

Hepcidina, Hierro, Hipoxia e Inflamación

Giuliani R.A.

E-mail ricardoantoniogiuliani@hotmail.com



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Fecha de recepción: 05/03/2012
Fecha de aprobación: 30/03/2012

HEMATOLOGIA, Vol. 16 N° 2: 100-105
Mayo-Agosto, 2012

El tema Hepcidina y Metabolismo del Hierro fue tratado en al menos dos publicaciones previas de la Revista Argentina de Hematología. Sin embargo, en dichos escritos quedaron muchas dudas sobre los mecanismos reguladores del gen codificante de Hepcidina (HAMP1). Por eso decidí realizar un esfuerzo adicional en la misma dirección.

RESUMEN

La transcripción del gen HAMP1 (Hepcidina) puede ser activada por inflamación o incremento en la concentración de hierro sérico. La proteína de sensibilidad (HFe) a Hemocromatosis Hereditaria tipo 1 (HH1) funciona como "sensor" de hierro. La transferrina (Tf) saturada (Holo-Tf) tiene mayor afinidad por el receptor tipo1 de Tf (TfR1) que la HFe. Por eso Holo-Tf desplaza a HFe de su complejo con TfR1 y habilita su interacción con TfR2. El complejo TfR1/Holo-Tf es internalizado y una vez extraído el Fe+3, reciclado a la superficie celular. Por el contrario, el complejo TfR2/HFe no se internaliza y sirve exclusivamente para activar la ruta Erk/MAPK que culmina en activación transcripcional del gen de Furina. Esta última tiene la misión de convertir Prepro-Hepcidina en Hepcidina activa y Hemojuvelina de membrana (mHJV) en HJV soluble (sHJV). La función de la Hepcidina es degradar Ferroportina, instrumento crítico para el ingreso de Fe+2 al plasma. Las mutaciones que comprometen la función de HFe, TfR2 y Furina dan lugar a sobrecarga de hierro (HH) por defecto en la función convertasa de Prepro-Hepcidina a Pro-Hepcidina de la Furina. Por otra parte mHJV funciona como "presentadora" de BMP6 a su receptor (BMP-R). La formación de este complejo ligante-receptor activa la función Serin-Treonin Kinasa de BMP-R, que fosforila rSMAD1, 3, 5 y habilita dimerizaciones con SMAD4. Los dímeros rSMAD/SMAD4

migran al núcleo y reaccionan con elementos respondedores a SMAD en el Promotor de HAMP1. Dicha interacción activa la transcripción de Prepro-Hepcidina, que luego será convertida a Pro-Hepcidina por Furina. Por eso la delección de Tf2 también genera HH. La Furina convierte mHJV en sHJV por corte en AA 332-335 y desprendimiento del módulo carboxiterminal responsable de su anclaje a membrana por interacción con Glucosilfosfatidilinositol (GPI). Ambas versiones de HVJ, libre (sHJV) y ligada a GPI (mHJV) tienen igual afinidad por BMP6 y compiten entre sí por esta citokina. Ergo, el incremento en sHJV conlleva decremento en la interacción BMP6/BMP-R. Por consiguiente la Furina por un lado activa la Hepcidina y por otro modera su activación transcripcional por generación de sHJV. Finalmente, la serino-endoproteasa Matriptasa-2 (MT-2) degrada la mHJV y contribuye a moderar la interacción BMP6/BMP-R. Por eso, la delección de MT-2 fortalece la ruta BMP6/BMP-R/rSMAD-SMAD4 y expresión de Prepro-Hepcidina, aumenta la degradación de Ferroportina y provoca anemia ferropénica resistente al tratamiento con hierro enteral (IRIDA). El promotor de HAMP1 también posee elementos respondedores a dímeros STAT (inflamación). La dimerización de STAT resulta de fosforilaciones en sitios Tirosina (Y) por kinasas Janus (JAK) y estas son activadas por complejos IL-1/IL1-R u otras combinaciones inflamatorias citokina-receptor. Por otra parte los radicales libres del oxígeno (ROS) constituyen mediadores críticos en la represión por hipoxia del gen HAMP1. Los ROS inhiben la interacción entre C/EBP α , STAT-3 y el elemento respondedor a STAT del promotor HAMP1. La eritropoyesis también modula la expresión de HAMP1 y lo hace a través del Factor 15 de Crecimiento y Desarrollo (GDF15) y Twisted Gastrulation (TWSG1), liberados respectivamente por progenitores eritroides tardíos y tempranos.

