

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Katedra biologických a biochemických věd

Normoblasty – struktura a funkce

Bakalářská práce

Autor práce: Jana Bartušková

Vedoucí práce: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

2020

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

Department of Biological and Biochemical sciences

Structure and function of normoblasts

Bachelor thesis

Author: Jana Bartušková

Supervisor: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jana Bartušková**
Osobní číslo: **C17141**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Normoblasty – struktura a funkce**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

- 1) Zpracujte literární rešerši zaměřenou na popis normoblastů. V rámci tohoto tématu nejprve popište obecně funkci kostní dřeně, myeloidní řadu vzniku krevních buněk a následně se zaměřte na erytropoézu. Normoblasty rozdělte do jednotlivých podtypů s podrobným popisem jejich morfologie, funkce, odlišných vlastností, atd.
- 2) Ke zpracování kompilace využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *ScienceDirect*, *HighWire*, *NCBI Pubmed*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

20. prosince 2019

Termín odevzdání bakalářské práce:

3. července 2020

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 ods. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnici Univerzity Pardubice č.7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10.7.2020

Jana Bartušková

Poděkování:

Zde bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce, za vstřícný přístup, čas při konzultacích a cenné rady, které mi při psaní práce ochotně poskytl. Poděkovat bych tímto chtěla i své rodině za podporu při studiu.

Anotace

Bakalářská práce je zaměřena na popis struktury a funkce normoblastů. Úvodní část zahrnuje popis lokalizace, vzniku a vývoje krvetvorby. Další kapitola se zabývá charakterizací kostní dřeně a zahrnuje popis hematopoetické kmenové buňky a myeloidní progenitorové buňky. Následující kapitola je věnována obecnému popisu vývoje erytropoézy včetně regulačních faktorů, hemoglobinu, erytroblastických ostrovů a je zakončena podkapitolou zabývající se proerytroblastem. V hlavní části práce jsou podrobně charakterizována jednotlivá stádia normoblastů. Práce zahrnuje jednotlivé mechanismy probíhající uvnitř vyvíjejících se bazofilních, polychromních a ortochromních normoblastů, až po extruzi jádra z ortochromního normoblastu a následnou clearanci organel. Konečná část práce pojednává o dalších dvou vývojových stádiích, jimiž jsou retikulocyt a zralá červená krvinka, tj. erytrocyt.

Klíčová slova

Normoblast, erytropoéza, enukleace, extruze, erytroblastický ostrov, kostní dřeň.

Annotation

The bachelor thesis is focused on the structure and function of normoblasts. The introductory part includes a description of the localization, origin and development of hematopoiesis. Next chapters deal with the characterization of bone marrow and include a description of hematopoietic stem cells and myeloid progenitor cell. The following chapter is devoted to a general description of the development of erythropoiesis, including regulatory factors, hemoglobin, erythroblastic islands, and proerythroblast. In the main part of the work, the individual stages of normoblasts are characterized in detail. The topical part of the thesis includes individual mechanisms linked with developing basophilic, polychromatophilic and orthochromatophilic normoblasts and following clearance of the organelles. The final part of the work deals with two other developmental stages, which are reticulocytes and the mature red blood cell, i.e.-erythrocyte.

Keywords

Normoblast, erythropoiesis, enucleation, extrusion, erythroblastic island, bone marrow.

Obsah

1.	Úvod.....	14
2.	Krvetvorba	15
2.1	Vznik a vývoj krevních buněk	15
2.2	Kostní dřeň.....	16
2.2.1	Hematopoetická kmenová buňka	17
2.2.2	Myeloidní progenitorová buňka	18
2.3	Erytropoéza	19
2.3.1	Regulační faktory erytropoézy	19
2.3.2	Hemoglobin	20
2.3.3	Erytroblastický ostrov	21
2.3.4	Proerytroblast	22
3.	Bazofilní normoblast.....	23
3.1	Membránové proteiny	23
3.2	Syntéza hemu	24
3.3	Kondenzace chromatinu v jádře.....	25
3.4	Transkripční faktor GATA-1	27
3.5	Regulační faktory	29
3.6	Autofagie.....	30
4.	Polychromní normoblast.....	31
4.1	Transkripční faktor E2F-2.....	31
4.2	Vývoj hemoglobinu.....	32
5.	Ortochromní normoblast.....	33
5.1	Enukleace jádra z ortochromního normoblastu.....	33
5.2	Pyrenocyt.....	34

5.3	Třídění membránových proteinů mezi retikulocyt a pyrenocyt.....	35
5.4	Clearance organel.....	35
5.4.1	Mitochondriální clearance.....	35
5.4.2	Ribozomy a jiné organely.....	37
6.	Retikulocyt.....	37
7.	Erytrocyt	38
8.	Závěr	40
9.	Seznam literatury	41

Seznam obrázků a tabulek

Obrázky

Obrázek 1: Porovnání krvetvorby myši a člověka	16
Obrázek 2: Hematopoéza člověka.....	18
Obrázek 3: Struktura dospělého lidského hemoglobinu	21
Obrázek 4: Erytoblastický ostrov	22
Obrázek 5: Průběh kondenzace chromatinu v jádře.....	26
Obrázek 6: Cílená delece transkripčních faktorů.....	27
Obrázek 7: Regulace vývoje erytroidních buněk.....	29
Obrázek 8: Změny v endomembránových kompartmentech	31
Obrázek 9: Důsledky ztráty AHSP v dozrávajících normoblastech	32
Obrázek 10: Proces erytroidní enukleace.....	34
Obrázek 11: Terminální diferenciaci ortochromního normoblastu	36
Obrázek 12: Tři stádia zrání retikulocyту	38

Tabulky

Tabulka I: Vybrané regulátory erytropoézy	20
---	----

Seznam použitých zkratek

AHSP	Alfa hemoglobin stabilizující protein
Atg 5/7, 4, 8	S autofagií související proteiny 5/7, 4, 8
BFU-E	Kolonie tvořící shluky (<i>Burst-forming unit-erythroid</i>)
BRD 3	Bromodomainův protein 3
CDK-9	Cyklin dependentní kináza 9
CFU	Kolonie tvořící jednotky
CFU-E	Kolonie tvořící jednotky-erytroidu (<i>Colony-forming unit-erythroid</i>)
CFU-GEMM	Kolonie tvořící jednotky-buňky myeloidní řady
CFU-GM	Kolonie tvořící jednotky-granulocyty, makrofágy
CFU-M	Kolonie tvořící jednotky-monocyty
CMP	Myeloidní progenitorová buňka
E2F-2	Transkripční faktor kódovaný genem E2F-2
EKLF	<i>Erythroid Krüppel-like factor</i>
FOG-1	Přítel transkripčního faktoru erytroidu 1
GATA-1	Transkripční faktor erytroidu 1
Gcn5	Histonacyltransferáza
GPA	Glykoforin A
HDAC	Histondeacetyláza
HSC	Hematopoetická kmenová buňka
IgG	Imunoglobulin G
IL-3	Interleukin 3
JAK 2	Janusová kináza 2
LC 3	Světelný kanál 3
MAPLC-3	Mikrotubulový protein 1 světelný kanál 3
miR-191	Erytroidní specifická mikro ribonukleová kyselina 191

MVB	Multivezikulární těla
Mxi-1	Interagující protein 1
NF-E2	<i>Nuclear factor-erythroid 2</i>
N-TAD	N-terminální transaktivační doména
PI3K	Mikrotubuldependentnífosfoinosid-3-kináza
Riok 3	Serin/threonin protein kináza 3
ROS	Reaktivní kyslíkové sloučeniny
SCF	Faktor kmenových buněk
STAT 5	Signální převodník a aktivátor transkripce 5
TfR	Transferinový receptor
Ulk1	Aktivační kináza 1
VCAM-1	Vaskulární buněčný adhezni protein 1

1. Úvod

Normoblasty představují nezralou formu červených krevních buněk. Nachází se v kostní dřeni uvnitř erytroblastických ostrovů. Vznikají z myeloidní progenitorové buňky a předchází jim fáze proerytoblastu. Můžeme je rozdělit na tři na sebe navzájem navazující stádia. Nejdříve se buňka vyvíjí ve stádiu bazofilního normoblastu, následuje období polychromního normoblastu a poslední vzniká fáze ortochromního normoblastu. Postupně během diferenciaci dochází ke kondenzaci chromatinu v jádře. Jádro se čím dál více zmenšuje, naopak produkce hemoglobinu s postupujícím vývojem stále narůstá. V průběhu diferenciaci normoblastů jsou syntetizovány proteiny tvořící membránu. Do vývoje se zapojují rovněž transkripční faktory, jejich hlavním zástupcem je GATA-1. Regulační faktory jsou také nezbytnou součástí fyziologického vývoje červených krevních buněk.

Ve stádiu ortochromního normoblastu dochází k vyloučení jádra z buňky tzv. enukleaci. E nukleace dává vzniknout dvěma buňkám, retikulocytu a pyrenocytu. Dochází rovněž ke clearanci organel z buňky. Retikulocyt a pyrenocyt si mezi sebou rozdělí jednotlivé proteiny. Pyrenocyt získává proteiny, které mu pomohou připojit se k makrofágům. Makrofág pyrenocyt pohltí. Naopak retikulocyt přijímá ty proteiny, které mu umožňují přesun do krevního řečiště, kde dojde k jeho maturaci ve zralý erytrocyt.

2. Krvetvorba

Mechanismus lokalizace, migrace a regulace hematopoézy v různých stádiích ontogeneze není dobře znám. Může se však vztahovat ke specifickým adhezivním interakcím mezi hematopoetickými kmenovými buňkami a jejich mikroprostředím v různých ontogenetických stádiích (Roy 1999). Během intrauterinního života plodu probíhá hematopoéza postupně ve žloutkovém vaku, fetálních játrech, dále ve slezině, a nakonec v kostní dřeni.

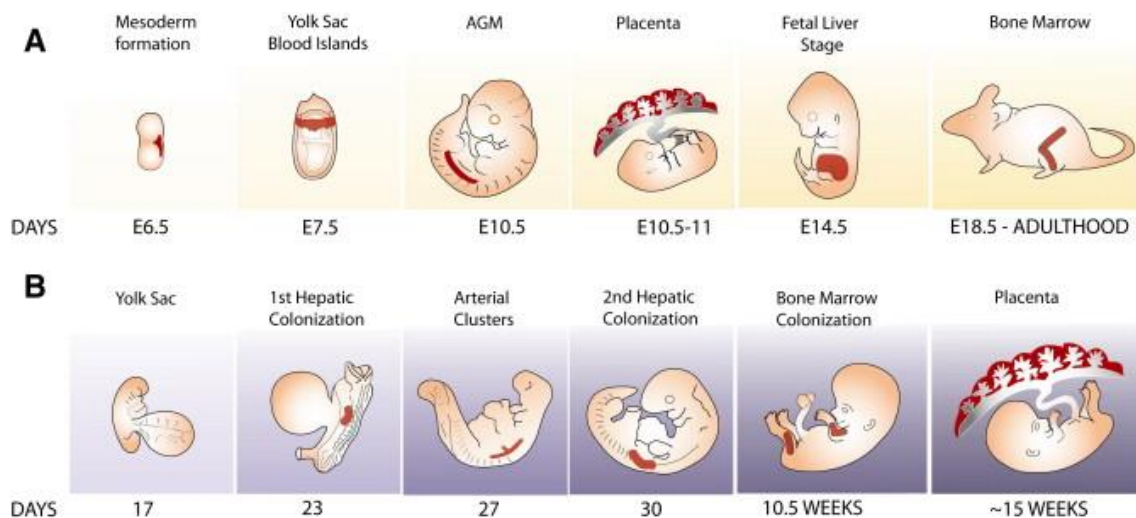
Proces krvetvorby začíná již ve velmi časně fázi prenatalního vývoje, kdy se vytvářejí primitivní, velké erytroblasty v krevních ostrůvcích žloutkového vaku. Hlavním místem krvetvorby jsou až do poloviny nitroděložního života fetální játra. Krevní oběh plodu obsahuje také velké množství hematopoetických progenitorů a kmenových buněk. Po narození tyto progenitory z oběhu mizí během 24-48 hodin, děje se tak pravděpodobně kvůli usazování v dutině dřeni (Pecka 2002). V dospělosti probíhá proces krvetvorby pouze v kostní dřeni. Krvetvorba je rozložena v obratlích, lebce, pánvi, žebrech, lopatkách, kosti pažní a kosti stehenní.

