

UCH-FC
Biotecnología
R 692
C. 1

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

EFFECTO DE LA SOBRE EXPRESIÓN DEL DOMINIO ALFA-1 DE LA
PROTEÍNA HFE Y PROYECCIÓN HACIA UNA TERAPIA GÉNICA CONTRA
LA HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA.

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

Por

Alejandro Rojas Fernández

Diciembre, 2005.
Santiago- Chile

Director de Tesis: Dr. Marco Tulio Núñez.





**EFFECTO DE LA SOBRE EXPRESIÓN DEL DOMINIO ALFA-1 DE LA
PROTEÍNA HFE Y PROYECCIÓN HACIA UNA TERAPIA GÉNICA
CONTRA LA HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA.**

**Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial
de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.**

ALEJANDRO ALFREDO ROJAS FERNÁNDEZ

Dr. Marco Tulio Núñez
Director de Memoria de Título

A blue ink handwritten signature of Marco Tulio Núñez, written over a horizontal line.



Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dra. Cecilia Vergara
Presidente Comisión

A blue ink handwritten signature of Cecilia Vergara, written over a horizontal line.

Dr. Michel Handford
Corrector

A blue ink handwritten signature of Michel Handford, written over a horizontal line.

Santiago de Chile, diciembre 2005





Ahora que cierro un ciclo, quizás es un buen momento para hacer una reflexión sobre mi vida estudiantil en la Facultad de Ciencias. Entré el año 2000 a biotecnología, venía arrancando de bioquímica donde estuve un año y medio. No supe de que arrancaba hasta que descubrí el subsuelo de la facultad, ese sustrato donde crecen árboles que dan frutos de múltiples sabores y colores.

Durante el curso de biología celular, antes de que se otorgaran las pasantías, me interesé en las clases del profesor Tulio Núñez y se me ocurrió hablar con él para ver si podía ir a su laboratorio a aprender. Él me tomó como pasante, con la condición que me sacara una buena nota en la primera prueba (cosa que era condición para tomar una). Frente a este desafío, respondí con un 65, de eso hacen ya casi 6 años. Durante ese tiempo aprendí muchas lecciones, una que siempre recuerdo y que más de alguna vez he parafraseado es: *“Para trabajar en ciencias, hay que aprender a trabajar la frustración”*.

En la facultad aprendí a amar y odiar las pipetas, a bailar de alegría con cada gen clonado y a sufrir con cada prueba de fisicoquímica o analítica. Estaré siempre agradecido de la formación inculcada por el profesor Núñez, creo que más que un estudiante común fui un experimento más de él, la pregunta a responder era ¿qué

pasará si le damos libertad a un estudiante para que haga cada cosa buena que se le ocurra? El resultado soy yo, un estudiante desordenado pero muy apasionado por la ciencia, que encontró en el laboratorio un lugar para hacer realidad sus sueños.

Otro hito en mi formación, fue el descubrimiento del grupo decenio, donde cada viernes aprendí cosas distintas. Ahí, los problemas importantes de la biología eran puestos sobre la mesa: la sistémica, la evolución, la filosofía de la ciencia, y hasta mis virus AAV alguna vez se pasearon por ese pizarrón.

Sólo espero que en el futuro todo lo que aprendí, como la perspectiva apasionada con la cual miro la ciencia, el entusiasmo y la valentía para desafiar grandes problemas nunca me abandonen.



**A mis padres y mi hermano quienes con su sacrificio me han dado
la posibilidad de seguir adelante.**

**A mi Familia y amigos quienes siempre han sido
un apoyo en mi camino.**

A Anne por su amor y por creer en mí.



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marco Tulio Nuñez, por ser el pilar de mi formación, quien siempre creyó en mí dándome la libertad para crear. Siempre será un ejemplo a seguir en mi vida.

A quienes con mucha paciencia me enseñaron cómo trabajar, Patricia Muñoz, Casilda Mura, Pabla Aguirre, Victoria Tapia, Dora Mazariegos y Miguel Arredondo.

A mis compañeros de laboratorio, por su apoyo y compañía. Pamela, Carol, Andrés, Pablo, Daniel, Carolina, Nicol y Carlitos.

Al profesor Yedi Israel y a Fernando Ezquer quienes han aportado con materiales e ideas al desarrollo de este trabajo.

A mis Amigos, Ariel, Felipe A., Tuti, Fabián, Barbara, Nachy, Naty, Fabiola, Pablo y mi primo Felipe quienes siempre han estado a mi lado y me han puesto de pie cada vez que he caído.

A mis compañeros de curso, quienes han compartido conmigo esta lucha por aprender a superar la frustración de los experimentos fallidos.

A mi querido Grupo Decenio, por enseñarme a que la biología es para pensar.

A mi comisión, Dra. Cecilia Vergara y Dr. Michel Handford, por sus críticas y su buena disposición.



INDICE DE CONTENIDO



| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCION | 1 |
| Objetivos generales | 14 |
| Hipótesis de trabajo | 14 |
| Objetivos específicos | 14 |
| | |
| 2. MATERIALES Y METODOS | 15 |
| 2.1 Materiales | 15 |
| 2.1.1 Reactivos | 15 |
| 2.1.2 Equipos | 16 |
| 2.2 Métodos | 16 |
| 2.2.1 Cultivo Celular | 16 |
| 2.2.2 Obtención de RNA y ADNc | 17 |
| 2.2.3 Purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa | 18 |
| 2.2.4 Desfosforilación y ligación de Fragmentos de DNA | 18 |
| 2.2.5 Cepas Bacterianas y transformación. | 19 |
| 2.2.6 Clonación del ADNc Dmt1 isoforma 1B no IRE en pEGFP-N1 | 21 |
| 2.2.7 Clonación del ADNc Dmt1 isoforma 1B-IRE en el vector pECFP-C1 | 20 |
| 2.2.8 Clonación del ADNc HFE en el Vector pEGFP-N1 | 21 |
| 2.2.9 Sub-Clonación del Fragmento EYFP en el vector p-HFE | 22 |
| 2.2.10 Sub-clonación de HFE nativo en el vector viral pAAV-MCS | 22 |
| 2.2.11 Sub-clonación de HFE H63D en el vector viral pAAV-MCS | 22 |
| 2.2.12 Sub-clonación de EGFP el vector viral pAAV-MCS | 23 |
| 2.2.13 Clonación del dominio alfa 1 de la proteína HFE en pcDNA3 | 23 |
| 2.2.14 Transfección transiente y estable de Células Caco-2 | 23 |
| 2.2.15 Transfección de células Hek 293 mediante Fosfato de Calcio. | 24 |
| 2.2.16 Producción de Virus Adeno asociados | 25 |
| 2.2.17 Transducción de células Caco-2 con virus adeno asociados | 26 |
| 2.2.18 Medición de la incorporación de hierro utilizando el isótopo ^{55}Fe | 26 |
| 2.2.19 Medición de la incorporación de hierro utilizando Calceína AM | 27 |
| 2.2.20 Análisis mediante microscopia confocal. | 28 |
| 2.2.21 Análisis estadístico | 29 |
| | |
| 3. RESULTADOS | 29 |
| 3.1 Generación de líneas estables de Caco-2 que expresan el dominio alfa1 de HFE. | 29 |
| 3.2 Estandarización de un sistema para medir la incorporación de hierro en células mediante el apagamiento de Calceína-AM. | 31 |
| 3.3 Incorporación de hierro medido por apagamiento de Calceína-AM en células Caco-2 normales y clones que expresan el dominio alfa1 de HFE y HFE nativa | 34 |
| 3.4 Incorporación de hierro medido por incorporación de ^{55}Fe en células Caco-2 normales y clones que expresan el dominio alfa1 de HFE y HFE nativa | 35 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.5 | Efecto de medios condicionados por sobre de células Caco-2 Alfa1 sobre la incorporacion de hierro por células Caco-2 wt | 37 |
| 3.6 | Distribución de la Proteína de fusión peGFP-N1-HFE y peYFP-n1-HFE. | 38 |
| 3.7 | Distribución de las proteínas de fusión Dmt1-IRE-CFP y Dmt1-GFP | 40 |
| 3.8 | Expresión de Dmt1-GFP isoforma 1B-no IRE | 41 |
| 3.9 | Búsqueda de FRET entre de HFE-YFP y Dmt1-CFP | 42 |
| 3.10 | Cambios en distribución de la proteína Dmt1 desde apical a basal inducidos por hierro. | 44 |
| 3.11 | Co-localización de HFE-YFP y Dmt1-CFP en la membrana Basolateral cuando las células son estimuladas con Hierro. | 47 |
| 3.12 | Generación de Virus Adeno asociados recombinantes para HFE, H63D y EGFP | 49 |
| 3.13 | Ensayos de transducción viral con el vector AAV-EGFP | 51 |
| 4. | DISCUSION | 52 |
| 4.1 | Disminución de la incorporación de hierro en células que sobre expresan el dominio alfa1 de HFE. | 52 |
| 4.2 | Incorporación de hierro mediante apagamiento de Calceina-AM. | 53 |
| 4.3 | Interacción entre Dmt1 y HFE y ensayos de FRET | 54 |
| 4.4 | Proyección hacia una terapia génica contra le Hemocromatosis hereditaria. | 57 |
| 6. | CONCLUSIONES | 59 |
| 7. | BIBLIOGRAFIA | 61 |





INDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------|--|----------------|
| Figura 1. | Isoformas de DMT1 | 5 |
| Figura 2. | Modelo descrito de absorción de hierro en células Caco2. | 10 |
| Figura 3. | Estructura, clonación y expresión de HFE y Alfa-1. A) Estructura de HFE- β 2M B) Clonación y partidores para RT-PCR C) RT-PCR de ARNm para células HFE, Alfa1 y Caco-2 wt | 30 |
| Figura 4. | Curva de incorporación de hierro de células Caco-2 mediante apagamiento de calceína-AM. | 31 |
| Figura 5. | Curvas de incorporación apical de hierro, cuando son cargadas con diferentes concentraciones Calceína-AM. | 32 |
| Figura 6. | Curva normalizada y promedio de las curvas de la Figura 4 | 33 |
| Figura 7. | Incorporación Apical de células Caco-2, Caco-2 que sobre expresan HFE, y Clones que sobre expresan el dominio Alfa 1 de HFE. | 35 |
| Figura 8. | Determinación de la incorporación apical del isótopo ^{55}Fe . | 36 |
| Figura 9. | Relación entre la incorporación porcentual determinada por el método de Calceína-AM y el método basado en el uso de ^{55}Fe . | 37 |
| Figura 10. | Efecto de medios condicionados de células que expresan el fragmento Alfa1 de HFE sobre Caco-2 Nativas. | 38 |
| Figura 11. | Expresión de las proteínas de fusión peGFP-N1-HFE y peYFP-n1-HFE. A) Corte Apical y basolateral de células peGFP-N1-HFE B) Reconstrucción en el eje Z de dos células con peYFP-N1-HFE. | 39 39 39 |
| Figura 12. | Distribución de Dmt1-IRE en células Hek293 y Caco-2 A) Células HEK 293. B) Células Caco-2. | 40 40 40 |
| Figura 13. | Expresión peGFP-N1-Dmt1 isoforma 1B en células Caco-2. | 41 |
| Figura 14. | Co-expresión de Dmt1-CFP con HFE-YFP. | 42 |
| Figura 15. | Decaimiento en el tiempo de ambas proteínas de Fusión | 43 |

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 16. | Expresión de Dmt1 en el tiempo luego de estimular con hierro FAS 50uM. | 45 |
| | A) Distribución de fluorescencia en el tiempo | 45 |
| | B) Fluorescencia en el tiempo a 2.4µm, 8.4µm y 14 µm | 45 |
| | C) Fotografías de mejor resolución 8.4µm | 45 |
| Figura 17. | Inducción de la co-localización en la membrana basolateral. | 49 |
| | A) Células no expuestas a Hierro. | 49 |
| | B) Células expuestas a Hierro 50 µM FAS durante 1 hora. | 49 |
| | C) Cuadrantes de los gráficos de co-localización | 49 |
| Figura 18. | Transfección triple de pAAV-EGFP, pRC y pHelper. | 50 |
| Figura 19. | Transducción de células Caco-2 con AAV-EGFP. | 51 |
| Figura 20. | Modelos de la acción de HFE sobre el transportador apical de hierro Dmt1. | 57 |
| | A) Modelo de secuestro endosomal de Dmt1 | 57 |
| | B) Modelo de Translocación basolateral. | 57 |
| Figura 21. | Proyección hacia una estrategia terapéutica contra la Hemocromatosis Hereditaria. | 58 |



LISTA DE ABREVIATURAS

- β 2M Beta-2 microglobulina
- ^{55}Fe Isótopo Hierro 55
- ADNc Acido desoxirribonucleico complementario
- Alfa-1 Dominio Alfa 1 de HFE
- BCA Acido bicincolínico
- Caco-2 Línea celular de Carcinoma de Colon
- CIAP Fosfatasa Alcalina de intestino de ternero
cola de histidina, que se encuentra en el marco de
lectura A
- Dcytb Citocromo b duodenal
- DEPC Di-etil piro Carbonato
- DMEM Medio Mínimo esencial Dulbecco
- DMT1 Transportador de metales divalentes
- ECFP Proteína fluorescente cian incrementada
- EDTA Ácido Etilendiaminotetracético
- EGFP Proteína fluorescente verde incrementada
el Adenovirus AV5
- EYFP Proteína fluorescente Amarilla incrementada
- FAS Sulfato ferroso Amónico
- Fe Hierro
- Fenton Reacción entre Hierro y H_2O_2 que produce a el radical
libre el hidroxilo
- Fn ferritina
- FRET Transferencia de energía de fluorescencia por

- G418 Antibiótico de acción Eucariota
- H63D HFE con la mutación H63D
- HBS2X Tampón balanceado salino Hans 2X
- Hek293 Células Embrionarias de Riñón
- HFE Proteína de la Hemocromatosis Hereditaria
- HH Hemocromatosis Hereditaria
- Hierro Hemico Hierro dentro del grupo Hemo de hemoglobina
- IRE Elementos de respuesta a Hierro de ARNm
- Ireg1 Tranportador de Hierro basolateral
- IRP1 Proteína de respuesta a Hierro 1
- IRP2 Proteína de respuesta a Hierro 2
- ITR Secuencia invertida Terminal para encapsidación viral
- LB Medio de crecimiento Bacterial LB
- LIP Contenido de Hierro reactivo
- NTA N,N-bis(Carboximetil) glicina, ácido triglicolamico
- Oligo dT Partidor para generar ADNc con RT-PCR
- pAAV-MCS Vector de expresión para generar Virus AAV
- Partidor globin+ Partidor comercial de secuenciación
- Partidor HG- Partidor comercial de secuenciación
- pcDNA3 Vector de expresión mamífero
- pcDNA3.1 Myc His A Vector de expresión mamifero, con epitope myc
- PCR Reacción en cadena de la ADN polimerasa
- pECFP-C1 vector de expresión con ECFP con MCS río abajo
- pECFP-N1 vector de expresión con ECFP con MCS río Arriba

- pEGFP-C1 vector de expresión con EGFP con MCS río abajo
- pEGFP-N1 vector de expresión con EGFP con MCS río Arriba
- pEYFP-C1 vector de expresión con EYFP con MCS río abajo
- pEYFP-N1 vector de expresión con EYFP con MCS río Arriba
- pHelper Vector que reemplaza la asistencia de Adenovirus
- pRC Vector que codifica todos los genes estructurales AAV
- rpm Revoluciones por minutos
- RTf Receptor de Transferrina
- RT-PCR Transcripción Reversa y PCR.
- SP6 Partidor comercial de secuenciación
- T3 Partidor comercial de secuenciación
- T7 Partidor comercial de secuenciación
- TAE Tampón Tris-EDTA acido acético
- TE Tampón Tris-HCl 10 mM pH 8.0 mas 1 mM EDTA
- Tf Transferrina
- Tf 1Fe Transferrina monoferrica
- Tf 2Fe Transferrina di ferrica
- Tf Apo Transferrina no unida a Hierro
- UA Unidades arbitrarias
- UG Copias genomicas Virales
- UI Unidad enzimática.

RESUMEN

El Hierro es un elemento esencial en el desarrollo de la vida, siendo su principal característica la de participar en reacciones de oxidación-reducción por su capacidad de ceder (Fe^{2+}) o captar (Fe^{3+}) un electrón en forma reversible. En la materia viva, el hierro es utilizado en el manejo del oxígeno molecular y en reacciones de transferencia de electrones. En el ambiente reductor intracelular, el Fe^{2+} reacciona con el peróxido de hidrógeno generando radical libre hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) mediante reacción de Fenton. Por esto, la concentración de hierro dentro de los organismos es controlada, ya que su acumulación puede saturar los sistemas de almacenamiento celular produciendo hierro redox-activo.

HFE, es una proteína de membrana presente en una variedad de tipos celulares entre los que destacan los enterocitos y los hepatocitos. Mutaciones en HFE son responsables de la Hemocromatosis Hereditaria, una enfermedad caracterizada por la sobre-absorción de hierro en el intestino, que en el tiempo resulta en daño a órganos como el hígado y el páncreas debido a una acumulación excesiva de este ion. Se ha descrito la interacción de HFE con el Receptor de Transferrina (RTf), proteína que tiene la función de endocitar la proteína transferrina (Tf), el transportador plasmático de hierro. Esta interacción inhibe competitivamente la endocitosis de Tf. El dominio alfa-1 de HFE ha sido identificado como el dominio de interacción con el RTf. En enterocitos, la proteína HFE es parte de la maquinaria que controla la incorporación apical de hierro. Se ha descrito que HFE inhibe la incorporación apical de hierro reduciendo, por mecanismos desconocidos, la capacidad del transportador DMT1 de internalizar hierro desde el medio apical. Por tanto HFE parece ser un regulador negativo de la incorporación intestinal de hierro.

En esta tesis se describe la distribución de las proteínas de fusión HFE-CFP y Dmt1-YFP cuando células Caco-2 son expuestas a hierro. También se describe el efecto de la expresión ectópica del dominio alfa-1 de HFE en la incorporación apical de hierro. Finalmente, se propone una estrategia para una terapia génica contra la hemocromatosis hereditaria basados en la sobre expresión de HFE mediante vectores virales adeno-asociados.

ABSTRACT

Iron is an essential element for the development of life. Its major feature is to be a reversible electron donor, which in live matter is utilized in the handling of molecular oxygen and in a myriad of biological processes that involve electron transfer. In a reaction called the Fenton reaction, Fe^{2+} , in the reducing intracellular environment of the cell, reacts with hydrogen peroxide producing the free hydroxyl radical ($\cdot OH$), one of the most reactive species in nature. This redox feature requires the tight control of the cellular concentration of iron, for cellular iron accumulation can saturates the store system producing Fenton-active iron.

HFE is a membrane protein abundantly present in enterocytes and hepatocytes. Mutations in HFE are responsible for the development of Hereditary Hemochromatosis, a disease characterized by increased intestinal iron absorption, which in time results in organ damage due to iron accumulation. The molecular interaction between HFE and the transferrin receptor (TfR) has been described. The TfR, by binding and internalizing the plasma protein transferrin, is part of the cell iron-acquisition system. HFE interacts with TfR through its alfa-1 domain that corresponds to the first 100 amino acids of the N-terminal end of HFE. HFE is also part of the machinery that controls the apical incorporation of iron by enterocytes. It has been described that HFE, by an unknown mechanism, reduces the capacity of the apical iron transporter Dmt1 to incorporate iron from the apical compartment. Thus, HFE seems to be a negative regulator of intestinal iron absorption.

In this thesis, the effect of the ectopic expression of the alfa-1 domain of HFE on apical iron uptake was studied. We also examined the cellular distribution of the fusion proteins HFE-CFP and Dmt1-YFP when the cells were stimulated with iron. Finally, by using the normal HFE gene encapsulated in an adeno-associated virus vector, we developed the basis for a gene therapy approach to treat Hereditary Hemochromatosis.

1. INTRODUCCIÓN

Importancia biológica del hierro.

El hierro participa en procesos de trascendencia biológica como lo son: la fotosíntesis, el transporte de electrones en la cadena respiratoria, el transporte de oxígeno asociada a la hemoglobina; además actúa como mediador de la acción catalítica de gran parte de proteínas asociadas a procesos de oxido reducción. Esta propiedad oxido reductora ha situado al hierro en el centro de algunas teorías sobre el origen de la vida, las que proponen que éste se habría asociado a moléculas de azufre en las cercanías de las fosas hidrotermales, formando la superficie en la cual se sintetizaron las primeras moléculas orgánicas (Wächtershäuser, 1988). Algunas teorías al respecto proponen que los metales fueron las primeras moléculas con actividad catalítica en la faz de la tierra y que las enzimas originalmente habrían sido en sus inicios una superficie que otorgaba especificidad a la acción catalítica del metal (Eduard, 1998). Esto hace sentido en muchas enzimas que actúan como reductoras y/u oxidantes.

