kmenem LUB-1 MIP.

5. PŘÍLOHY

Příloha 1.

Jan Tachezy, Jaroslav Kulda, Ivana Bahníková, Pavel Suchan,
Jakub Rázga, and Joseph Schrével

***Tritrichomonas foetus*: iron acquisition from lactoferrin
and transferrin.**

Experimental Parasitology

1996

Vol. 83: 216-228

Příloha 2.

Jan Tachezy, Pavel Suchan, Joseph Schrével, and Jaroslav Kulda

**The host-protein-independent iron uptake in
*Tritrichomonas foetus***

Experimental Parasitology

1998

Vol. 90: 155-163

Příloha 3.

Jaroslav Kulda, Marie Poislová, Pavel Suchan, and Jan Tachezy

**Iron enhancement of experimental infection of mice by
*Tritrichomonas foetus***

Parasitology Research

1999

Vol. 85: 692-699

Příloha 4.

Pavel Suchan, Daniel Vyoral, Jiří Petrák, Róbert Šuťák, Dominique Rasoloson, Eva Nohýnková, Pavel Doležal and Jan Tachezy

Incorporation of iron into *Tritrichomonas foetus* cell compartments revealed ferredoxin as a major iron-binding protein in hydrogenosomes

Microbiology

ACCEPTED (in press)