2.1 Vznik a vývoj krevních buněk

Hematopoéza u člověka začíná již mezi 14.-19. dnem zárodečného života (obr. 1). Dělíme ji do třech období: mezoblastového, hepatolienálního a medulárního. Hematopoetický systém je nezbytný od nejranějších stádií vývoje a přizpůsobuje se rychle se měnící anatomii embrya a plodu. Krevní ostrov žloutkového vaku představuje místo, kde se začíná vyvíjet krvetvorba. Krvetvorba zde probíhá od 3. do 10. týdne vývoje. První krevní ostrůvky se objevují v extraembryonálním mezodermu žloutkového vaku, spojovacím stvolu a choriu. Při formování embryoidních tělísek se embryonální kmenové buňky spontánně diferencují v různé embryoidní struktury včetně krevních ostrůvků. Ještě před propojením s extraembryonálními cévami se krevní ostrůvky objeví také uvnitř intraembryonálního mezodermu. Napojením extraembryonálních a intraembryonálních cév vznikne souvislá síť primitivních krevních cév naplněných krevními buňkami. Mimo vlastní embryo se nejdříve vytvářejí pluripotentní kmenové buňky, z nichž se postupně uskutečňuje krvetvorba dalších krevních buněk. Krevní buňky pak pocházejí ze dvou odlišných hematopoetických kmenových buněk. Extraembryonální hematopoetické kmenové buňky (HSC) produkují zejména erytroidní buňky, nikoli lymfoidní. Intraembryonální HSC produkují všechny typy buněk včetně lymfoidních.

Hepatosplenální období začíná v 6. týdnu, kdy se vytváří základ thymu a trvá až do porodu. Brzlík je osídlován kmenovými buňkami krvetvorby, ze kterých se postupně vyvíjí mateřské buňky lymfocytů. Po přibližně šesti týdnech gravidity dochází k migraci hematopoézy do fetálních jater. Játra pak během těhotenství působí jako hlavní hematopoetický orgán (Pahal 2000). Z mezenchymu, uloženého mezi jaterními buňkami, se začínají vytvářet krvetvorné buňky. Ve 12. týdnu se začínají formovat základy sleziny. Ve stejném časovém období vznikají z pluripotentních kmenových buněk, zanesených do lymfatických orgánů, lymfocyty. Vytváří se rovněž sekundární lymfatické orgány, jako je již zmiňovaná slezina nebo lymfatické uzliny.

Kostní dřeň je poslední krvetvorná tkáň, která se vyvíjí v ontogenezi. Vyvíjí se na úkor chrupavkovitých embryonálních základů dlouhých kostí, které jsou nápadné již v 8. týdnu gravidity (Tavian 2005). Nicméně krvetvorba je zde zahájena až ve 20. týdnu těhotenství. Toto období nazýváme medulární. Mimodřeňová krvetvorba zaniká ve druhém až třetím týdnu po narození, ale může být obnovena za patologických okolností.



Obr.1 Porovnání krvetvorby myši a člověka (Baron 2013).

2.2 Kostní dřeň

Kostní dřeň patří mezi největší orgány těla. Tvoří 3,4-5,6 % tělesné hmotnosti. U dospělého člověka se jedná o 1600-3700 gramů. Aktivní kostní dřeň tvoří asi 1300 gramů z uvedeného množství. Za 24 hodin vyprodukuje 100 miliard erytrocytů, 70 miliard leukocytů a 100 miliard trombocytů na 1 kilogram hmotnosti člověka (Pecka 2002). Nachází se mezi kostními trávci houbovitě kosti a uvnitř diafýzy dlouhých kostí. Tvoří ji cévy, lymfatická, nervová a tuková tkáň. Důležitou součástí představuje rovněž

podpůrná tkáň tvořena zejména fibroblasty. Dřeňovou dutinu, kde je kostní dřeň uložena, vystýlá blána – endosteum. Endosteum zodpovídá za tvorbu osteoblastů.

Pokud je tento prostor vyplněn převážně hematopoetickými buňkami nazýváme jej červená dřeň. Pokud obsahuje většinu adipocytů jedná se o žlutou dřeň. Ze žluté dřeně může v pozdním věku vznikat ztrátou adipocytů dřeň šedá. Červená dřeň se skládá ze stromatu, provazců hematopoetické tkáně a sinusoidních kapilár. Síťovou strukturu stromatu vytvářejí fagocytující retikulární buňky, retikulární vlákna a matrix. Amorfní matrix je vytvářena převážně z proteoglykanů a glykoproteinů. Žlutý typ dřeně slouží primárně jako sklad tuků, ale za určitých podmínek, jako je horečka či velká ztráta krve, se může přeměnit na dřeň červenou. Adipocyty kostní dřeně nejsou seskupeny do lubulů jako v jiných tukových zásobách, ale jsou rozptýleny v hematopoetické tkáni (Hardouin 2014).

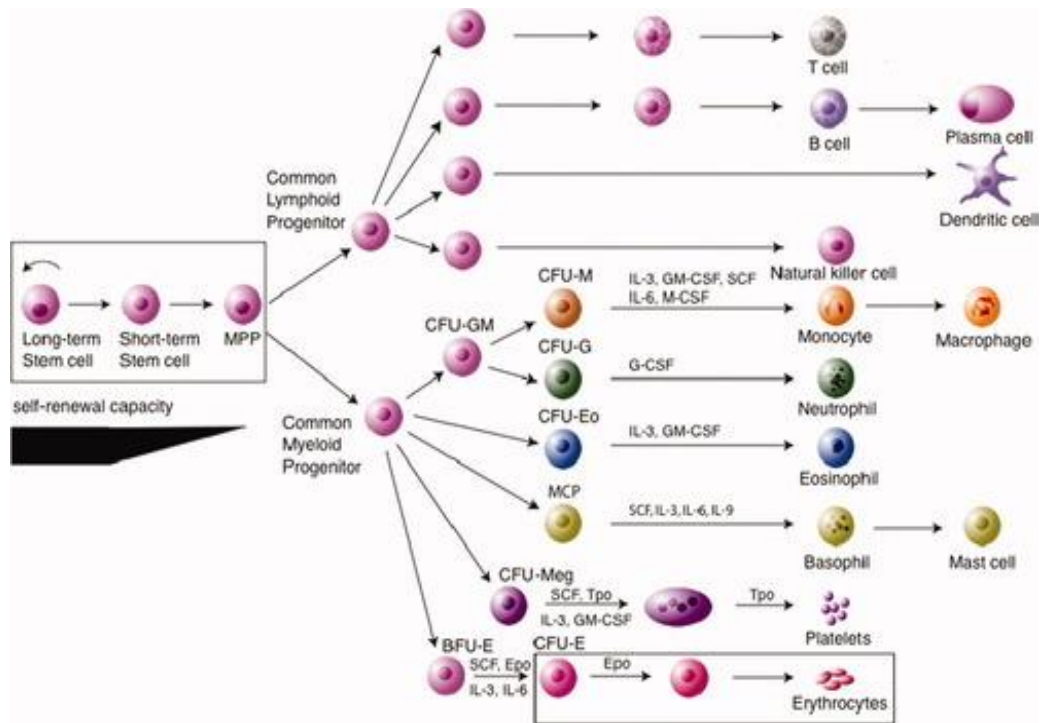
Po narození jsou kostní dutiny vyplněny hlavně červenou dřeví, která je postupně nahrazena žlutou dřeví. Ve věku 25 let je červená dřeň omezena na axiální kostru, žebra a hrudní kost. U člověka vytváří červená dřeň všechny krevní buňky. Podílí se spolu s játry a slezinou i na odbourávání starých erytrocytů. V neposlední řadě se v ní také ukládá železo pocházející z odbouraného hemoglobinu. Vyplavování zralých krevních elementů z červené kostní dřeně řídí tzv. *Releasing factor*. Tento efekt vykazuje mimo jiné C3 složka komplementu, glukokortikoidy, androgeny i některé bakteriální toxiny. Podstatná je interakce mezi makrofágy a normoblasty v kostní dřeví, protože makrofágy poskytují normoblastům železo a mimo jiné usnadňují jejich proliferaci a diferenciaci (Moras 2017).

Uvolňování jednotlivých krevních buněk a jejich přechod do krve se uskutečňuje různými mechanismy. Leukocyty se do krve dostávají aktivním pohybem – diapedézou. Erytrocyty procházejí vzhledem ke své deformovatelnosti mezi endotelovými buňkami krevních cév do nitra cévy, kde opět získávají svůj typický bikonkávní tvar. Výběžky megakaryocytů prorůstají mezi endotelovými buňkami do nitra cév a krevní proud z nich uvolňuje a odplavuje trombocyty. Kostní dřeň je bohatým zdrojem krvetvorných buněk a progenitorových buněk jednotlivých řad.

2.2.1 Hematopoetická kmenová buňka

Výchozí buňkou všech krevních buněk je mezenchymová kmenová buňka, která se diferenciuje v retikulární buňku a ta se pak stává základem vývojového buněčného systému pro krvinky (obr. 2). Sebeobnova a schopnost diferenciaci do všech dalších

bunčných typů krvetvorby jsou typickými vlastnostmi pro hematopoetickou kmenovou buňku. Krvetvorné kmenové buňky jsou přítomny v kostní dřeni, játrech, v lymfatických uzlinách a v periferní krvi. V kostní dřeni se nachází mikroprostředí tzv. *niche*, kde jsou vytvářeny buňky a biomolekuly extracelulární matrix, které umožňují usídlení HSC a dále i produkci jejího potomstva. Kmenová buňka se může ze svého *niche* uvolnit. Volné *niche* může přijmout i jinou kmenovou buňku, např. exogenní. Počet *niche* ve tkáni se může měnit. HSC je odvozena z mezodermu a má velký proliferativní potenciál stejně jako široký diferenciační potenciál. Osud hematopoetických kmenových buněk je dvojitý, jedna část buněk se dále diferencuje do progenitorových buněk a druhá část zachovává pool kmenových buněk. Asi 80 % buněk zůstává v G0 fázi, zatímco 20 % buněk proliferuje (Pecka 2002).



Obr.2 Hematopoéza člověka (Lodish 2010).

2.2.2 Myeloidní progenitorová buňka

Myeloidní progenitorová buňka se sama nedokáže obnovovat (Baker 2014). Proliferující kmenové buňky se diferencují do progenitorových kmenových buněk, které značíme CFU tzn. *Colony forming unit*. Progenitorové buňky jsou potom určeny pro buněčné typy např. CFU-GM pro makrofágy a granulocyty, CFU-M pro buňky monocytární řady. CFU-GEMM je určeno pro buňky myeloidní. Omezují se pouze na

jednu linii. Myeloidní progenitorové buňky dávají vzniknout megakaryocytům, erytrocytům, granulocytům a makrofágům (Akashi 2000).