La capacidad del hierro de participar reversiblemente en reacciones de entrega de un electrón (Fe^{2+}) o captación de un electrón (Fe^{3+}), lo sitúan como un elemento altamente tóxico. La acumulación celular de hierro puede guiar la reacción de Fenton hacia la producción del radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), generando daño a proteínas debido a la formación de aductos, al DNA con la formación de 8 hidroxí-derivados de sus bases y a membranas por peroxidación lipídica. (Núñez y col.2001a; Núñez y col. 2001b; McCord. 2004).

Homeostasis del hierro.

En términos celulares, es complejo presentar un modelo general de la homeostasis de hierro, ya que diferentes tejidos cumplen roles distintos y presentan variación en su sistema de regulación. Por ejemplo, las células hepáticas lo almacenan o lo hacen disponible dependiendo de las necesidades del organismo, las células epiteliales del intestino delgado actúan como conductoras en el transporte regulado entre el lumen del intestino y la circulación sanguínea, los macrófagos lo reciclan a partir de glóbulos rojos senescentes y las células hematopoiéticas lo incorporan con avidez para utilizarlo en la síntesis de hemoglobina. En este trabajo se utilizó como modelo la línea celular de carcinoma de colon humano con diferenciación de epitelio intestinal denominada Caco-2 (Álvarez-Hernández y col.1991; Flowers y col. 1996). Las células Caco-2, son cultivables asociadas a superficie y presentan una marcada polarización apical-basolateral. Además desarrollan uniones estrechas que sellan los espacios entre las células, las cuales se generan durante el proceso de diferenciación. Por esta razón, podemos definir dos dominios membranosos en estos cultivos: el apical que corresponde a la membrana que encara el lumen intestinal y el basolateral, que corresponde a la membrana que en el intestino se conecta por difusión con plasma sanguíneo (Peterson y col 1993). El grado de unión entre las células puede ser cuantificado midiendo la resistencia eléctrica a través de la monocapa celular que se genera cuando éstas son crecidas y diferenciadas en insertos bicamerales. Para un mejor entendimiento citamos aquí la figura 2, la cual será útil para el entendimiento del texto a continuación.

Las células Caco-2 poseen dos sistemas de incorporación de hierro asociados a la membrana apical (Tallkvist y col 2000), uno para el Fe-hémico (asociado al grupo hemo de la hemoglobina) y otro para Fe^{+2} . Presentan también un sistema basolateral de incorporación de hierro mediado por el receptor de transferrina (RTF1). El mecanismo por el cual se incorpora el hierro hémico asociado a la membrana apical es poco conocido. Dos isoformas de la enzima hemoxigenasa son capaces de descomponer los grupos hemo y sacar el hierro que estos coordinan (Kikuchi y col. 2005).

Inicialmente, el hierro es incorporado como hierro reactivo dentro de las célula, lo que se denomina pool de hierro lábil (labile iron pool, LIP) (Epsztejn y col. 1997). Parte de este LIP es almacenado en ferritina (Fn) en tanto que otra parte es transportado hacia el plasma sanguíneo por un transportador de la membrana basolateral denominado Ireg1 o ferroportinal, cuya expresión es inhibida por la exposición a hierro en enterocitos (Abboud & Haile 2000; Thomas & Oates 2004) y estimulada en macrófagos (Yang y col 2002). También existe una regulación muy poco estudiada a la que se le denomina bloqueo mucosal y que consiste en la inhibición de la incorporación de una segunda ingesta de hierro a nivel de la mucosa intestinal (Topham y col. 1992)

El transporte de Fe^{2+} en intestino y en células Caco-2 está mediado por una proteína ubicada en la superficie apical denominada Transportador de Metales Divalentes 1, DMT1, también conocida como DCT1 y Nramp2 (Gunshin y col 1997; Canonne-Hergaux y col. 1999). El transportador DMT1 es una proteína integral de membrana con sus extremos amino-terminal y carboxilo-terminal orientados hacia el citoplasma. Esta proteína posee 12 dominios de trans-membrana y es altamente hidrofóbica. Transporta hierro con valencia +2 desde el medio extracelular al medio

intracelular, y su mecanismo ha sido descrito como un co-transporte asociado a un protón (Gunshin y col, 1997). DMT1 transporta al menos 8 metales divalentes y su afinidad de mayor a menor por estos metales está dada en el siguiente orden $Zn^{+2} > Cd^{+2} > Mn^{+2} > Cu^{+2} > Fe^{+2} > Co^{+2} > Ni^{+2} > Pb^{+2}$ (Garrick y col, 2003). Se conocen 4 isoformas para DMT1 generadas por procesamiento alternativo del ARNm, uno de ellos en su primer y segundo exon (1A y 1B) y otro en el último exon, IRE o no IRE. La primera isoforma (exon 1A) tiene 29 aminoácidos más que el exon 1B en el extremo 5', conservando el marco de lectura. La segunda isoforma (exon 1B), por tanto, carece de los 29 aminoácidos iniciales (Hubert & Hentze 2002; Tabuchi y col 2002). El segundo procesamiento alternativo, se encuentra en el último exón, en el cual la tercera isoforma (exón 16) tiene 18 aminoácidos además de una secuencia de regulación traduccional denominada elemento de respuesta a hierro (IRE) que genera una estructura secundaria tipo orquilla en el ARN mensajero. La cuarta isoforma (exón 16 No-IRE), tiene una extensión de 25 aminoácidos y no presenta esta secuencia regulatoria, por lo que se denominan isoforma IRE e isoforma No-IRE respectivamente (Lee y col 1998). (Figura 1). Las isoformas de DMT1 se expresan diferencialmente en tejidos, a modo de ejemplo en corazón, estómago, pulmón, bazo y timo se expresan las isoformas 1B IRE y 1B No-IRE. En riñón y duodeno se expresan todas las isoformas sin embargo la 1A IRE se expresa significativamente más que las otras. Por el contrario en el Hígado se expresa mucho mas isoforma 1B-IRE. (Hubert & Hentze 2002)

El hierro dietario, se encuentra mayoritariamente como Fe^{3+} . Una proteína capaz catalizar la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} , que se denomina citocromo b duodenal (Dcytb), ha sido descrita en la superficie apical de enterocitos. (McKie y col. 2001; Knopfel &

Soloz 2002; Núñez y col 1994). Ambas proteínas, DMT1 y Dcytb, presentan regulación asociada a la disponibilidad de hierro dietario, incrementando su expresión en ratones que son alimentados con una dieta deficitaria en hierro, y decreciéndola cuando altas concentraciones de hierro son disponibles (Frazer y col 2003; Yeh y col 2000).

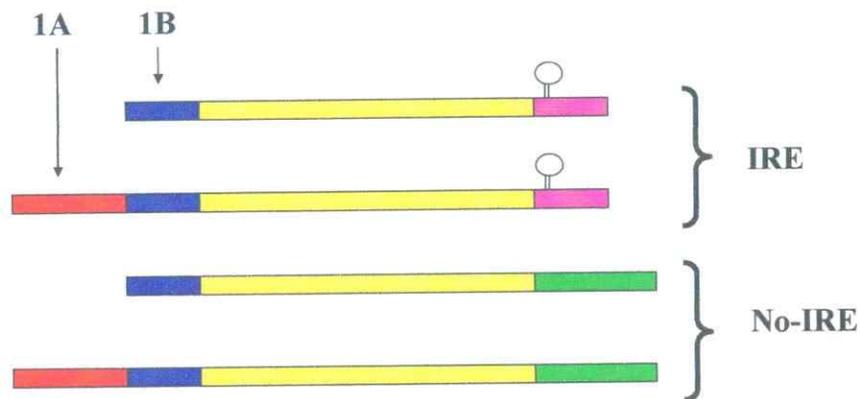


Figura 1. Isoformas de DMT1. Se muestra en rojo la isoforma 1A, en azul la 1B, en amarillo el cuerpo central, en morado la isoforma IRE y en verde la isoforma No-IRE.

En la superficie basolateral, se encuentra otro sistema de incorporación de hierro. Este sistema es general para todas las células del organismo y está compuesto por una serie de proteínas relacionadas entre sí. El hierro que circula en la sangre es transportado por Tf, proteína capaz de unir 2 átomos de hierro Tf-2Fe, la cual presenta un receptor ubicuo en todos los tipos celulares denominado RTf1 (Núñez y col. 1996). RTf1 es endocitado en vesículas unido a Tf-2Fe para luego fusionarse con los endosomas tempranos, donde la acidificación genera la liberación del hierro unido a Tf (Aisen & Brown 1980). El hierro luego es reducido y transportado por la isoforma

DMT1-1B desde el endosoma hacia el citoplasma (Lam y col. 2005; Mountain 2000). El RTfI unido a apo-Tf es reciclado siendo destinado posteriormente al endosoma común apical/basolateral desde donde regresa a la membrana basolateral liberando apo-Tf el que se incorpora posteriormente al plasma sanguíneo (Eisenstein 2000). Este sistema tiene una regulación negativa ejercida por una proteína de la familia MHC de clase I denominada HFE la cual no presenta antígenos (Feder y col. 1996; Rohrllich y col. 2005).

HFE es una proteína con una extensión de 348 aminoácidos, compuesta por una señal de destinación a retículo endoplásmico que va desde el aminoácido 1 al 21; 3 dominios extracelulares: alfa-1 aminoácidos 22 al 112, alfa-2 del amino ácido 113 al 204 y alfa-3 aminoácidos del 205 al 304; una sección de trans-membrana desde al aminoácido 305 al 329 y una pequeña sección citoplasmática del 330 al 348. Esta proteína, así como todas las MHC de clase I, depende de la unión a la proteína llamada beta-2-microglobulina (β 2M), para llegar hasta la membrana plasmática. El interés en HFE surge cuando se asocio una mutación localizada en la región del cromosoma 6, correspondiente a HFE, con la enfermedad llamada Hemocromatosis Hereditaria (HH), enfermedad asociada a una sobre absorción de hierro y acumulación de hierro en tejidos (Feder y col. 1996; Ruddy y col. 1997).

La sobreexpresión de HFE genera un marcado decrecimiento de la incorporación de hierro. El sitio de unión de esta proteína en RTfI se transpone parcialmente con el sitio de unión de Tf (West y col. 2001; Lebron y col. 1998 & 1999; Bennett y col. 2000). Esto sugiere que una de las acciones de HFE es impedir la endocitosis de Tf unida a

hierro y de esta forma disminuir la incorporación celular de hierro (Giannetti, & Bjorkman 2004; Roy y col 1999).

El flujo de hierro desde el citoplasma de enterocitos al plasma sanguíneo es mediado por un transportador de hierro denominado Ireg 1 ubicado en superficie basolateral de las células Caco-2 que cuya expresión es disminuida cuando las células son expuestas a altas concentraciones de hierro (Martín y col. 2002). Según la predicción de su estructura tiene 9 dominios de trans-membrana con su amino terminal orientado hacia el citoplasma y su carboxilo hacia el extracelular. Ireg 1 se asocia funcionalmente a hefestina, una oxidasa de membrana, proteína que oxida el Fe^{2+} a Fe^{3+} , función que es ejercida también por otra proteína plasmática llamada ceruloplasmina la cual coordina estructuralmente un cobre (Figura 2).

El hierro además puede ser almacenado en el citoplasma de las células por la proteína ferritina (Fn), la cual es capaz de almacenar una gran cantidad de átomos de hierro (Munro y col. 1990).

Tanto la incorporación celular de hierro así como su almacenaje, se encuentra al menos bajo dos mecanismos reguladores, uno poco conocido a nivel transcripcional y otro traduccional, que ha sido descrito para tres de las proteínas mencionadas en este texto. El sistema de regulación traduccional consiste en otorgar estabilidad a una secuencia presente en el ARNm no traducido de DMT1, RTf1 y Fn (Rouault y col, 1989; Haile y col. 1989), esta secuencia genera una estructura secundaria tipo orquilla con un tallo de 11 pares de bases complementarias y un bulbo de 6 bases, denominada IRE. A los IREs se unen proteínas regulables por hierro o IRPs. Existen dos tipos IRP1 e IRP2. IRP 1 tiene un núcleo de 4Fe-4S (Rouault y col. 1992), el cual es sensible a las

concentraciones de hierro intracelulares y cuando se encuentra frente a bajas en la concentración de hierro el núcleo 4Fe-4S se disocia incrementando la afinidad de IRP1 por las estructuras IREs, produciendo su posterior unión a estas estructuras secundarias de ARNm con una constante de afinidad de $K_d \sim 20 \text{ pM}$ (Guo y col 1995). IRP2 no tiene núcleo de hierro-azufre, siendo siempre activa en su capacidad de unión a IREs. Se ha descrito que altas concentraciones de hierro intracelulares inducen la degradación de IRP2 (Iwai y col. 1995). La unión de IRP a IRE tiene efectos contrapuestos dependiendo de la ubicación del elemento IRE en el ARNm. Tanto RTf1 como DMT1, tienen sus elementos IRE hacia el extremo 3' no traducido y la unión de IRP estabiliza su mensajero e incrementa su traducción. Por el contrario, la unión de IRP al elemento IRE de Fn, ubicado en el extremo 5' no traducido de su mensajero, provoca la inhibición de su traducción. Este mecanismo es concordante con una regulación homeostática de los niveles celulares de hierro. Cuando baja el hierro la célula expresa más RTf1 y DMT1 e inhibe la síntesis de Fn. Cuando la concentración celular de hierro es alta, se desfavorece la expresión de DMT1 y RTf1 e incrementa su almacenaje por Fn. Este sistema ha sido también descrito en células Caco-2 (Arredondo y col. 1997).

Nuestro laboratorio tiene evidencias de que la proteína HFE no sólo estaría regulando la incorporación celular mediada por el RTf1 en la membrana basolateral sino también podría estar regulando negativamente al transportador apical de hierro DMT1. Evidencias de co-inmunoprecipitación entre DMT1 y HFE (Arredondo y col. 2006), y experimentos de sobre-expresión de la proteína HFE, en el cual se han disminuido la incorporación apical de hierro y el flujo transepitelial sustentan esta hipótesis (Arredondo y col. 2001). Esta inhibición de incorporación ha sido también reportada en

otras líneas celulares (Corsi y col. 1999). Además se ha descrito que HFE y DMT1 tienen una regulación recíproca a los niveles de hierro (Han y col. 1999). Por otra parte, el hallazgo que DMT1 colocaliza con RTf1 en los compartimientos endosomales mediante microscopia confocal (Tabuchi y col. 2000; Yuxiang y col. 2002; Touret y col. 2003), sugiere que también colocaliza con HFE, ya que su internalización se realiza por medio de la unión a RTf1 (Ramalingam y col. 2000). Estas evidencias nos han estimulado a investigar la relación espacial y funcional entre HFE y DMT1.

HFE y Hemocromatosis.

La patología de la HH consiste en un aumento en la absorción intestinal de hierro, lo que produce, con la edad, sobrecarga corporal del este ión metálico (Trinder y col. 2002; Fleming y col. 2002). HH se evidencia en la forma de múltiples patologías, como cirrosis hepática, cáncer de hígado, diabetes sacarínica, insuficiencia cardíaca debida a miocardiopatías, artritis, impotencia secundaria e hipogonadismo hipotalámico (Shaheen y col. 2003; Gunn y col. 2004). La HH es la enfermedad genética más frecuente en occidente, ya que afecta a 1 de cada 400 personas siendo 1 de cada 10 caucásicos heterocigoto para gen afectado (Wohlk y col. 2003). Dos mutaciones en la proteína HFE: C282Y y H63D, generan más del 90 % de los casos clínicos. La mutación C282Y es más penetrante que la mutación H63D, la cual sólo está presente en el 1,5 % de los casos clínicos. El doble heterocigoto, formado por las dos mutaciones, genera aproximadamente un 6 % de los casos. La mutación C282Y disrumpe un enlace disulfuro el cual es relevante en la conformación del dominio alfa-3 de HFE, dominio importante en la interacción con $\beta 2M$. HFE-C282Y se acumula en retículo

endoplásmico y es posteriormente degradada (Feder y col. 1997). La frecuencia de esta mutación a nivel mundial dibuja un mapa que predice su origen en el pueblo celta (Lucotte 1998). La mutante se denominó C282Y, sustitución de cisteína por tirosina (Feder y col 1996; Pointon y col. 2004). Otra mutación, más frecuente pero menos penetrante que C282Y fue reportada en el dominio Alfa1: la sustitución de una histidina por un ácido aspártico en el aminoácido 63, denominada H63D (Waheed y col., 1997).

Se han generado ratones que carecen de la expresión de HFE o bien que emulan la mutación C282Y, los cuales generan un fenotipo de hemocromatosis, (Zhou y col. 1998). Sin embargo, se desconoce que sucede con la mutación H63D y cómo ésta puede llegar a producir hemocromatosis (Waheed y col., 1997).

El mecanismo por el cual se asocia a esta proteína con una sobre absorción de hierro se basa en la interacción descrita de HFE con RTf1. Sin embargo, creemos, al igual que algunas publicaciones recientes, que la pérdida de esta interacción no es suficiente para explicar el aumento en la incorporación de hierro corporal y la acumulación tisular de hierro (Tallkvist y col. 2000). Nuestra aproximación al problema apunta a que la pérdida de una regulación negativa de HFE sobre DMT1 podría estar relacionada con el aumento en la incorporación de hierro en HH (Arredondo y col. 2001).

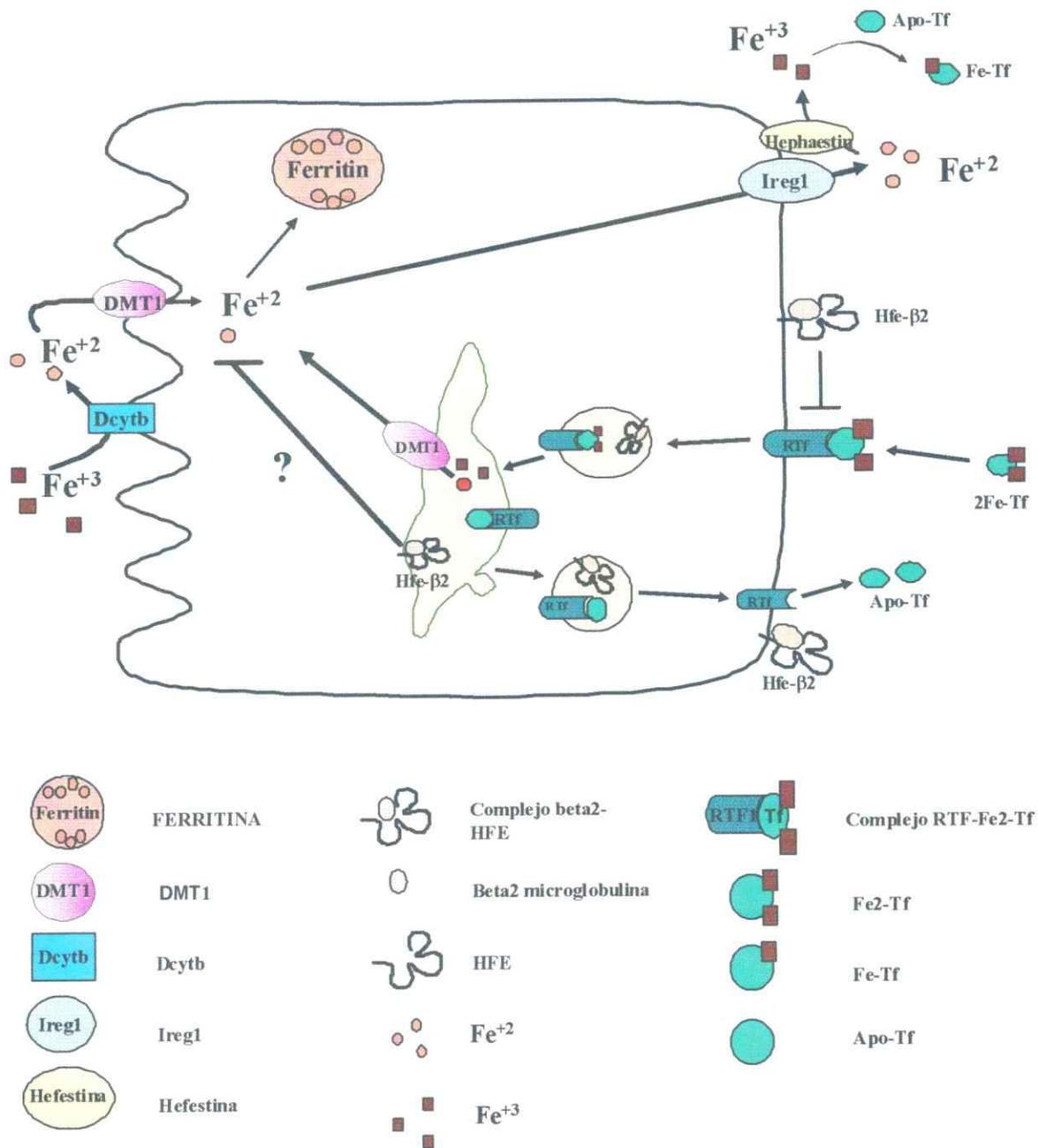


Figura 2. Modelo descrito de absorción de hierro en células Caco2. El hierro dietario es reducido por Dcytb, luego incorporado por DMT1, para luego formar parte del LIP o ser almacenada en ferritina o ser exportado por Ireg 1 y oxidado por hefestina, en la membrana basolateral. El hierro plasmático se encuentra asociado a transferrina, la cual se asocia al Receptor de transferrina 1 RTF1, para ser incorporado mediante endocitosis, de esta manera el hierro llega al endosoma común, donde es transportado al citoplasma mediante DMT1. HFE ha sido reportado inhibiendo ambos sistemas.