Palabras claves: Hepcidina Hemocromatosis, Proteína Morfogénica de Hueso

ABSTRACT

HAMP1 gene can be activated by inflammation or increase in seric Iron concentration. The marker protein (HFE) of Hereditary Hemochromatosis type 1 (HH1) works as an Iron Sensor. Saturated Transferrin (Holo-Tf) has more affinity for Tf Receptor 1 (TfR1) than by HFE. Therefore, Holo-Tf removes HFE of its complex with TfR1 and allows its interaction with TfR2. TfR1/Holo-Tf is internalized, Fe+3 is released and the complex recycled to the cell surface. On the contrary, the complex TfR2/Holo-Tf remains on the cell surface and stimulates the Erk/MAPK pathway to activate the the Furin gene (*fur*). The role of Furin is to convert Pro-Hepcidine into active Hepcidin and membrane Hemojuvelin (mHJV) into soluble HJV. Hepcidin induces internalization and degradation of Ferroportin, which is critical for the export of Iron to plasma. Mutations of the HFE, TfR2 or Furin genes are known to cause Iron Overload (HH) by defect in the function of Furin proconvertase that transform Preprohepcidin in Prohepcidin. On the other hand, mHJV works as an "introducer" of BMP6 to its receptor (BMP-R). The assembling of this ligand-receptor complex activates the Serine-Threonine Kinase of BMP-R, which phosphorylates rSMADs 1, 3, 5 and promotes dimerization with SMAD4. The dimers rSMAD/SMAD4 migrates to the nucleus and reacts with SMAD responsive elements at the HAMP1 promoter. Such interaction activates the transcription of Preprohepcidin, which would be converted in Prohepcidin by Furin. That is why the deletion of TfR2 also give rise to HH. In addition to this, Furin converts mHJV in sHJV by splitting at AA 332-335 and detachment of its carboxyterminal domain, which is responsible for its anchoring to the membrane, through interaction with Glycosylphosphatidylinositol (GPI). Both versions of HJV, "free" (sHJV) and bound to GPI (mHJV) have similar affinity for BMP6 and competes among them for this cytokine. For that reason the increase in sHJV implies decrease in the interaction between BMP6/BMP-R. Therefore, Furin has the dual task to activate Hepcidin and moderate its transcription by generation of sHJV. Finally the Serinendoprotease Matriptase-2 (MT-2) degrades mHJV and helps to moderate the interaction between BMP6-BMP-R. That is why the deletion of MT-2 enhance the pathway BMP6-BMP-R/r-SMAD-SMAD4 and expression of Hepcidin, increase Ferroportin degradation and provoques enteral Iron treatment Resistant Iron Deficiency Anemia (IRIDA). The HAMP1 promoter have also responsive elements to STAT dimers (inflammation). STAT dimerization occurs by phosphorylation in Tyrosine (Y) residues, mediated by Janus Kinases (JAK), and these enzymes are activated by complexes IL-1/IL1-R or other inflammatory cytokin-receptor combinations. On the other hand, Reactive Oxygen Species (ROS) are critical mediators of the suppression of HAMP1 gene by hypoxia. The ROS inhibits the interaction among C/EBP α , STAT3 and the STAT responsive element at the HAMP1 promoter. The erythropoiesis also modulates the expression of HAMP1 and does it through Growth and Differentiation Factor 15 (GDF15) and Twisted Gastrulation (TWSG1), which are released by early and late erythroid progenitors

Key words: Hepcidin Hemochromatosis, Bone Morphogenetic Protein

La Hepcidina controla el egreso de hierro desde Macrófagos, Hepatocitos y Enterocitos, mediante unión a Ferroportina (FP) e inducción de su degradación. Por eso la Hepcidina desempeña un rol central en metabolismo del hierro. Esta proteína se produce mayormente en Hígado y su expresión es regulada en sentido positivo por Hemojuvelina (HJV), Transferrin Receptor 2 (TfR2), proteína de susceptibilidad (HFE) a Hemocromatosis Hereditaria tipo I (HH1), Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) y Neogenina (NG) y en sentido negativo por Matriptasa-2 (MT-2), Hipoxia (ROS) y factores eritroides GDF15 y TWSG1¹.