2.3 Erytropoéza

BFU-E a CFU-E jsou progenitorové buňky pro erytrocytární krvetvornou řadu. BFU-E, neboli *Burst forming unit-erythroid*, se vyvíjí jako první a vyžadují pro svůj růst a diferenciaci především SCF, tzn. *Stem cell factor*. CFU-E *Colony forming unit-erythroid* jsou pak ve větší míře závislé na erythropoetinu. Z těchto buněk se dále vyvíjí prekurzorové buňky. V případě erytrocytární řady se jedná o proerytoblast. Proerytoblast je prvním vývojovým stádiem směřujícím k produkci erytrocytu. Každé buněčné dělení při erytropoéze je současně spojeno s diferenciací. Pro většinu typů buněk v organismu generuje každé buněčné dělení dvě dceřiné buňky, které jsou téměř totožné s mateřskou buňkou. Během erytropoézy jsou však dceřiné buňky strukturně i funkčně odlišné od mateřské buňky (Hu 2013).

2.3.1 Regulační faktory erytropoézy

Důležitým regulačním faktorem pro erytropoézu je erythropoetin. Jde o hormon glykoproteinové povahy, který se tvoří převážně v peritubulárních buňkách kůry ledvin, u plodu se tvoří převážně v játrech. V počátečních stádiích erytropoézy erythropoetin zabraňuje apoptóze buněk CFU-E, podporuje rychlé dělení buněk a tvorbu mnoha genů, které kódují důležité proteiny pro erytrocyty (Ji 2010). Hlavním stimulem pro tvorbu erythropoetinu v ledvinách je tkáňová hypoxie, která zvyšuje transkripci genu pro erythropoetin pomocí hypoxií indukovatelného faktoru 1. Interleukiny rovněž významně ovlivňují erytropoézu. Patří do skupiny cytokinů. Z biochemického hlediska jsou to struktury proteinové povahy, např. interleukin 3 (IL-3) působí na HSC a podporuje růst a diferenciaci buněk v kostní dřeni.

Somatotropní hormon, tyroxin, či testosteron rovněž stimulují tvorbu červených krevních buněk, naopak inhibiční účinek mají glukokortikoidy a ženské pohlavní hormony zejména estrogeny. Transkripční faktor erytroidu 1 (GATA-1) má schopnost vázat funkčně důležité regulační sekvence DNA nalezené v globinových genech (Cantor 2002). Mezi další látky ovlivňující erytropoézu patří vitamín B12. Tento vitamín napomáhá zrání erytrocytů, syntéze DNA a své uplatnění nalézá i při buněčném dělení. Kyselina listová je součástí koenzymů důležitých pro syntézu DNA, uplatňuje se

také při diferenciaci buněk. Pyridoxin nebo také vitamín B6 je nezbytný pro tvorbu hemu.

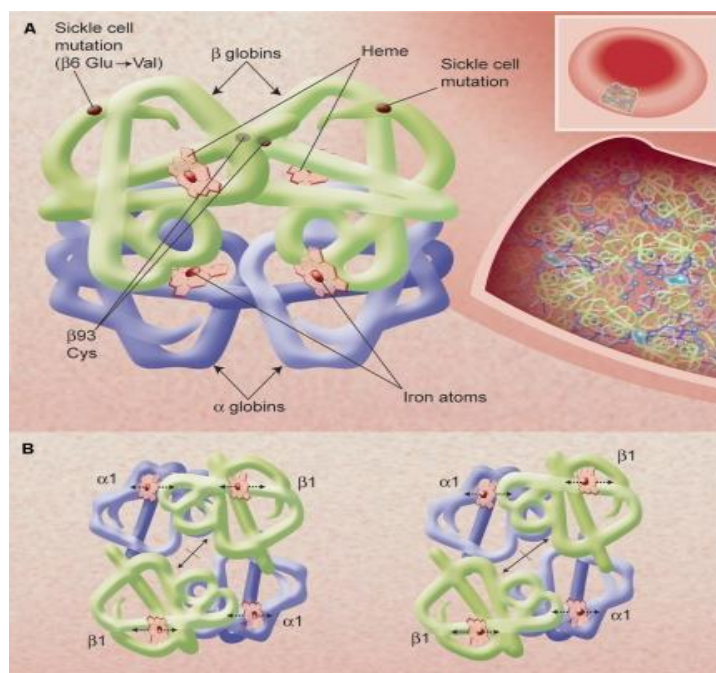
Tab. I: Vybrané regulátory erytropoézy.

Typ regulace	Hlavní příklady
Růstové faktory	SCF, G-CSF, IL-3
Diferenciační faktory	EPO, TGF-beta, GDF11, Activin A
Transkripční faktory	GATA-1, STAT5 A, B
Faktory pro přežití	MCL-1, BCL-xL, HSP70*
Negativní regulátory růstu	Inhibin, FAS ligand, Kaspázy
Vitamíny a stopové prvky	B12, kyselina listová, měď
Železo a bílkoviny	Feritin, transferin, feroportin, hepcidin

2.3.2 Hemoglobin

Chromoproteiny jsou bílkoviny s obsahem kovu, do skupiny chromoproteinů patří i hemoglobiny. Kovovou složku v tomto případě zastupuje železo. Při normálním stavu se v erythrocytech nachází více než 75 % celkového železa v těle (Liu 2013). Homeostáza hladin železa, hemu a hemoglobinu je nepostradatelná pro erytropoézu. Molekuly lidského hemoglobinu jsou tetramery skládající se ze čtyř bílkovinných – globinových řetězců a čtyř hemů. Globin tvoří 96 % molekuly hemoglobinu, zatímco hem jen 4 %.

Molekula $\alpha_2\beta_2$ tvoří hlavní typ dospělého hemoglobinu. Jde o tetramer složený ze dvou α a dvou β globinových řetězců. Každý globinový řetězec váže prostetickou skupinu hem, která poskytuje vazebné místo pro molekulární kyslík, jak můžeme vidět na obr. 3. Jeho hlavní funkcí je transport kyslíku z plic do tkání, ale zároveň specificky interaguje i s oxidem uhličitým (CO_2), oxidem uhelnatým (CO), a oxidem dusnatým (NO), které mají důležité biologické role. Celkem čtyři polypeptidy hemoglobinového tetrameru mají centrální prostor, do kterého je prostetická skupina hemu, molekula železa, protoporfyrinu IX, vázána nekovalentními vazbami. Tímto je atom železa chráněn před přístupem k okolnímu vodnému roztoku (Schechter 2008). Atomy železa jsou v tomto prostředí ve dvojmocném valenčním stavu.

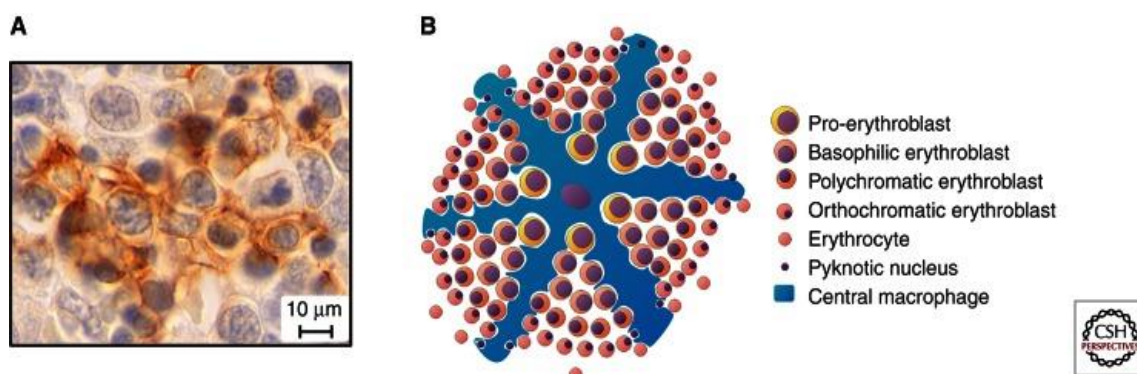


Obr.3 *Struktura dospělého lidského hemoglobinu (Schechter 2008).*

2.3.3 Erytoblastický ostrov

Erytoblastické ostrovy jsou mnohobuněčné klastry s centrálním makrofágem obklopené množstvím vyvíjejících se erytroidních buněk. Tyto ostrovy jsou shlukem primitivních erytroblastů obklopených endoteliálním krytím (Manwani 2008). Při ustálené erytupoéze se erytoblastické ostrovy skládají z erytroidních buněk v různých stádiích vývoje od CFU-E po mladé retikulocyty. Počet erytroblastů v jednom ostrově se liší. Ostrovy lidské kostní dřeně obsahují 5-30 erytroblastů (obr. 4) (Yokoyama 2002).

Vyskytují se v kostní dřeni, fetálních játrech a ve slezině. Erytoblastický ostrov produkuje retikulocyty. Proerytroblasty se připojují k erytoblastickému ostrovu jako velké jaderné buňky obsahující mitochondrie, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum a později se oddělí jako anukleární retikulocyty nesoucí obrovské množství hemoglobinu a malé množství mitochondrií (Yeo 2019).



Obr.4 Erytroblastický ostrov (Dzierzak 2013).

2.3.4 Proerythroblast

Proerythroblasty jsou velké mononukleární buňky o velikosti 20-25µm, v případě lidských buněk. V důsledku vysoké koncentrace RNA mají bazofilní cytoplazmu a velké kulaté jádro, které zabírá 75-80 % objemu buněk s poměrem jader a cytoplazmy 8:1. Z jednoho lidského proerythroblastu může během 3 dnů vzniknout 16 retikulocytů (Yeo 2019). Děje se tak díky tomu, že podléhá 3-4 mitózám (Eymard 2015). U myši bylo prokázáno, že proerythroblasty podléhají 3 mitózám, aby došlo ke vzniku postupně dvou bazofilních normoblastů, čtyř polychromních normoblastů a konečně osmi ortochromních normoblastů (Hu 2013). Proerythroblasty obsahují jadérka, v nichž je uložen euchromatin. Jadérka se obvykle objevují v malém počtu, nejčastěji dvou až čtyř. Chromatin má v tomto stádiu sytou, bazofilní a hustě síťovitě uspořádanou strukturu. Bazofilní cytoplazma může mít laločnatý, nebo cípovitý výběžek. Okolo jádra můžeme pozorovat perinukleární projasnění. Tyto proerythroblasty, jak již bylo řečeno interagují s erythroblastickými ostrov a mají vysokou proliferativní kapacitu (Ludwig 2019). U většiny proerythroblastů je pozorováno mRNA pro ankyrin a protein 4.1 (Kodippili 2010). Glykoforin A (GPA) se začíná objevovat také na povrchu proerythroblastů, kdy se jedná o erytroidní specifický marker (Hu 2013).

3. Bazofilní normoblast

Průměr bazofilního normoblastu se pohybuje mezi 8-16 μm . Tato buňka je menší než proerytroblast se zvýšenou nukleární kondenzací (Chen 2009). Jádro má kulatý tvar a je uloženo ve středu buňky. Velikost jádra dosahuje 8 μm . V tomto stádiu cytoplazma vykazuje silnou bazofilii v důsledku zvýšeného počtu ribozomů syntetizujících hemoglobin. Hrubé uspořádání chromatinu v jádře připomíná hrudky nebo trámce. Chromatin bazofilních normoblastů se agreguje. Jadérka nejsou v tomto stádiu zřetelná.

3.1 Membránové proteiny

V průběhu diferenciaci lidských normoblastů jsou syntetizovány proteiny tvořící membránu, rovněž je vytvořena membránová kostra na bázi spektrinu, která poskytuje lipidové dvouvrstvě sílu a stabilitu. Stabilní asociace spektrinu s membránou erytrocytů se shoduje se syntézou ankyrinu, proteinu 4.1 a proužku 3, které společně organizují spektrin a aktin do cytoskeletu zakotveného v membráně (Kodippili 2010). Znalost složení a organizace membránových proteinů normoblastů v různých vývojových stádiích je přesto v současné době nízká, oproti znalosti membránových proteinů zralých erytrocytů.