Proyección hacia una Terapia Génica contra la HH.

Terapia génica es una estrategia terapéutica que tiene como finalidad modificar la expresión génica en un organismo con el fin de mejorar su calidad de vida (Mountain 2000). Actualmente el tratamiento contra la HH es el mismo que se aplicaba en el medioevo, la flebotomía, que consiste en sangrías periódica como manera de excretar hierro. Algunos pacientes con HH deben hacerlo dos o tres veces por semana cuando presentan crisis, con el fin de disminuir la carga de hierro corporal. Los estudios realizados por Arredondo y col. 2001, predicen que HFE nativa cumpliría un fuerte rol en la regulación negativa de la absorción intestinal de hierro. Lo anterior, asociado a nuevas generaciones de vectores virales, puede orientarse hacia una posible estrategia de terapia génica contra la HH (Ezquer y col, 2005).

Dentro de los vectores de tercera generación (Qiao y col. 2002; Stratagene 2002) los virus adeno-asociados (AAV) presentan muchas características que los hacen favorables para la transducción intestinal. Los AAV, pueden transducir eficientemente células en el intestino delgado de ratones (During y col. 1998), sin filtrar virus a otros tejidos, además, de mantener una expresión ectópica prolongada por más de 6 meses (Bals y col. 1999; Summerford y col. 1998). Aquí se presenta el primer paso para una terapia génica de la HH, que consiste en la generación de vectores de transducción y el estudio de capacidad de estos de aquellos en nuestro sistema modelo, células Caco-2.

Antecedentes

Nuestro laboratorio ha descrito que la sobreexpresión de HFE, y no así la sobreexpresión de HFE con la mutación H63D, inhibe tanto la incorporación apical de hierro así como su flujo transepitelial. También la sobreexpresión de HFE disminuye el LIP dentro de las células. Ensayos de co-inmuno precipitación utilizando anticuerpos contra HFE o bien con su chaperona β 2M, coprecipitan al transportador de hierro DMT1 (Arredondo y col. 2006).

En este trabajo se investigó el efecto del dominio Alfa-1 de HFE, el cual contiene la región en la cual se encuentra la mutación H63D, en la incorporación de hierro (Figura 3). Creemos que este dominio es relevante en la regulación de HFE sobre DMT1. Además analizamos el efecto del hierro en la distribución del transportador DMT1 con el objetivo de encontrar su rol en la incorporación apical de hierro. Este estudio fue desarrollado mediante sobreexpresión del dominio Alfa-1 en células Caco-2 así como también mediante el uso de microscopía confocal utilizando proteínas de fusión, análisis de FRET y co-localización (Wilson y col. 2002; Truong y col 2001). Es importante hacer notar que el fragmento clonado al cual nos referiremos en adelante como dominio Alfa-1, cuenta con 21 aminoácidos en su extremo amino terminal, correspondiente a un péptido señal de destilación a retículo endoplásmico, y 42 aminoácidos hacia su extremo carboxilo terminal que corresponden a una sección del dominio Alfa-2.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La sobre-expresión del dominio Alfa-1 de HFE genera una disminución de la incorporación apical de hierro similar a la proteína HFE en las células Caco-2.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el efecto de la sobre-expresión dominio Alfa-1 de HFE en células de epitelio intestinal Caco-2 y buscar una futura aplicación biotecnológica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1. Clonar y expresar el dominio Alfa-1 de la proteína HFE.** Clonación, utilizando sitios de restricción, de un fragmento correspondiente a 464 pb el cual contiene todo el dominio de Alfa-1 y una pequeña fracción del dominio Alfa-2, en el vector pcDNA3.
- 2. Caracterizar la incorporación de hierro en células Caco-2 que expresan establemente el fragmento Alfa-1.** Realizar experimentos de incorporación de hierro, en células Caco-2-HFE, células Caco-2-Alfa-1 y células Caco-2 control.
- 3. Determinar si la distribución de HFE y DMT1 tiene alguna relevancia en la absorción apical de hierro.** Se estudiará la posible co-localización mediante FRET y colocalización utilizando microscopía confocal. Se estudiará el cambio en la distribución de DMT1-CFP como respuesta a un estímulo de hierro, en el medio extra-celular apical.
- 4. Posible terapia génica contra la HH.** Utilizando el sistema AAV, se realizarán las construcciones de AAV-HFE, AAV-H63D y AAV-eGFP y se transducirán células Caco-2. Se analizará la incorporación de hierro en células transducidas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Reactivos generales.

NaCl, CO₂, CaCl₂, NaHPO₄, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaI, NaOH, H₂SO₄, TRIS, BCA, NTA, PBS, TE, TAE, HBSS, FAS, DTPA, DEPC, SIH, KCl, FAS, CH₃COOK, CH₃COONa, Etanol, Metanol, isopropanol, glicerol, Tween 20, SDS, Triton X100, LB, MgCl₂, HBS2X, HCl, FeCl₃, Calceína-AM, ⁵⁵FeCl₃, bicarbonato de sodio calidad de cultivo, EDTA, NTA, sílica (Sigma S5631), TRIzol (Gibco), los reactivos son provistos por Sigma Chemical Company o de Merck Chile.

Cultivo celular.

Medio de cultivo DMEM, G418, suero fetal de bovino inactivado FBS, tripsina-EDTA, fungizona y antibióticos fueron adquiridos de Gibco-Invitrogen; agua calidad inyectable de Laboratorios Sanderson, Tripsina-5 mM EDTA, HBS2X, CaCl₂, Lipofectamina 2000 con Optimem invitrogen.

Biología Molecular.

Enzimas de restricción, Kpn1, BamH1, EcoR1, Apa1, HindIII, Xho1, Not1, AgeI, Xba1, enzimas CIAP, T4 ligasa, Taq polimerasa, Pfu polimerasa, Vent Polimerasa, Transcriptasa reversa, DNAsa I, RNAsa I, LB, agar, agarosa, acrilamida, lipofectamina 2000, TRIzol, FENOL, cloroformo, oligonucleotidos. Los proveedores utilizados fueron Fermentas, New England Biolabs e Invitrogen.

2.1.2 Equipos utilizados.

Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda EZ210, Lector de Elisa Tecan Sunrise Magellian, Termociclador MiniCycler MJ Research, Lector de Fluorescencia multipocillos CytoFluor II Series 4000, Centrífuga Sorvall RT6000B, Micro-centrífuga Hettich Mikro-22R, Microscopio Confocal Carl Zeiss LSM510, Contador Beta Beckmann LS 7000.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Cultivo celular.

Línea celular Caco-2 (HTB37, American Type Culture Collection, Rockville, MD) cultivadas en medio DMEM, con 10% suero fetal de bovino (FBS), suplementado con 100.000 UI de penicilina/estreptomicina y 25 mg/mL de fungizona. Estas células crecen adosadas a superficies formando monocapas con uniones estrechas, por lo que se pueden distinguir dos superficies diferentes la Apical y la basolateral. Esta propiedad se utiliza con gran ventaja en insertos bicamerales, un sistema para el crecimiento de células sobre una matriz que permite exponer ambas superficies polarizadas a diferentes medios de cultivo, lo que permite tratar y analizar diferencialmente ambas superficies. Las células Caco-2 se crecen sembrando alrededor de 150.000 células en botellas de 25 cm², y se mantienen con cambios de medio cada 2 días. Cuando las células alcanzan confluencia se disocian utilizando tripsina al 5% con EDTA 1 mM y se vuelven a sembrar para mantención en las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

Línea celular de epitelio embrionario de riñón humano HEK293 (CRL-1573, American Type Culture Collection), fueron cultivadas con medio DMEM, con 10% de FBS desactivado 30 minutos a 56 °C, suplementado con 100.000 UI de penicilina /estreptomomicina y 25 mg/mL de fungizona. Se siembran alrededor de 150.000 células por botella de 25 cm², las cuales se cultivan a 37 °C, en un ambiente con CO₂ al 5 %, con cambio de medio cada 2 días. Las células se tripsinizan cuando la confluencia llega a 80 %. Estas células, resultan muy eficientes para ser transfectadas mediante el protocolo de fosfato de calcio, por tanto se utilizaron en este trabajo para analizar la expresión de constructos así como también para la producción de virus adeno asociados.

2.2.2 Obtención de ARN y de ADNc.

La extracción de ARN se realizó utilizando TRIzol (Gibco). Para una botella de 25 cm² de Caco-2 se agregan 2.5 mL de TRIzol se incuban durante 5 minutos a temperatura ambiente, luego se agregan 0,2 mL de cloroformo por cada mL de TRIzol agregado, se agita vigorosamente y se incuba 3 minutos, luego se centrifuga durante 1 minuto a 10.000 rpm a 4 °C, se separa la fase acuosa superior y se agrega 0,5 mL de isopropanol por cada mL de TRIzol agregado, incubar a temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugar a 10.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C, se elimina el sobrenadante y se lava dos veces con etanol al 75 % en H₂O tratada con DEPC. Se resuspende en H₂O-DEPC. El RNA obtenido se cuantifica midiendo absorbancia a 260 nm, donde 1 unidad de absorbancia equivale a 40 µg/mL de ARN. El ADNc se obtiene mediante transcripción reversa (Transcriptasa reversa kit Superscript One-Step RT-PCR System,

Promega) utilizando oligo dT como partidor y usando como templado 2 µg de ARN total.

2.2.3 Purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa.

Se carga una cantidad superior a 2 µg del ADN en un gel de agarosa 1 %, y se corre a 40 V durante el periodo de tiempo suficiente para separar las bandas, luego se corta la banda de interés y se traspasa a un tubo Ependorff de 1.5 mL. El peso de la banda no debe exceder los 300 mg. Se agregan dos volúmenes de NaI 6 M y se calienta a 55 °C durante 10 minutos. Después se agregan 10 µL de sílica (Sigma S5631) 100 mg/mL, y se incuba durante 5 minutos en hielo. Luego se centrifuga a 10.000 rpm durante 1 minuto a 4 °C, se descarta el sobrenadante y se lava el precipitado dos veces con tampón de lavado (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH. 7.5, 2.5 mM. EDTA, 50 % etanol V/V). Se extrae el sobrenadante y se seca el precipitado. Se agrega a este 25 µL de TE pH 8.0, se resuspende el precipitado y se calienta durante 10 minutos a 55 °C. Se centrifuga a 10.000 rpm durante 1 minuto a 4 °C, se recupera el sobrenadante que contiene el ADN para ser cuantificado y se descarta el precipitado.

2.2.4 Desfosforilación y ligación de fragmentos de DNA.

La desfosforilación es un procedimiento que disminuye la probabilidad de obtener colonias positivas debido a la re-ligación del vector. Se utilizo CIAP (Fermentas), 1 UI para 40 µL de solución que contenga un máximo de 1 µg ADN. Se efectuaron dos ciclos de 30 minutos a 37 °C. Posteriormente la fosfatasa se inactivó a 70 °C durante 10

minutos. Si se cuenta con ADN suficiente, es preferible realizar una purificación de ADN antes de ligar.

Para la ligación de fragmentos se utilizó la ligasa T4 (Fermentas) a 400 UI/uL, utilizando 400 UI por reacción de ligación. Las ligaciones se realizan incubando la mezcla de vector e inserto, con razones que pueden variar de 3 veces inserto por una de vector hasta 10 veces de inserto por una de vector. La incubación se realizó por dos horas a temperatura ambiente y luego toda la noche a 16 °C.

2.2.5 Las Cepas bacterianas y transformación.

Las cepas bacterianas utilizadas fueron variantes de *E.coli* como DH5 α , TOP10 y *E.coli* SURE. Las diferentes cepas presentan diferentes fenotipos. Se caracterizan por tener disminuida su capacidad de modificar en DNA foráneo, como es el caso de Top10 y *E.coli* SURE, lo que las hace cepas más seguras para vectores con secuencias invertidas repetidas. Previo a la transformación, las bacterias se hicieron químicamente competentes utilizando CaCl₂ 0,1 M. Se inocularon bacterias en 5 ml de medio LB, y se crecieron durante toda la noche a 37 °C con agitación. Se realizó una dilución 1/100 del cultivo de noche en 12 mL de medio LB, se crecieron alrededor de 2 horas, hasta llegar a una absorbancia a 600 nm entre 0,3 - 0,4 unidades de absorbancia. Las células se centrifugan a 3.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C, se descarta el sobrenadante y se resuspenden en 5 mL de CaCl₂ 0,1 M, pre-enfriado a 4 °C. Luego se centrifugan a 3.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C, se resuspenden en un décimo del volumen original de la dilución o sea aproximadamente 1 mL. Para la transformación, se agregan 150 μ L de

células competente a una cantidad no mayor de 20 ng de DNA y se incuban 30 minutos en hielo. Luego se realiza un golpe térmico de 90 segundos a 42 °C, para luego regresar al hielo durante 10 minutos. En el caso de vectores con resistencia a kanamicina, las células deben recuperarse y expresar las resistencias por tanto el paso siguiente es agregar 900 µL de LB, e incubarlas durante 1 hora a 37 °C con agitación, antes de sembrarlas en placas, no así las los vectores resistentes a ampicilina el cual puede ser directamente depositados en la placa con LB. La concentración de antibióticos para la selección en las placas fue de 50 µg/ml para las placas con ampicilina y de 30 µg/mL para aquellas con kanamicina.

2.2.6 Clonación del ADNc DMT1 isoforma 1B no IRE en pEGFP-N1.

A Partir de ADNc de células Caco-2, se amplificó mediante PCR el ADNc de DMT1 isoforma 1B, utilizando los partidores DMT1+ cagccactcaggtaccaccatgg, el cual introduce un sitio de restricción Kpn1, y el partidor DMT1Apa1-ccagggcccatttaacgtagcc, el cual introduce un sitio Apa1 sobre el codon de término de DMT1, dejando en el mismo marco de lectura el gen DMT1 y GFP. El programa de ciclos fue el siguiente: 3 minutos a 94 °C; 30 ciclos 30 segundos a 94 °C; 60 segundos a 54 °C; 90 segundos a 72 °C y se finaliza con 10 minutos a 72 °C manteniéndose posteriormente a 4 °C. Se digiere tanto el ADNc amplificado de DMT1 isoforma 1B y el vector pEGFP-N1 con la enzima Apa1, con 5 unidades por cada 1 µg de DNA, durante 2 horas a 37 °C. Se diluye la muestra al menos en un 30 % y se digiere con la enzima Kpn1 cuyo tampón contiene mayor concentración de sales (el orden de corte es función de la concentración de sales de los tampones de cada enzima), utilizando 5 UI por cada

1 µg de DNA. Las muestras son purificadas mediante un protocolo similar al utilizado para obtener fragmentos desde hueles de agarosa. La ligación se realiza en 10 µL utilizando diferentes razones entre la concentración de inserto y vector. Se probaron las razones 1:1, 3:1, 4:1 partiendo de 100 ng de vector. Luego se transforman en E.coli quimiocompetentes y se siembran en placas kanamicina resistentes. El correcto ensamblaje del constructo pEGFP-N1-DMT1-1B fue comprobado por secuenciación con los partidores DMT1+674 y scXFP-N1.

2.2.7 Clonación del ADNc DMT1 isoforma 1B-IRE en el vector pEGFP-C1.

A partir de ADNc de células Caco-2, se amplificó el ADNc de DMT1 isoforma 1B mediante PCR, utilizando partidores DMT1-C5'+ cagccactcaggtacccccatgg, el cual introduce un sitio de restricción KpnI y corta una adenina dos nucleótidos río debajo de la secuencia KpnI para mantener el marco de lectura, y con el primer DMT1-C3'-cagacgggccagtggtatttaa, el cual introduce un sitio ApaI y conserva el codon termino de DMT1. El programa de ciclos, la digestión y la ligación se realiza de la misma forma que para la isoforma 1B. La razón utilizada para esta ligación fue de 3 veces mas inserto que de vector. Luego del análisis mediante patrón de digestión con enzimas de restricción el vector pEGFP-C1-DMT1-1B-IRE fue secuenciado con los partidores scXFP-C1+ y scXFP-C1-.

2.2.8 Clonación del ADNc HFE en el Vector pEGFP-N1.

Se utilizó el vector pcDNA3-HFE, disponible en el laboratorio, como templado para amplificar HFE con los partidores sentido HFEXHO2+ 5' taccgagctcaggtccgaaatggg 3'

y con el reverso HFEXHO2-5'gcatgctcgagggtgccctcacg 3'. Ambos partidores generan mutacionalmente sitios de restricción Xho1 y dejan HFE en el marco de lectura apropiado sin el codon de término para ser clonado dentro del vector pEGFP-N1. El constructo fue caracterizado mediante su mapa de restricción y luego secuenciado con los partidores Alfa2+ y Alfa2-.

2.2.9 Sub-Clonación del Fragmento EYFP en el vector p-HFE.

Tanto el vector pEGFP-N1-HFE como el vector pEYFP-C1 fueron transformados en una cepa Bacteriana Dam -, la cual no es capaz de metilar el sitio Xba1 de este vector, Luego se realizó una mini preparación de plasmidos y se digirieron con Xba1 y con Age1. Luego se realizó la desfosforilación y posterior ligación de el fragmento YFP en el vector p-N1-HFE (Xba1, Age1), generando el vector de expresión pEYFP-N1-HFE, el cual fue secuenciado con los partidores Alfa2- y Alfa2+ y expresado.

2.2.10 Sub-clonación de HFE nativo en el vector viral pAAV-MCS.

Se obtuvo el ADNc de HFE clonado en pcDNA3, entre los sitios BamH1 y Xho1 y se subclonó en el vector de expresión viral pAAV-MCS, el vector generado de pAAV-HFE fue secuenciado completamente, con los partidores globin+ y HG-.

2.2.11 Sub-clonación de HFE-H63D en el vector viral adenoasociado pAAV-MCS.

El ADNc de HFE con la mutación H63D clonado en pcDNA3 entre los sitios BamH1 y Xho1, disponible en el laboratorio, se subclonó en el vector de expresión viral

pAAV-MCS, el vector pAAV-HFE-H63D fue secuenciado completamente con los partidores globin⁺ y HG⁻, constatando la posición adecuada de la mutación puntual.

2.2.12 Sub-clonación de EGFP en vector viral pAAV-MCS.

El Vector pEGFP-N1 fue transformado dentro de una cepa Dam⁻ de E.coli, la cual no metila el sitio Xba1 ubicado río abajo de la secuencia de EGFP. Luego se realizó una mini preparación plasmidial. El DNA fue digerido con EcoR1 y con Xba1, y luego fue subclonado dentro del vector pAAV-MCS. Para generar el vector pAAV-EGFP. El vector fue secuenciado con los partidores globin⁺ y HG⁻ y expresado en células Caco-2.

2.2.13 Clonación del dominio Alfa 1 de la proteína HFE en pcDNA3.

Se digirió el vector pAAV-HFE, con la enzima EcoR1, con lo cual se obtuvo un fragmento de 464 pb ubicado hacia extremo 5' del ADNc de HFE clonado en este vector. El que corresponde al dominio Alfa-1 de HFE, este fragmento contiene una señal de destinación a retículo situado en frente del codon ATG inicial, este fragmento fue subclonado en el vector pcDNA3 y también en el Vector pcDNA3.1 Myc-his A. La secuencia correspondiente al inserto alfa-1 fue comprobada por análisis de restricción y por secuenciación con los partidores T7 y SP6 para pcDNA3 y T7 y Alfa2⁺ para el vector pcDNA3-Myc-his A.

2.2.14 Transfección transiente y estable de Células Caco-2.

Se sembraron 120.000 células por cada pocillo de una placa de 6 pocillos, un día antes de la transfección. Al día siguiente, 2 horas antes de la transfección se cambió el

medio por medio fresco. Para la transfección, se mezclaron 10 μ L de lipofectamina 2000, con 200 μ L de Optimem (solución A). En un tubo aparte se mezclaron 5 μ g de DNA con la cantidad de Optimem suficiente para 100 μ L (solución B). Se incubaron durante 10 minutos por separado. Transcurrido este tiempo se mezclaron ambas soluciones y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente, para luego agregar 1 mL de medio DMEM sin suero ni antibióticos. Las células se lavaron con PBS, se les agregó la mezcla de las soluciones A y B y se cultivaron 12 horas a 37 °C, 5% CO₂, en el incubador. Para optimizar las transfecciones transcientes, se repitió el procedimiento al día siguiente, partiendo desde el cambio de medio fresco con 10 % suero e incubando las células al menos por 6 horas con la mezcla de soluciones A y B.