El promotor del gen de Hepcidina (HAMP1) posee elementos de respuesta a dímeros STAT (inflamación) y SMAD (metabolismo del hierro).

Por eso la activación transcripcional del gen HAMP1 responde tanto a inflamación (JAK/STAT) como a incremento en la concentración de hierro (BMP-R/SMAD)².

Elementos de Respuesta son secuencias del DNA que reaccionan específicamente contra determinados Factores Transcripcionales. En este caso dímeros STAT o SMAD.

Ambas vías de activación transcripcional, STAT y SMAD, pueden funcionar aisladamente o responder de manera sinérgica. De hecho el Coactivador transcripcional p-300 ejerce efecto puente entre dímeros STAT y SMAD a nivel del promotor de HAMP1^{3, 2}.

La vía inflamatoria, que responde a Receptores de Interleukinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, L-12/IL-23, IL17 depende del auxilio de Tirosin Kinasas Janus (JAK) ligadas a su proyección intracelular. Las Kinasas JAK fosforilan monómeros STAT, inducen su dimerización y exponen un sitio de localización nuclear que habilita su migración al núcleo^{4, 5}.

Algo parecido ocurre con los receptores de Bone Morphogenetic Protein (BMP-R) y Transforming Growth Factor β (TGF β -R), porque fosforilan e inducen dimerización en monómeros SMAD⁶.

Los sistemas de transmisión de señales STAT y SMAD constituyen modelos de reacción extremadamente rápidos, eficaces y económicos.

El encuentro entre el ligante y su receptor promueve la formación de un dímero STAT o SMAD y este se traslada directamente al núcleo para activar la transcripción de determinados genes.

Los monómeros STAT son fosforilados por kinasas Janus (JAK) en residuos Tirosina (Y) y los monómeros rSMAD por TGF β -R/BMP-R en Serinas (S) y Treoninas (T).

Las citocinas y receptores de familia BMP pertenecen a la superfamilia TGF β y todos los receptores

de esta superfamilia señalizan mediante formación de dímeros SMAD.

Es importante remarcar que **SMAD4 es un monómero constitutivamente activo**, por eso también se le denomina cSMAD.

Los monómeros SMAD4 son imprescindibles para la formación de dímeros SMAD, sin ellos las señales que emiten los receptores de superfamilia TGF β quedan automáticamente interrumpidas.

Los murinos Knock Out para c-SMAD (SMAD4) mueren antes de la etapa de gastrulación: esto pone en evidencia el amplio rango de funciones que depende de la integridad de la ruta SMAD de señalizaciones⁷.

Mediante sistemas Cre-Lox P es posible elegir con precisión el momento, región y tejido específico para deletar un determinado gen⁸.

Este recurso permitió descubrir que la delección SMAD4 en tejidos epiteliales de cabeza y cuello, provoca inestabilidad genómica y habilita el desarrollo de tumores en dichos tejidos.

La delección de SMAD4 bloquea las señalizaciones vía TGF β y BMP y la expresión de p21, que es un inhibidor de Kinasas Dependientes de Ciclinas (CDKs). Por eso estos animales desarrollan tumores malignos de piel entre los 3 y 13 meses de edad⁹.

La interacción ligante-receptor entre moléculas de superfamilia TGF β , activa la función Serin-Treonin Kinasa de sus proyecciones intracelulares.

La activación de receptores TGF β -R y BMP-R se traduce en fosforilaciones sobre residuos Serina y Treonina de monómeros rSMAD.

Los monómeros SMAD que dependen del receptor para adquirir forma activa, se distinguen con letra "r" (rSMAD).

El panel rSMAD a disposición de receptores de superfamilia TGF β es bastante restringido y específico: SMAD 2 y 3 para TGF β -R y SMAD 1, 5 y 8 para BMP-R.

Los dímeros SMAD resultan de la interacción entre un rSMAD y SMAD4, por eso, la delección de SMAD4 silencia todas las señalizaciones de superfamilia TGF β .

La superfamilia TGF β incluye a Bone Morphogenetic Protein (BMP), que es una subfamilia TGF β responsable de la arquitectura de diversos tejidos, entre otros el tejido óseo¹⁰.