U zralých erytrocytů je pomocí ankyrinu proužek 3 spojený se spektrinovou sítí v membráně. Membrána obsahuje i volný komplex proužku 3, lipidové částice a aktinové uzly. Membránový cytoskelet je spojen s membránou díky vazbám spektrinu s ankyrinem, interakcí mezi glykoforinem C a proteinem 4.1 a vazbami mezi ankyrinem a proužkem 3. Membránový cytoskelet udává membráně erytrocytu tvar, sílu a flexibilitu, rovněž napomáhá udržet organizaci lipidů a integrálních proteinů jejich lokalizaci a pohyblivost (Li 2014).

Zatímco ve stádiu bazofilního normoblastu studie prokázaly asynchronní syntézu a sestavení membránových proteinů, zejména α a β -spektrinu, ankyrinu a pásu 3, během diferenciaci. Potvrzeny jsou rovněž exprese adhezních molekul, jako je $\alpha 4/\beta 1$ integrin, $\alpha 5/\beta 1$ integrin (Eymard 2015). Tyto adhezní molekuly hrají důležitou roli při interakcích normoblastů i makrofágů a vytváří integritu. Integriny $\alpha 4/\beta 1$ jsou exprimovány normoblasty, aby bylo usnadněno připojení k vaskulárnímu buněčnému adheznímu proteinu 1 (VCAM-1) exprimované erytroblastickým ostrovem.

U bazofilního normoblastu se zvyšuje hladina transferinového receptoru CD71 a roste množství GPA, naopak hladina hemoglobinu je v tomto stádiu nízká (Kodippili

2010). Transferinový receptor se skládá ze dvou řetězců aminokyselin, které jsou spojeny disulfidickým můstkem. Jeho hlavní úlohou v organismu je vazba transferinu nesoucího molekulu železa a následný transport železa do buňky. Až 80 % tohoto receptoru je exprimováno na proliferujících erythropoetických buňkách, dospělým erytrocytům chybí. Transferinový receptor můžeme v praxi využít ke stanovení sníženého obsahu železa v buňkách (Maes 1997).

Hlavním transmembránovým sialoglykoproteinem ve vyvíjejících se normoblastech je GPA. Jeho molekulární funkce nebyla dosud pochopena, ale bylo prokázáno, že interaguje s proužkem 3. Předpokládá se, že existují tři populace proužku 3, z nichž 40 % molekul asociuje s GPA (Giger 2016). Proužek 3 zodpovídá za homeostázu ve vyvíjejícím se erytrocytu a tím i v celém organismu. Udržuje rovnováhu kyselin, distribuci iontů, hlavně výměnu chloridů a hydrogenuhličitanů přes membrány erytrocytů a výměnu plynů (Remigante 2019). Lze tedy říct, že tento protein slouží jako aniontoměnič (Chen 2009).

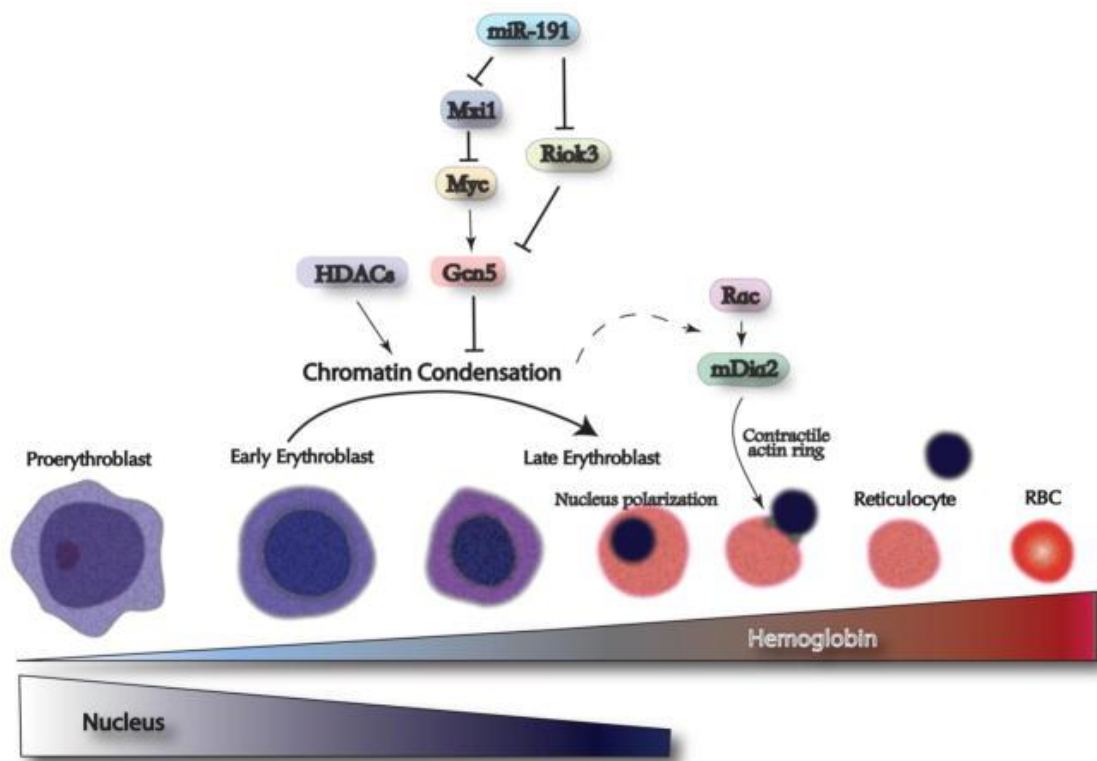
3.2 Syntéza hemu

Hem je syntetizován řadou enzymatických reakcí. Tyto reakce probíhají v cytozolu a mitochondriích. V prvním kroku kondenzuje sukcinyl-CoA s glycinem, tato reakce se uskutečňuje v cytozolu a je katalyzována erytroidní aminolevulátsyntázou. Naopak poslední krok, jímž je inkorporace železa do protoporfyrinu IX, probíhá v mitochondriích. Tento krok je katalyzován ferrochelátázou. Přenos železa do mitochondrií zahrnuje transportní molekulu mitferrin 1, jenž se nachází v mitochondriální membráně. Pro syntézu hemu je vstup železa limitujícím krokem. Tento krok je totiž zprostředkován pomocí transferinového receptoru-1. Vrcholná exprese transferinového receptoru-1 nastává v polychromním stádiu normoblastu a postupně klesá v ortochromním stádiu normoblastu, zde normoblasty zbavují zbývající receptory transferinového receptoru-1 exocytózou nebo proteolytickým štěpením, to vede ke vzniku rozpustného transferinového receptoru-1 (Papanikolaou 2017). Jeho plazmatická koncentrace je dobrým ukazatelem rychlosti erytropoézy.

3.3 Kondenzace chromatinu v jádře

Sekvenováním mRNA bylo zjištěno, že exprese asi 600 genů se během terminální erytropoézy zvyšuje více než dvojnásobně. Mezi tyto geny patří velké množství genů důležitých pro normoblasty, včetně α a β globinů, biosyntetických enzymů hemu, cytoskeletálních proteinů a transkripčních faktorů. Objem jádra se postupně snižuje, až se zmenší na desetinu svého původního objemu s vysoce kondenzovaným chromatinem. Během diferenciaci normoblastů chromatin kondenzuje, zatímco koncentrace hemoglobinu se postupně zvyšuje (Ji 2011). Bylo zjištěno, že nejvyšší aktivitu měly hemové biosyntetické procesy ve fázi bazofilního normoblastu a rovněž byl zjištěn vysoký podíl transportu kyslíku v tomto stádiu (Ludwig 2019).

Mechanismy kondenzace savčího erytroidního chromatinu zatím nebyly zcela objasněny. Víme však, že enzymatické funkce histondeacetyláz jsou zapojeny do procesu kondenzace. Imunofluorescenční experimenty odhalily, že většina histonových proteinů byla částečně uvolněna z jádra prostřednictvím jaderného otvoru v časném stádiu terminální erytropoézy. Kaspáza-3 se podílela na tvorbě jaderných otvorů. V současné době je podporována myšlenka, že kondenzace chromatinu během erytropoézy je zprostředkována postupným uvolňováním jader histonu (Zhao 2016). Složení nukleozomů nebylo změněno, došlo však ke zvýšení dimetylace histonu H3 a ke snížení acetylace histonu H4 během terminální erytropoézy. Úloha H4 ve skládání chromatinu vyššího řádu je hlavně v inter-nukleozomových interakcích. Během mitózy, globální fosforylace H3S10 pomocí Aurora B, kinázy vpouští histon deacetylázy do chromatinu a spouští kondenzaci chromatinu. Funkční role deacetylace histonu v jaderné kondenzaci je podpořena řadou studií (Yeo 2019).



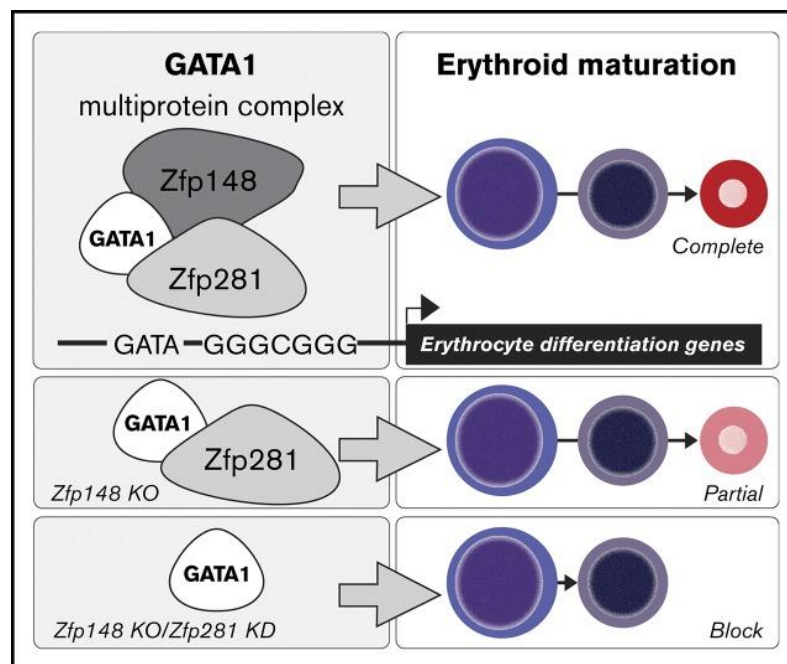
Obr.5 Průběh kondenzace chromatinu v jádře (Ji 2011).

Aby mohlo dojít k extruzi jádra ve stádiu ortochromního normoblastu, musí tomuto ději předcházet aktivace funkcí mnoha molekulárních a buněčných cest již během vývoje bazofilního normoblastu. Kondenzace chromatinu zahrnuje deacetylaci histonu, která je regulována up-regulací histondeacetyláz (HDAC) a down-regulací histonacetyltransferáz (Gcn5) ve stádiu bazofilního normoblastu. Gcn5 jsou přímo regulovány c-myc, jehož hladina se během dozrávání normoblastů postupně snižuje. Erytroidní specifická mikroRNA (miR-191), cílí na interagující protein 1 (Mxi1) a serin/threonin protein kinázu 3 (Riok3) pro regulaci c-myc a Gcn5. Následně může kondenzace chromatinu poskytnout neznámé signály pro aktivaci dráhy Rac-GTPázy-mDia2, která je vyžadována pro tvorbu kontraktálních aktinových kruhů a enukleaci. Hladiny c-Myc se snižují během dozrávání normoblastů hlavně ve stádiu ortochromního normoblastu, v tomto období dochází také k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi a následuje enukleace. Transkripční faktor Myc zastává důležitou roli při regulaci proliferace, diferenciace, buněčného růstu a apoptózy (obr. 5) (Jayapae 2010).

Histondeacetyláza a histonacetyltransferáza jsou dvě protichůdné třídy enzymů epigenetické modifikace. Acetylace zprostředkovaná histonacetyltransferázou otevírá

chromatin a umožňuje transkripci genu (Wang 2020). Histondeacetylázy mají represivní účinek na genovou expresi, katalyzují odstranění acetylových funkčních skupin z lyzinových zbytků histonových i nonhistonových proteinů. Tyto enzymy využívají k deacetylaci substrátů acetyllyzinu mechanismy závislé na NAD⁺ nebo na zinku (Seto 2014).