Para transfecciones estables, a las células transfectadas luego de la incubación de 12 horas se les cambió el medio por medio fresco. Al día siguiente se tripsinizaron y sembraron en una placa de 10 mL, incubándose hasta el día siguiente. Luego se agregó el antibiótico G418 en una concentración de 1,2 mg/ml, y incubaron por 15 días cambiando el medio con G418 cada 2 días. Las colonias aisladas, de un tamaño entre 3 a 10 mm, se colectaron con cilindros de clonación y se traspasaron a pocillos individuales. En esta etapa no se les agregó antibióticos, a las células para favorecer su adhesión a la superficie. Un día después de cambió el medio por medio DMEM 10% FBS conteniendo 0,2 mg/mL de antibiótico G418 para su mantención.

2.2.15 Transfección de células HEK293 mediante Fosfato de Calcio.

Se sembraron alrededor de 300.000 células en una placa de 10 mL, y se inspeccionaron para detectar cuando lleguen a alrededor de un 80 % de confluencia. La

concentración de los plásmidos se ajustó a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, y se agregó 1 mL de CaCl_2 , sobre 10 μL (10 μg) del DNA (solución A). En otro tubo se agregó 1 mL de la solución HBS2X (280 mM NaCl, 1,5 mM. Na_2HPO_4 , 50 mM. HEPES, ajustado a pH. 7,1 con NaOH) (solución B). La solución A se agregó cuidadosamente gota a gota sobre la solución B con agitación, a una velocidad de 1 gota cada 2 segundos, Se incubó no más de 10 minutos y se agregó la mezcla sobre las células mantenidas en medio de cultivo completo.

2.2.16 Producción de virus adeno-asociados.

Se sembraron 300.000 células HEK293 en placas de 10 ml, se crecieron hasta alcanzar 80 % de confluencia y se transfectaron utilizando fosfato de calcio. Al día siguiente se cambió el medio por medio fresco y se incubó durante 48 horas, cuando se quiso rescatar las células antes de que estas fueran lisadas por los virus de tal forma de obtener virus concentrados. Alternativamente, las células se cultivaron por 72 horas, obteniéndose virus en el medio de cultivo. En ambas situaciones, los virus y/o células se sometieron a dos ciclos de congelamiento y descongelamiento de $-80\text{ }^\circ\text{C}$ a $37\text{ }^\circ\text{C}$, con el fin de destruir las membranas y soltar todos los virus. Luego se centrifugaron a 3.000 rpm durante 10 minutos y se descartó el precipitado. Los virus se incubaron con DNAsa 1 y RNAsa 1, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizó la purificación de AAV mediante columnas de afinidad basada en bolitas de agarosa unidas a heparina tipo I (Sigma HEP-1-5), según el método descrito (Auricchio y col. 2001).

2.2.17 Transducción de células Caco-2 con virus adeno-asociados.

Diferentes títulos virales del vector AAV-EGFP fueron agregados directamente sobre células Caco-2 no diferenciadas, y se mantuvieron con agitación durante 4 horas y después durante 12 horas a 37 °C en el incubador con 5 % CO₂. El medio viral fue descartado, las células lavadas, y posteriormente incubadas durante 14 días. Se determinó la expresión de EGFP mediante microscopia de fluorescencia confocal.

2.2.18 Medición de la incorporación de hierro utilizando el isótopo ⁵⁵Fe.

El isótopo radioactivo de hierro-55 (81.1 mCi/mg), se mezcló con el isótopo no-radioactivo hierro-56 en una relación 1 : 9 y ambos se combinaron con NTA en una relación 1 : 2,2 (mol:mol). Esta mezcla se denomina ⁵⁵Fe-NTA. Es importante notar que si utiliza DMEM como medio de transporte, éste no debe contener suero por que viene con hierro que interfiere con el experimento. Las células se incubaron con 1 µM ⁵⁵Fe-NTA (0.5 mL por pocillo para placa 12 pocillos) que corresponden a una actividad específica como hierro de 0,124 µCi/mg por el tiempo requerido. Cumplido el tiempo, se retiró el medio radioactivo, que se desechó mediante el protocolo de desechos radioactivos. Las células se lavaron a 4 °C secuencialmente con PBS, PBS con 1 mM de EDTA y luego dos lavados con PBS. Las células se disgregaron con Tris-salino con EDTA 5 mM y luego se centrifugaron a 2.000 rpm por 2 minutos. Las células se resuspendieron en PBS y se re-centrifugaron. Al sedimento celular se le agregó tampón de lisis a razón de 25 µL por cada millón de células. Se incubó a 4 °C por 15 minutos, se centrifugó y se colectó el sobrenadante, al que se le determinó proteínas por el método

del ácido bicincolínico (Bio-Rad) y radioactividad de ^{55}Fe en un contador de radioactividad beta.

2.2.19 Medición de la incorporación de hierro utilizando Calceína-AM.

El experimento clásico por el cual se determina la cinética del proceso de incorporación de hierro es la exposición de células a hierro radioactivo, Fe^{55} o Fe^{59} para luego detectar la carga radioactiva en el interior de las células (Lajtha y Suit, 1955). Este sistema es muy eficaz, sin embargo tiene el problema de la manipulación de isótopos. Por esta razón, se modificó una técnica para determinar hierro reactivo intracelular (LIP) basada en la sonda fluorescente calceína-AM (Kakhlon & Cabantchik, 2002), para poder utilizar esta sonda en la medición de la incorporación de hierro en tiempo real. La calceína es una sonda fluorescente con una constante de afinidad de 10^6 con excitación máxima a 486 nm y emisión máxima a 517 nm. En su forma esterificada (calceína-AM, no fluorescente) entra a la célula donde esterasas celulares la transforman en la sonda libre, de baja permeabilidad a membranas. La fluorescencia de calceína se apaga al unir hierro. Se crecieron células Caco-2 en placas de 12 pocillos por 12 días, lo que permitió una adecuada polarización celular. Las células se cargaron con Calceína-AM 1 μM por 10 min a 37°C. Las células se lavaron 3 veces con medio HBSS-glucosa 5 mM con el fin de eliminar la calceína-AM no incorporada a las células. La calceína-AM incorporada se determinó en un lector de fluorescencia de microplacas con filtros de 480/20 nm y 520/20 nm, para excitación y emisión, respectivamente. Inicialmente estableció una línea basal de fluorescencia durante 5 o 10 ciclos de lectura (cada aproximadamente 1,1

minutos). Luego se agregó hierro al medio de cultivo en la forma de FAS 5 μM y se registró el apagamiento de la fluorescencia de calceína en el tiempo durante 20 ciclos de 1 min. La reacción se finalizó agregando un quelante no-permeante de hierro (DTPA 1 mM) para eliminar la posible fluorescencia de calceína remanente en el medio extracelular, seguido por la adición de SIH 100 μM . SIH es un quelante permeante a la membrana plasmática de alta afinidad por hierro. La adición de SIH resultó en la recuperación de la fluorescencia de calceína previamente apagada por su unión a hierro.

2.2.20 Análisis mediante microscopia confocal.

Se observaron células Caco-2, y células HEK293 mediante un microscopio Confocal Carl Zeiss LSM510 con diferentes objetivos: i) Análisis de transducción viral en células Caco-2 transducidas con el vector viral AAV-EGFP, ii) observación de la expresión de proteínas de fusión, determinando localización en el eje basal-apical y desplazamiento de la localización en el tiempo luego de ser tratadas con 50 μM de FAS, y iii) estudios de FRET entre las proteínas de fusión que expresan los plásmidos pEYFP-N1-HFE y pECFP-C1-DMT1-IRE, a las cuales también se les determinó co-localización. Las longitudes de excitación y el filtro utilizado para captar la emisión se detallan a continuación en la Tabla 1. Los parámetros de ganancia, pinhole e intensidad del láser fueron variados dependiendo de la expresión de las proteínas de fusión.

| Fluoróforo | Excitación(nm) | Filtro(nm) |
|------------|----------------|------------|
| EGFP | 488 | BP 530-600 |
| ECFP | 458 | LP 475 |
| EYFP | 514 | LP 530 |

2.2.21 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con la ayuda del programa GraphPad Prism, Versión 3.02. Se realizaron análisis de ANOVA de dos colas.

3. RESULTADOS

3.1. Generación de líneas estables de Caco-2 que expresan el dominio alfa-1 de HFE

Antecedentes de nuestro laboratorio han descrito que sobre-expresión de HFE en células Caco-2 resulta en inhibición de la captación apical de hierro. Además se determinó que péptidos sintéticos correspondientes a la zona de la mutación H63D en el dominio alfa-1 (amino terminal) de HFE, inhiben la captación basolateral de hierro mediada por el RTf1 (Arredondo y Col. 2001). Esos resultados se retomaron en esta tesis, bajo la hipótesis que la actividad inhibitoria de HFE podría residir en dominio Alfa-1.

La figura 3A muestra la estructura de HFE determinada por cristalografía de rayos X (Lebron y col. 1998) y la ubicación y estructura del dominio alfa-1. En la Figura 3B se esquematiza la estrategia de clonamiento del fragmento Alfa-1 a partir del cDNA de HFE completo y la ubicación de los partidores para la realización de RT-PCR de ARNm. La figura 3C muestra el resultado del RT-PCR para ARNm de células Caco-2, y células Caco-2 clones que sobre-expresan HFE y el fragmento alfa-1.

Dado que las transfecciones transientes de células Caco-2 presentan baja eficiencia, fue necesario generar líneas celulares que expresan establemente el dominio Alfa-1. Los clones celulares fueron denominados Alfa-1 C1 y Alfa-1 C5.

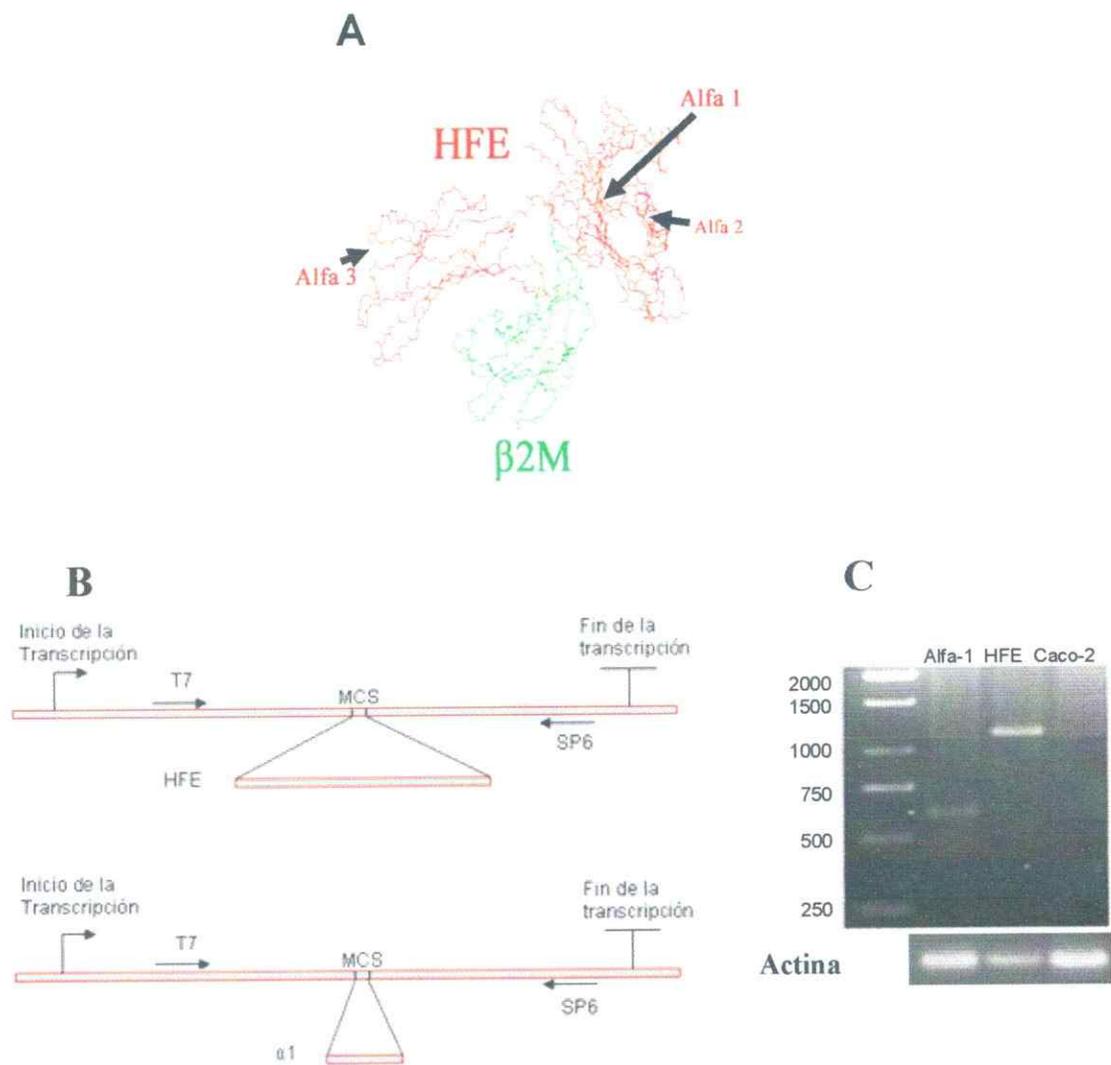


Figura 3. Estructura, clonación y expresión de HFE y Alfa-1. A) estructura del complejo HFE- β 2M en la que se muestra el dominio Alfa-1. B) estrategia de clonación de HFE y del dominio Alfa-1 dentro del plasmido pcDNA3 flanqueados por los partidores T7 y SP6. C) expresión de los clones mediante RT-PCR con los partidores T7 y SP6, para células Caco-2 HFE, células Caco-2 Alfa-1 y células Caco-2 controles.

3.2 Estandarización de un sistema para medir la incorporación de hierro en células mediante el apagamiento de Calceína-AM.

Se diseñó un método para medir cambios de hierro intracelular utilizando calceína. Esta sonda es altamente sensible a cambios de la concentración de hierro apagando su fluorescencia a concentraciones crecientes de este metal. El procedimiento de medición se compuso de cuatro etapas, i) establecimiento de la línea basal dada por la carga de calceína dentro de las células, ii) cinética incorporación de hierro, iii) eliminación de posibles contaminantes extracelulares, iv) determinación de hierro total intracelular unido a calceína. Un registro tipo se muestra en la Figura 4.

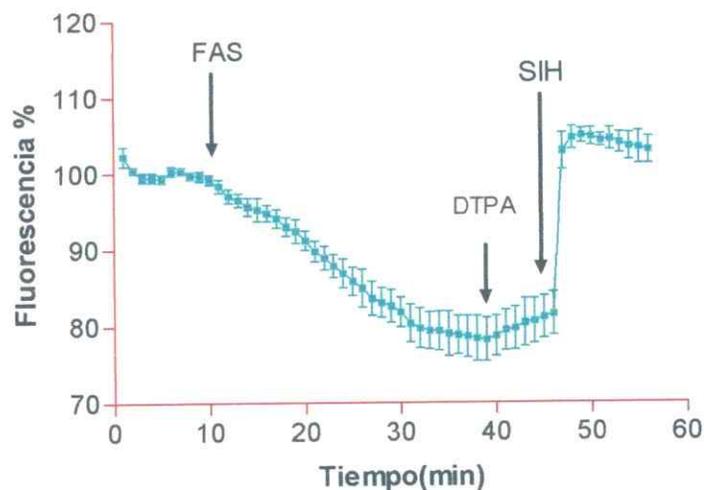


Figura 4. Curva de incorporación de hierro de células Caco-2 mediante apagamiento de calceína. La curva fue obtenida de una placa de 12 pocillos, cargadas con la misma solución de calceína-AM 0.5 μM en HBS-glucosa. Esta curva da una idea de la variación entre repeticiones lo que sirve de base para el análisis de variación entre experimentos no relacionados que son cargados con diferentes concentraciones de Calceína-AM.

El primer problema encontrado fue que la fluorescencia basal tenía una gran variación entre un pocillo de cultivo y otro. Esta variación podría ser debida a variaciones en la

cantidad de calceína-AM cargada por las células y/o, dentro de un cultivo de densidad heterogénea, a variaciones en el número de células excitadas por el haz de luz de excitación del instrumento. Para evaluar estas posibilidades, analizamos la variación de lectura con diferentes cargas de calceína-AM y la variación de lectura entre réplicas en diferentes pocillos. La carga de una placa de 12 pocillos con células Caco-2 con 0,5 μM de calceína-AM durante 20 minutos presentó un porcentaje de variación en la lectura de fluorescencia de 1,43 % con un $P < 0,0001$ (Figura 4).

En otro experimento se analizó la variación asociada a células con tres diferentes concentraciones de calceína-AM: 0.25, 0.5 y 1 μM durante 20 minutos en tampón HBS (Figura 5).

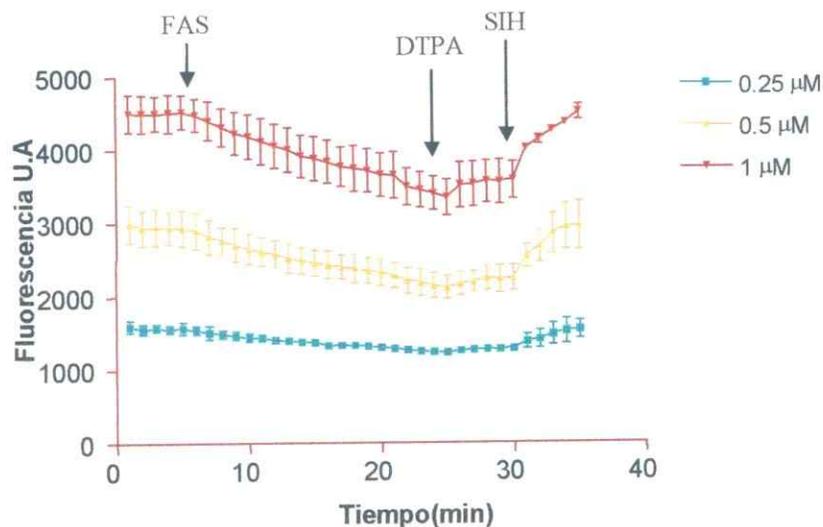


Figura 5. Curvas de incorporación apical de hierro, cuando son cargadas con diferentes concentraciones Calceína-AM. Células Caco-2 crecidas sobre placas de 12 pocillos son incubadas a tres diferentes concentraciones de Calceína-AM durante 10 minutos en cuadruplicado, posteriormente se llevan al lector de micro placas y se realiza un ensayo de incorporación de hierro. Las curvas mostradas conservando los ejes, se ven muy distintas, sin embargo es solo un artefacto el que puede ser corregido normalizando por la línea basal.

Las curvas fueron posteriormente normalizadas con respecto a la línea basal es decir se tomaron los 5 primeros puntos antes de agregar hierro y se estableció aquel promedio como el 100 % de carga de calceína-AM. Posteriormente se realizó un análisis de varianza para determinar si los valores obtenidos son independientes de la carga de calceína-AM inicial para lo cual el porcentaje de variación obtenido fue de 2,54 % con un $P < 0,0001$ (Figura 6).

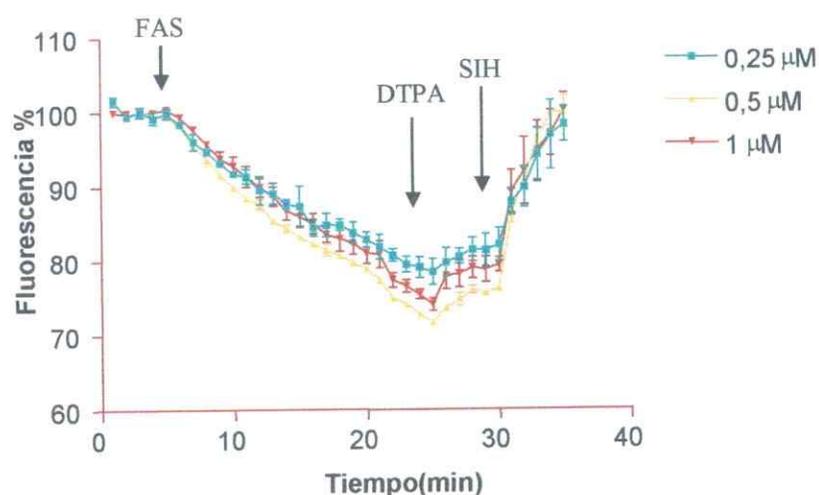


Figura 6. Curva normalizada y promedio de las curvas de la Figura 4. Se muestra la variación real entre las curvas una vez normalizadas, así como también el error asociado a una carga desigual de calceína-AM en los experimentos de incorporación de hierro. Este error está dentro del rango aceptable dado que los ensayos de incorporación realizados con isótopos presentan cerca de 10 % de error porcentual entre duplicados.