Debe entonces remarcar que SMAD 4 no es un "Modulador" de moléculas TGF β .

Moduladores de citocinas son moléculas como Fibrilina, que moderan la actividad de TGF β en tejido conectivo de grandes vasos, cartílago y aparato de sostén del cristalino. La falta de Fibrilina provoca Síndrome de Marfan por exceso de TGF β en dichos tejidos¹¹.

Modulador es la Hemojuvelina solubilizada por Furina (sHJV), porque conserva la misma afinidad por BMP6 que la HJV ligada a membrana (mHJV) y puede "modular" el acceso de esa citokina a su receptor (BMP-R)¹².

Ambas versiones de HJV, libre (sHJV) y ligada a membrana (mHJV), compiten en su afinidad por BMP6 y de esta manera regulan la expresión de Hecpídina¹³.

La HJV de membrana (mHJV) funciona como co-receptor de BMP2,4,6 y forma complejo con BMP-R^{14,15}.

Por eso los animales HJV-/- exhiben bajo nivel de fosforilación en SMAD1,5 y 8¹⁶.

La coexpresión de mHJV es entonces crítica para la reacción entre BMP2, 4 y 6 y su receptor (BMP-R).

La delección de HJV en murinos reproduce el mismo síndrome de sobrecarga temprana de hierro que se ve en pacientes con mutaciones en el gen de HJV¹⁷.

Coherente con estos conceptos, la inyección crónica de sHJV en murinos provoca sobrecarga de hierro, porque bloquea el acceso de BMP al complejo receptor mHJV/BMP-R y anula totalmente la expresión de Hecpídina¹⁸.

La solubilización de HJV ocurre por efecto de Furina, que corta la molécula a nivel del AA 332-335 y desprende sHJV del módulo que la mantiene anclada a Glucosilfosfatidilinositol (GPI).

Recordemos que mHJV permanece ligada a membrana mediante anclaje a GPI, como ocurre con CD55, CD59 y muchas otras proteínas¹⁹.

Es importante y necesario precisar cómo funciona el eje central de activación transcripcional de HAMP1, que es el gen de Hecpídina.

La citokina BMP6 y en menor medida BMP2 es "capturada" por mHJV y "presentada" a su receptor BMP-R.

El cambio conformacional que sufre **BMP-R** por interacción con su ligante, habilita fosforilaciones en residuos Serina y Treonina de monómeros r-SMAD.

Recordemos que **TGF β** y **BMP** son miembros de la gran superfamilia TGF β , igual que sus receptores, por consiguiente la interacción ligante-receptor funciona de manera similar en ambos casos.

El dímero **TGF β** (**o BMP**) se une a **TGF β -R2** (**o BMP-R2**), este recluta **TGF β -R1** (**o BMP-R2**), activa por fosforilación su módulo **Serin-Treonin-Kinasa (STK)** y promueve la formación del dímero receptor de **TGF β o BMP**.

Una vez **ensamblado el complejo receptor**, los monómeros rSMAD son atraídos y fosforilados, quedando en condiciones de reacción con SMAD4, formar un dímero rSMAD/SMAD4 y trasladarse al núcleo para ligarse a determinados promotores genéticos, en este caso al promotor de HAMP1.

El silenciamiento de HFE y/o Tfr2 reduce tanto la fosforilación de Erk como la expresión de Furina.

Los animales Tfr2 -/- (nulos) exhiben bajo nivel de fosforilación en Erk1/2 y pobre actividad de Furina.

Por otra parte, el tratamiento con un inhibidor de Furina también suprime fuertemente la expresión de Hpcidina¹.

Para su solubilización la mHJV debe ser "arrastrada" de alguna manera desde la superficie celular hasta el sitio de acción de la Furina, ubicado en el Trans-Golgi. Acorde con Zhang et al dicha tarea es ejercida por Neogenina (NG), un ligante específico de mHJV²⁰.

La NG exhibe un extenso dominio extracelular adornado con 4 motivos símil inmunoglobulinas y tres dominios citoplasmáticos nominados P1, P2, P3²¹.

Acorde con Zhang et al NG competiría con GPI en su afinidad por mHJV y haría posible su regreso al interior de la célula, particularmente al trans-Golgi.