Transkripční faktor Zfp148 nebo také nazývaný ZBP-89 je interagujícím partnerem hlavního erytroidního transkripčního faktoru GATA-1. V systému erytroidního vývoje působí GATA-1 se zinkovým prstem jako hlavní regulátor regulující expresi většiny genů specifických pro vyvíjející se erythrocyty. Cílená delece Zfp 148 narušuje zrání normoblastů, pokud dojde k blokaci Zfp 148 i Zfp 281, nedojde k dozrání na erythrocyt vůbec (obr. 6) (Woo 2019).



Obr.6 Cílená delece transkripčních faktorů (Woo 2019).

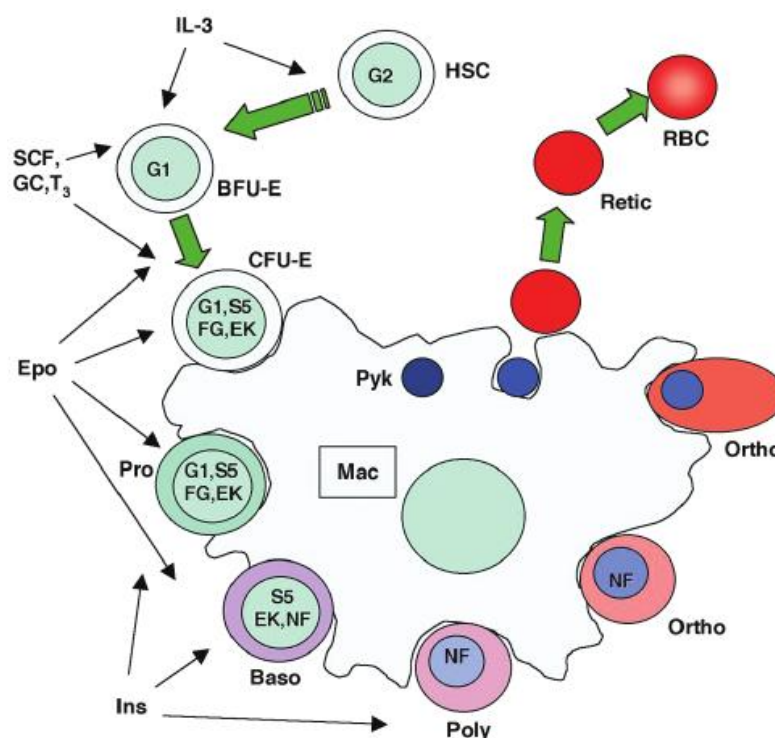
3.4 Transkripční faktor GATA-1

Udržení vysoké hladiny GATA-1 proteinu je klíčové v časném stádiu erythropoézy, později v jednotlivých vývojových stádiích normoblastů jeho hladina postupně klesá. Tento transkripční faktor reguluje na transkripční úrovni všechny aspekty zrání a funkce jednotlivých vývojových stádií erythrocytu. Udržování homeostázy proteinu GATA-1 je velmi pečlivě regulovaný proces, při poruše regulace dochází k hematologickým transformacím. Tento protein má 3 hlavní funkční domény:

N-terminální transaktivační doménu (N-TAD) a dvě homologické domény ZnF (Gutiérrez 2020).

GATA-1 je nezbytný při regulaci exprese globinu, biosyntéze hemu a membránových genů během vývoje erytrocytu. Později bylo potvrzeno, že aktivuje geny zapojené do autofagie a lysozomálních funkcí. Autofagie představuje potřebný proces pro odstranění organel prostřednictvím lysozomální clearance během vývoje normoblastů. GATA-1 prochází několika posttranslačními modifikacemi. Acetylace probíhá histonacetyltransferázou na zbytcích lysinu na karboxilových koncích jeho zinkových prstových domén. Acetylace tohoto proteinu je vyžadována pro diferenciaci erytrocytů a pro obsazení GATA-1 chromatinu a transkripční aktivaci. Acetylovaný GATA-1 interaguje s Bromodomainovým proteinem 3 (BRD3), který stabilizuje vazbu GATA-1 na chromatin (Tsifoglou 2009).

Podstatné jsou rovněž interakce s dalšími transkripčními faktory, kofaktory a chromatinovými regulačními komplexy. Nejvíce prostudované jsou interakce mezi GATA-1 a FOG-1. Interakce těchto dvou faktorů je nezbytná pro erytrocytní, ale i megakaryocytovou diferenciaci (Gutiérrez 2020).



Obr.7 Regulace vývoje erytroidních buněk (Ingley2004). Zkratky: (HSC) hematopoetická kmenová buňka, (BFU-E) Shluky tvořící jednotky-erytroidu, (CFU-E) kolonie tvořící jednotky-erytroidu, (Pro) proerythroblast, (Baso) bazofilní normoblast, (Poly) polychromní normoblast, (Ortho) ortochromní normoblast, (Pyk) pyrenocyt, (MAC) makrofág, (Retic) retikulocyt, (RBC) erytrocyt, (IL-3) interleukin-3, (SCF) faktor kmenových buněk, (GC) glukokortikoidy, (T₃) Trijódtyronin, (Epo) erythropoetin, (Ins) inzulín, (G1) transkripční faktor erytroidu 1, (G2) transkripční faktor erytroidu 2, (S5) signální převodník a aktivátor transkripce 5, (FG) přítel transkripčního faktoru erytroidu 1, (EKLF) erythroid Krüppel-like factor, (NF) Transkripční faktor genu NF-E2.

3.5 Regulační faktory

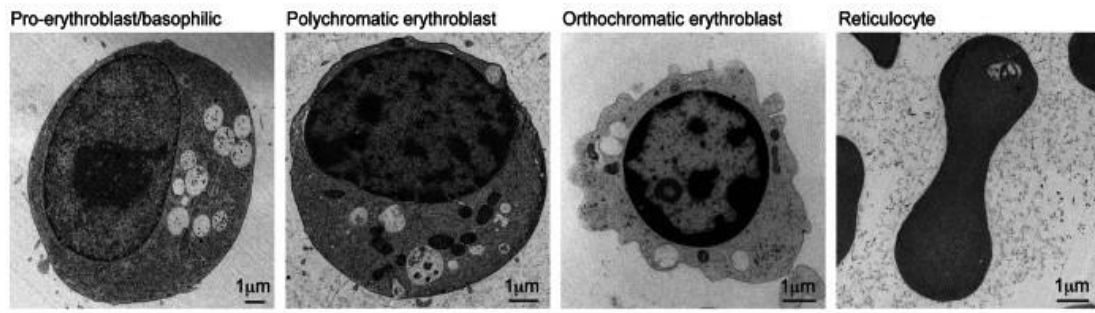
Jak můžeme vidět na obr.7, stádium bazofilního normoblastu je regulováno pomocí S5, EK a NF. Zkratka NF náleží transkripčnímu faktoru NF-E2. S5 je zkratkou pro Stat 5, jde o signální převodník a aktivátor transkripce 5. Ligand indukovaný erythropoetiovým receptorem vyvolá dimerizaci erythropoetinu a spouští aktivaci předem asociované janusové kinázy 2 (JAK 2). JAK 2 fosforyluje tyrozinové zbytky na cytoplazmatickém konci erythropoetiového receptoru. Tyto fosfotyroziny slouží jako místa pro proteiny, které slouží k aktivaci různých signálních drah. Centrální cestou v signalizaci erythropoetiového receptoru je však aktivace transkripčního faktoru Stat 5.

Po fosforylaci se dimery Stat 5 přemístí do jádra, váží se na příbuzné prvky v různých promotorech a aktivují transkripci. Stat 5-zprostředkované funkce regulují proliferaci buněk, diferenciaci a apoptózu. Pro funkční erythropoézu je zapotřebí několika důležitých Stat 5 cílových genů, jako je c-Myc, Pim, Oncostatin M, Bcl-xL a dalších (Grebien 2008).

Na obr. 7 je značen jako EK, ve většině zdrojů se s ním setkáváme pod zkratkou EKLF, neboli Erytroidní Krüppel-like faktor je erytroidní transkripční faktor potřebný pro transkripci genů, které regulují erythropoézu, rovněž se jedná o tzv. modifikátor chromatinu. Je obsažen v jádře, ale i v cytoplazmě bazofilního normoblastu. Bylo prokázáno, že ELKF je transkripční aktivátor inhibitorů buněčného cyklu (Yien 2012). Koordinuje expresi genů, které kódují proteiny, tyto proteiny spojují membránu a cytoskelet, syntézu hemu, produkci energie prostřednictvím pyruvát kinázy a β -globinu (Hodge 2006). ELKF reguluje dospělý gen β -globinu (Basu 2007). Zapojuje se jako aktivátor β -globinu, účastní se remodelace chromatinu a vytvoření aktivního chromatinového náboje (Pilon 2008).

3.6 Autofagie

Indukce autofagie přichází ve stádiu polychromního normoblastu, avšak autofagozomy zůstávají hojně zastoupeny až do enukleace jádra ve stádiu ortochromního normoblastu. Autofagie je nezbytně důležitý katabolický proces, ve kterém lysozomy degradují a recyklují cytoplazmu buněk. Recyklují se toxické nebo již nadbytečné složky sekvestrací částí cytoplazmy, včetně celých organel (obr. 8). Tento proces probíhá v autofagozomech s dvojitou membránou a následně dochází k fúzi s lysozomy. Autofagie může být neselektivní nebo vysoce substrátově specifická. Zásadním krokem je v obou případech kovalentní vazba fosfatidylethanolaminu na exprimovaný C-koncový glycin autofagozomového markeru Atg8. Endopeptidáza Atg4 je klíčovým regulátorem, jelikož připravuje nově syntetizovaný pro-Atg8 (Betin 2013). Proces autofagie napomáhá k udržení homeostázy, chrání buňky před stresem a má svou úlohu během vývoje a buněčné diferenciaci.



Obr.8 Změny v endomembránových kompartmentech (Betin 2013).

4. Polychromní normoblast

Polychromní normoblast je menší než bazofilní normoblast, dosahuje průměru 8-12µm. Sytě zbarvené jádro obsahuje hutný, pyknotický chromatin, mohou se objevovat i hrudky chromatinu. Jádro je více kondenzované, obsahuje heterochromatinové klastry. Dochází totiž ke ztrátě nukleolů. Jedná se o husté fibrilární oblasti a granulární centra, to je jediná viditelná struktura v polychromních normoblastech. Rozklad nukleolů odpovídá snížení produkce ribozomální RNA (Yeo 2019). Příměs narůžovělé barvy v jinak šedé cytoplazmě indikuje přítomnost hemoglobinu. Buňka má kulovitý tvar, stejně tak i jádro. Polychromní normoblasty se vyznačují hemoglobinizací cytoplazmy a nepravidelně kondenzovanými jádry (Ovchynnikova 2018). Toto stádium tedy exprimuje větší množství hemoglobinu než stádium bazofilního normoblastu a vykazuje i vyšší množství GPA (Kodippili 2010). Na úrovni polychromního normoblastu dosahuje maxima také exprese mRNA pro proužek 3. Exprese polypeptidu proužku 3 pokračuje až do stádia ortochromního normoblastu.