El conjunto de estos resultados indican que las mediciones de la incorporación de hierro utilizando calceína-AM, presentan una alta reproducibilidad, e incluso un menor error porcentual que los ensayos realizados con los isótopos. Algunos puntos a considerar son que: la calceína-AM se ha utilizado como marcador de viabilidad, por tanto, este ensayo considera solo células vivas sin aporte al error por la corrección de proteína total en su cuantificación; las células cargan en promedio una cantidad similar de calceína-AM por

tanto cada una actúa como un quantum constante de fluorescencia en las curvas; la cantidad de datos entregados fortalece estadísticamente los resultados.

3.3 Incorporación de hierro medido por apagamiento de Calceína-AM en células Caco-2 normales y clones que expresan el dominio alfa-1 y HFE nativa.

Con el objetivo de determinar si el dominio Alfa-1 posee un efecto en la homeostasis de hierro, se determinó la incorporación de este metal mediante ensayo de apagamiento de calceína-AM. Células Caco2-HFE nativo, Caco-2 Alfa-1 clon 5, Caco-2 Alfa-1 clon 1 y Caco-2 control fueron crecidas en medio DMEM 10 % FBS, el cual contiene alrededor de 5 μ M de hierro, hasta alcanzar un estado avanzado de diferenciación (6 días después de alcanzar confluencia). Las células Caco2-HFE, tal como había sido reportado, responden incorporando menos hierro, que las células Caco-2 control (Figura 7). Similarmente, las células que sobre-expresan el dominio Alfa-1 presentaron una cinética de incorporación similar a las Caco2-HFE. Estos resultados indican que el dominio Alfa1 produce una disminución en la incorporación de hierro, al igual que la proteína nativa.

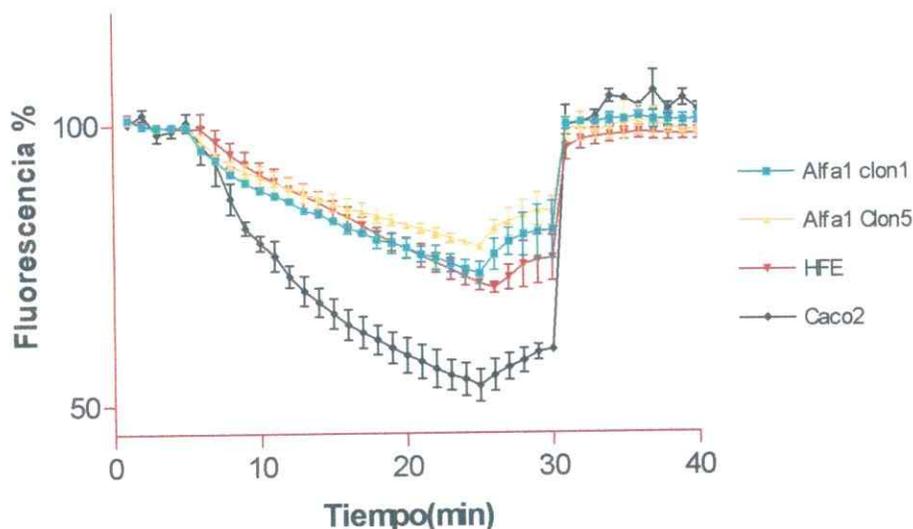


Figura 7. Incorporación apical de hierro en células Caco-2, Caco-2 que sobre-expresan HFE, y clones que sobre-expresan el dominio Alfa 1 de HFE. Las curvas se dividen en cuatro periodos de tiempo. Desde el minuto 1 a 5 min se establece la línea base. A los 5 min se agrega hierro FAS 5 μM al medio. En el segundo período de 6 a 25 min se realiza la detección de la incorporación de hierro por apagamiento de la fluorescencia de Calceína-AM. Luego a los 26 min se agrega DTPA. Finalmente, a los 30 min, se rescata la fluorescencia total agregando SIH. Las curvas verde y amarilla representan la incorporación de hierro a células Caco-2 que sobre-expresan el dominio Alfa-1, la curva roja a células que sobre-expresan HFE y la curva negra a células Caco-2 control. Los valores fueron normalizados a una fluorescencia inicial igual a 100%.

3.4 Incorporación de hierro medido por incorporación de ^{55}Fe en células Caco-2 normales y clones que expresan el dominio alfa1 de HFE y HFE nativa.

Para corroborar los datos obtenidos en los ensayos de apagamiento de calceína-AM se realizaron experimentos de captación de hierro utilizando el isótopo radioactivo ^{55}Fe . Se expusieron las células anteriormente mencionadas a hierro-NTA, 1 μM ^{55}Fe mas 4 μM ^{56}Fe , durante 1 hora y luego se midió la radioactividad intracelular mediante un contador de centelleo. El resultado fue similar al obtenido con el método de apagamiento de la fluorescencia de calceína-AM, dado que tanto las células que sobre-expresan HFE así

como las que sobre-expresan exclusivamente el dominio alfa-1 de HFE captaron significativamente menor cantidad de hierro que las células Caco-2 normales (Figura 8). Por lo tanto, la sobre-expresión del dominio alfa-1 es tan efectiva como la de HFE para inhibir la captación apical de hierro.

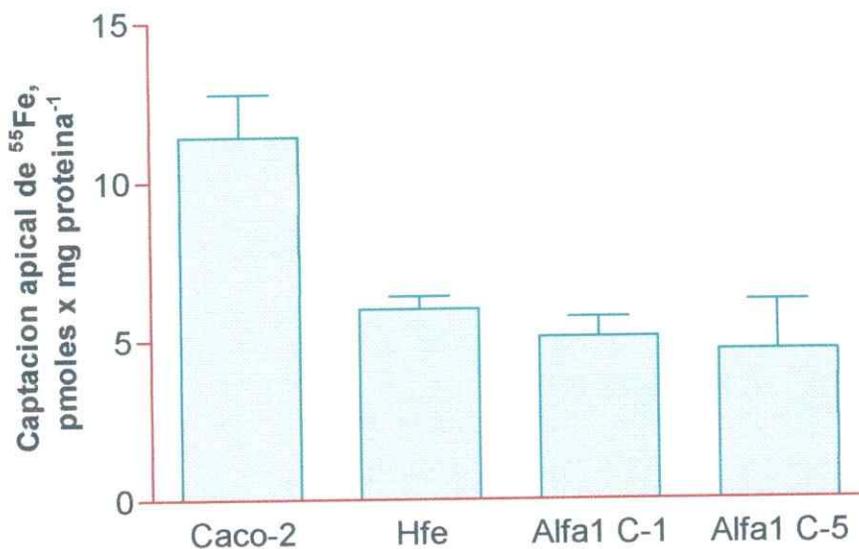


Figura 8. Determinación de la incorporación apical del isótopo ^{55}Fe . Se determinó la captación apical del isótopo de ^{55}Fe , por células Caco-2, células Caco-2 que sobreexpresan HFE y células Caco-2 que sobreexpresan el dominio alfa-1 de HFE. Se observó que tanto las células que expresan HFE como alfa-1 presentaron una significativa disminución con una variación porcentual de 3.52 %. Es importante notar que este ensayo tiene un error per sé de alrededor de un 10 %.

En la Figura 9 se puede apreciar las diferencias entre ambos métodos utilizando el punto anterior a la aplicación del quelante SIH. Para las mediciones de la disminución de la incorporación de los clones se utilizó a las células Caco2 en la normalización de los datos.

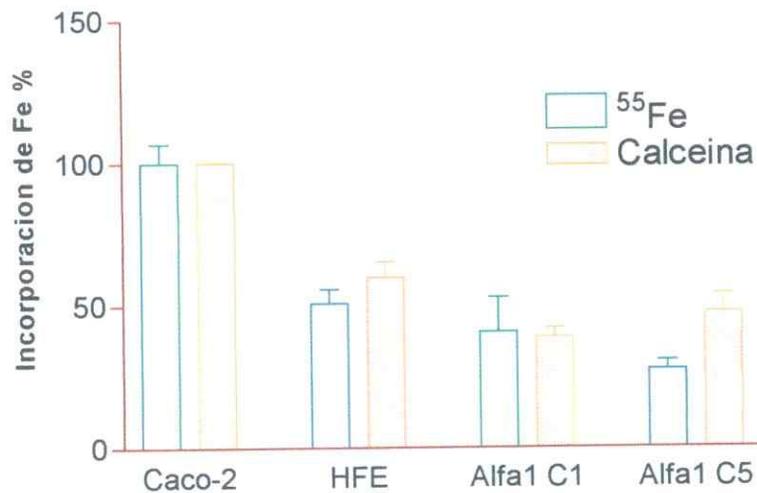


Figura 9. Relación entre la incorporación porcentual determinada por el método de calceína-AM y el método basado en el uso de ^{55}Fe . Las barras naranjas muestran las diferencias en la fluorescencia de calceína entre antes y después de la aplicación de SIH, y las barras blancas el porcentaje de ^{55}Fe incorporado comparado a la incorporación de células Caco-2 control.

Con este análisis no sólo se validan los resultados obtenidos para los clones Alfa-1, sino también la metodología de medición de la incorporación de hierro utilizando calceína-AM, ya que los datos presentan reproducción entre ambas metodologías.

3.5 Efecto de medios condicionados por células Caco-2 Alfa-1 sobre la incorporación de hierro por células Caco-2 wt.

Para determinar si el dominio Alfa-1 estaba siendo secretado y si ejercía su función inhibitoria de la incorporación apical de hierro desde el medio extracelular, se evaluó el efecto de los medios condicionados en la captación de hierro. Para esto, células Caco-2 control se cultivaron por 1, 24 y 48 horas con medio condicionado obtenido de células Caco-2 Alfa-1 clon 5. Luego se determinó la captación apical de hierro mediante isótopo ^{55}Fe (Figura 10).

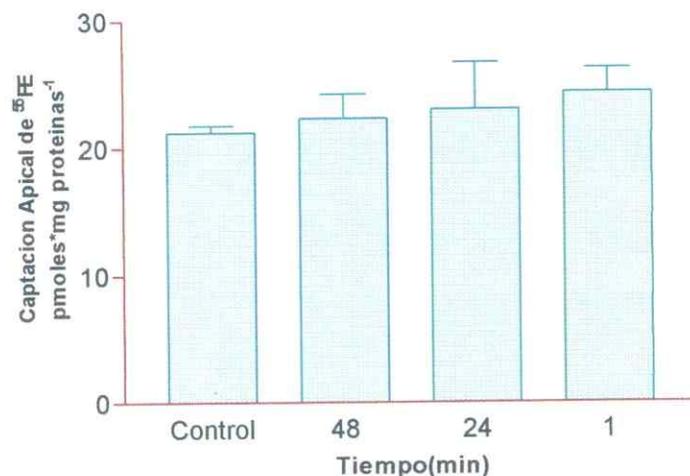


Figura 10. Efecto de medios condicionados de células que expresan el fragmento Alfa-1 de HFE sobre Caco-2 nativas. Medios condicionados de 5 días de células Caco-2 (control, 48 horas), y de células Caco-2 que sobre-expresan el dominio Alfa-1 de HFE, (1, 24 y 48 horas) fueron extraídos y agregados sobre células Caco-2 normales crecidas y diferenciadas. Se determinó la incorporación apical de hierro durante 1 hora, mediante un contador de centelleo.

No encontramos un efecto significativo de los medios condicionados de las células Caco2-alfa1 sobre la captación apical de hierro en las células Caco-2 a ninguno de los tiempos de exposición, por lo cual pensamos que el efecto producido por el dominio alfa 1 es intracelular.

3.6 Distribución de la Proteína de fusión pEGFP-n1-HFE y pEYFP-n1-HFE.

Con el objetivo de obtener la proteína HFE de fusión para poder ser utilizada en experimentos de interacción con DMT1, se generaron los vectores pEGFP-N1-HFE y pEYFP-N1-HFE, los fueron transfectados en células Caco-2 para determinar la localización sub-celular de la proteína por microscopia confocal. Las células fueron

analizadas in vivo, dos días después de ser transfectadas, y se realizaron cortes ópticos utilizando microscopía confocal de 1 a 2 μm , recorriendo una altura aproximada de 30 μm , grosor suficiente para cubrir la altura promedio de 24 μm para una célula Caco-2 (Figura 11).

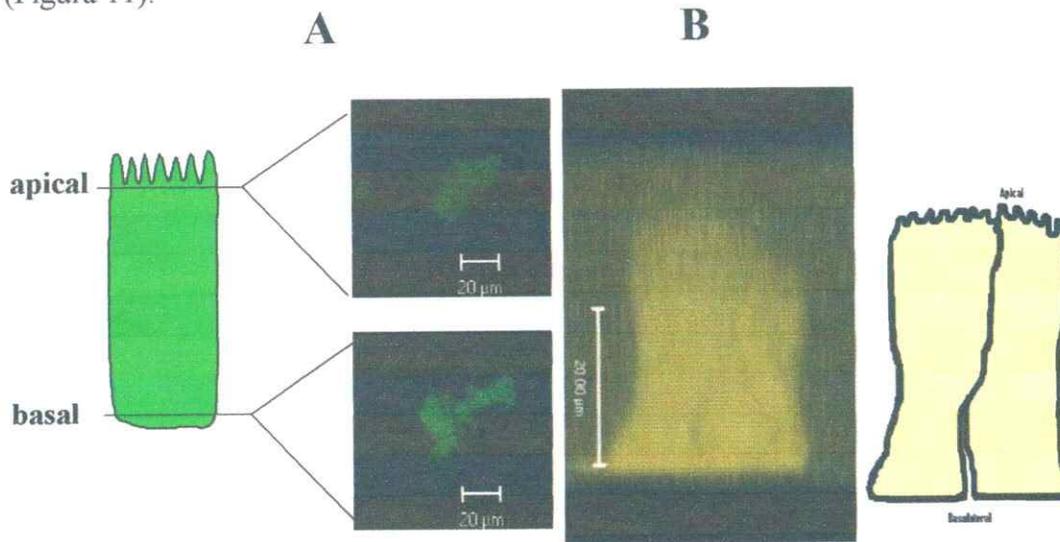


Figura 11. Expresión de las proteínas de fusión pEGFP-N1-HFE y pEYFP-N1-HFE. Se transdujeron células Caco-2 con los vectores que producen las proteínas de fusión y se observaron, luego de dos días, mediante microscopía confocal. Se realizaron cortes ópticos desde el extremo basal al apical, como también integraciones tridimensionales. **A)** Corte apical y basal de dos células Caco-2 transfectadas con pEGFP-N1-HFE. **B)** Reconstrucción en el eje Z de dos células transfectadas con pEYFP-N1-HFE.

Se observó que la distribución de la proteína HFE fue preponderantemente intracelular y enriquecida hacia la membrana basolateral. La Figura 11A, muestra dos fotografías, como muestra el esquema. Una muestra un corte apical y la otra un corte basolateral. Ambas fueron producidas a partir de una misma galería de cortes por lo cual fueron tomadas utilizando los mismos parámetros en el microscopio. En la figura 11B se observa reconstrucción tridimensional de dos células transfectadas con pEYFP-N1-HFE, donde se puede apreciar la morfología de las células Caco-2 como también la

distribución de HFE. La cuantificación densitométrica de HFE en estas células indicó que hay 1,5 veces más HFE en la región basolateral que en la región apical, tomando como referencia un corte a 2,19 μm basolateral con uno a 17,55 μm del extremo apical.

3.7 Distribución de las proteínas de fusión DMT1-IRE-CFP y DMT1-GFP

Se analizó la distribución de DMT1 en células HEK 293 y células Caco-2 transfectadas con DMT1-IRE-CFP y DMT1-GFP mediante microscopía confocal (Figura 12). Se encontró una distribución predominantemente no-nuclear así como también concentraciones de fluorescencia localizadas espacialmente, lo que creemos son compartimientos endosomales. Una distribución similar ha sido descrita por dos otros grupos (Garrick y col. 2003; Tabuchi col. 2000.)

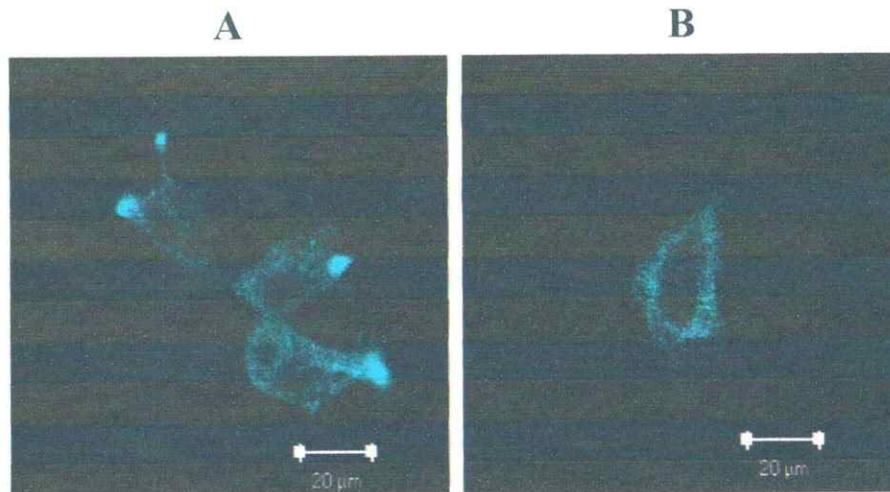


Figura 12. Distribución de DMT1-IRE en células HEK293 y Caco-2. La distribución de DMT1 isoforma 1B IRE, tanto en células HEK293 como en Caco-2, es no-nuclear además de presentar concentraciones de fluorescencia en el sistema endosomal. **A)** Células HEK 293. **B)** Célula Caco-2.

3.8 Expresión de DMT1-GFP isoforma 1B no IRE

La primera isoforma descrita de la proteína DMT1 fue DMT1 1B con un elemento IRE en la región 3' no traducida (DMT1 1B IRE), con la cual comenzamos nuestros estudios. Posteriormente fueron descritos procesamientos alternativos. En la región 3' terminal que cambiaba los últimos 18 aminoácidos por un exon 16A que no contenía la secuencia de respuesta a hierro IRE (isoforma 1B no IRE). y otro procesamiento alternativo que genera un exon extra en el extremo 5' no traducido denominada isoforma 1A (Hubert & Hentze 2002; Tabuchi y col 2002). En esta tesis se trabajó con la isoforma 1B IRE. Sin embargo, en el desarrollo del constructo pEGFP-N1-DMT1, fue extraída la secuencia no codificante correspondiente a la estructura secundaria IRE en el ARN mensajero. La distribución así como era esperado no se vio afectada por la pérdida de la secuencia no traducida IRE, como se muestra en la Figura 13.

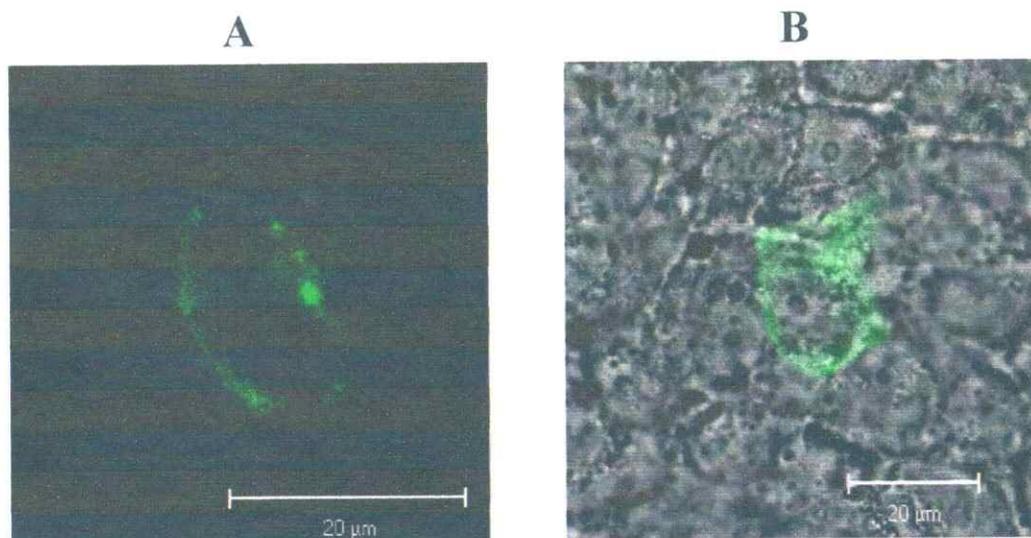


Figura 13. Expresión pEGFP-N1-DMT1 isoforma 1B en células Caco-2. La expresión del Transportador DMT1 como proteína de fusión con GFP, muestra una distribución en membranas además de concentrarse en los sistemas endosomales y no nuclear A) Presencia de DMT1-GFP en compartimientos endosomales, descrito previamente por Garrick y col 2003. B) Se muestra la distribución dentro de las células, se puede apreciar que la distribución de DMT1 es no nuclear.