En el Trans-Golgi la Furina cortaría la mHJV a nivel AA 332-335, amputando la región carboxi-terminal que le sirve de anclaje a GPI, para habilitar su acceso al espacio extracelular²².

La liberación de HJV mediada por Furina es regulada de manera negativa por Hierro Ligado y No Ligado a Transferrina.

La Furina está codificada en un gen ubicado corriente arriba del gen FES (Fes Upstream Region). Por eso al producto de este gen se le llama FURINA²³.

FES es acrónimo de Feline Sarcoma Oncogene. Este gen está representado en el humano y codifica una proteína con actividad tirosin-kinasa, que tiene a cargo la fosforilación de un grupo de proteínas adhesivas del macrófago.

La Furina es una serino-endoproteasa transmembrana que corta la Hemojuvelina (HJV) a nivel de un sitio polibásico Arg-x-(Arg/Lys)-Arg, ubicado en su extremo carboxilo (AA 332-335). De esta manera HJV de 50 kDa es convertida en una forma soluble de 40 kDa^{24,25}.

Sin embargo, las experiencias de Lee DH et al, recientemente publicadas en Blood, tienden a debilitar esta hipótesis²⁶.

Lee et al observaron que los animales deprivados del gen de NG reproducen el fenotipo humano de Hemocromatosis Juvenil (HH2), caracterizado por sobrecarga de hierro en Hígado y depleción en Macrófagos²⁶.

Acorde con estas experiencias la NG parece promover señales que culminan en activación del gen HAMP1 (Hpcidina). Por eso los animales NG -/- exhiben fuerte incremento en la concentración de Ferroportina (FPN) de diversos tejidos: intestino, hígado, bazo y músculo.

En suma, los fenotipos de ratones mutantes NG -/- parecen ser muy parecidos al de animales knock out HJV -/- y BMP6 -/-. Todos ellos se caracterizan

por sobrecarga de hierro hepático, pobre expresión de Hpcidina y defectuosa señalización vía BMP-R (26).

Acorde con Lee et al, es probable que la NG forme parte del complejo receptor (NG/mHJV/BMP-R), presunción que se apoyaría en la probada coexpresión de NG, HJV y BMP-R en diversas células, particularmente hepatocitos perivenosos y músculos^{27,26}.

En definitiva, de las experiencias recientemente publicadas sobre NG y HJV surgen resultados fuertemente contradictorios, por consiguiente, lo único que podemos afirmar actualmente es que NG desempeña un rol muy importante en metabolismo del hierro. Falta develar su íntima relación con mHJV y Furina.

Sin dudas la expresión de Hpcidina se encuentra fuertemente regulada en respuesta a múltiples estímulos: sobre regulada por incremento en los niveles séricos de hierro o citokinas inflamatorias y sub regulada por hipoxia o progenitores eritroides^{28,29}.

En condiciones de hipoxia muscular, la liberación de sHJV denunciaría que es insuficiente la concentración de hierro en músculo. Funcionaría como mecanismo específico de tejido, independiente del status de oxigenación hepático³⁰.

También la expresión de BMP6 se encuentra estrechamente regulada por la concentración de Hierro sérico: a mayor Hierro mayor expresión.

Es importante remarcar que BMP6 queda atrapado en el espacio extracelular cuando predomina sHJV y accede a BMP-R cuando predomina mHJV.

También la **Serino-proteasa Matriptasa-2 corta la molécula de mHJV, pero lo hace a nivel Arginina 228**, dando lugar a un fragmento soluble que carece de afinidad por BMP-6²⁵.

Destacamos entonces que la serino-endoproteasa MT-2 y la pro-proteino-convertasa Furina modulan la actividad mHJV y BMP-R de manera diferente.

MT-2 regula la concentración de mHJV y Furina modera el acceso de BMP6 a su receptor.

MT-2 degrada la mHJV liberando un producto inerte que carece de afinidad por BMP6.

Furina genera sHJV mediante clivaje de mHJV y dicho fragmento compite con mHJV en su afinidad por BMP6²⁵.

La molécula de susceptibilidad a la **Hemocromatosis Hereditaria tipo 1 (HFe)** es en definitiva un regulador de la expresión de Furina.

Y la Furina es además la llave convertora de Pro-Hpcidina en Hpcidina.