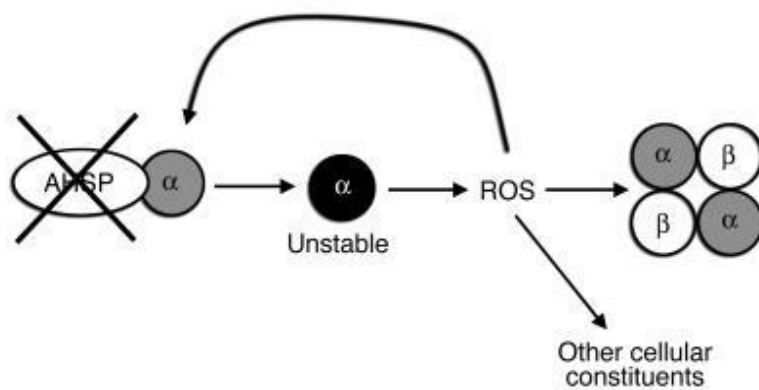
4.1 Transkripční faktor E2F-2

Jedná se o transkripční faktor regulovaný retinoblastomem. Nukleární kondenzaci ovlivňuje zřejmě i retinoblastom-1, reguluje totiž buněčný cyklus a diferenciaci. Retinoblastom je regulátorem buněčného cyklu, konkrétně řídí G1 progresi do fáze S. Ovlivnění nukleární kondenzace bylo popsáno *in vitro*. Normoblasty s nedostatkem retinoblastomu-1 vykazovaly vadnou jadernou kondenzaci, čímž byl narušen i proces enukleace. V terminální erythropoéze za regulaci E2F-2 zodpovídá EKLF (Swartz 2016). E2F-2 řídí regulaci genů, které se účastní buněčného cyklu a

chromozomů. Ztráta E2F-2 zhoršuje jadernou kondenzaci, a tím je pak ovlivněna i následná enukleace.

4.2 Vývoj hemoglobinu

Pozdější vývoj erytroidních buněk je z velké části věnován produkci hemoglobinu A. Syntéza hemoglobinu musí být pečlivě koordinována, aby nedošlo k akumulaci volných α - nebo β -podjednotek, které jsou cytotoxické. Syntéza hemoglobinu je koordinována homeostatickými mechanizmy. Alfa hemoglobin stabilizující protein (AHSP) je erytroidní protein, který se specificky váže na volný α -globin, stabilizuje jeho strukturu a omezuje jeho schopnost účastnit se chemických reakcí, které vedou k vytvoření reaktivních kyslíkových sloučenin (Kong 2004). AHSP specificky rozpoznává G a H helixy α -globinu a tvoří stabilní komplex s volnými α -globiny až do spojení s partnerskými β -podjednotkami (Zhou 2006). AHSP byl původně identifikován při screeningu genů, které jsou regulovány esenciálním hematopoetickým transkripčním faktorem GATA-1. Byly stanoveny určité charakteristiky jeho interakce s α -globinem. Vazba α -globinu je přes $\alpha_1\beta_1$ dimer rozhraní, β -globin a AHSP proto nemohou vázat α -globin současně. β -globin váže α -globin pevněji než AHSP, proto β -globin snadno vytlačí AHSP z α -globinu. AHSP může indukovat oxidaci hemového železa a hemoglobinu (Kong 2004).



Obr.9 Důsledky ztráty AHSP v dozrávajících normoblastech (Kong 2004).

Bez AHSP se α -globin stává nestabilním, podléhá zvýšené náchylnosti k tvorbě reaktivních kyslíkových sloučenin (ROS), dochází k poškození a vysrážení α -globinu a hemoglobinu A, ale i k oxidaci dalších buněčných složek. Nestabilní α -hemoglobin degraduje a uvolňují se z něj toxické porfyriny, volné železo a denaturované α -

globinové proteinové řetězce. Výsledkem je předčasná ztráta cirkulujících erytroidních buněk a prekurzorů erytrocytu (obr. 9).

5. Ortochromní normoblast

Velikost této buňky se pohybuje mezi 8-12 μm . Jádru je kulaté, malé, může být uloženo centrálně nebo excentricky. Chromatin je v tomto stádiu kondenzovaný bez jakékoliv struktury, pyknotický. Cytoplazma má v této fázi vývoje eozinofilní charakter, je tedy po obarvení růžová. Ve stádiu ortochromního normoblastu dochází k extruzi jádra, které je poté fagocytováno makrofágy. Bez jádra již není buňka schopna dále se dělit. Dochází také ke ztrátě všech organel, jako je Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum, mitochondrie či ribozomy. V tomto stádiu se zastavuje buněčný cyklus a buňka již není schopna dále se dělit.

5.1 E nukleace jádra z ortochromního normoblastu

E nukleaci lze chápat jako formu asymetrického buněčného dělení (Wolner 2017). Jádru zaujímá před nukleací excentrickou polohu. Je obklopeno úzkým okrajem cytoplazmy, která je bohatá na hemoglobin a obsahuje ribozomy. Vimentinová vlákna tvoří cytoskeletární síť, která drží jádru na místě. Během erytropoézy je vimentin exprimován a organizován do vláken, střední vlákna jsou degradována. To vede k tomu, že se jádru stává excentrickým.

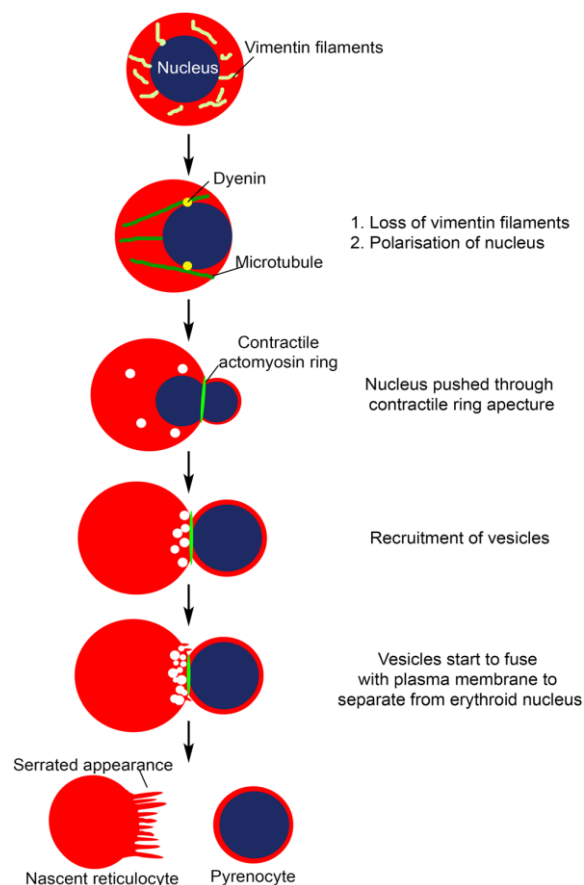
Polarizace kondenzovaného jádra, zprostředkovaná přeskupením mikrotubulů, je zásadní pro jadernou extruzi (Mardin a Schiebel 2012). Kondenzované jádru je nejdříve polarizováno excentricky v procesu regulovaném mikrotubuldependentní fosfoinosid-3-kinázou (PI3K) (Wang 2012). Pro zprostředkování této polarizace je také důležitý dynein. Jedná se o motorický protein, který zprostředkovává jednosměrný pohyb směrem k minusovému konci mikrotubulu (Kobayashi 2016). Cyklin-dependentní kináza-9 (CDK-9), jejímž hlavním úkolem je regulace buněčného cyklu, se zapojuje tím, že reguluje kondenzaci a nukleaci jádra, ačkoli mechanismus není znám (Wolner 2015).

V následujícím stádiu pyknotické jádru proniká do cytoplazmatického výčnělku a v tomto procesu se začíná deformovat. Úzký okraj cytoplazmy odděluje jádru od buněčné membrány. Hlavní část jádra, ale stále zůstává v původní buňce. Buňka je nepravidelně formovaná, větší část jádra je protlačena skrze úzký otvor. +

F-aktin, distálně od jádra generuje cytoplazmatické kontrakce, a tudíž tlak tlačí elastické jádro úzkým otvorem z buňky (Nowak 2017). Vezikula a vakuoly pak cestují mezi počínajícím retikulocytem a jádrem. Tato vezikula se spojí do větších vezikul a ta pak podporují remodelaci cytoplazmatické membrány a separaci jádra ortochromního normoblastu (Keethivasan 2010). Výsledkem je vznik retikulocyta a pyrenocyta (obr.10).

5.2 Pyrenocyt

Plazmatická membrána vypuzeného jádra exprimuje povrchový protein. Tento protein obsahuje nízkou hladinu glykoforinu A a receptoru pro transferin ve srovnání se vzniklým retikulocytem (Ji 2010). Pyrenocyty začínají na svém povrchu exprimovat fosfatidylserin, což dává makrofágům signál, aby je pohltily. K pohlcení makrofágy dochází u erytoblastických ostrovů uvnitř fetálních jater či kostní dřeně (Keerthivasan 2011). Jádro se štěpí v lysozomu, kde DNáza II štěpí DNA pohlcených jader (Kawene 2001).



Obr.10 Proces erytroidní enukleace (Hao 2019).

5.3 Třídění membránových proteinů mezi retikulocyt a pyrenocyt

Při enukleaci mohou být ztraceny proteiny, které nejsou potřebné pro další vývoj zralého erytrocytu, ale je třeba zachovat ty proteiny, které jsou nutné k udržení struktury a funkce zralé červené krvinky. Tyto proteiny musí být zachovány v cytoplazmatické membráně retikulocytů (Satchwell 2015). Během procesu třídění proteinů jsou proteiny rozděleny mezi retikulocyt a pyrenocyt. Spektrin se váže na vznikající retikulocyt. Proužek 3 a ankyrin se také připojují k retikulocytu. Transferin se přemístí na membránu pyrenocytu, což znamená, že v další fázi zrání retikulocytu na zralý erytrocyt nebude využit. Proteiny zprostředkovávající intercelulární připojení, jako je integrin P1, jsou směřovány do pyrenocytu. Glykoforin A se segreguje na membránu retikulocytu (Keerthivasan 2011). Toto třídění pravděpodobně napomáhá tomu, aby se pyrenocyt se svými získanými proteiny mohl připojit k makrofágům a zároveň, aby bylo umožněno retikulocytům přesunout se do krevního oběhu.

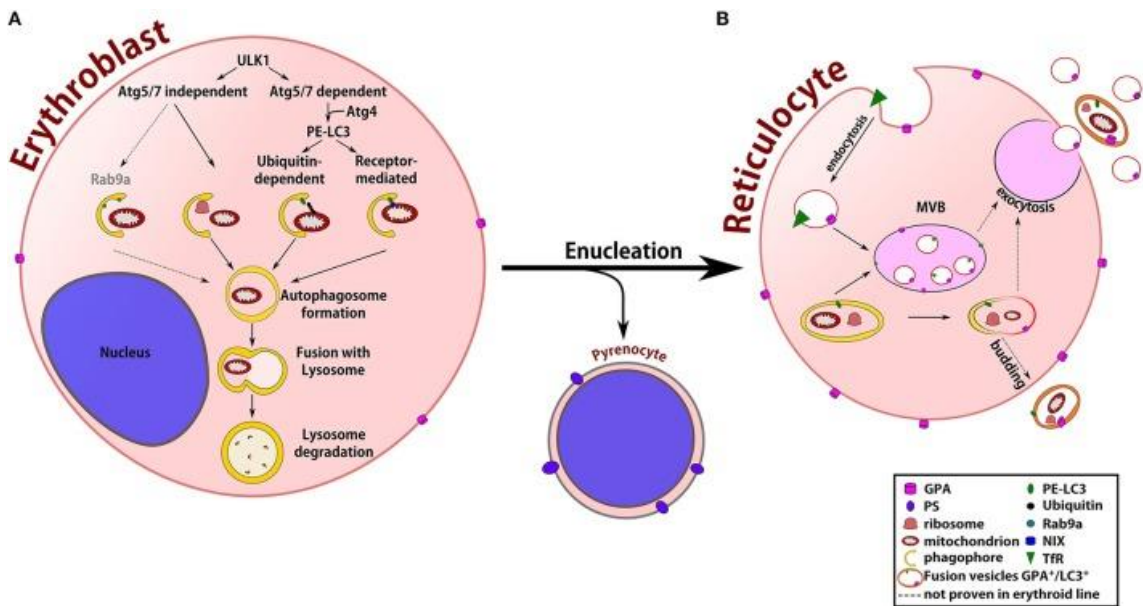
5.4 Clearance organel

Clearance organel začíná současně s enukleací a pokračuje ve stádiu retikulocytu. Postupně jsou vyloučeny všechny organely z buňky. Dochází k vyloučení mitochondrií, ribozomů i endoplazmatického retikula. Buňka postupně přechází k využití energie ve formě ATP z glykolýzy.