3.9 Búsqueda de FRET entre de HFE-YFP y DMT1-CFP.

Se determinó la distribución espacial de las proteínas de fusión HFE-YFP y DMT1-CFP, y la posible interacción de ambas proteínas, la que había sido previamente caracterizada mediante inmuno co-precipitación (Arredondo y col, 2001). El experimento se desarrolló mediante una doble transfección de ambos plásmidos, dentro de células Caco-2, y luego de dos días se observó in vivo el posible FRET mediante microscopía confocal. En la Figura 14 se puede apreciar la expresión de ambos plásmidos en las células Caco-2.

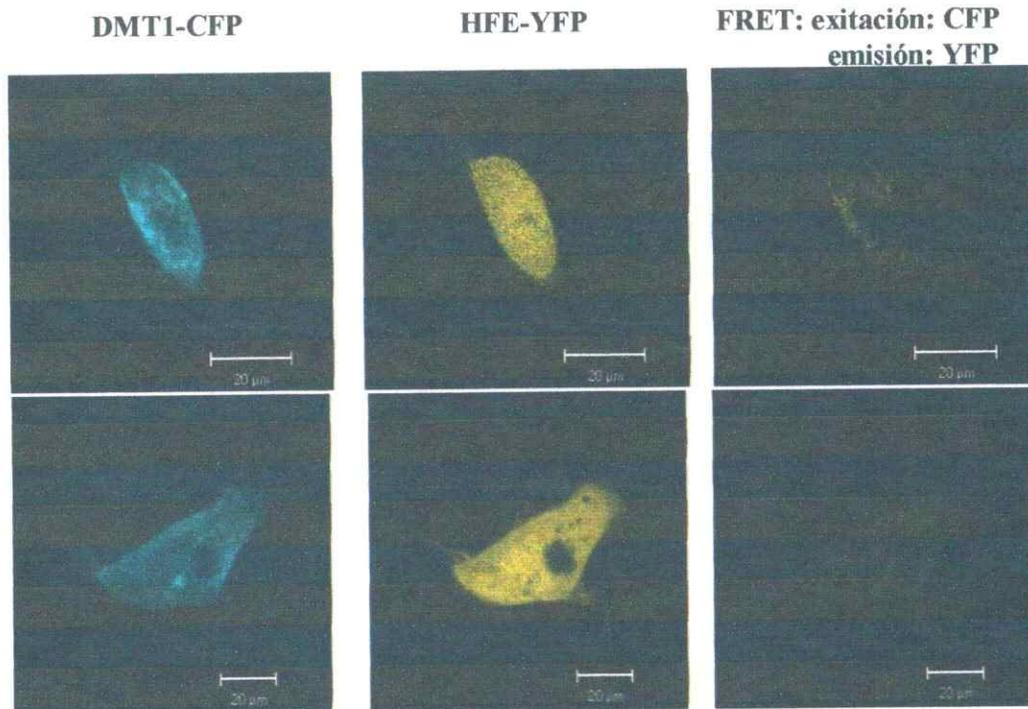


Figura 14. Co-expresión de DMT1-CFP con HFE-YFP. Se transfectaron células Caco-2 con simultáneamente con los vectores pECFP-C1-DMT1 y pEYFP-N1-HFE, las que expresaron las correspondientes proteínas de fusión. Este ensayo fue desarrollado para la determinación de FRET, sin embargo no se detectó un traspaso significativo de energía entre los fluoróforos.

No observamos FRET entre las proteínas. Como control se quemó con el láser el fluoróforo amarillo de HFE-YFP y se determinó la caída de la señal de FRET tras excitar CFP, sin embargo, la señal obtenida resultó no ser significativa.

Se intentó favorecer las condiciones para la determinación de FRET agregando 50 μM de hierro FAS a las células, lo que debería inducir una mayor interacción de HFE con DMT1 concordante con el rol de regulador negativo de DMT1 asignado a HFE. Tampoco bajo estas circunstancias se encontró FRET, sin embargo realizamos la siguiente observación; la fluorescencia de CFP-DMT1 y YFP-HFE en puntos donde se encontraban co-localizadas decaían en forma paralela en el tiempo en presencia de hierro (Figura 15).

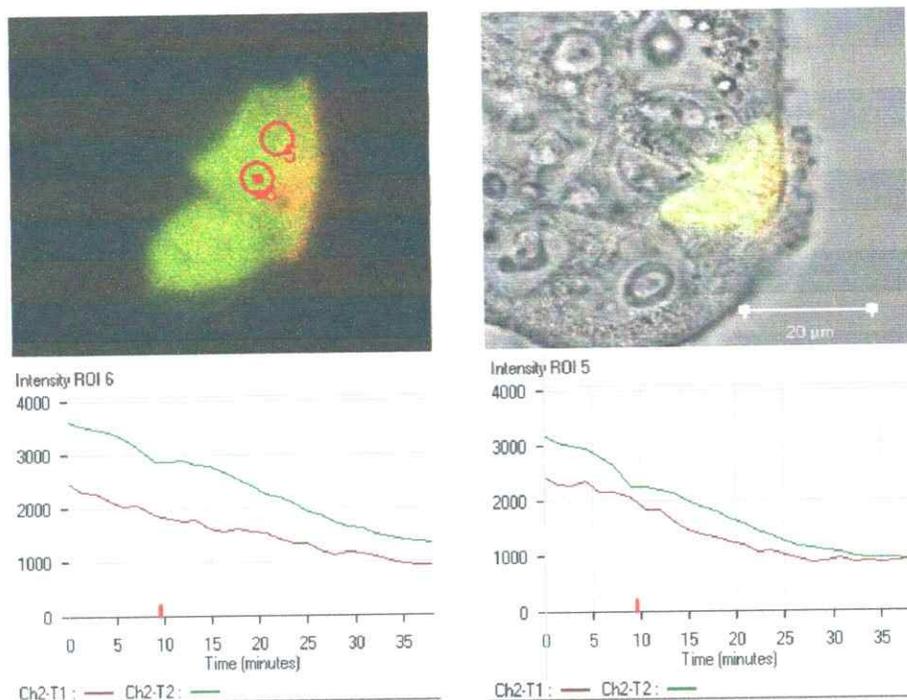


Figura 15. Decaimiento en el tiempo de ambas proteínas de fusión. Se realizó el análisis en el tiempo de regiones de interés ROI 5 y ROI 6 las que mostraron un decaimiento paralelo de ambos fluoróforos. DMT1 curva roja y HFE-YFP curva verde.

Esta observación generó la pregunta de si era posible que DMT1 y HFE estuvieran re-localizándose en forma conjunta siendo la baja en la fluorescencia consecuencia de la salida de estas proteína de fusión del corte óptico que observamos o contrariamente, la disminución en fluorescencia se podía deber al foto-blanqueo de los fluoróforos. Por tanto, se estudio la distribución de DMT1-CFP a lo largo del eje apical-basal en el tiempo tras dar un estímulo con FAS. Lo que nos indico finalmente que había una re-localización de DMT1 tras el estímulo.

3.10 Cambios en distribución de la proteína DMT1 desde apical a basal inducidos por hierro.

Se transfectaron células Caco-2 con el vector pECFP-C1-DMT1, las cuales luego de dos días se analizaron mediante microscopia confocal. Se realizaron galerías desde el extremo basal hacia el apical, con cortes de 1.6 μm , los que cubrieron una altura de sobre los 30.4 μm , y se programó el microscopio para que realizará una galería completa cada 3 minutos aproximadamente. Después de realizada la segunda galería se agregó 50 μM de FAS y se continuó hasta completar 36 ciclos. El análisis de las galerías puede hacerse con dos variables, tiempo y distancia desde la membrana basal. En la Figura 16 se observan los cambios en la distribución de DMT1 en el tiempo.

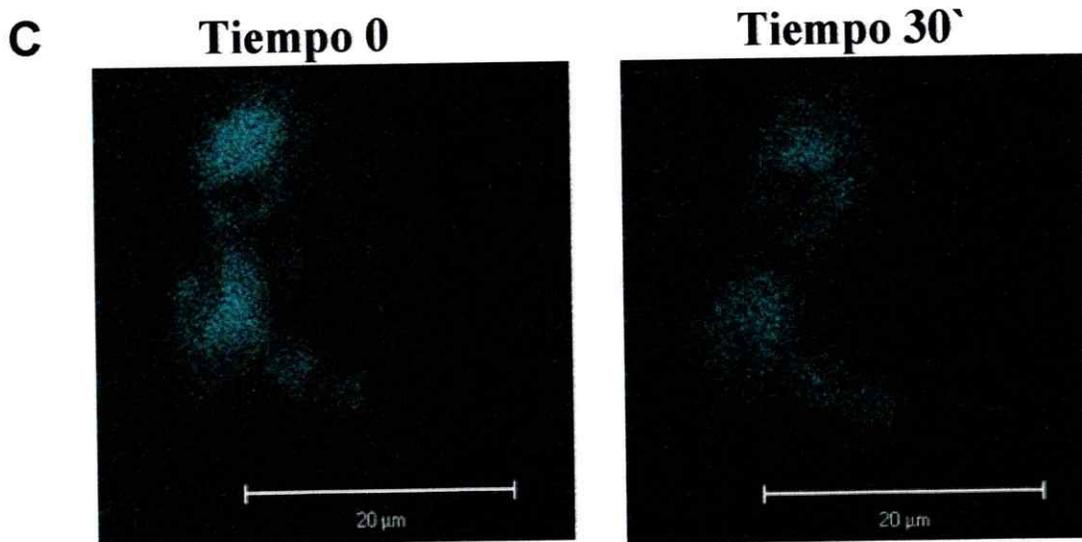
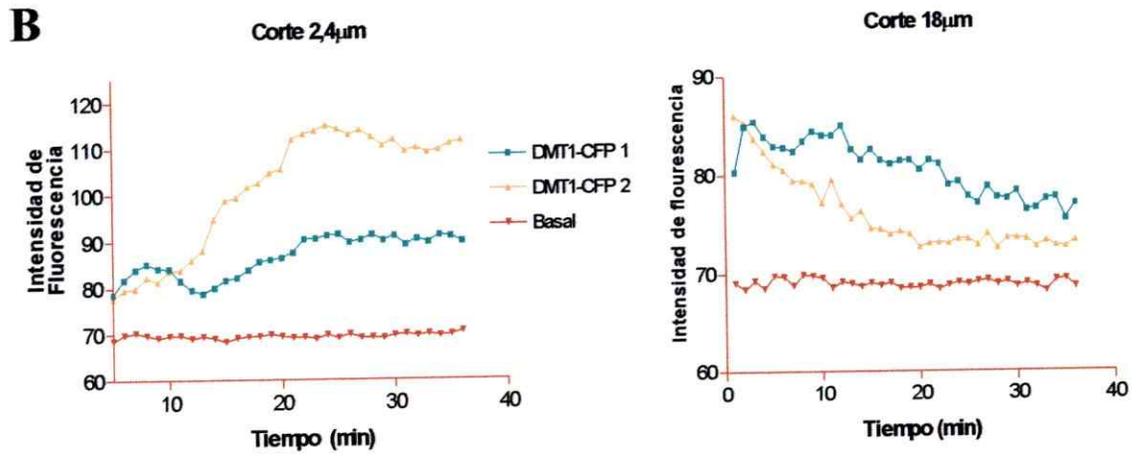
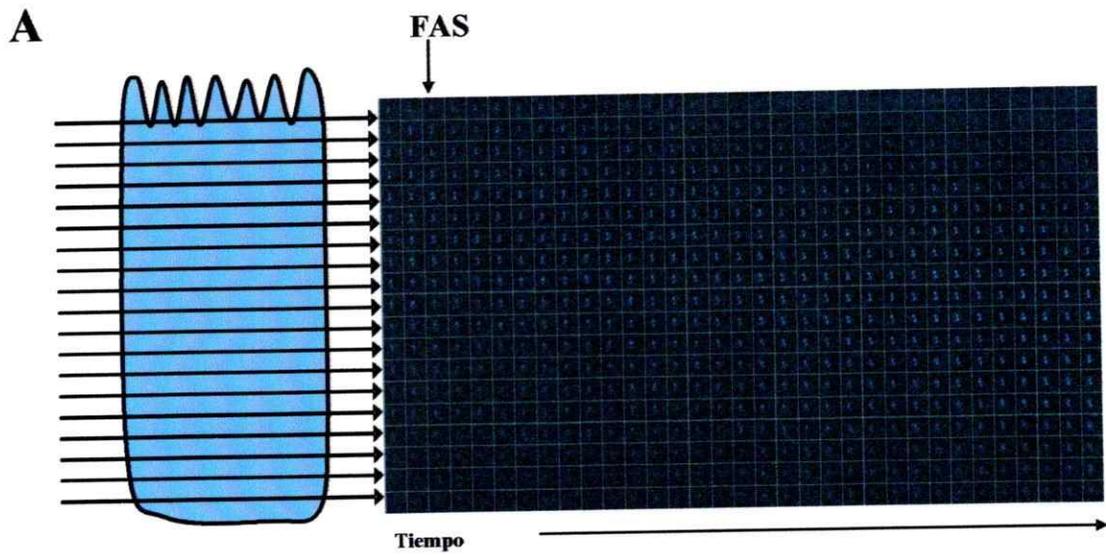


Figura 16. Expresión de DMT1 en el tiempo luego de estimular con FAS 50uM. Células Caco-2 fueron transfectadas con el vector pECFP-C1-DMT1, luego de 2 días fueron montadas in vivo en un microscopio confocal. Luego se realizaron cortes de un ancho de 1,6 μm desde el extremo basal hacia el extremo Apical y se midió en cada corte la expresión de la proteína de fusión en el tiempo. **A)** La galería de imágenes muestra de izquierda a derecha la distribución de fluorescencia en el tiempo, y de arriba a bajo muestra la ocisión del corte realizado como indica el esquema situado al la izquierda de la galería. La flecha sobre el segundo tiempo indica que luego de recoger dos galerías se agrego hierro FAS. Observamos que luego de agregar hierro la distribución cambia desplazando la fluorescencia hacia la membrana basal. **B)** Estos tres gráficos muestran la intensidad de fluorescencia en el tiempo de dos cortes a una distancia de 2,4 μm y 18 μm desde la membrana basal. Donde se incrementa la proteína DMT1-CFP, en el corte mas próximo al basal y no así en los cortes mediales o apicales. **C)** Muestra una fotografía con mayor resolución uno de los recuadros, ubicado a 8.4 μm de la membrana basal a tiempo cero y a tiempo 30 minutos.

Se determinó que DMT1-CFP, es estimulado a distribuirse desde un dominio apical hacia un dominio medial y basal inducido por la presencia de hierro (figura 16 A y B), esto puede ser de gran relevancia dado que una ingesta inicial de hierro, genera una disminución en la absorción intestinal de una segunda ingesta, lo que se conoce como bloqueo mucosal, cuyo mecanismo es desconocido, esta migración de corto plazo del orden de horas podría explicar este tipo de respuestas rápidas a la ingesta. La proteína de fusión se mueve desde compartimientos intracelulares ubicados medialmente en las células así como también desde los cortes mas apicales, lo que nos indica una posible traslocación de membrana apical hacia la zona medial/basal, como lo indica la figura 16B , donde se muestra la intensidad de fluorescencia en el tiempo de dos células, presentando dos cortes ópticos uno basal a 2.4 μm de la membrana basal y uno apical ubicado a 18 μm de la membrana basal. La estandarización del foto blanqueo de las sondas fluorescentes, dio como resultado un error máximo de un 12 % en la ultima

galería, por lo que en experimentos posteriores no se realizaran mediciones sobre una hora, con el fin de trabajar un error cercano al 5 % debido al decaimiento.

Experimentos similares indicaron que HFE también responde a un incremento en la concentración de hierro extracelular re-localizándose hacia la membrana basolateral. Sin embargo, la alta cantidad de HFE en el dominio basal, complicaron la cuantificación. Se encontró que entre un 4% a un 6 % de la proteína HFE-GFP total re-localiza a la membrana basal. Experimentos de biotilación selectiva de la membrana basolateral de nuestro laboratorio, indican que la cantidad de la proteína HFE incrementa en la membrana basal como función de la concentración de hierro en el medio de cultivo, proceso que también es estimulado por la sobreexpresión de HFE (Arredondo y col. 2006). Por esto, decidimos abordar el problema mediante la cuantificación de la co-localización entre ambas proteínas.

3.11 Co-localización de HFE-YFP y DMT1-CFP en la membrana basal cuando las células son estimuladas con Hierro.

Se estudió la posible co-localización de las proteínas de fusión DMT1-CFP y HFE-YFP en la membrana basal, para lo cual se utilizó un programa del microscopio confocal el cual grafica la intensidad de fluorescencia, poniendo en el eje X uno de los fluoróforos y en el eje Y el otro, luego asocia un valor espacial a cada píxel y los distribuye en el grafico de forma que los píxeles que presentan solo fluorescencia de DMT1, se distribuyen en el cuadrante 1, los que solo presentan fluorescencia HFE se localizan en el cuadrante 4, los píxeles de baja intensidad que forman parte de la fluorescencia basal se localizan en el cuadrante 2 y finalmente la co-localización se establece en el cuadrante 3. Con este ordenamiento, la coincidencia de fluorescencia de

alta intensidad a distancias equidistantes en el cuadrante 3 corresponde a co-localización de las sondas. Se analizaron diferencias en la distribución apical-basal de la co-localización de HFE y DMT1, entre células no expuestas a hierro y células expuestas a 50 μ M de hierro FAS, en un corte óptico basolateral (Figura 17). En la Figura 17A se muestra la gráfica correspondiente a la membrana basolateral de células no expuestas a hierro y en la Figura 17B un corte basolateral de células tratadas con hierro. Se observó que la co-localización en basolateral se incrementa cuando las células son estimuladas con hierro.

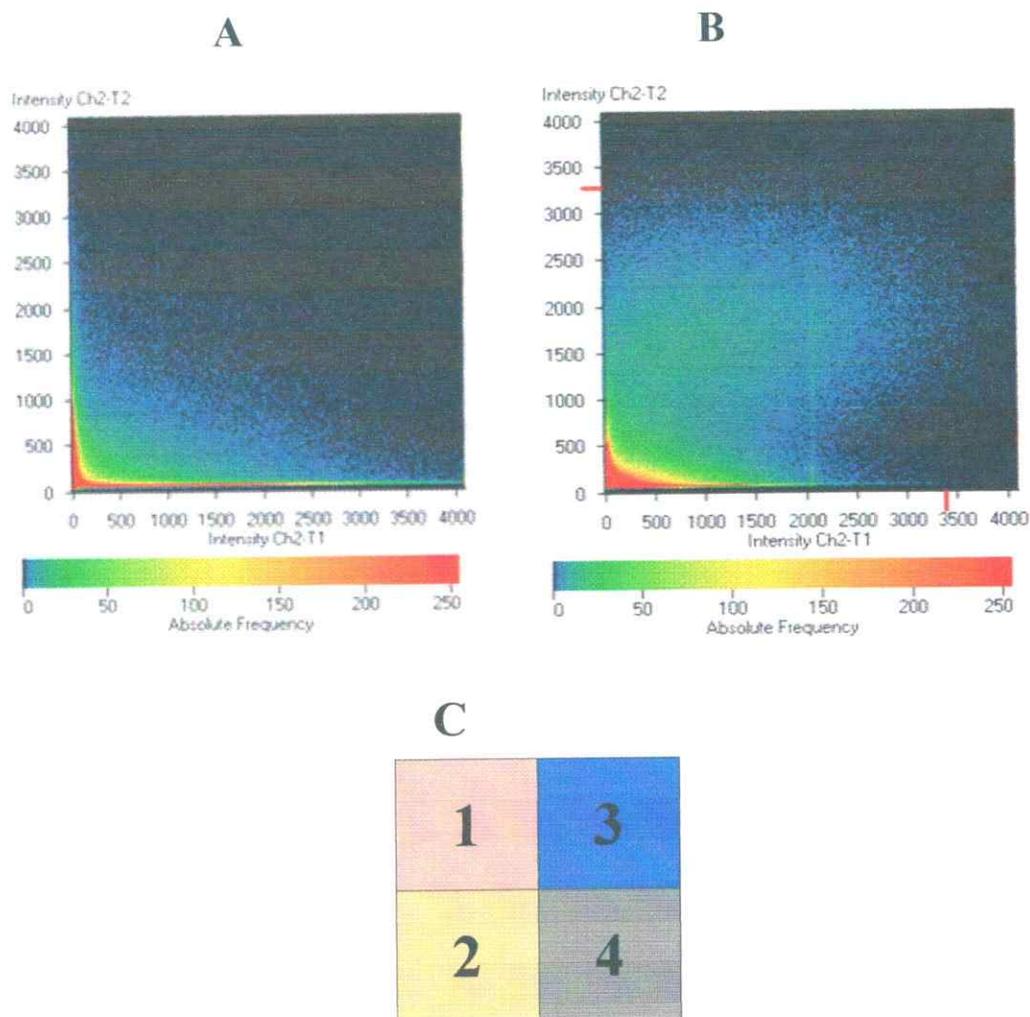


Figura 17. Inducción de la co-localización en la membrana basolateral. Gráficos de intensidad de co-localización de un corte basolateral de 2.4 μm de células Caco-2. **A)** Células no expuestas a Hierro. **B)** Células expuestas a Hierro 50 μM FAS durante 1 hora. **C)** Distribución de píxeles, expresión de HFE cuadrante 1, expresión DMT1 cuadrante 4, fluorescencia basal cuadrante 2, co-localización cuadrante 3.