Sin Furina no hay expresión de Hpcidina y sin Hpcidina es imposible modular el acceso de Hierro al plasma.

Por eso se dice que HFe y Tfr2 funcionan como **sensores de Hierro sérico.**

La HFe permanece ligada aTfr1 hasta ser desplazada por Holo-Tf y captada por Tfr2.

Finalmente la interacción HFe/TfR2 habilita señales vía Erk1, Erk2, MAPK, que culminan en la activación transcripcional del gen de Furina.

En suma, esta enzima ejerce un efecto moderador sobre la activación transcripcional de HAMP1 y activador postranscripcional por conversión de Pro-Hepcidina en Hepcidina^{31, 30, 32, 25}.

Las ratas ferropénicas liberan gran cantidad de HJV al plasma, sin que esto se traduzca en cambios en el nivel de mRNA/HFe hepático ni en el nivel de HJV en músculo^{33, 32}.

La Hepcidina liga Ferroportina e induce su internalización y degradación. De esta manera modula la exportación de hierro desde Enterocitos, Macrófagos y Hepatocitos³⁴.

La Hepcidina es una Defensina que ejerce su tarea antimicrobiana mediante privación de Hierro sérico, un elemento crítico para la vida de diversos microorganismos.

Los fenómenos inflamatorios generan anemia ferropénica porque inducen hiperhepcidinemia dependiente e independiente de Interleukina-6 (IL-6)^{35, 36}.

Los pacientes con Mieloma Múltiple (MM) suelen presentar Anemia aunque tengan Función Renal Normal y escasa infiltración clonal en Médula Osea.

En estos casos es frecuente registrar alto nivel sérico y urinario de Hepcidina y este fenómeno suele tener correlato con incremento en la concentración sérica de IL-6 y BMP2^{37, 38, 39}.

De hecho, el suero de pacientes con MM induce incremento en la expresión de Hepcidina en cultivos celulares y dicho fenómeno puede neutralizarse mediante anticuerpos anti-IL-6.

Es importante recordar que el MM se caracteriza por fuerte expresión de IL-6 en células estromales de Médula Osea³⁷.

Por otra parte, en pacientes con MM es frecuente registrar incremento en la concentración de BMP-4 y BMP-6, citocinas que también intervienen en la activación transcripcional de HAMP1^{40, 41}.

La Hipoxia aumenta significativamente la generación de Radicales Libres de Oxígeno (ROS) y decrementa la activación transcripcional de HAMP1 (Hepcidina). Por otra parte los anti-oxidantes previenen el efecto supresor de la Hipoxia sobre la expresión de Hepcidina^{42, 43}.

Los Factores Transcripcionales (FT) C/EBP α y STAT3 se disocian del promotor de HAMP1 en condiciones de Hypoxia y se asocian fuertemente al mismo bajo tratamiento con anti-oxidantes.

Estos datos sugieren que los ROS bloquean el acceso de los FT C/EBP α y STAT3 al promotor de HAMP1y así desactivan la expresión de Hepcidina. Los estudios realizados en ratas con delección de Hipoxia Inducible Factor (HIF) demostraron que este

FT no es responsable del efecto de la Hipoxia sobre HAMP1^{42, 43}.

Los Síndromes Talasémicos se caracterizan por fuerte expansión en la masa de progenitores eritroides y esto se correlaciona con supresión en la expresión de HAMP1. Vehículo de este efecto supresor son las proteínas TWSG1 y GCF15, liberadas respectivamente por progenitores eritroides tempranos y tardíos^{44, 45}.

En Talasemia humana se demostró alto nivel de expresión en GDF15 y esto tuvo correlato con bajísimo nivel en la excreción urinaria de Hepcidina. Por otra parte, en animales talasémicos se observó incremento de TWSG1 en Bazo, Médula Osea e Hígado.

Ambas proteínas, GDF15 y TWSG1, ejercen efecto supresor sobre las señalizaciones que emanan del complejo mHJV/BMP-R^{46, 47}.

Mucho es lo que hemos aprendido en el curso de las últimas décadas sobre mecanismos reguladores del metabolismo del hierro.

Los actores y las rutas principales involucradas en este juego ya han sido identificados. Sin dudas gran parte de los interrogantes pendientes serán respondidos en los próximos años⁴⁸.