5.4.1 Mitochondriální clearance

Hlavním mechanismem mitochondriální clearance je mitofagie, tj. selektivní typ autofagie, která umožňuje degradaci poškozených mitochondrií. Důležitost tohoto procesu je zdůrazněna s vědomím, že poškození mitochondriální funkce způsobuje zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku, což může způsobit poškození buněčných složek (bílkoviny, nukleové kyseliny a lipidy) a vyvolat buněčnou smrt (Lee 2012). Mitochondrie je třeba eliminovat, jelikož hlavním úkolem erytrocytů je přenos kyslíku a mitochondrie kyslík spotřebovávají. Nix je protein související s Bcl-2, který je up-regulován během terminální erytropoézy. U retikulocytů s nedostatkem Nix byl pozorován defekt mitochondriální clearance (Sandoval 2008). Mitochondrie, které se chystají podstoupit clearanci, jsou obklopeny strukturami s dvojitou membránou a následně podléhají degradaci a eliminaci exocytózou. Enzym 15-lipooxygenáza vstupuje

do mitochondriálních membrán v retikulocytech a umožňuje přístup lytických enzymů k mitochondriím (Ney 2011).



Obr.11 Terminální diferenciace ortochromního normoblastu (Moras 2017).

Jak můžeme vidět na obr. 11 A, ve fázi ortochromního normoblastu jsou aktivovány dvě autofagické dráhy, které jsou zprostředkovány pomocí Ulk1, tento děj probíhá proto, aby došlo ke clearanci organel. Atg 5/7-závislá cesta s proteolytickou Atg4-závislou aktivací MAPLC 3, mikrotubulovým proteinem 1 světelným kanálem 3 (LC 3) a Atg 5/7-nezávislá cesta, která souvisí s proteinem LC 3. Aktivace LC 3 umožňuje vložení do fagoforové membrány, zahájení pohlcení organel rozpoznáváním ubikvitinového signálu nebo přímou vazbou specializovaných receptorů na organelové membráně. Po vytvoření autofagozomu umožňuje jeho fúze s lysozomem degradaci organel hydrolytickými enzymy.

Na obr. 11 B vidíme, jak jsou během tohoto stádia nežádoucí membránové proteiny, např. transferinový receptor (TfR), internalizovány endocytózou a vyloučeny exocytózou z multivezikulárních struktur těla. GPA / LC3 dvojitě pozitivní vezikuly obsahující zbytky organel se také nacházejí v retikulocytech, což značí spolupráci mezi endotelovými (GPA +) a autofagovými (LC 3+) cestami k eliminaci organel. Jak však autofagozomy interagují s multivezikulárními těly (MVB) sledující stejnou cestu

recyklace membránových proteinů nebo pučení přímo z plazmatické membrány po fúzi s endocytovými vezikuly, zůstává stále neznámý (Moras 2017).

5.4.2 Ribozomy a jiné organely

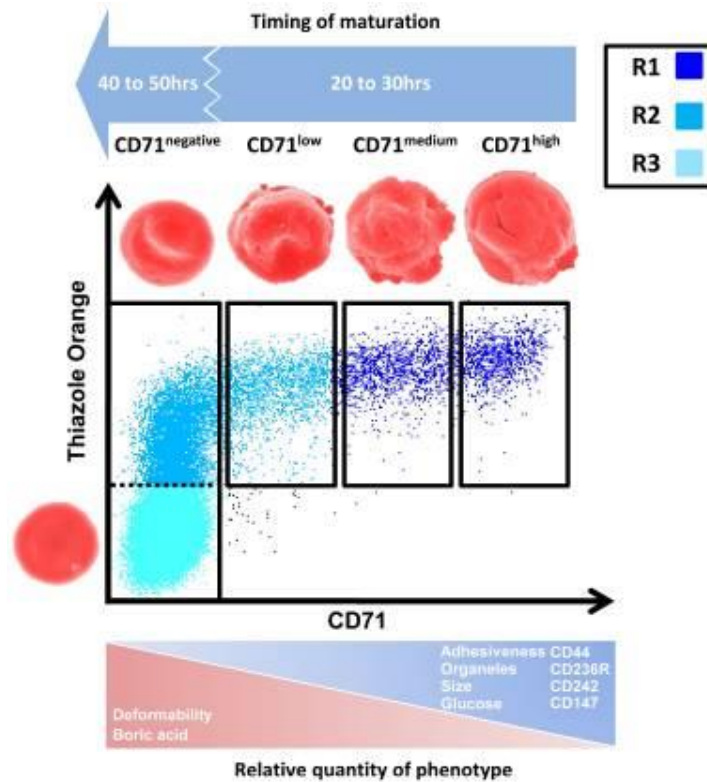
Obecně hraje autofagie zásadní roli při eliminaci dalších organel, jako jsou lysozomy a endoplazmatické retikulum. Zatímco pro odstranění mitochondrií je vyžadován Nix. Ulk1 se podílí na degradaci ribozomů a mitochondrií (Schweers2007). Podobně byla u myši pozorována účinná clearance ribozomů, endoplazmatického retikula a inhibice mitofagie (Mortensen 2010). Tyto údaje naznačují, že non-autofagické nebo Atg7-nezávislé autofagické dráhy mohou sloužit pro odstranění jiných organel.

6. Retikulocyt

Nově vznikající buňky retikulocytů zůstávají v kostní dřeni po dobu 24-48 hodin, následně kostní dřev opouštějí a vstupují do krevního oběhu, kde dochází po dalších 24 hodinách k dozrání na erythrocyty. Než retikulocyt dozraje, je třeba, aby vyloučil nežádoucí membránové proteiny, jako jsou: integrin $\alpha_4\beta_1$, CD 98 a receptor transferinu CD 71 (obr. 12). Tento děj probíhá prostřednictvím uvolňování malých váčků nazývaných exozomy. Exozomy jsou uvolňovány, aby došlo k snížení buněčného povrchu, a tím mohla buňka přejít z multilobulárního tvaru na tvar bikonkávní. Ke zmenšení buněčného povrchu retikulocytů dochází i díky ztrátě lipidů z membrány. Právě vzniklé retikulocyty mají tuhou membránu. Tato tuhá membrána je méně stabilní než u zralého erythrocytu. K oslabené asociaci dochází mezi cytoskeletem a lipidovou dvouvrstvou nebo uvnitř cytoskeletu nezralých retikulocytů. Zobrazení cytoskeletu odhalilo, že spektrínová vlákna v nezralých retikulocytech byla ve srovnání s erythrocyty prodloužena (Li 2018).

K pučení membrány retikulocytů může docházet na základě snížení cytoskeletové konektivity. Pučení slouží jako druhý mechanismus vylučování plazmatické membrány při dozrávání retikulocytů. Zrání retikulocytu zahrnuje tři stádia. V prvním z nich pozorujeme pohyblivé multilobulární buňky. Tyto buňky se nachází stále v kostní dřeni. Během průběhu druhého stádia zrání ztrácí motilitu a získávají asymetrický tvar s prstencem a viditelnými granulemi uvnitř buňky a dostávají se

z kostní dřeně do krevního oběhu. V konečném stádiu granula uvnitř retikulocytů mizí a buňka získává svůj charakteristický bikonkávní tvar.



Obr.12 Tři stádia zrání retikulocytu (Malleret 2013).

7. Erytrocyt

Erytrocyty tvoří u dospělého člověka 40-45 % objemu krve. Celkově dosahují až k počtu 25 % všech lidských buněk. Každou sekundu erythropoéza vyprodukuje 2 miliony erytrocytů. Mladý erytrocyt je větší než zralá červená krevní buňka. Jeho velikost se upravuje v průběhu prvního týdne přítomnosti v periferní krvi. Dále se v prvním týdnu sníží obsah hemoglobinu asi o 7 % (Pecka 2002).

Membrána zralých erytrocytů se skládá z plazmatické membrány cholesterolu/fosfolipidu, na níž je ukotvena elastická síť cytoskeletálních proteinů obsahující aktin a protein 4.1. Cytoskelet se k lipidové dvojvrstvě ukotvuje pomocí spojů s glykoforinem C. Ankyrinový proužek 3 stabilizuje cytoskelet k lipidové dvojvrstvě. Díky této síti se mohou zralé červené krvinky deformovat během průchodu úzkými kapilárami a po průchodu opět získat svůj charakteristický bikonkávní tvar (Palis 2014).

Erytrocyt cirkuluje v krevním oběhu po dobu 100-120 dní, než dojde k jeho recyklaci a nahrazení. Studie dokázaly, že během života červené krvinky se mění mnoho aspektů. Její objem klesá asi o 20 %, hmotnost hmoty hemoglobinu klesá asi o 15 %, stejně tak je snížena i povrchová plocha. Poměr povrch/objem se tak naopak zvyšuje. Dochází ke změně symetrie fosfatidylserinu (Higgins 2015).

V průběhu stárnutí dochází v erytrocytech ke změnám fyziologickým, fyzikálním i biochemickým. Během stárnutí můžeme pozorovat pokles objemu buněk i pokles množství hemoglobinu. Staré červené krvinky zvyšují svoji hustotu a vážou se na autologní imunoglobulin G (IgG), ten slouží pro iniciaci odstranění senescentních erytrocytů. Spuštění vazby protilátek IgG má spojitost s proužkem 3. Tato vazba vede ke vzniku neoantigenů. Snižuje se rovněž transport síranů, což zabraňuje navázání ankyrinu na glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázu, která má roli klíčového enzymu v glykolýze. Dochází také ke zvýšení glykovaného hemoglobinu v buňce. Buňka ztrácí vodu a další významné látky, jako jsou: 2,3-bisfosfoglycerát, ATP, proteiny a hemoglobin.

Naopak se zvyšuje počet vezikul. Červené krvinky ztrácí i povrchové materiály, např. kyselinu sialovou. Kyselina sialová je zodpovědná za změnu struktury, funkci membrány a za elektrický náboj buněk (Hsieh 2019). Senescentní erytrocyty jsou vyčištěny splenickými makrofágy, které dokáží rozpoznat seskupený proužek 3 na povrchu buňky. Interakce CD 47 s trombospondinem-1 na senescentních erytrocytech mohou převést signály nejíst mě na jíst mě, což vede k clearanci erytrocytu makrofágovými buňkami (Palis 2014).

8. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo popsat funkci kostní dřeně a myeloidní řadu krevních buněk, následně se zaměřit na erythropoézu a podat poznatky o morfologii, funkcích a odlišných vlastnostech normoblastů. Práce je rovněž zaměřena na mechanismy, které během vývoje krvetvorných buněk probíhají.

Zásadní částí diferenciací buněk v erytrocyt je enukleace ve stádiu ortochromního normoblastu. Erytrocyt je jednou ze tří buněk v těle, u kterých dochází k extruzi jádra. Než vznikne plně vyvinutá červená krevní buňka trvá to zhruba 7 dní. Diferenciací z retikulocytu na zralý erytrocyt je dlouhá 24-48 hodin. Detailní průběh některých mechanismů a procesů během vývoje lidského erytrocytu však není dosud znám. Některé z nich byly prokázány pouze *in vitro* nebo u zvířat.

Toto téma mne velmi zaujalo a v této oblasti jsem se během vypracování práce dozvěděla mnoho nových a zajímavých informací.