3.12 Generación de Virus Adeno-asociados recombinantes para HFE, H63D y EGFP.

Con el objetivo de aproximar una posible terapia génica a HH se realizaron construcciones de virus adeno-asociados y se estudió la factibilidad de la transducción en células Caco-2. Con este objetivo se generaron 3 vectores recombinantes en el vector

pAAV: i) pAAV-HFE, ii) pAAV-HFE con la mutación H63D, y iii) pAAV-EGFP. Cada uno de estos fue transfectado junto con los plásmidos pRC y pHelper del sistema AAV helper Free system de Stratagene, en células HEK 293. Observamos que las células transfectadas cambian de morfología en el tiempo de una forma estrellada a una esférica. En la Figura 18 se muestran células 48 horas después de la transfección las cuales presentan ambos fenotipos el estrellado y el esférico.

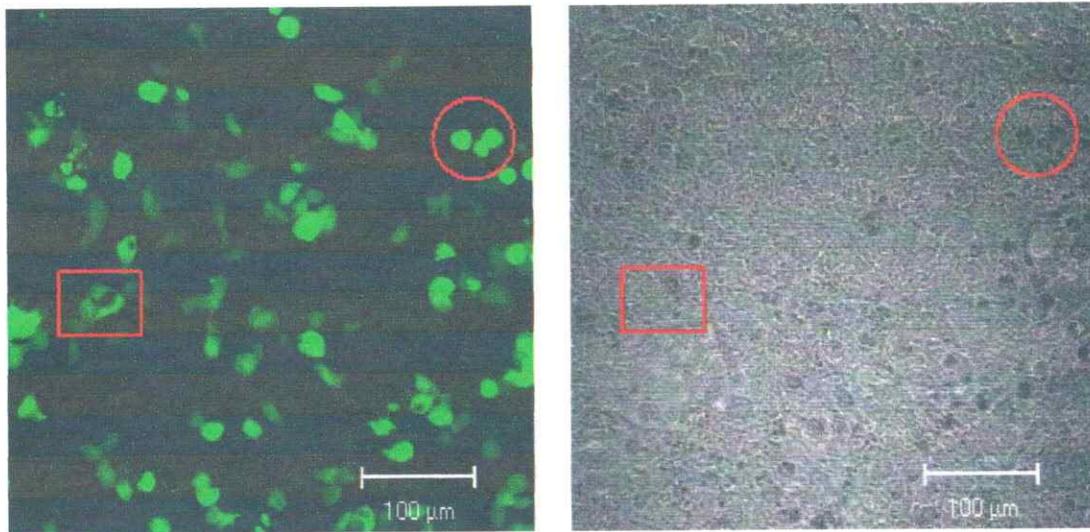
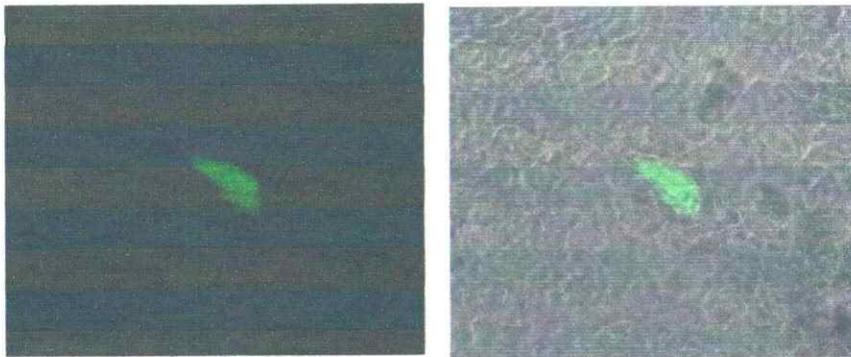


Figura 18. Transfección triple de pAAV-EGFP, pRC y pHelper. Células Hek293, 48 horas después de la transfección, muestran diferentes morfologías, Las células nativas presentan una morfología estrellada, la cual después de la transfección cambia hacia una morfología esférica producto de la acumulación viral intracelular la cual induce desdiferenciación. El cuadrado muestra células estrelladas las cuales indican baja o nula producción viral y el círculo muestra células esféricas indicando producción viral. **A)** Imagen de confocal con excitación y filtros para detección de EGFP. **B)** Imagen de fase del corte A, donde se puede observar el daño sufrido por células con producción viral en su interior.

3.13 Ensayos de transducción viral con el vector AAV-EGFP

Células Caco-2 fueron transducidas con 200 unidades genómicas de virus AAV-EGFP por célula. Análisis mediante microscopia confocal comprobó la transducción de células Caco-2 (Figura 19). Sin embargo, la efectividad de transducción viral se estimó en un 0,1 %. Debido a esta baja tasa de transducción, no se encontraron diferencias significativas en la incorporación de hierro en las células cuando estas fueron transducidas con virus AAV-HFE, o AAV-H63D o AAV-EGFP.

A



B

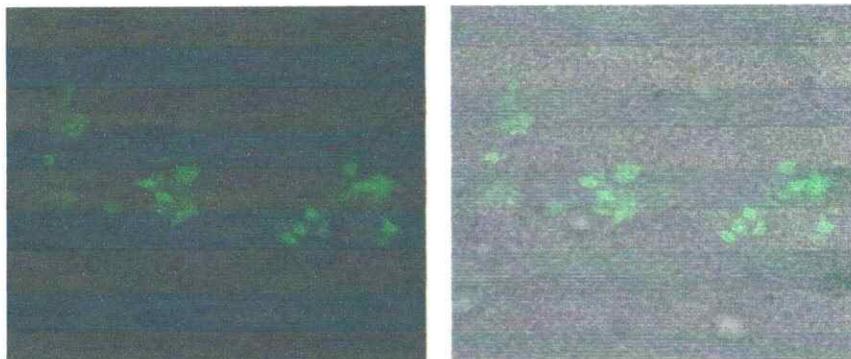


Figura 19. Transducción de células Caco-2 con AAV-EGFP. Las células fueron incubadas 4 horas con agitación, en presencia de 200 unidades genómicas de AAV-EGFP y luego incubadas durante 14 días antes de su análisis mediante microscopia confocal. Los recuadros muestran fotografías de células transducidas con el virus AAV-EGFP, en A) puede apreciar tanto la transducción de células únicas en B) se muestra la generación de colonias generadas por la división celular.

4. DISCUSION

4.1. Disminución de la incorporación de hierro en células que sobre-expresan el dominio alfa-1 de HFE.

El mecanismo por el cual HFE inhibe la incorporación de hierro a través de la membrana apical es aún desconocido. A pesar que se ha reportado que HFE interactúa directamente con RTF1 en la membrana basolateral, esta interacción no da cuenta de la influencia de HFE sobre el transportador apical DMT1, el cual incluso es sobre-expresado en células que sobre-expresan HFE (Arredondo y col. 2001).

Los resultados obtenidos en esta tesis ayudan en la comprensión del problema, al mostrar que el dominio alfa-1 de HFE es suficiente para inhibir la incorporación apical de hierro. Podemos decir entonces que esta actividad inhibitoria de HFE recae en este fragmento.

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio apuntan a que la maquinaria basolateral de incorporación de hierro, basada en el reciclaje endocítico del RTF1 (Gross y col. 1998), ejerce algún tipo de control sobre la incorporación apical. Una de las hipótesis propuestas por nuestro laboratorio es que HFE interactúa con el transportador apical DMT1, induciendo la internalización del transportador y translocándolo a la membrana basolateral. En esta región debiera funcionar en el sentido inverso, es decir sacando hierro desde el espacio extracelular próximo a la membrana basolateral hacia el interior del enterocito. Hemos encontrado que HFE con la mutación H63D no puede alcanzar la membrana apical, y por lo tanto no inducirá la translocación de DMT1 a la membrana basolateral (Arredondo y col. 2006).

Adicionalmente no observamos inhibición de la incorporación de hierro en células Caco-2 en presencia del medio condicionado de las células Caco2-alfa1, por tanto suponemos el efecto de Alfa-1 sobre DMT1 es probablemente a nivel intracelular, asociado a otras proteínas celulares como el RTF1.

4.2. Incorporación de hierro mediante apagamiento de Calceína-AM.

Nuestros resultados indican que la medición de incorporación de hierro utilizando Calceína-AM es de sensibilidad similar al uso de ^{55}Fe , ya que la variación porcentual entre los valores de incorporación de hierro obtenidos por apagamiento de Calceína-AM e incorporación del isótopo radioactivo ^{55}Fe fue solo de 4,5 %.

Con el establecimiento de este sistema se logra evitar el uso de isótopos radiactivos. Así también se incrementa la cantidad de datos obtenidos en cada experimento, ya que cada pocillo de células da lugar a múltiples lecturas en el tiempo y que el lector de microplacas puede leer hasta placas de 96 pocillos. El potencial de la técnica se encuentra todavía inexplorado dado que se pueden hacer otro tipo de determinaciones como velocidad inicial de transporte, salida de hierro de las células y flujo transepitelial, entre otras posibles aplicaciones. La medición de hierro reactivo (LIP) mediante la sonda Calceína-AM se ha utilizado durante años, sin embargo la estandarización de la esta sonda para la medición de la incorporación de hierro, es una propuesta novedosa la cual podría reemplazar el uso de isótopos radioactivos.

En un análisis en profundidad del comportamiento del error asociado a las curvas, determinamos que cuando se utilizan altas concentraciones de Calceína-AM, el error es menor después de agregar SIH. Pensamos que esto se debe a que los pocillos

presentan variación en la cantidad de hierro que son capaces de incorporar dependiendo del grado de diferenciación, días de cultivo, entre otras variables. Por tanto algunos de los posillos tenían una cantidad mayor de hierro que otras, las cuales apagaron inicialmente a la Calceína-AM bajando las curvas constantemente durante el experimento, sin embargo al agregar SIH, esta variación regresa a su nivel de carga de Calceína-AM real, dado que la incorporación Calceína-AM debería ser similar, el error disminuye dando lugar a este tipo de curvas. En las curvas estandarizadas, el error se incrementa durante la incorporación de hierro, esto se debe a que la normalización se realiza con respecto a la fluorescencia inicial de Calceína-AM. La causa de esta variación es que los posillos pueden presentar variación en la incorporación y que esta variación se incrementa en el tiempo, al alejarse de las primeras mediciones con las cuales se realizó la normalización.

4.3 Interacción entre DMT1 y HFE y ensayos de FRET

Resultados previos de nuestro laboratorio han mostrado interacción entre HFE y DMT1 mediante ensayos de co-inmunoprecipitación. Si bien los ensayos de FRET aquí presentados fueron negativos en indicar una interacción entre HFE y DMT1, estos no son en lo absoluto determinantes, dado que se requiere de condiciones espaciales estrictas para que ocurra FRET entre los dos fluoróforos. Aparentemente estas condiciones no se cumplieron en el caso de HFE-YFP y DMT1-CFP. La distancia entre las proteínas (entre 10-100 Å) es una de las condiciones limitantes, la que puede verse afectada por múltiples factores: i) las proteínas de fusión HFE-YFP y DMT1-CFP interactúan, pero las sondas fluorescentes no están a una distancia adecuada para realizar

FRET, y ii) ambas proteínas forman parte de un sistema de regulación de mayor complejidad donde participan otras proteínas como podría ser el RTF1, Tf, β 2M y posiblemente otros componentes de la maquinaria de destinación de tráfico vesicular, entre otros.

Las proteínas de fusión generadas se utilizaron para caracterizar la co-localización entre HFE y DMT1 y la localización sub-celular de estas. Observamos que DMT1 presenta una migración apical a medial-basal cuando se aumentó el hierro en el medio apical.

Asociando estos resultados al efecto ejercido por HFE/Alfa-1 surgen dos hipótesis para explicar la inhibición sobre la incorporación apical de hierro. La primera es que tanto HFE como Alfa-1 son capaces de realizar un secuestro a nivel endosomal de DMT1. Esta hipótesis se sustenta en el reporte de que DMT1 lleva a cabo un proceso endocítico y que HFE y DMT1 co-localizan en compartimentos endosomales (Tabuchi y col 2002). El compartimiento en que DMT1 y HFE podrían interactuar es el endosoma común de células epiteliales (Mostov y col. 2000), endosoma donde coinciden ligandos y receptores internalizados desde la membrana apical y la membrana basolateral (Figura 20A) La segunda Hipótesis es que HFE es capaz de secuestrar a DMT1 y redirigirlo a la membrana basolateral, lo que sería aún más efectivo en disminuir la incorporación de hierro a través del intestino, ya que DMT1 podría internalizar hierro desde el espacio basolateral pericelular hacia el interior del enterocito (Figura 20B).

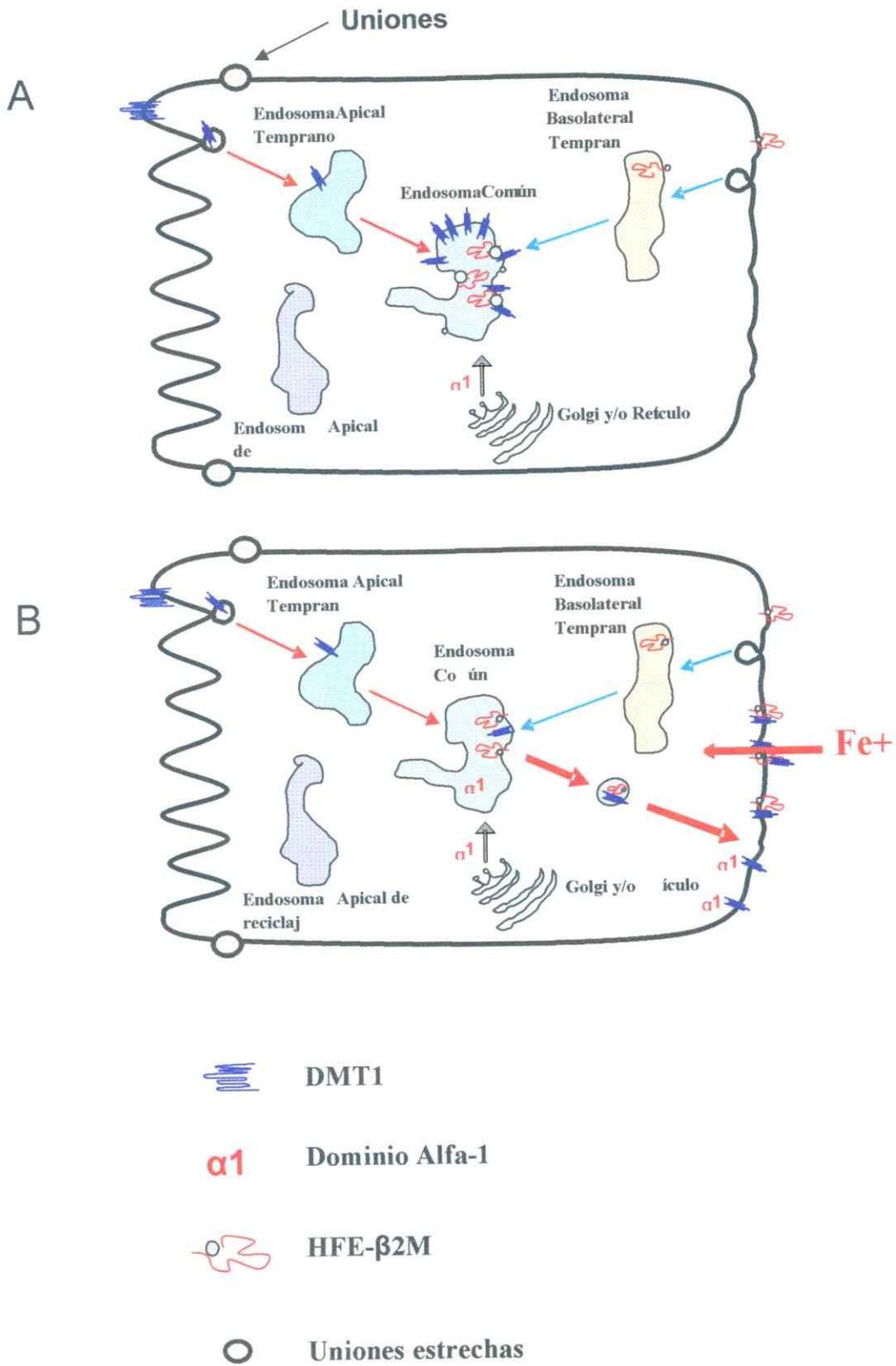


Figura 20. Modelos de la acción de HFE sobre el transportador apical de hierro DMT1. **A)** Modelo de secuestro endosomal de DMT1 mediado por HFE. Este modelo presenta la posibilidad de que tanto HFE como el dominio Alfa-1 sean capaces de secuestrar a DMT1 en el endosoma común, desplazándolo de la membrana apical donde ejerce su efecto. HFE alcanzaría el endosoma común unido a RTf1. **B)** Modelo de translocación basolateral. Este modelo plantea la posibilidad de que DMT1, interactuando con HFE, sea translocado hacia la membrana basolateral por un proceso mediado por el reciclaje de HFE-RTf1. En la membrana basolateral DMT1 podría transportar hierro desde el espacio pericelular hacia el enterocito.

4.4 Proyección hacia una terapia génica contra la HH.

La hemocromatosis hereditaria genera un incremento en la incorporación y acumulación de hierro en el organismo. Nuestro objetivo fue plantear una alternativa a la flebotomía, mediante el uso de la terapia génica, la cual apunta a generar una mejor calidad de vida en los enfermos. Propusimos un procedimiento para disminuir la carga de hierro mediante el bloqueo del sistema de absorción de hierro por HFE, restableciendo de esta forma el control negativo natural de la absorción intestinal de hierro.

Durante el desarrollo de este trabajo se construyeron los vectores para ser utilizados en el desarrollo futuro de esta investigación: i) el gen terapéutico pAAV-HFE nativo, ii) el control negativo del efecto pAAV-H63D, y iii) el control de transducción viral pAAV-EGFP. Se logró demostrar que estos virus son capaces de transducir el sistema modelo de células Caco-2. Sin embargo, durante el transcurso de esta tesis no se logró optimizar el sistema, dado que la cantidad de células transducidas fue siempre demasiado bajo alrededor de un 0.1 % de las células. Este problema podría ser superado enviando los plasmidos a compañías biotecnológicas especializadas en la producción de este tipo de virus, quienes logran altos títulos virales con los cuales podrían realizarse ensayos en ratas, las que han demostrado ser eficientemente receptivas para estos vectores.

Similarmente, en un trabajo en colaboración (Ezquer y col. 2005) logramos transducir con mayor eficiencia células Caco-2 con AAV que expresa antisentidos de RNA contra DMT1.

Por otra parte, la transducción en tejido de epitelio intestinal en ratones indica que los AAV pueden transducir las células madres de las criptas intestinales (During et al., 1998) en donde se logró la expresión de Lac Z durante 6 meses después de la transducción, siendo que las células del intestino tienen un tiempo de recambio de tres días. La Figura 21 muestra un esquema de los virus AAV-HFE alcanzando las criptas de las vellosidades intestinales las que luego de ser transducidas podrían sobre-expresar la proteína en grandes áreas de la superficie intestinal.

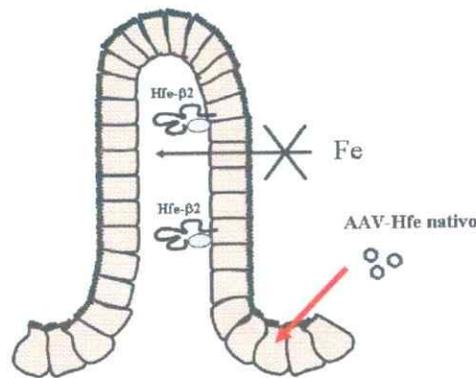


Figura 21. Proyección hacia una estrategia terapéutica contra la Hemocromatosis Hereditaria. Transducción de AAV-HFE Los virus AAV-HFE podrían transducir las células de la cripta generando la amplificación necesaria para una inhibición eficiente de la absorción intestinal de hierro.