BIBLIOGRAFÍA

1. Poli M, Liscieti S, Gandini V et al (2010) Transferrin receptor 2 and HFE regulate furin expression via mitogen-activated protein kinase/ extracelular signal-regulated kinase (MAPK/ Erk) signaling. Implications for trans-ferrin-dependent hepcidin regulation *Hematol* 95 (11) 1832-1840
2. Nakashima K, Yanagisawa M, Arakawa H et al (1999) Synergistic Signaling in Fetal Brain by STAT 3-Smad1 Complex Bridged by p300. *Science* 284 (5413) 479-482
3. Pouppnot C, Jarayaraman L, Massagué J (1998) Physical and Functional Interaction of SMADs and p300/CBP. *J Biol Chem* 273 (36) 22865
4. Malemud CJ, Pearlman E (2009) Targeting JAK/STAT signaling pathway in inflammatory diseases. *Curr Signal Transduct. Ther* 4: 201-221
5. Kaplan MH (2005) STAT4: A critical regulator of inflammation in vivo. *Immunol Res* 31: 231-242
6. Bessa PC, Casal M, Reis RL (2008) "Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to the clinic. Part I Basic concepts" *J Tissue Eng Regen Med* 2 (1) 1-13
7. Sirard C, de la Pompa JL, Elia A et al (1998) The tumor suppressor gene Smad4/Dpc4 is required for gastrulation and later for anterior development of the mouse embryo. *Genes Dev* 12 (1) 107-119
8. Sauer B, Henderson N (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5166-5170
9. Qiao W, Li AG, Owens P et al (2006) Hair follicle defects and squamous cell carcinoma formation in Smad4 conditional knockout mouse skin. *Onco-gene* 25: 207-217
10. Bleuming SA, He XC, Kodach LL et al (2007) "Bone morphogenetic protein signaling suppresses tumorigenesis at gastric epithelial transition zones in mice". *Cancer Res* 67 (17) 8149-8155
11. Kainulainen K, Karttunen L, Puhakka L et al (1994) "Mutations in the fibroblast growth factor receptor gene responsible for dominant ectopia lentis and neonatal Marfan syndrome". *Nat Genet* 6 (1) 64-69