9. Seznam literatury

1. Akashi K., Traver D., Miyamoto T.: *A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages*. Nature, **2000**, 404, p. 193-197.
2. Baker S. J., Maayan A., Lieu Y. K., John P., et al.: *B-myb is an essential regulator of hematopoietic stem cell and myeloid progenitor cell development*. PNAS, **2014**, 111, p. 3122-3127.
3. Basu P., Lung T. K., Lemsaddek W.: *EKLF and KLF2 have compensatory roles in embryonic beta-globin gene expression and primitive erythropoiesis*. Blood, **2007**, 110, p. 3417-3425.
4. Cantor A. B., Orlein S. H.: *Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners*. Oncogene, **2002**, 21, p. 3368-3376.
5. Dzierzak E., Phillipsen S.: *Erythropoiesis: development and differentiation*. CSHPM, **2013**, 3, p. 1-16.
6. Grebien F., Kerényi M. A., Kovacic B.: *Stat5 activation enables erythropoiesis in the absence of EpoR and Jak2*. Blood, **2008**, 111, p. 4511-4522.
7. Gutiérrez L., Caballero N., Fernández-Callea L., Karkoulina E. et al: *Regulation of GATA1 levels in erythropoiesis*. IUBMB, **2020**, 72, p. 89-105.
8. Hardouin P., Pansini V., Cortet B.: *Bone marrow fat*. Joint Bone Spine, **2014**, 81, p. 313-319.
9. Higgins J. M.: *Red blood cell population dynamics*. Clin Lab Med, **2015**, 35, p. 43-57.
10. Hodge D., Coghill E., Keys J.: *A global role for EKLF in definitive and primitive erythropoiesis*. Blood, **2006**, 107, p. 3359-3370.
11. Hsieh C., Prabhu N. C. S., Rajashekaraiyah V.: *Age-Related Modulations in Erythrocytes under Blood Bank Conditions*. Transfus Med Hemother, **2019**, 46, p. 257-266.
12. Hu J., Liu J., Xue F., Halverson G., et al.: *Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo*. Blood, **2013**, 121, p. 3246-3253.
13. Chen K., Liu J., Heck S., Chasie J. A., et al.: *Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis*. PNAS, **2009**, 106, p. 17413-17418.

14. Ingley E., Tilbrook P. A., Klinken S. P.: *New insights into the regulation of erythroid cells*. IUBMB, **2004**, 56, p. 177-184.
15. Jayapal S. R., Lee K. L., Ji P., Kaldis P., et al.: *Down-regulation of Myc is essential for terminal erythroid maturation*. J Biol Chem, **2010**, 285, p. 40252-40265.
16. Ji P., Yeh V., Ramirez T., Mureta-Hori M., et al.: *Histone deacetylase 2 is required for chromatin condensation and subsequent enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts*. Haematologica, **2010**, 95, p. 2013-2021.
17. Kawane K.: *Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver*. Science, **2001**, 5521, p. 1546-1549.
18. Keerthivasan G., Small S., Liu H.: *Vesicle trafficking plays a novel role in erythroblast enucleation*. Blood, **2010**, 116, p. 3331–3340.
19. Keerthivasan G., Wickrema A., Crispino J. D.: *Erythroblast enucleation*. Stem cells, **2011**, 1, p. 1-9.
20. Kobayashi I., Ubukawa K., Sugawara K.: *Erythroblast enucleation is a dynein-dependent process*. Exp Hematol, **2016**, 44, p. 247–256.
21. Kodippili G. C., Spector J., Kang G. E., Liu H., et al.: *Analysis of the kinetics of band 3 diffusion in human erythroblasts during assembly of the erythrocyte membrane skeleton*. Br J Haematol, **2010**, 150, p. 592-600.
22. Kong Y., Zhou S., Kihm A. J.: *Loss of alpha-hemoglobin-stabilizing protein impairs erythropoiesis and exacerbates beta-thalassemia*. J Clin Invest, **2004**, 114, p. 1457-1466.
23. Koury S. T., Koury M. J., Bondurant M. C.: *Cytoskeletal distribution and function during the maturation and enucleation of mammalian erythroblasts*. J Biol Chem, **1989**, 109, p. 3005–3013.
24. Lee J., Giordano S., Zhang J.: *Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling*. J Biol Chem., **2012**, 441, p. 523–540.
25. Li H., Yang J., Chu T. T.: *Cytoskeleton Remodeling Induces Membrane Stiffness and Stability Changes of Maturing Reticulocytes*. J Biophys, **2018**, 114, p. 2014-2023.
26. Liu S., McConnell S. C., Ryan T. M.: *Erythropoiesis in the absence of adult hemoglobin*. J Biol Chem, **2013**, 33, p. 2241-2251.

27. Lodish H., Flygare J., Chou S.: *From stem cell to erythroblast: regulation of red cell production at multiple levels by multiple hormones*. IUBMB, **2010**, 62, p. 492-496.
28. Maes M.: *Components of biological variation in serum soluble transferrin receptor: relationships to serum iron, transferrin and ferritin concentrations, and immune and haematological variables*. J Clin Invest, **1997**, 57, p. 31-41.
29. Malleret B., Xu F., Mohandas N., Suwanarusk R., et al.: *Significant biochemical, biophysical and metabolic diversity in circulating human cord blood reticulocytes*. Plos One, **2013**, 8, p. 1-9.
30. Manwani D., Bieker J. J.: *The erythroblastic island*. Curr Top Dev Biol, **2008**, 82, p. 23–53.
31. Mardin B. R., Schiebel E.: *Breaking the ties that bind: new advances in centrosome biology*. J Biol Cell, **2012**, 197, p. 11–18.
32. Mc Grath K. E., Bushnell T. P., Palis J.: *Multispectral imaging of hematopoietic cells: where flow meets morphology*. J Immunol Methods, **2008**, 336, p. 91–97.
33. Mc Grath K. E., Kingsley P. D., Koniski A. D.: *Enucleation of primitive erythroid cells generates a transient population of "pyrenocytes" in the mammalian fetus*. Blood, **2008**, 111, p. 2409–2417.
34. Moras M.: *From Erythroblasts to Mature Red Blood Cells: Organelle Clearance in Mammals*. Front Physiol, **2017**, 8, p. 1076.
35. Mortensen M., Ferguson D. J. P., Edelmann M., Kessler B., et al: *Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo*. PNAS, **2010**, 107, p. 832–837.
36. Ney P. A.: *Normal and disordered reticulocyte maturation*. Curr Opin Hematol, **2011**, 18, p. 152-157.
37. Nowak R. B., Papoin J., Gokhin D. S.: *Tropomodulin 1 controls erythroblast enucleation via regulation of F-actin in the enucleosome*. Blood, **2017**, 130, p. 1144-1155.
38. Pahal G. S., Jauniaux E., Kinnon C., Thrasher A. J. et al.: *Normal development of human fetal hematopoiesis between eight and seventeen weeks' gestation*. AJOG, **2000**, 183, p. 1029-1034.
39. Palis J.: *Primitive and definitive erythropoiesis in mammals*. Front Physiol, **2014**, 5, p. 1-9.

40. Papanikolaou G., Pantopoulos K.: *Systemic iron homeostasis and erythropoiesis*. IUBMB, **2017**, 69, p. 399-413.
41. Pecka M.: *Laboratorní hematologie v přehledu: Buňka a krvetvorba*. Finidr, **2002**, 1, p. 5-160.
42. Pilon A. M., Arcasoy M. D., Dressman H. K.: *Failure of terminal erythroid differentiation in EKLF-deficient mice is associated with cell cycle perturbation and reduced expression of E2F2*. J Biol Chem, **2008**, 28, p. 7394-7401.
43. Popova E. Y., Krauss S. W., Short S. A.: *Chromatin condensation in terminally differentiating mouse erythroblasts does not involve special architectural proteins but depends on histone deacetylation*. Chromosome Res, **2009**, 17, p. 47-64.
44. Remigante A., Morabito R., Marino A.: *Natural Antioxidants Beneficial Effects on Anion Exchange through Band 3 Protein in Human Erythrocytes*. Antioxidants, **2019**, 9, p. 1-11.
45. Roy V., Verfaillie C. M.: *Expression and function of cell adhesion molecules on fetal liver, cord blood and bone marrow hematopoietic progenitors: implications for anatomical localization and developmental stage specific regulation of hematopoiesis*. Exp Hematol, **1999**, 27, p. 302-312.
46. Sandoval H., Thiagarajan P., Dasgupta S. K.: *Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells*. Nature, **2008**, 454, p. 232-235.
47. Satchwell T. J., Bell A. J., Toyne A. M.: *The sorting of blood group active proteins during enucleation*. ISBT, **2015**, 10, p. 163-168.
48. Seto E., Yoshida M.: *Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes*. CSHPB, **2014**, 6, p. 1-26.
49. Schechter A. N.: *Hemoglobin research and the origins of molecular medicine*. Blood, **2008**, 112, p. 3927-3938.
50. Schweers R. L., Zhang J., Randall M. S., Loyd M. R., et al.: *NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation*. PNAS, **2007**, 104, p. 19500–19505.
51. Swartz K. L., Wood S. N., Murthy T.: *E2F-2 Promotes Nuclear Condensation and Enucleation of Terminally Differentiated Erythroblasts*. J Biol Chem, **2016**, 37, p. 1-18.
52. Tavian M., Péault B.: *The changing cellular environments of hematopoiesis in human development in utero*. Exp Hematol, **2005**, 33, p. 1062-1069.

53. Tsiftoglou A. S., Vizirianakis J. S., Strouboulis J.: *Erythropoiesis: model systems, molecular regulators, and developmental programs*. IUBMB, **2009**, 61, p. 800-830.
54. Valent P., Büsche G., Theurl I., Uras I. Z., et al.: *Normal and pathological erythropoiesis in adults: from gene regulation to targeted treatment concepts*. Haematologica, **2018**, 103, p. 1593-1603.
55. Wang J., Ramirez T., Ji P.: *Mammalian erythroblast enucleation requires PI3K-dependent cell polarization*. J Cell Sci, **2012**, 125, p. 340–349.
56. Wang P., Wang Z., Liu J.: *Role of HDACs in normal and malignant hematopoiesis*. Mol Cancer, **2020**, 19, p. 1-21.
57. Wölwer C. B., Gödde N., Pase L. B.: *The asymmetric cell division regulators Par3, scribble and pins/Gpsm2 are not Essentials for erythroid development or enucleation*. Plos One, **2017**, 1, p. 12.
58. Wölwer C. B., Pase L. B., Pearson H. B., Godde J., et al.: *Chemical Screening Approach to Identify Novel Key Mediators of Erythroid Enucleation*. Plos One, **2015**, 10, p. 142-655.
59. Yeo J. H., Lam Y. W., Fraser S. T.: *Cellular dynamics of mammalian red blood cell production in the erythroblastic island niche*. Biophysical Reviews, **2019**, 11, p. 873-894.
60. Yien Y. Y., Bieker J. J.: *Functional interactions between erythroid Krüppel-like factor (EKLF/KLF1) and protein phosphatase PPM1B/PP2C β* . J Biol Chem, **2012**, 287, p. 15193-15204.
61. Yokoyama T.: *No apoptotic cell death of erythroid cells of erythroblastic islands in bone marrow of healthy rats*. J Vet Med Sci, **2002**, 64, p. 913-919.
62. Yoshida H., Kawane K., Koike M., Mori Y., et al.: *Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells*. Nature, **2005**, 437, p. 754–758.
63. Zhao B., Mei Y., Schipma M. J.: *Nuclear Condensation during Mouse Erythropoiesis Requires Caspase-3-Mediated Nuclear Opening*. Dev Cell, **2016**, 36, p. 498-510.
64. Zhou S., Olson J. S., Fabian M., Weiss M. J., et al.: *Biochemical fates of alpha hemoglobin bound to alpha hemoglobin-stabilizing protein AHSP*. J Biol Chem, **2006**, 281, p. 32611-32618.