Estos antecedentes indican que no obstante la baja eficiencia de transducción, esta estrategia de terapia génica se proyecta como una alternativa lógica de reemplazo génico, no invasiva y fuertemente respaldada por datos experimentales obtenidos y confirmados en este trabajo.

6. CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de esta investigación se establecieron tres resultados relevantes que abren nuevos campos para la investigación en torno a la homeostasis de hierro: 1) El dominio alfa-1 de la proteína HFE es suficiente para explicar la disminución de la incorporación apical de hierro; 2) Tanto DMT1 como HFE responden en cortos períodos de tiempo a la concentración de hierro, cambiando su distribución desde el polo apical hacia el polo basal, y 3) Las células Caco-2 son capaces de ser transducidas con AAV.

Es de gran interés que el fragmento Alfa-1 de la proteína HFE inhiba *per se* la incorporación apical de hierro, dado que mutaciones en este fragmento generan HH. Con estos resultados se acota el efecto inhibitor a este fragmento de HFE, por tanto los dominios Alfa 2 y Alfa 3 podrían estar más bien involucrados en la regulación, tanto de las posibles interacciones como de la distribución de HFE en la célula. El paso siguiente es determinar, por mutaciones sitio-dirigidas, los residuos aminoacídicos responsables de esta interacción.

El descubrimiento que tanto HFE como DMT1 realizan un tráfico apical a basal como respuesta a un incremento de hierro en el medio, permitió la generación de un modelo para el efecto inhibitorio de la incorporación apical de hierro ejercido por HFE/Alfa-1.

El mecanismo aquí propuesto de relocalización del transportador DMT1 puede explicar el fenómeno de bloqueo mucosal, el cual es del orden de horas. Esto correlaciona con nuestra observación de la redistribución de DMT1 por tanto

proponemos que el bloqueo mucosal sería producido por un cambio en la distribución de DMT1 mediado por HFE.

En términos de una aproximación de terapia génica para la HH, en esta tesis se logró la transducción de células Caco-2 con AAV-HFE y AAV-H63D, sin embargo el porcentaje de células transducidas fue extremadamente bajo. Queda por lo tanto para un futuro desarrollo la obtención de niveles de transducción lo suficientemente altos como para inhibir efectivamente la incorporación apical de hierro.

Finalmente, combinando los resultados obtenidos en este trabajo con resultados de biotinylation selectiva de membranas desarrollados en nuestro laboratorio que muestran que la sobre-expresión de HFE tiene como consecuencia una mayor distribución de DMT1 en la membrana basolateral, proponemos que posiblemente DMT1 presente en la membrana apical endocita al endomoma común, alcanzando posteriormente la membrana basolateral mediante la interacción con el complejo HFE-RTf1.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abboud, S. and Haile, D.J. 2000. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *JBC* 275(26):19906-19912.
- Aisen, P. and Brown.E. 1980. Structure and Function of transferrin. *Progress in Hematology*. 8:25-58.
- Alvarez-Hernandez, X., Nichols, G.M., and Glass J, 1991. Caco-2 cell line: a system for studying iron transport across epithelial cell monolayers. *Biochim Biophys Acta* 1070:205-208.
- Arredondo, M., Orellana, a., Gárate ,M., and Nuñez M. 1997. Intracellular iron regulates iron Absortion and IRP activity in intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Am. J. Physiol.* 273: G275-G280.
- Arredondo, M., Tapia, V., Rojas, A., Aguirre, P., Marzolo, M.P. and Nuñez MT 2006. Apical distribution of HFE-β2 microglobulin is associated with inhibition of apical iron uptake in intestinal epithelia cells. *Biometals en prensa*.
- Arredondo, M., Muñoz, P., Mura, C. and Nuñez M.T. 2001. HFE is a negative modulator of apical iron uptake by intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Faseb J.* 15:1276-1278.
- Auricchio, A., Hildinger, M., O'Connor, E., Gao, G. and Wilson, J.M. 2001. Isolation of Highly Infectious and Pure Adeno-Associated Virus tipe 2 Vectors with a Single-Step Gravity-Flow Column. *Human Gene Therapy* 12:71-76.
- Bals, R., Xiao, W., Sang, N., Weiner, D.J., Meegalla, R. and Wilson, J.M. 1999. Transduction of Well-Differentiated Airway Epithelium by Recombinant Adeno-Associated Virus Is Limited by Vector Entry. *J Virol* 73(7)6085-6088.
- Bennett, M., Lebron, J., Bjorkman, P.(2000) Crystal structure of the hereditary hemochromatosis protein HFE complexed with transferring receptor. *Nature*. 403: 46-53.
- Canonne-Hergaux, F., Gruenheid, S., Ponka, P. and Gros P. 1999. Cellular and Subcellular Localization of the Nramp2 Iron Transporter in the Intestinal Brush Border and Regulation by Dietary Iron. *Blood*, 93(12): 4406-4417.
- Corsi, B., Levi, S., Cozzi, A., Corti, A., Altimare, D., Albertini, A., And Arosio, P. (1999) Overexpression the Hereditary Hemochromatosis protein, HFE, in HELA cells induces an Iron deficient phenotype. *FEBS lett* 22:149-152.

- During, M.J., Xu, R., Young, D., Kaplitt, M.G., Sherwin, R.S. and Leone, P. 1998. Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector. *Nature Medicine* 4(10):1131-1136.
- Edwards, M.R. 1998. From a soup or a seed? Pyritic metabolic complexes in the origin of life, *TREE* 13(5):78-181.
- Eisenstein, R. (2000) Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian Fe metabolism. *Annu Rev Nutr.* 20:627-662.
- Epsztejn, S., Kakholon, O., Glickstein, H., Brever, W. and Cabantchik. J. 1997. Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. *Anal Biochem* 248(1):31-40
- Ezquer, F., Nuñez, M.T., Israel, Y. 2005. Antisense gene delivered by and adenoassociated virus vector inhibits iron uptake in human intestinal cells: Potential application in Hemochromatosis. *Biochem Pharmacol.* 69(11):1599-1606.
- Feder, J.N, Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy D.A., Basava, A., Dormishian, F., Domingo, R., Jr, Ellis, M.C., Fullan, A., Hinton, L.M., Jones, N.L., Kimmel, B.E., Kronmal, G.S., Lauer, P., Lee, V.K., Loeb, D.B., Mapa, F.A., McClelland, E., Meyer, N.C., Mintier, G.A., Moeller, N., Moore. T., Morikang, E., Prass, C.E., Quintana, L., Star S.M., Schatzman, R.C., Brunke, K.J., Drayna, D.T., Risch, N.J., Bacon, B.R., Wolff, R.K. 1996. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 13(4):399-408.
- Feder, J., Tsuchihashi, Z., Irrinki, A., Lee, V., and Mapa, F. 1997. The Hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts β 2-microglobulina interaction and cell surface expression. *JCB* 272(22): 14025-14028.
- Fleming, R.E. and Sly, W.S. 2002. Mechanisms of iron accumulation in hereditary hemochromatosis *Annual. Rev. Physiol* 64:663-680.
- Flowers, G.N. and Cook, J.D. 1996. The Caco-2 cell system can be used as a model to study food iron availability. *J nutr.* 126:251-258.
- Frazer, D.M., Wilkins, S.J., Becker, E.M., Murphy, T.L., Vulpe, C.D., McKie, A.T., Anderson, G.J. 2003 A rapid decrease in the expression of DMT1 and Dcytb but not Ireg1 or hephaestin explains the mucosal block phenomenon of iron absorption *Gut* 52:340-346.

- Garrick, M.D., Dolan, K.G., Horbinski, C., Ghio, A.J., Higgins, D., Porubcin, M., Moore, E.G., Hainsworth, L.N., Umbreit, J.N., Conrad, M.E., Feng, L., Lis, A., Roth, J.A., Singleton, S., Garrick, L.M. 2003. DMT1: a mammalian transporter for multiple metals. *Biometals*. 16(1):41-54.
- Giannetti, A.M. and Bjorkman, P.J. 2004. HFE and Transferrin Directly Compete for Transferrin Receptor in Solution and at the Cell Surface. *JBC* 279(24):25866–25875.
- Gross, C.N., Irrinki, A., Feder, J.N. and Enns, C.A. 1998. Co-trafficking of HFE, a Nonclassical Major Histocompatibility Complex Class I Protein, with the Transferrin Receptor Implies a Role in Intracellular Iron Regulation. *JBC* Vol. 273 (34):22068–22074.
- Gunn, I.R., Maxwell, F.K., Gaffney, D., McMahon, A.D. and Packard, C.J. 2004. Haemochromatosis gene mutations and risk of coronary heart disease: a west of Scotland prevention study (WOSCOPS) substudy. *Heart* 90:304-306.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L. and Hediger, M.A. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter, *Nature* 388(31):482-487.
- Guo, B., Brown, F., Phillips, J., Yu, Y. and Leibold, E. (1995) Iron Regulates cytoplasmic levels of a novel iron-responsive element binding protein without aconitase activity. *JBC*. 270:16529-16535.
- Haile, D., Hentze, M., Rouault, T., Harford, M. and Klausner, R. (1989) Regulation of interaction of the iron responsive element binding protein with iron responsive RNA element *Mol cell Biol* 9:5055-5061.
- Han, O., Fleet, J.C. and Richard, J. 1999. Wood Reciprocal Regulation of HFE and Nramp2 Gene Expression by Iron in Human Intestinal Cells. *J. Nutr.* 129:98–104.
- Hubert, N. and Hentze, M.W., 2002. Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: Implications for regulation and cellular function. *PNAS* 99(19):12345–12350.
- Iwai, K., Klausner, R.D., and Rouault, T.A. 1995. Requirement for iron regulated degradation of the RNA binding protein Iron regulatory protein 2. *EMBO J* 14(21):5350-5357.
- Kakhlon, O. and Cabantchik, Z.I. 2002. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radical Biology and Medicine* 33(8):1037-1046.

- Kikuchi, G., Yoshida, T. and Noguchi, M. 2005. Hemeoxygenase and Heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 338(1):558-567.
- Knopfel, M. and Solioz, M. 2002. Characterization of a cytochrome b (558) ferric/cupric reductase from rabbit duodenal brush border membranes. *Biochem Biophys Res Commun*. 291:220-225.
- Lajtha, L.G. and Suit, H.D. 1955. Uptake of radioactive Iron (⁵⁹Fe) by Nucleated red cells in vitro *Br J Haematol* 1(1):55-61
- Lam, S., Tseung, Y., Touret, N., Grinstein, S. and Gros, P.(2005) Carboxyl-Terminus Determinants of the Iron Transporter DMT1/SLC11A2 Isoform II (-IRE/1B) Mediate Internalization from the Plasma Membrane into Recycling Endosomes. *Biochemistry* 44:12149-12159.
- Lebron, J.A., Bennett, M.J., Vaughn, D.E., Chirino, A.J., Snow, P.M., Mintier, G.A., Feder, J.N., Bjorkman, P.J. 1998. Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell*. 3;93(1):111-23.
- Lebron, J.A., West, A. and Bjorkman, P. 1999. The hemochromatosis protein HFE competes with transferrin for binding to the transferrin receptor. *J Mol Biol* 294: 239-245.
- Lee, P.L., Gelbart, T., West, C., Halloran, C., Beutler, E. 1998. The human Nramp2 gene: characterization of the gene structure, alternative splicing, promoter region and polymorphisms. *Blood Cells Mol Dis*. 24:199-215.
- Lucotte, G. 1998. Celtic origin of the C282Y mutation of hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis* 24(4):433-438.
- Martini, L., Tchack, L. and Wood R.J. 2002. Iron Treatment Downregulates DMT1 and IREG1 mRNA Expression in Caco-2 Cells. *J. Nutr.* 132:693-696.
- McCord, J.M. 2004. Iron, Free Radicals, and Oxidative Injury. *J.Nutr.* 134:3171S-3172S.
- McKie, A.T., Barrow, D., Latunde-Dada, G.O., Rolfs, A., Sager, G., Mudaly, E., Mudaly, M., Richardson, C., Barlow, D., Bomford, A., Peters, T.J., Raja, K.B., SShirali, S., Hediger, M.A., Farzaneh, F., Simpson, R.J. 2001. An Iron-Regulated Ferric Reductase Associated with the Absorption of Dietary Iron. *Science* 291(2):1755-1759.

- Mostov, K.E., Verges, M., and Altschuler, Y. 2000. Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Current Opinion in Cell Biology* 12: 483-490.
- Mountain, A. (2000) Gene therapy: the first decade *Tintech.* 18:119-128.
- Munro, H.M. 1990. Iron regulation of ferritin gene expression. *JBC* 44(2):107-115
- Nuñez, M.T., Alvarez, X., Smith, M., Tapia, V, And Glass J. 1994. Role of redox systems on Fe⁺³ uptake by transformed human intestinal epithelia (Caco-2) Cells. *Am J Physiol.* 267(32):C1582-C1588.
- Nuñez, M.T., Osorio, A., Tapia, V., Vergara, A. and Mura, C. 2001a. Iron-Induced Oxidative stress Up-Regulates Calreticulin Levels in Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells, *JCB* 82:660-665.
- Nuñez, M.T., Tapia, V. and Arredondo, M. 1996. Intestinal epithelia(Caco-2) cells acquire iron through the basolateral endocytosis of transferrin *J nutr* 126:2151-2158.
- Nuñez, M.T., Tapia, V., Toyokuni, S., and Okada, S. 2001b. Iron-Induced Oxidative Damage in Colon Carcinoma(Caco-2) cells. *Free Rad Res.* 34:57-68.
- Peterson, M., Berment, W., Mooseker, M. 1993. An in vitro model for the analysis of intestinal brush border assembly. Changes in the expression and localization of brush border proteins during cell contact- induces brush border assembly in Caco-2 cells. *J gastroenterology.* 102:802-809.
- Pointon, D.J. Weatherall and J Rochette K J H Robson, A T Merryweather-Clarke, E Cadet, V Viprakasit, M G Zaahl, J J. 2004. haemochromatosis: a transition state Recent advances in understanding. *J. Med. Genet.*41:721-730.
- Qiao, C., Wang, B., Zhu, X., Li, Juan. and Xiao X. (2002). A Novel Gene Expression Control System and Its Use in Stable, High-Titer 293 Cell-Based Adeno-Associated Virus Packaging Cell Lines. *Journal of Virology* 76(24):13015-13027.
- Ramalingam, T.S., West, A.P., Lebron, J.A., Nangiana, J.S., Hogan, T.H., Enns, C.A and Bjorman, P.J. 2000. Binding of transferrin receptor is required for endocytosis of HFE and regulation of iron homeostasis. *Nature Cell Biol.*2:953-957.

- Rohrich, P.S., Fazilleau, N., Ginhoux, F., Firata, H., Michel F, Cocheta, M., Lahamh, N., Rothi, M.P., Pascolo, S., Nato, F., Coppini, H., Charneau, P., Danos, O., Acuto, O., Ehrlich, R., Kanellopoulos, J. and Lemonnier, F A. 2005. Direct recognition by cytolytic T cells of Hfe, a MHC class Ib molecule without antigen-presenting function. PNAS 102(36):12855–12860.
- Rouault, T., Haile, D., Downey, W., Philpott, C., Tang, C. and Samaniego, F. 1992. An Iron-Sulfur cluster plays a novel regulatory role in the iron responsive element binding protein Biometals 5:131-140.
- Rouault, T., Hentze, M, Haile, D., Harford, J. and Klausner, R.(1989) Binding of a cytosolic protein to the iron-responsive element of human ferritin messenger RNA Science 241:1207-1210.
- Roy, CN., Penny, DM., Feder, JN. and Enns, CA. (1999) The Hereditary Hemochromatosis Protein, HFE, Specifically Regulates Transferrin-mediated Iron Uptake in HeLa Cells, JBC 274(13):9022–9028.
- Ruddy, DA., Kronmal, GS., Lee, VK., Mintier, GA., Quintana, L., Domingo, R., Meyer, NC., Irrinki, A., McClelland, EE., Fullan, A., Mapa, FA., Moore, T., Thomas, W., Loeb, DB., Cyrus H, Tsuchihashi, Z., Wolff, RK., Schatzman, RC., and Feder, JN.,(1997)A 1.1-Mb Transcript Map of the Hereditary Hemochromatosis Locus Genome Research 7:441–456.
- Shaheen, N.J., Silverman, L.M., Keku, T., Lawrence, L.B., Rohlf, E.M., Martin, C., Galanko, J., Sandler R. 2003. Association Between Hemochromatosis (HFE) Gene Mutation Carrier Status and the Risk of Colon Cancer. Journal of the National Cancer Institute 95(2):154-159.
- Stratagene 2002.AAV Helper-Free System. Instruction manual. www.stratagene.com
- Summerford, C. and Samulski, RJ. (1998)Membrane-Associated Heparan Sulfate Proteoglycan Is a Receptor for Adeno-Associated Virus Type 2 Virions J virol 72(2):1438–1445.
- Tabuchi, M., Yoshimori, T., Yamaguchi, K., Yoshidai, T. and Kishi, F. (2000) Human NRAMP2/DMT1, Which Mediates Iron Transport across Endosomal Membranes, Is Localized to Late Endosomes and Lysosomes in HEp-2 Cells, JBC 275(29):22220–22228.
- Tabuchi, M., Tanaka, N., Nishida-Kitayama, J., Ohno, H, and Kishi, F. 2002. Alternative Splicing Regulates the Subcellular Localization of Divalent Metal Transporter 1 Isoforms. Molecular Biology of the Cell 13:4371–4387.

- Tallkvist, J., Bowlus, C.L. and Lönnerdal, B. 2000. Functional and molecular responses of human intestinal Caco-2 cells to iron treatment. *Am J Clin Nutr* 72:770–775.
- Thomas, C., Oates, P.S. 2004. Ferroportin/IREG-1/MTP-1/SLC40A1 modulates the uptake of iron at the apical membrane of enterocytes *Gut* 53:44–49.
- Topham, R., Eads, C. and Butler, B. (1992) Alteration in the mucosal processing of iron in response to very-short term dietary iron depletion and replication. *Biochem J* 284:877-884.
- Touret, N., Furuya, W., Forbes, J., Gros, P. and Grinstein, S. 2003. Dynamic Traffic through the Recycling Compartment Couples the Metal Transporter Nramp2 (DMT1) with the Transferrin Receptor, *JBC* 278(28):25548–25557.
- Trinder, D., Fox, C., Vautier, G., Olynyk J K. (2002) Molecular pathogenesis of iron overload. *Gut* 51:290–295.
- Truong, K. and Ikura, M. 2001. The use of FRET imaging microscopy to detect protein–protein interactions and protein conformational changes in vivo. *Structural Biology* 11:573–578.
- Wächtershauser, G, 1988. Before enzymes and templates theory of surface metabolism, *Microbiol, Rev* 52:452-484.
- Waheed, A., Parkkila, S., Zhou, X., Tomatsu, S., and Feder, J. 1997. Hereditary hemochromatosis : effects of C282Y and H63D mutations on association with β 2-microglobulina, intracellular processing, and surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. *PNAS* 96:1579-1584.
- West, AP., Giannetti, AM., Herr, AB., Bennett, MJ., Nangiana JS., Pierce, JR. Weiner, LP., Snow, PM. and Bjorkman, PJ. (2001) Mutational Analysis of the Transferrin Receptor Reveals Overlapping HFE and Transferrin Binding Sites. *J. Mol. Biol.* 313:385-397.
- Wilson, MC., Meredith, D., and Halestrap, A.P. 2002. Fluorescence Resonance Energy Transfer Studies on the Interaction between the Lactate Transporter MCT1 and CD147 Provide Information on the Topology and Stoichiometry of the Complex in Situ. *JBC* 277(5): 3666–3672.
- Wohlk, N., Zapata, R., Acuña, M, Reyes H, Navarro, A., Roa, I., Roa, J.C. 2003 HFE Gene Mutations in Chile *Annals of Internal Medicine* 139(8):708-709.

- Yang F, Wang X, Haile DJ, Piantadosi CA, Ghio AJ. 2002. Iron increases expression of iron-export protein MTP1 in lung cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 283: L932-L939.
- Yeh, KY., Yeh, M., Watkins, J.A., Rodriguez-Paris, J. and Glass, J. 2000. Dietary iron induces rapid changes in rat intestinal divalent metal transporter expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G1070–G1079.
- Yuxiang M.A, Specian, R.D., Yeh, K.Y., Yeh, M., Rodriguez-Paris, J., and Glass, J. 2002. The transcytosis of divalent metal transporter 1 and apo-transferrin during iron uptake in intestinal epithelium *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283:G965–G974.
- Zhou, X.Y., Tomatsu, S., Fleming, R.E., Parkkila, S., Waheed, A., Jiang, ., Fei, Y., Brunt, E.M., Ruddy, D.A., Prass, C.E., Schatzman, R.C., O'neill, R., britton, RS., Bacon, B.R. and Sly. WS. 1998. HFE gene knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis. *PNAS* 95:2492–2497.