12. Silvestri L, Pagani A, Camaschella C (2008) Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. *Blood* 111 (2) 924-931
13. Lin L, Goldberg YP, Ganz T (2005) Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin. *Blood* 106 (8) 2884-2889
14. Samad Tam Rebbacoragada A, Bell E et al (2005) DRAGON: a bone morphogenetic protein co-receptor. *J Biol Chem* 280 (14) 14122-1429
15. Babbit JL, Zhang Y, Samad TA et al (2005) Repulsive guidance molecule (RGMa) a DRAGON homologue, is a bone morphogenetic protein core-ceptor. *J Bio Chem* 280 (33) 29820-29827
16. Babbit JL, Huang FW, Wrighting DM et al (2006) Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet* 38 (5) 531-539
17. Niedekofler V, Salie R, Arber S (2005) Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload. *J Clin Invest* 115 (8) 2180-2186
18. Babbit JL, Huang FW, Xia Y et al (2007) Modulation of Bone Morphogenetic Protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J Clin Invest* 117 (7) 1933-1939
19. De Domenico I, Ward DM, Kaplan J (2007) Hepcidin regulation: ironing out the details. *J Clin Invest* 117 (7) 1755-1758
20. Rajagopalan S, Deitinghoff L, Davis D et al (2004) Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule. *Nat Cell Biol* 6 (8) 756-762
21. Kolodziej PA, Timpe LC, Mitchell KJ et al (1996) Frazzled encodes a Drosophila member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* 87 (2) 197-207
22. Thomas G (2002) "Furin at the cutting Edge: from protein traffic to embryogenesis and disease" *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (10) 753-766
23. Jucker M, McKenna K, da Silva AJ et al (1997) "The Fes protein-tyrosine kinase phosphorylates a subset of macrophage proteins that are involved in cell adhesion and cell-cell signaling". *J Biol Chem* 272 (4) 2104-2109
24. Zhang AS, Yang F, Wang J et al (2009) Hemojuvelin Neogenin Interaction Is Required for Bone Protein 4 induced Hepcidin Expression. *J Biol Chem* 284 (34) 22580-22589
25. Maxon J, Chen J, Enns Cam Zhang AS (2010) Matriptase-2 and proprotein convertase cleaved forms of hemojuvelin have different roles in the down-regulation of hepcidin expression. *J Biol Chem* (ahead of print/Oct 11)
26. Lee DH, Zhou LI, Zhou Z et al (2010) Neogenin Inhibits HJV secretion and regulates BMP-induced hepcidine expression and iron homeostasis. *Blood* 115 (15) 3136-3145
27. Kang JS, Yi MJ, Zhang W et al (2004) Netrins and neogenin promote myotube formation *J Cell Biol* 167 (3) 493-504
28. Roy CN, Andrews NC (2005) Anemia of inflammation: the hepcidin link. *Curr Opin Hematol* 12 (2) 107-111
29. Nemeth E (2008) Iron regulation and erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 15 (3) 169-175
30. Silvestri L, Pagani A, Camaschella C (2008) Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. *Blood* 111 (2) 924-931
31. Kuninger D, Kuns-Hashimoto R, Nili M, Rotwein P (2008) "Pro-protein convertases control the maturation and processing of the iron-regulatory protein, RGMc/hemojuvelin". *BMC Biochem* 9:9
32. Lin L, Nemeth E, Goodnough JB et al (2008) "Soluble hemojuvelin is released by proprotein convertase-mediated cleavage at a conserved polybasic RNRR site" *Blood Cells Mol Dis* 40 (1) 122-131
33. Zhang AS, Anderson SA, Meyers KR et al (2007) Evidence that inhibition of hemojuvelin shedding in response to iron is mediated through neogenin. *J Biol Chem* 282:12547-12556
34. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J et al (2004) Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization *Science* 306 (5704) 2090-2093
35. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V et al (2004) IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin *J Clin Invest* 113 (9) 1271-1276
36. Rivera S, Gabayan V, Ganz T (2004) In chronic inflammation there exists an IL-6 independent pathway for the induction of hepcidin. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 104 (11) Abstract 3205
37. Sharma S, Nemeth E, Chen YH et al (2008) Involvement of hepcidin in the anemia of multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 14 (11) 3262-3267
38. Ganz T, Olbina G, Girelli D et al (2008) Immunoassay for human serum hepcidin *Blood* 112 (10) 4292-4297
39. Maes K, Nemeth E, Roodman GD et al (2010) In anemia of multiple myeloma, hepcidin is induced by increased bone morphogenetic protein 2 *Blood* 116 (18) 3635-3644
40. Seckinger A, Meissner T, Moreaux J et al (2009) Bone morphogenetic protein 6: a member of a novel class of prognostic factors expressed by normal and malignant plasma cells inhibiting proliferation and angiogenesis. *Oncogene* 28 (44) 3866-3879
41. Grcevic D, Kusec R, Kovacic N et al (2010) Bone morphogenetic proteins and receptors are over-expressed in bone-marrow cells of multiple myeloma patients and support myeloma cells by inducing ID genes *Leuk Res* 34 (6) 742-751
42. Choi SO, Cho YS, Kim HL, Park JW (2007) ROS mediate the hypoxic repression of the hepcidin gene by inhibiting C/EBP β and STAT-3 *Biochem Biophys Res Com* 356 (1) 312-317
43. Volke M, Gale DP, Maegdefrau U et al (2009) Evidence for a lack of a direct transcriptional suppression of the iron regulatory peptide hepcidin by hypoxia inducible factors *PLoS One* 4 (11) e7875
44. Tanno T, Porayette P, Sripathi O et al (2009) Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood* 114 (1) 181-186
45. Nemeth E (2008) Iron regulation and erythropoiesis *Curr Opin Hematol* 15 (3) 169-175
46. Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA et al (2007) High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin *Nat Med* 13: 1096-1101
47. Gardenghi S, Marongiu MF, Ramos P et al (2007) Ineffective erythropoiesis in β -thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by down-regulation of hepcidin and up-regulation of ferroportin. *Blood* 109: 5027-5035
48. Anderson GJ, Darshan D, Wilkins SJ, Frazer DM (2007) Regulation of systemic iron homeostasis: how the body responds to changes in iron demand. *Biometals* 20:665-674